

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

TESIS DOCTORAL



**MECANISMOS MOLECULARES EMPLEADOS POR LA
QUIMIOQUINA CXCL12 PARA REGULAR
SIMULTÁNEAMENTE LA QUIMIOTAXIS Y LA
SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS
MADURAS.**

Cristina Delgado Martín

Madrid, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

TESIS DOCTORAL

**MECANISMOS MOLECULARES EMPLEADOS POR LA
QUIMIOQUINA CXCL12 PARA REGULAR
SIMULTÁNEAMENTE LA QUIMIOTAXIS Y LA
SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS
MADURAS.**

Este trabajo ha sido realizado por **Cristina Delgado Martín**, para optar al grado de Doctor, en el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), bajo la dirección del **Dr. José Luis Rodríguez Fernández**.



A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Bueno, parece que es cierto eso que dicen de que todo llega, ¡hasta este momento, que a ratos ha parecido inalcanzable! Un libro, ni más ni menos! Una historia, con su introducción, nudo...y el desenlace que, como es habitual en estos casos, es un “TO BE CONTINUED”. Un libro del que soy co-autora junto con un montón de gente que ha contribuido, en mayor o menor medida, a su desarrollo.

El primer culpable es mi primo Carlos, un gran científico que se encargó de meterme el gusanillo de la investigación en el cuerpo cuando aún no tenía muy claro que iba a hacer con mi vida. A pesar de ello no tengo nada de que culparte: siempre fuiste franco al hablarme de las alegrías, sacrificios y dificultades que conlleva esta profesión. En este oficio eres un espejo en el que mirarse, muchas gracias por todo.

Después me encontré a Jose Luis, un hombre tan apasionado por su trabajo y con tanta habilidad para contagiarte ese entusiasmo que uno no podía por menos que enamorarse perdidamente de las células dendríticas en el instante en que te las presentaba. Todavía no me creo la suerte que he tenido de contar con un director de tesis, o mentor, como tú. No sólo eres un científico excepcional, sino que acompañas tu capacidad de trabajo y tu espíritu crítico con un optimismo y resistencia al desaliento que en los momentos duros y en las malas rachas suponen un soplo de aire fresco y te ayudan a uno a seguir hacia delante. Muchas gracias por ser tan buena persona y por preocuparte tanto por tus “niños”, gracias por tus consejos, anécdotas y por tu paciencia. Muchísimas gracias por ser el mejor jefe del mundo.

Y en el “Pack del Lab.147” estaba también Lorena, mi “mini-jefa” y la que me enseñó los trucos de las técnicas y del trabajo del día a día. Gracias por enseñarme y estar conmigo en los duros comienzos. Luego llegó Cris, esa máquina a la que me gustaría parecerme cuando sea mayor. No sé que habría sido de mí sin tus consejos científicos, tu dulzura y tu espíritu práctico y resuelto. No te imaginas lo que te hecho de menos, y lo que me pesa que no puedas estar en este “parto”, con todo lo que este “hijo” tiene que agradecerte. Y después llegaron Miguel y Ángela. A Ángela me quedan pocas cosas que decirle que no le haya dicho ya, la alegría del 147 y sus aledaños. Paño de lágrimas y fuente de risas, consejos y chorradas varias. ¡Sin ti no volvió a ser lo mismo! Y a Miguel, pues que gracias por las risas, los consejos y por toda tu ayuda.

Y los vecinos de al lado, qué bien se han portado siempre con las niñas de Jose Luis, tanto los que se han ido (Diego, burgalés ilustre, Tilman y Rocío, Carmen...) como los que vinieron y los que siempre estuvieron, mamá Ángeles, que los sabe “todo, todo y todo” y tiene una paciencia... Elena, una máquina de investigar y de coreografiar; Noemí, siempre tan dulce y tan pendiente de cómo va, qué tal todo, necesitas algo; Sonia, que también lo sabe todo y se preocupa por todos, Mateo, ese pobre hombre que no sabía dónde se metía y está aguantando como un jabato, María, la más reciente adquisición pero que ha sido una más desde el minuto uno; Concha, la voz de la experiencia; Laura, una de las personas más fuertes que conozco y que además me

AGRADECIMIENTOS

hizo sentir en casa cuando llegué. Y por último Ángel, muchas gracias por los comentarios, consejos y críticas de los seminarios. He aprendido mucho gracias a vosotros.

Y para compensar el trauma del cambio de planta llegaron mis “niños”, Iván, el hombretón del laboratorio que además ejerce como tal (por suerte para nosotras), nuestra argentina Laura, todo un descubrimiento: los argentinos no están tan mal, sin las sonrisas y carcajadas que me has provocado habría sucumbido en algunos momentos! La nueva Laura, el encanto y la dulzura hecha persona, una curranta que vale para todo; y Jaime, que tan pronto está como ha desaparecido. Muchas gracias por darme vidilla aunque haya sido una hermitaña gruñona estos meses.

Y como por suerte no todo es trabajo en el trabajo, he podido contar a mi alrededor con gente como Rubentxu, las risas, el buen humor, la energía y el siempre estar ahí (desde el principio de los tiempos!) que tanta falta me han hecho muchas veces. Ana Kris, que al principio me daba como miedito y luego fijate las risas, fiestas, cañas, angustias y demás que hemos compartido, y el cariño que te tengo, churra! Lo mismo que a Mari Paz, me encanta cómo eres, de lo más auténtico que conozco. Los colegas de doctorado, Pableras, Evita, Fátima, Rocío...vosotros fuisteis sin duda lo más provechoso de los cursos de doctorado. Y toda la cuadrilla de las casas rurales, los cumpleaños, las cañas y las fiestas inolvidables del CIB, Rodri creador de eventos, Carlos superstar, Mikel repostero de lujo, Eva generadora de buen rollo, Kike tan grande como buen tío, Elisa la italiana más divertida, me dejo a muuucha gente, muchas gracias por todos los buenos momentos que permiten que los malos se olviden, todos vosotros sois lo que más voy a echar de menos del “trabajo”.

Mención especial para la gente de San Diego, primero para M. Farquhar, que me abrió las puertas de su laboratorio y me permitió así vivir una experiencia personal y profesional muy especial. Muchas gracias por ello. A Eva y Carlos por ayudarme con todo desde el principio. Y sobre todo a Mikel, mi “jefe”, y a Amagoia, los dos fuisteis mi familia cuando estaba tan lejos de mi casa, me acogisteis y me quisisteis aunque fuese un poco pesadita! Muchísimas gracias por vuestro cariño.

Además tengo la suerte de haber podido contar con mucha gente toda mi vida, gracias a lo cual soy lo que soy. Primero mis niñas de Aranda, mi casa de siempre, mis amigas de toda la vida, que han estado y estarán siempre conmigo, Conchi, Isas, Patri, Noa, Vivix, Vane, Mae, Sara, María y Blanca, por muchos años más. Y Kike, qué te voy a decir que no sepas. Mis salmantinos de la universidad, mi otra familia cuando me alejé de ella, “gracias” a vosotros la marcha a Madrid fue todo un drama, Mon, Lau, Patri, Aída, y sobre todo Alberto, eres y siempre serás un tío muy especial para mí. Mi “cuadri política”, los de Ermua, que me adoptasteis como si fuese “uno más” desde el minuto uno y que hacéis que cada fin de semana o evento allí sea memorable, el día que aprenda euskera os vais a caer de culo.

AGRADECIMIENTOS

Mis niñas de Madrid, desde la carrera a la eternidad, sin vosotras no sé qué habría sido de mí, sois la alegría de mi vida en Madrid, ojalá dure para siempre, Meri, Carmela, Sarilla, Cris, Ianire, Esti, muchas gracias por todos los momentos juntas, os quiero muchísimo. Y claro, los consortes, Julito, Dani, Jorge, que me las tienen como reinas. Y Carlangas y Jesusito, los dos niños de la cuadrilla, ideales para discusiones socio-políticas y para todo lo que uno se pueda imaginar, porque siempre se puede contar con vosotros, porque sois dos tíos auténticos. Y a los colegas de la facultad con los que es más difícil coincidir, Oihane, David, Patri... siempre es un alegrón veros, aunque sea de ciento en viento!

Y por supuesto, mi familia, lo más importante de mi vida, lo que me ha mantenido a flote y me ha hecho crecer y ser como soy. Pase lo que pase sé que soy la persona más afortunada del mundo por tener una familia unida y que se quiere de forma incondicional. Mis padres, que me dieron la vida y me la devolvieron. Mi hermano, que por suerte siempre ha sido también mi amigo (y ahora que somos mayores y nos pegamos menos, pues más aún). Y su ángel, que le ha hecho mejor persona y se ha ganado un lugar en la familia. Mis tíos, que son como mis otros padres, y mis primos, la alegría de la casa. Y mis abuelos, la semilla de todo este cariño. No os cambio por nada. Incluyo aquí a mi nueva familia, la euskaldún, en vuestra casa me siento como en la mía, muchas gracias por quererme y demostrármelo. Askó maite zaituztet.

Y por último, mis dos gordos, el gordito y mi compañero, mi mejor amigo, mi psicoanalista, mi otra mitad, el penúltimo miembro de mi familia. Tú me complementas, me haces seguir cuando no puedo más. Eres el sitio donde quiero estar el resto de mi vida. Gracias por ser feliz haciéndome feliz. Te quiero.

ÍNDICE

ÍNDICE	3
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	
1- LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS	
1.1- El sistema inmune y la respuesta inmunológica	13
1.2- Ciclo biológico y función de las CDs	14
2- LAS QUIMIOQUINAS Y SUS RECEPTORES	
2.1- Las quimioquinas	16
2.2- Los receptores de quimioquinas	18
2.3- Las proteínas G heterotriméricas	19
3- LA QUIMIOQUINA CXCL12 Y SUS RECEPTORES CXCR4 Y CXCR7	
3.1- La quimioquina CXCL12	20
3.2- El receptor CXCR4	23
3.3- El receptor CXCR7	24
4- LA APOPTOSIS	25
4.1- La familia de proteínas Bcl-2	27
4.2- Las caspasas	28
4.3- La apoptosis en el contexto de las CDs	28
5- LA QUIMIOTAXIS	29
5.1- La quimiotaxis en las CDs	30
6- SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS	32
6.1- PI3K	33
6.2- Akt	34
6.3- Erk1/2	36
6.4- FoxO	38
6.5- mTOR y mTORC1	39

ÍNDICE

OBJETIVOS	43
-----------	----

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos generales	49
---------------------	----

Animales	50
----------	----

Cultivos celulares

1. CDs humanas derivadas de monocitos	50
---------------------------------------	----

2. CDs murinas de bazo	50
------------------------	----

3. Linfoblastos	51
-----------------	----

RT-PCR	51
--------	----

Análisis de la quimiotaxis	51
----------------------------	----

Análisis de la adhesión	52
-------------------------	----

Análisis de la velocidad migratoria y de la fugotaxis	52
---	----

Análisis de la endocitosis	53
----------------------------	----

Western Blot	53
--------------	----

Citometría de flujo	54
---------------------	----

Microscopía de fluorescencia y confocal	54
---	----

Vectores de expresión, siRNAs y nucleofecciones	54
---	----

Ensayos de apoptosis	55
----------------------	----

1. Tinción con Hoechst 33342	55
------------------------------	----

2. Tinción con Anexina V-Fitc / IP	55
------------------------------------	----

Ensayo de quimiotaxis y apoptosis en ratón

1. Análisis <i>ex vivo</i> de la quimiotaxis de las CDs a los ganglios linfáticos	56
---	----

2. Análisis <i>in vivo</i> de la apoptosis de las CDs en los ganglios linfáticos	56
--	----

Análisis estadístico	57
----------------------	----

RESULTADOS

1- CXCL12 regula quimiotaxis y supervivencia en las CDs humanas, pero no motilidad, fugotaxis, endocitosis ni maduración	61
--	----

2- La quimiotaxis y la supervivencia dependientes de CXCL12 en las CDs humanas están reguladas por CXCR4 pero no por CXCR7	66
--	----

3-	CXCR4 regula la migración de las CD4 de ratón al ganglio y también su supervivencia <i>in vivo</i>	69
4-	La estimulación de las CD4 maduras humanas con CXCL12 induce activación de Akt y Erk1/2 dependientes de Gi, el dímero $\beta\gamma$ y de PI3K	71
5-	CXCL12 induce activación del complejo mTORC1 a través de AKT y de Erk1/2	74
6-	Los componentes señalizadores Gi, $G_{\beta\gamma}$, PI3K $\alpha/\gamma/\delta$, Akt, Erk1/2 y mTORC1 contribuyen a la regulación de la quimiotaxis y la supervivencia de las CD4	77
7-	Los miembros de la familia FoxO regulan apoptosis, pero no quimiotaxis, y su actividad es inhibida por la estimulación con CXCL12 en las CD4	82
	DISCUSIÓN	87
	CONCLUSIONES	99
	BIBLIOGRAFÍA	103
	ANEXOS	
A.	Abreviaturas	123
B.	Publicaciones	125

RESUMEN



Las quimioquinas se definen como citoquinas quimiotácticas (Chemotactic cytokines), un nombre que subraya su papel como quimioatrayentes. Sin embargo, a pesar de esta denominación, estas moléculas no controlan exclusivamente la quimiotaxis sino también otras funciones celulares. Las células dendríticas (CDs) son presentadoras de antígeno profesionales capaces de iniciar la respuesta inmunológica mediante la activación de los linfocitos T vírgenes. En la fase de diferenciación denominada de CDs madura (CD mad), llevan a cabo la presentación en los ganglios linfáticos de antígenos capturados, en una fase de diferenciación previa, en las zonas de inflamación. Para llevar a cabo su función, las CDs mad deben migrar a través de los vasos linfáticos hasta los ganglios, donde se producirá la presentación antigénica a los linfocitos T. La quimioquina CXCL12, ligando de los receptores CXCR4 y CXCR7, se expresa en los vasos linfáticos aferentes y en los ganglios linfáticos, lo que sugiere que es muy probable que las funciones de las CDs mad puedan estar reguladas por este ligando.

En esta Tesis Doctoral mostramos que CXCL12 regula *in vitro* la quimiotaxis y la supervivencia de las CDs mad humanas e *in vivo* la migración de las CDs murinas a los ganglios linfáticos y también su supervivencia. Además, aportamos información sobre los mecanismos moleculares mediante los cuales CXCL12 regula esas dos funciones simultáneamente en las CDs mad humanas. CXCL12 estimula el receptor CXCR4, pero no a CXCR7, que no se expresa en las CDs. CXCL12 induce la activación de dos vías, la primera que incluye Gi, G_{βγ}, PI3K-α, -γ y -δ, Akt, mTORC1 y la segunda, que incluye Gi, G_{βγ}, las isoformas PI3K-α, -γ y -δ, Erk1/2 y mTORC1. Sorprendentemente, todos los componentes de ambas vías son necesarios para que CXCL12 controle la quimiotaxis y la supervivencia de las CDs mad, aunque la contribución en la regulación de cada una de las funciones de cada efector es cuantitativamente diferente.

Además, la estimulación de las CDs con CXCL12 induce la fosforilación inhibidora de FoxO1 dependiente de Akt, lo cual hace que este factor de transcripción se transloque desde núcleo -donde controla la expresión de la proteína pro-apoptótica Bim- al citosol. La regulación de la actividad de FoxO1 es independiente de la vía de Erk1/2 y del efector común de ambas vías mTORC1. Por otro lado, a diferencia de lo que se observa con los demás elementos regulados por CXCL12, FoxO1 regula apoptosis en las CDs mad, pero no la quimiotaxis en respuesta a CXCL12, lo que sugiere existen componentes en las rutas analizadas capaces de regular selectivamente sólo una de las funciones estudiadas.

Finalmente, cuando se comparan las vías de señalización inducidas por CXCR4 con aquellas inducidas por CCR7 (que también regula la quimiotaxis y la supervivencia de las CDs), se observa que los receptores de quimioquinas pueden emplear los mismos elementos señalizadores organizados de diferente manera para regular las mismas funciones en las CDs humanas.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN

1- LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.

1.1 El Sistema inmune y la respuesta inmunológica

El sistema inmunitario constituye un sistema de defensa multifuncional que protege a los animales de la invasión de patógenos provenientes del entorno y frente a alteraciones en las propias células del organismo que pudieran dar lugar a enfermedades como el cáncer. La respuesta inmune es el resultado de la coordinación de la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa (Fearon 1996).

La respuesta inmune innata, que proporciona la primera línea de defensa contra una infección, está constituida mayoritariamente por mecanismos que no son específicos de un patógeno determinado, sino que están presentes incluso antes de que se produzca una infección. Abarcan componentes celulares y moleculares que reconocen productos del metabolismo microbiano conservados entre diversos microorganismos, a los que se denomina “patrones moleculares asociados a patógenos” (Medzhitov 2001). En la inmunidad innata participan las barreras físicas como los epitelios, diferentes tipos celulares como los linfocitos NK (*Natural Killer*), células fagocíticas como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas (CDs) y diversos componentes antimicrobianos usados por el huésped, como las proteínas del complemento.

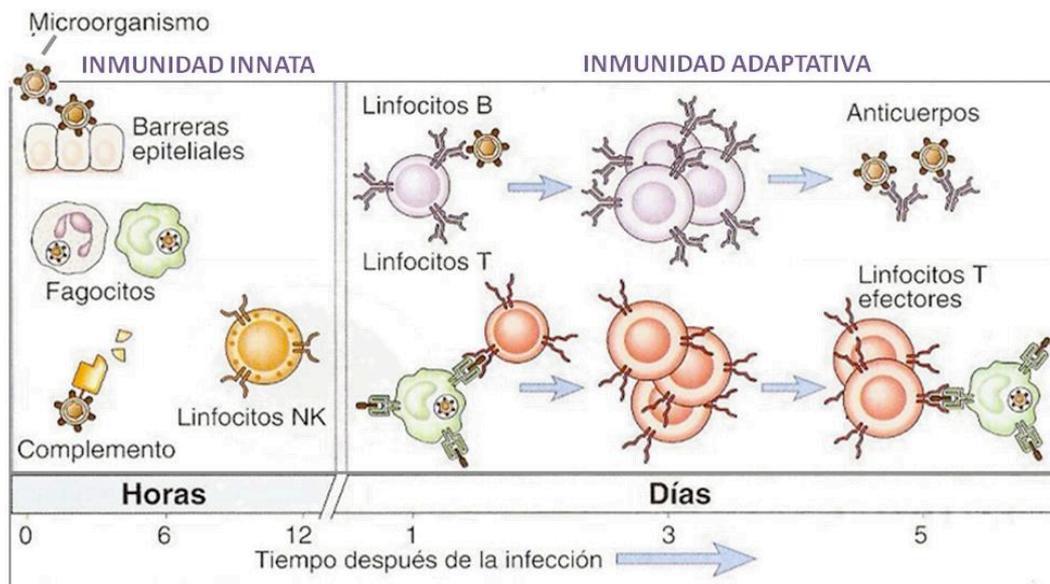


Figura 1. **Respuesta inmune ante un patógeno.** Los mecanismos de la inmunidad innata constituyen la primera defensa ante una infección, mientras que las respuestas adaptativas se desarrollan después. La cinética de ambas respuestas aquí mostrada es aproximada y depende del tipo de infección.

La respuesta inmune adaptativa se desarrolla sólo frente a la sustancia que indujo su iniciación y está mediada por los linfocitos T y los linfocitos B. Este tipo de respuesta confiere al organismo la capacidad de generar clones de linfocitos específicos para una casi ilimitada variedad de antígenos y la denominada “memoria

inmunológica”, es decir, la capacidad de responder nuevamente a un determinado antígeno si el organismo vuelve a estar expuesto a él. Para que se inicie esta respuesta inmune se requiere el reconocimiento del antígeno que la induce por parte de los linfocitos que poseen los receptores específicos para ese antígeno, y la posterior activación de dichos linfocitos (Litman 2010). Las células encargadas de la presentación antigénica son las llamadas células presentadoras de antígenos (CPAs). Estas células, entre las que se encuentran las CDs, reconocen e incorporan patógenos, a los cuales procesan para presentarlos posteriormente a los linfocitos (Trombetta 2005).

1.2 Ciclo biológico y función de las CDs

Las CDs son potentes células presentadoras de antígeno que poseen la propiedad de activar a los linfocitos T vírgenes o *naïve*. Al igual que los monocitos y los macrófagos, las CDs se originan en la médula ósea a partir de progenitores derivados de células madre hematopoyéticas con un potencial de diferenciación mieloide. Tras sucesivas etapas de diferenciación, las pre-CDs pasan al torrente sanguíneo desde donde se extravasarán a los tejidos en forma de CDs inmaduras (Geissmann 2010), aunque también se han descrito poblaciones de monocitos que dan lugar a diferentes subpoblaciones de CDs (Serbina 2008). Las CDs emplazadas en los tejidos periféricos (no linfoides) están en un estado denominado “inmaduro” (CD inm) y tienen como función la de actuar como “centinelas” frente a agentes infecciosos. Durante esta fase las CDs muestran gran habilidad para internalizar y procesar antígenos de patógenos que capturan mediante macropinocitosis, fagocitosis y endocitosis mediada por receptores de manosa (Sallusto 1995). Estas CDs inm expresan en su membrana receptores que reconocen quimioquinas que son producidas en los focos inflamatorios y que atraen a las CDs hacia los sitios donde se originó la infección (Steinman 1991). Sin embargo, para que las CDs puedan desencadenar el inicio de la respuesta inmune adaptativa es necesario que sean capaces de activar a los linfocitos T, lo cual sólo les es posible tras pasar por un proceso de diferenciación denominado “maduración” (Steinman 1991; Banchereau 1998) que las convierte en CDs maduras (CDs mad).

Este proceso de maduración comienza cuando las CDs detectan “señales de peligro”, como productos microbianos (ej. LPS, (*LipoPoliSacárido*)) o citoquinas inflamatorias (ej. TNF α (*Tumor Necrosis Factor α*)), y conlleva cambios fenotípicos como el aumento en los niveles de MHC I y II y de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86, características que hacen que las CDs pasen de ser detectores y procesadores de patógenos a ser potentes presentadoras de antígeno y activadoras de linfocitos T. Además, las CDs mad pierden la expresión de receptores de quimioquinas inflamatorias y comienzan a expresar CCR7, lo cual les permite salir de los lugares donde ha comenzado la respuesta y migrar hacia los ganglios linfáticos guiadas por los ligandos de CCR7, las quimioquinas CCL21 (presente en los vasos linfáticos aferentes y

en las zonas T de los ganglios linfáticos) y CCL19 (presente en esta última localización y también secretada por las propias CDs) (Cyster 1999; Baekkevold 2001).

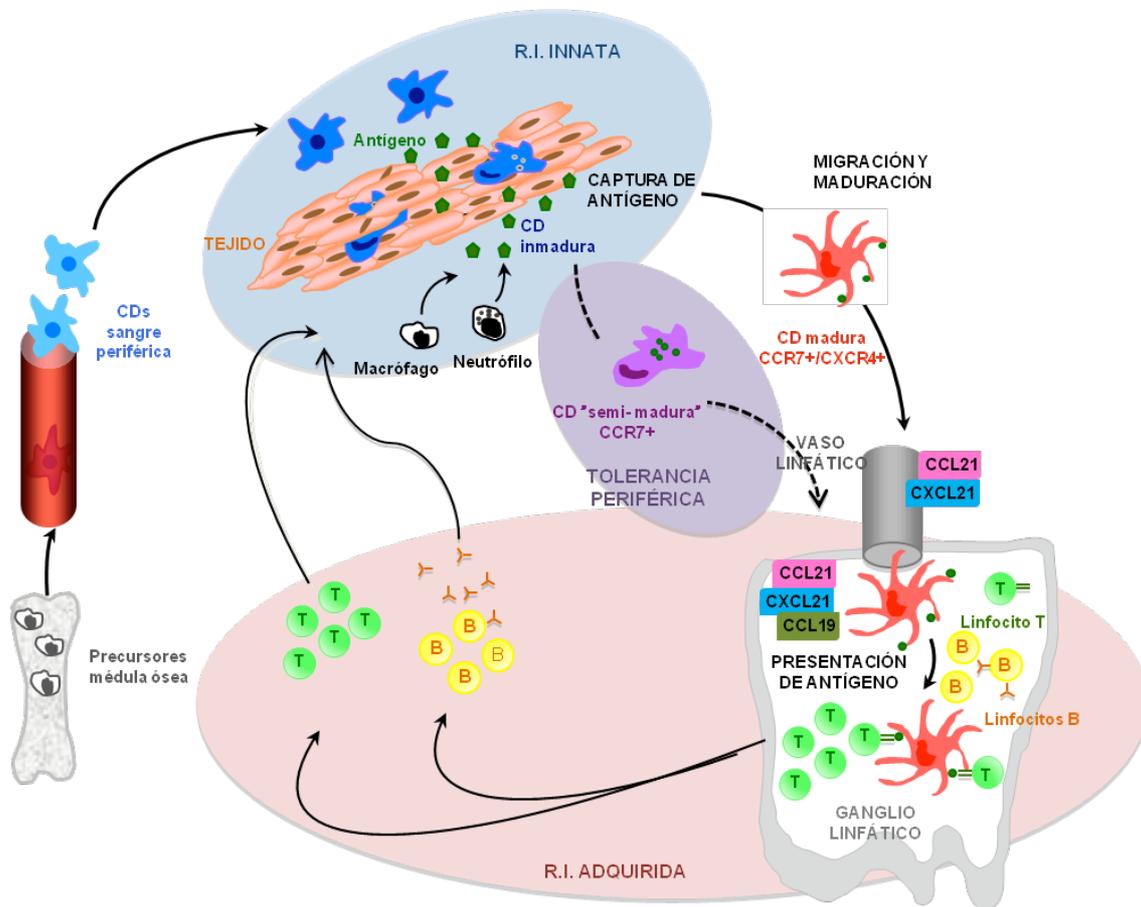


Figura 2. Ciclo biológico de las CDs. Los precursores de médula ósea pasan a la sangre donde se diferencian a CDs de sangre periférica. Éstas migran desde los vasos sanguíneos hacia los tejidos periféricos, donde residen como CDs inmaduras, que capturan y procesan antígenos. Tras su exposición a las “señales de peligro”, comienzan a madurar y migran hacia los ganglios linfáticos, en los cuales, como CDs maduras, presentan 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.

Una vez localizadas en las zonas T de los ganglios, las CDs mad presentarán los antígenos capturados en la fase de CD inm a los linfocitos T para que las células T que poseen el TCR específico para la carga antigénica de las CDs mad experimenten un proceso de activación y proliferación (Mempel, Henrickson et al. 2004). La activación de los linfocitos T en los órganos linfoides secundarios por parte de las CDs mad induce unos cambios en los patrones de expresión de las moléculas de adhesión y receptores quimiotácticos de estos linfocitos, que determinará que se dirijan al lugar de infección donde las CDs captaron los antígenos (Dudda and Martin 2004).

INTRODUCCIÓN

	INMADURAS	MADURAS
LOCALIZACIÓN	Órganos y tejidos	Vasos aferentes ganglios linfáticos
FENOTIPO	MHC II + CD80 -/+ CD86 -/+	MHC II +++ CD80+++ CD86+++ CD83+
FUNCIÓN	Captación de antígenos	Presentación antigénica
CAP. ENDOCÍTICA	Elevada	Baja
RECEPTORES	CCR1, CCR2, CCR5, CCR6, CXCR1, CXCR2, CXCR4	CCR7, CXCR4

Figura 3. Tabla comparativa de CDs inmaduras y maduras. En la tabla se muestran algunas de las características que distinguen a las CDs inmaduras de las CDs maduras.

Existe además una subpoblación de CDs, denominadas “semi-maduras”, que expresan CCR7 y migran a los ganglios linfáticos de forma constitutiva, incluso en ausencia de inflamación. Estas CDs regulan a los linfocitos T autorreactivos para inducir tolerancia periférica (Steinman 2002; Ohl, Mohaupt et al. 2004; Probst, McCoy et al. 2005)

2- LAS QUIMIOQUINAS Y SUS RECEPTORES

2.1 Las quimioquinas

Las quimioquinas (del inglés *chemokines*: *CHEMO*tactic *cytoKINES*) son pequeños polipéptidos (8-14 KDa) que actúan como quimioatrayentes celulares mediante la activación de sus receptores específicos (Rollins 1997). A excepción de CX3CL1 (fractalquina), que es una proteína de membrana, todas las quimioquinas son proteínas secretadas. Gracias a su carga positiva son capaces de unirse a los proteoglicanos sulfatados o a proteínas polisialiladas presentes en la superficie celular o en la matriz extracelular (Webb 1993; Rey-Gallardo, Delgado-Martín et al. 2011). Así, una vez que son liberadas tienden a permanecer concentradas localmente formando gradientes estables. Las quimioquinas y sus receptores, junto con las moléculas de la matriz extracelular y sus receptores específicos, juegan un papel fundamental en la organización de la migración de los leucocitos en el sistema inmunológico (Baggiolini 1998; Bromley, Mempel et al. 2008).

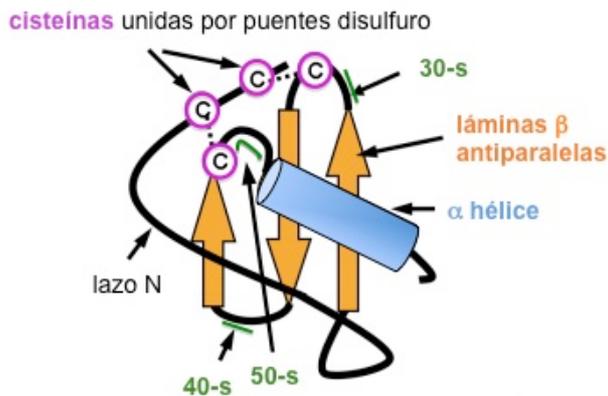


Figura 4. Esquema de la estructura terciaria de una quimioquina. La estructura secundaria de todas las quimioquinas consta de un segmento amino-(N)-terminal flexible que precede a las cisteínas conservadas, seguido de tres láminas β antiparalelas y una hélice α en el extremo carboxilo-(C)-terminal (Allen, Crown et al. 2007). Estas últimas estructuras están separadas entre sí por tres lazos denominados 30-s, 40-s y 50-s respectivamente.

Las quimioquinas presentan en su secuencia cuatro residuos de cisteína muy conservados, de manera que la posición relativa de las dos primeras permite clasificar las quimioquinas en cuatro familias (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 (Murphy, Baggiolini et al. 2000; Zlotnik 2008)

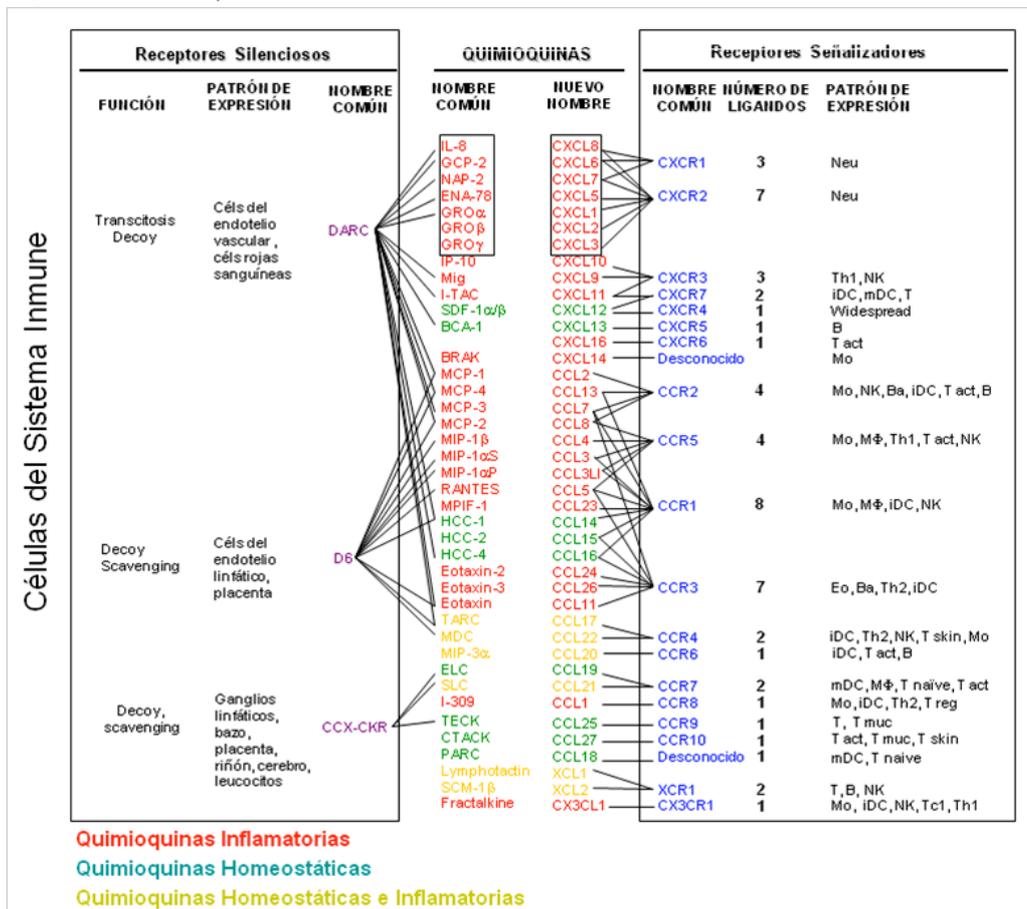


Figura 5: Clasificación funcional de las quimioquinas y sus receptores. Se muestran las quimioquinas clasificadas en base a su función en tres grupos: quimioquinas inflamatorias o inducibles (rojo), quimioquinas homeostáticas o constitutivas (verde) y quimioquinas que pueden actuar como inflamatorias 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 en dos grupos: homeostáticas (o *constitutivas*) e inflamatorias (o *inducibles*), aunque algunas quimioquinas pueden ejercer ambas funciones (**Figura 5**). Las quimioquinas homeostáticas, son responsables de la migración basal de los leucocitos y de la organización de los órganos linfoides secundarios. Por el contrario, las quimioquinas inflamatorias son sintetizadas en zonas de inflamación, es decir, su presencia es transitoria, y permiten el reclutamiento de los leucocitos a estos lugares (Cyster 1999; Sallusto 2000; Schaerli and Moser 2005). Terminados estos procesos, las quimioquinas inflamatorias dejan de secretarse en las zonas correspondientes.

2.2 Los receptores de quimioquinas

Las quimioquinas ejercen su función a través de su unión a receptores específicos denominados receptores quimiotácticos. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores *heptahelicoidales* acoplados a proteínas G heterotriméricas (GPCRs). Se han descrito hasta el momento unos 20 receptores quimiotácticos funcionales diferentes y otros tres receptores, denominados “*scavenger*”, que no señalizan pero que unen, internalizan y, en algunos casos, degradan, sus quimioquinas específicas, retirándolas del medio y ayudando así a terminar la respuesta inmune (Weber 2004; Graham 2009). Además, es importante mencionar la promiscuidad existente 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. Se desconocen las razones exactas de las consecuencias funcionales de esta aparente redundancia, pero es posible que las diferentes combinaciones de receptores y ligandos junto con las de otras moléculas implicadas permitan un ajuste más preciso de las respuestas inmunes (Mantovani 1999).

Los receptores quimiotácticos están constituidos por siete hélices alfa transmembrana conectadas por tres lazos extracelulares y otros tantos situados en el interior de la célula. Su extremo N-terminal está expuesto fuera de la membrana mientras que el extremo C-terminal se encuentra en el citoplasma. La capacidad de los receptores de quimioquinas de señalizar tras la unión de sus ligandos se debe en gran parte a la presencia, en el segundo lazo intracelular, del motivo DRY (Aspártico, Arginina, Tirosina), una región muy conservada que está implicada en la inducción de señales intracelulares y que no existe o está alterada en los receptores *scavenger* (Allen 2007).

Al igual que ocurre con las quimioquinas, los receptores quimiotácticos se clasifican en cuatro grupos: CC, CXC, C y CX₃C, en función del tipo de quimioquina/s que unen (Murphy, Baggiolini et al. 2000; Zlotnik 2000). Asimismo se pueden clasificar, al igual que sus ligandos, en homeostáticos o inflamatorios, si están involucrados en la regulación de uno u otro proceso.

2.3 Las proteínas G heterotriméricas

La estimulación por sus ligandos de los receptores de quimioquinas implica el acoplamiento funcional del receptor con proteínas G heterotriméricas que actúan como transmisores de las señales intracelulares del receptor. Estas proteínas G están constituidas por una subunidad α , una subunidad β y una subunidad 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 familias en función de la subunidad α que contienen: α_s , $\alpha_{i/o}$, $\alpha_{q/11}$ y $\alpha_{12/13}$ (Cabrera-Vera 2003). Se han descrito 21 subunidades α diferentes, 6 β y 12 γ . El heterotr trímero $\alpha\beta\gamma$ puede estar formado por cualquier combinación de las tres subunidades, de manera que la expresión diferencial y la localización de las diferentes subunidades es clave para la especialización en la señalización a través de los GPCRs (Robishaw and Berlot 2004). En este sentido es importante señalar que las CD expresan específicamente algunos tipos concretos de subunidades α , β y γ de proteínas G (Resultados sin publicar MA Vega y AL Corbí).

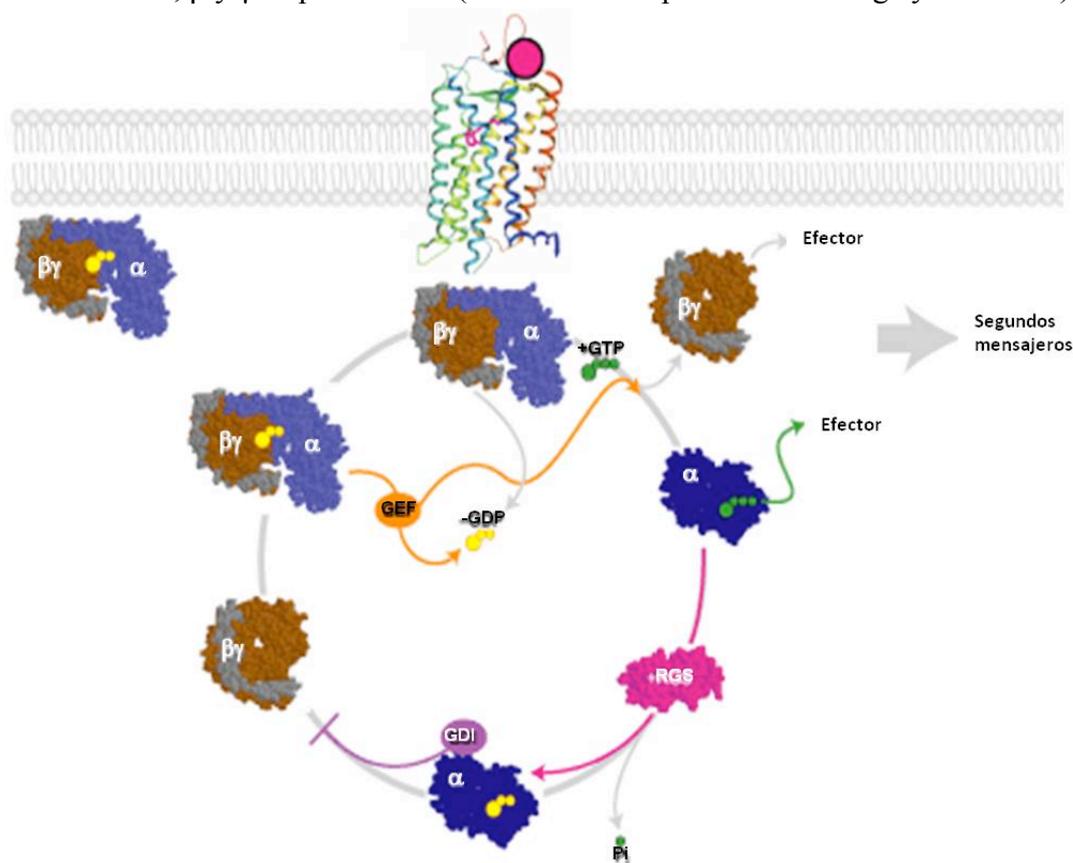


Figura 6: Ciclo de las proteínas G. Las proteínas G heterotriméricas están inhibidas en condiciones de reposo porque la subunidad α permanece en su forma inactiva (α -GDP) asociada al dímero $\beta\gamma$, que también está inactivo. La asociación del ligando al receptor lo activa y hace que actúe como 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 y las GDIs impiden la disociación del GDP, evitando así la acumulación de proteína G activa

INTRODUCCIÓN

En condiciones de reposo, es decir, en ausencia de ligando, la subunidad α está unida al GDP y se encuentra fuertemente asociada al dímero $\beta\gamma$, constituyendo de esta forma un trímero que representa la forma inactiva de la proteína G heterotrimérica. Cuando el ligando interacciona con el extremo N-terminal y los lazos extracelulares del receptor se induce un cambio en la conformación del receptor. El receptor actuará ahora como un GEF (*Guanidin nucleotide Exchange Factor*), es decir, como un intercambiador de nucleótidos que permite la liberación del GDP de la subunidad α y su sustitución por GTP (Hamm 1998), de forma que esta subunidad pase así a su estado activo. Consecuentemente, se producirá la disociación del dímero $\beta\gamma$ y la subunidad α , que quedan libres para interactuar con sus efectores. En este sentido, la subunidad α -GTP y el dímero $\beta\gamma$ pueden interactuar con diferentes moléculas diana, lo cual les permite regular diferentes vías de señalización (Cabrera-Vera 2003). El ciclo de las proteínas G se completa, cuando las RGSs (*Regulators of G protein Signaling*), estimulan la actividad GTPasa intrínseca de la subunidad α , lo que provoca la liberación del GTP, que es nuevamente sustituido por el GDP. Aumenta así la afinidad de la subunidad α por el dímero $\beta\gamma$, lo cual permite que se asocien de nuevo, y vuelvan a su estado inactivo (Figura 6).

Los receptores de quimioquinas se acoplan preferentemente, aunque no exclusivamente, a proteínas de la familia $G\alpha_{i/0}$ (Thelen 2001), se ha visto también que regulan específicamente la quimiotaxis a través de la interacción con miembros de esta familia de proteínas G. Este hecho se ha comprobado mediante el empleo de la toxina pertúsica (PTX), la cual ADP-ribosila proteínas de la familia α_i inhibiéndolas e impidiendo su disociación del dímero $\beta\gamma$ (Hsia 1984; Van Dop, Yamanaka et al. 1984). Sin embargo, 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 ARN de interferencia o construcciones como $\alpha_{\text{Transducina}}$, o $\beta\text{Ark-CT}$ que inhiben específicamente al dímero $\beta\gamma$. Estas estrategias han permitido establecer que este dímero está implicado en la regulación de la quimiotaxis (Arai, Tsou et al. 1997; Neptune, Iiri et al. 1999).

3- LA QUIMIOQUINA CXCL12 Y SUS RECEPTORES CXCR4 Y CXCR7

3.1 La quimioquina CXCL12

CXCL12, también denominada SDF-1 (del inglés *Stromal Derived Factor-1*), pertenece a la categoría de las quimioquinas homeostáticas. Su estructura consiste en tres láminas beta antiparalelas y una alfa-hélice suprayacente. Es el extremo N-terminal (residuos 1-8) el que interacciona con el receptor. Concretamente, sus dos primeros aminoácidos (Lys y Pro) serían responsables de la activación del receptor, mientras que los seis siguientes serían los involucrados en la unión al mismo (Crump 1997). La

composición rica en aminoácidos básicos de CXCL12 permite su unión a los glucosaminoglicanos (GAGs) o proteínas polisialiladas de carga negativa presentes en la superficie celular, lo cual estabiliza la unión de esta quimioquina con su receptor.

Hasta hace poco se habían descrito dos isoformas de CXCL12, CXCL12 α y CXCL12 β , que se generan por *splicing* alternativo de dicho gen (Tashiro, Tada et al. 1993). Ambas isoformas mantienen idéntica secuencia aminoacídica a excepción de de la presencia de 4 aminoácidos adicionales en el carboxilo terminal de CXCL12 β (Shirozu, Nakano et al. 1995). Sin embargo, más recientemente han sido descritas otras cuatro variantes de CXCL12 denominadas CXCL12 γ , CXCL12 ϵ , CXCL12 δ y CXCL12 θ y que también son resultado del corte alternativo de exones.

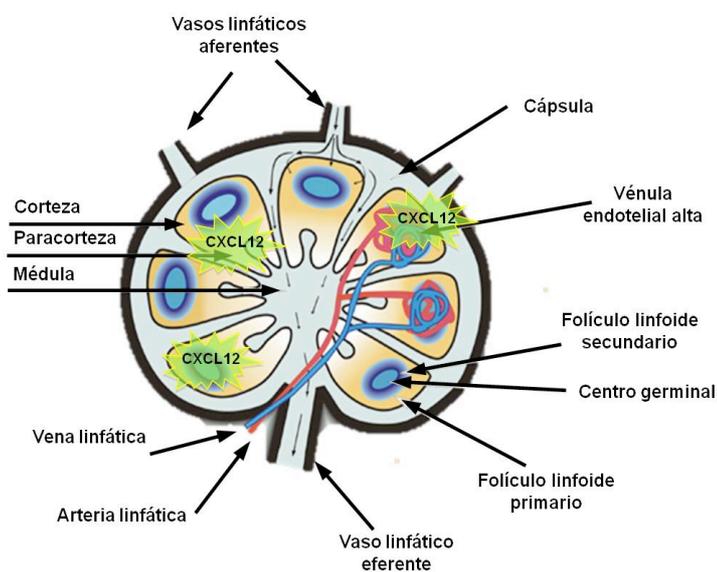
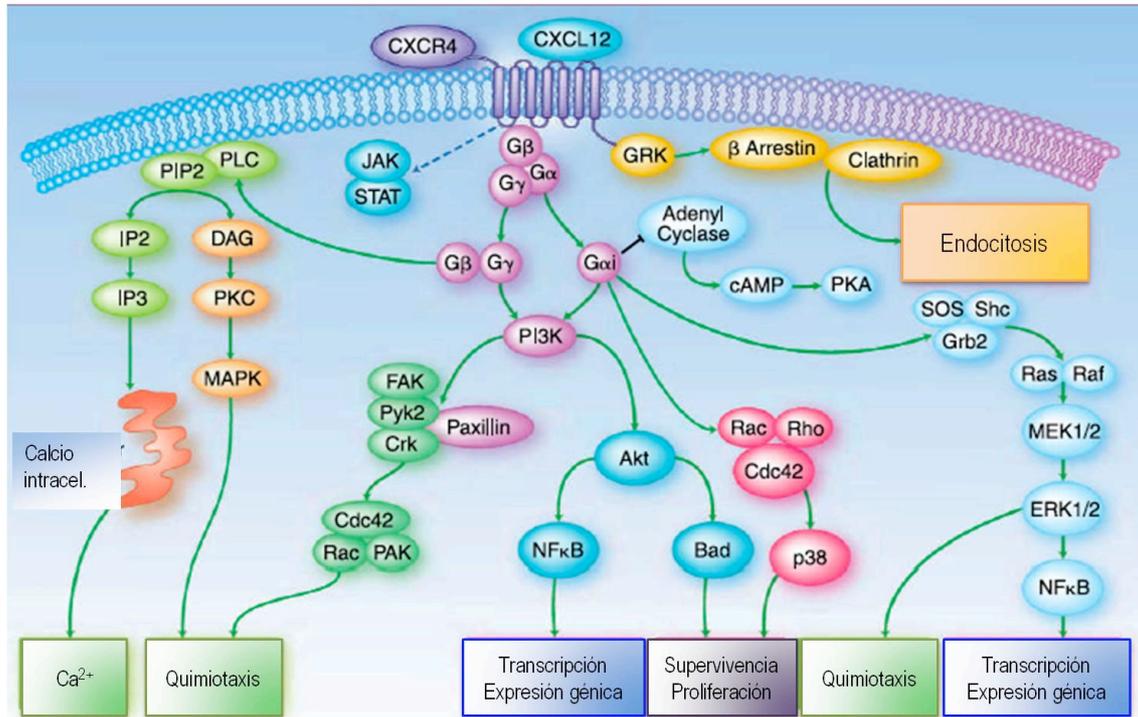


Figura 7: Localización de CXCL12 dentro del ganglio linfático.

Marcajes inmunohistoquímicos han mostrado la presencia de CXCL12 en la luz de las vénulas endoteliales altas (Okada, Ngo et al. 2002), las regiones foliculares y parafoliculares y en las áreas paracorticales de los ganglios linfáticos (Gonzalez, Bermejo et al. 2010)

La variante más extendida, y a la que nos referiremos en todo momento en esta tesis, es CXCL12 α (Janowski 2009). CXCL12 se expresa constitutivamente en una gran variedad de tejidos, como en células estromales, células endoteliales, fibroblastos de la dermis, vasos linfáticos y células de la médula de los ganglios linfáticos (Pablos 1999; Hargreaves 2001; Kabashima 2007). Además, su expresión en estos lugares puede aumentar si se produce una exposición a estímulos inflamatorios (Timmer 2007). Como todas las quimioquinas homeostáticas, CXCL12 se ocupa de regular el tráfico leucocitario y la arquitectura de los órganos linfoides secundarios, pero además se ha descrito su implicación en multitud de procesos como la diferenciación de los linfocitos B (Nagasawa 1996), la migración de las células madre hematopoyéticas a la médula ósea (Lapidot 2005), la migración de las células germinales primordiales (Boldajipour, Mahabaleshwar et al. 2008), el desarrollo y modulación del sistema nervioso (Li 2008) etc. Los ratones deficientes para esta quimioquina mueren al poco de nacer con alteración del desarrollo cardíaco y defectos en la hematopoyesis y mielopoyesis (Nagasawa 1996).



Adaptado de Teicher B. y Fricker S., *Molecular Pathways* 2010

Figura 8: Esquema de algunas rutas de transducción de señales inducidas por CXCL12.

Además de los procesos fisiológicos mencionados, CXCL12 también juega un papel importante en el desarrollo y evolución de varias patologías. Se ha descrito, por ejemplo, su implicación en la migración metastática de algunos tipos de células cancerosas (Kaifi, Yekebas et al. 2005; Zhang, Lu et al. 2007; Woo, Hong et al. 2008; Yoshitake 2008), así como su papel inhibitor en la entrada y replicación del virus del VIH en las células a través del receptor CXCR4 (Bleul, Farzan et al. 1996; Oberlin, Amara et al. 1996). Por otro lado, dado que el promotor de CXCL12 contiene dos sitios de unión de HIF-1 α y que este factor se encuentra sobreexpresado en tejidos hipóxicos o dañados, se han observado unos niveles elevados de CXCL12 en estos tejidos, lo cual permite la quimioatracción de las células madre específicas de tejido circulantes (Ceradini, Kulkarni et al. 2004). La desregulación de su función como quimioatrayente de leucocitos también genera situaciones patológicas por una inflamación excesiva de los tejidos, como puede ocurrir en el caso de la esclerosis múltiple (McCandless 2008) o la artritis reumatoide (Kim, Cho et al. 2007).

En el caso concreto de las CD, experimentos *in vitro* demuestran que CXCL12 es un potente quimioatrayente para estas células (Humrich, Humrich et al. 2006; Ricart, John et al. 2011). Además, estudios realizados *in vivo* demuestran que si se bloquea la unión de esta quimioquina con su receptor la migración de las CD a los ganglios se encuentra alterada (Kabashima 2007) y que el tratamiento con anticuerpos bloqueantes de CXCL12 impide la migración de las células de Langerhans desde la epidermis hacia la dermis tras un estímulo inflamatorio (Ouweland, Santegoets et al. 2008). Esta misma

estrategia permitió demostrar que CXCL12 regulaba la supervivencia de las CD4⁺ células tímicas mediante la modulación del ratio entre las proteínas Bcl-2 y Bax (Hernández-López 2008).

Como ya se ha comentado, para llevar a cabo sus funciones las quimioquinas deben unirse a sus receptores específicos. Durante mucho tiempo se había considerado que CXCL12 se unía de manera única al receptor de quimioquinas CXCR4 (Bleul, Farzan et al. 1996; Oberlin, Amara et al. 1996) una convicción reforzada por la gran similitud en los fenotipos de los ratones deficientes en ambas proteínas (Ma, Jones et al. 1998). Sin embargo, de forma más reciente se ha descubierto que el anteriormente considerado “receptor huérfano” RDC1, renombrado CXCR7, también es capaz de unir CXCL12 (Balabanian, Lagane et al. 2005).

3.2 El receptor CXCR4

Como el resto de receptores de quimioquinas, CXCR4 contiene siete dominios transmembrana unidos por lazos intra y extracelulares, así como un dominio N-terminal extracelular y un C-terminal que se encuentra en el interior de la célula. Este receptor fue inicialmente descrito como un receptor huérfano y denominado, literalmente, “Receptor con Siete Dominios Transmembrana Derivado de Leucocitos (LESTR, del inglés *leukocyte-derived seven-transmembrane domain receptor*), y más tarde *fusina* una vez que se descubrió su capacidad como correceptor del virus del VIH en los linfocitos CD4⁺ (Feng 1996; Oberlin, Amara et al. 1996). Este hecho junto con su capacidad para mediar la metástasis de gran variedad de cánceres y su importancia en la funcionalidad del sistema inmune han propiciado que sea uno de los receptores de quimioquinas mejor estudiado.

CXCR4 es el receptor de quimioquina más ampliamente expresado y puede encontrarse en multitud de tipos celulares. Además, tiene una importancia vital en muchos procesos fisiológicos, comenzando por el desarrollo embriológico de diversos tejidos como vasos sanguíneos, músculos, células germinales primordiales, cerebelo, etc. (Tachibana 1998; Zou 1998; Odemis 2005). También se ha demostrado ampliamente su expresión constitutiva en células del sistema nervioso (neuronas, microglía, oligodendrocitos, etc.) donde es responsable de la regulación de multitud de procesos como la migración de los progenitores neuronales o la correcta elongación de los axones (Li 2008).

INTRODUCCIÓN

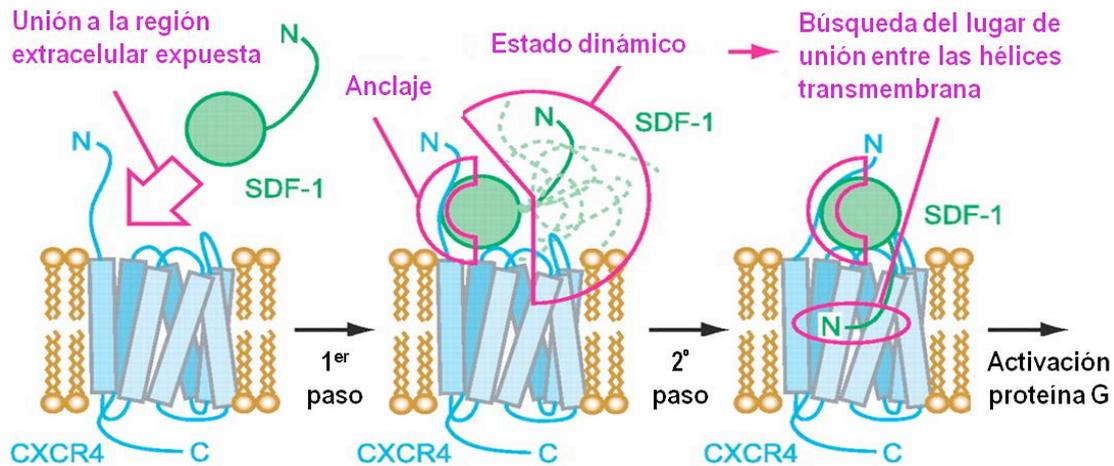


Figura 9: Esquema de la unión de CXCL12 a CXCR4 en dos pasos. El primer paso en la interacción entre la lámina β , el lazo 50-s y el lazo N de CXCL12 y la región extracelular de CXCR4 facilita un anclaje eficiente de la quimioquina al receptor. En el segundo paso el flexible extremo N terminal de CXCL12 encuentra el lugar de unión entre las hélices transmembrana de CXCR4, de manera que se induce un cambio conformacional en el receptor que desencadena la activación de la proteína G acopladas al mismo (Brelot 2000). La interacción de CXCR4 con su ligando CXCL12 puede ser bloqueada de forma muy específica y eficaz por la unión al receptor del agonista AMD3100 (Donzella 1998; Fricker 2006)

Diversas poblaciones de células madre hematopoyéticas expresan este receptor de quimioquinas (Miller 2008) y en el caso del sistema inmune se ha descrito la expresión de CXCR4 por linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y CDs, donde que regula multitud de funciones además de la quimiotaxis, como la apoptosis, la supervivencia o la fugotaxis (Suzuki 2001; Vlahakis 2002; Vianello, Kraft et al. 2005; Eash, Greenbaum et al. 2010). Los ratones deficientes en CXCR4 mueren al poco de nacer y presentan alteraciones hematopoyéticas y en el desarrollo cardiaco y cerebelar.

Además, como ocurre con CXCL12, este receptor está implicado en diversos procesos patológicos como la infección por VIH, la metástasis y angiogénesis en multitud de tipos de cáncer (Zlotnik 2008), desórdenes neurodegenerativos (Mines 2007) y enfermedades inmunes como el WHIM (Hernandez 2003).

3.3 El receptor CXCR7

A pesar de que su gen fue clonado como posible GPCR ya en 1991 (Libert, Passage et al. 1991), ha seguido siendo considerado un “receptor huérfano” hasta hace relativamente poco, cuando se describió su gran afinidad tanto por CXCL12 como por la quimioquina CXCL11 (Balabanian, Lagane et al. 2005; Burns 2006), a su vez ligando del receptor quimiotáctico CXCR3.

Tanto la señalización, funcionalidad e incluso la presencia o no de este receptor en determinados tipos celulares ha estado siempre rodeada de controversia. Con respecto a su capacidad señalizadora, a pesar de que se ha descrito que los receptores de

quimioquinas se acoplan esencialmente a proteínas G de la familia Gi (Thelen 2001), este hecho no se ha observado en CXCR7, posiblemente por una alteración en la secuencia DRYLAIV del segundo lazo intracelular, imprescindible para el acoplamiento del receptor a las Gi (Thelen and Thelen 2008). Además, la unión de CXCL12 ó CXCL11 a CXCR7 tampoco induce movilización de flujo de calcio, que es una característica típica de la señalización mediada por receptores de quimioquinas (Burns 2006). Sin embargo, se ha descrito su implicación en diversos procesos tanto fisiológicos como patológicos, como la migración neuronal (Sanchez-Alcañiz, Haege et al. 2011; Wang, Li et al. 2011), la migración de las células de primordio de la línea lateral (Valentin, Haas et al. 2007), el desarrollo cardiaco (Sierro, Biben et al. 2007; Gerrits, van Ingen Schenau et al. 2008) o la quimiotaxis, supervivencia y proliferación de diferentes tipos de cáncer (Burns 2006; Begley, MacDonald et al. 2007; Miao, Luker et al. 2007). Estas observaciones plantean la cuestión de mediante qué mecanismos moleculares es CXCR7 capaz de ejercer su funcionalidad. Se ha sugerido que la señalización inducida por este receptor estaría mediada por β -arrestinas (Luker 2009; Rajagopal, Kim et al. 2010), moléculas que también permitirían la internalización del receptor e incluso la activación de MAPKs (Wang, Li et al. 2011). CXCR7 podría actuar como co-receptor para CXCR4, modulando la señalización proveniente de CXCL12 (Levoye, Balabanian et al. 2009). En algunos casos se ha comprobado que se comporta como un receptor no funcional o *decoy* que elimina el exceso de CXCL12, con lo cual podría modular la funcionalidad de CXCR4 (Boldajipour, Mahabaleshwar et al. 2008; Naumann, Cameroni et al. 2010). También se ha sugerido que existe una correlación entre la funcionalidad y señalización de CXCR7 y CXCR4 (Hartmann, Grabovsky et al. 2008), aunque esta variaría según el tipo celular.

Se ha descrito que CXCR7 se expresa en diversos tipos de células cancerosas (Sun, Cheng et al. 2010), neuronas de diferentes zonas del sistema nervioso (Sanchez-Alcañiz, Haege et al. 2011; Wang, Li et al. 2011) células sanguíneas como linfocitos T, linfocitos B, CD mad, y monocitos (Balabanian, Lagane et al. 2005; Infantino, Moepps et al. 2006; Sanchez-Martin, Estecha et al. 2011). Sin embargo, también la expresión o no de CXCR7 en ciertos tipos celulares genera controversia, como refleja un artículo publicado recientemente en el que se sostiene que CXCR7 no se expresa en leucocitos humanos o de ratón (Berahovich, Zabel et al. 2011).

4- LA APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso fisiológico regulado genéticamente que controla la muerte celular, y cuya ejecución es fundamental durante el desarrollo embrionario y para el mantenimiento de la homeostasis tisular (Prindull 1995). En el individuo adulto está implicada en el mantenimiento del número adecuado de células en los tejidos. El programa apoptótico debe estar muy finamente regulado ya que cualquier alteración en este proceso puede generar defectos durante el desarrollo, enfermedades autoinmunes,

INTRODUCCIÓN

neurodegeneración o cáncer (Thompson 1995; Igney and Krammer 2002; Zahir and Weaver 2004). Sin embargo, la apoptosis también darse como medio de defensa cuando las células están dañadas o en respuesta a una gran variedad de estímulos fisiológicos y patológicos.

La apoptosis es un mecanismo altamente conservado que fue descrito por primera vez en 1972 (Kerr 1972). La duración del proceso de apoptosis es muy variable (se ha estimado que *in vivo* oscila entre 6 y 24 horas dependiendo del tipo celular (Gavrieli, Sherman et al. 1992)) y no ocurre de un modo sincrónico dentro de una población. Consta de diferentes fases bien documentadas; durante la fase de iniciación los estímulos pro-apoptóticos activan la maquinaria central de la apoptosis; esta activación dará lugar a la aparición de los cambios morfológicos característicos de la apoptosis que comienzan durante la siguiente fase, la fase efectora. Estos cambios incluyen la formación de “burbujas” en la membrana, la disminución del tamaño celular, la condensación de la cromatina, la fragmentación del ADN y la pérdida de la adherencia celular (Saraste and Pulkki 2000). En esta fase se produce también un cambio en la localización de fosfatidilserina (PS), que pasa de estar en la cara citoplasmática de la membrana a estar expuesta en la superficie (Savill and Fadok 2000; Savill and Fadok 2000). Finalmente, se produce la fase de degradación, en la cual se forman los denominados cuerpos apoptóticos, fragmentos cerrados de membrana plasmática que contienen orgánulos celulares y restos nucleares y que son reconocidos y eliminados por células fagocíticas. Este reconocimiento es posible gracias a la PS expuesta en el exterior de la membrana plasmática de las células apoptóticas.

La generación de estos cuerpos apoptóticos, que mantienen el contenido celular atrapado en el interior de una membrana, confiere al proceso apoptótico otra de sus características distintivas que es la ausencia de inflamación posterior al proceso. En el caso de la necrosis, por el contrario, 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 and Jäätelä 2001).

La apoptosis puede tener lugar a través de dos vías principales, una vía extrínseca o dependiente de receptores de muerte y una vía intrínseca o mitocondrial. Los mecanismos de regulación y de señalización implicados en ambas vías son complejos, sin embargo ambas convergen en la activación de caspasas efectoras, que degradan componentes vitales y conducen a la muerte celular (Strasser, O'Connor et al. 2000; Jin and El-Deiry 2005) (ver **Figura 10**).

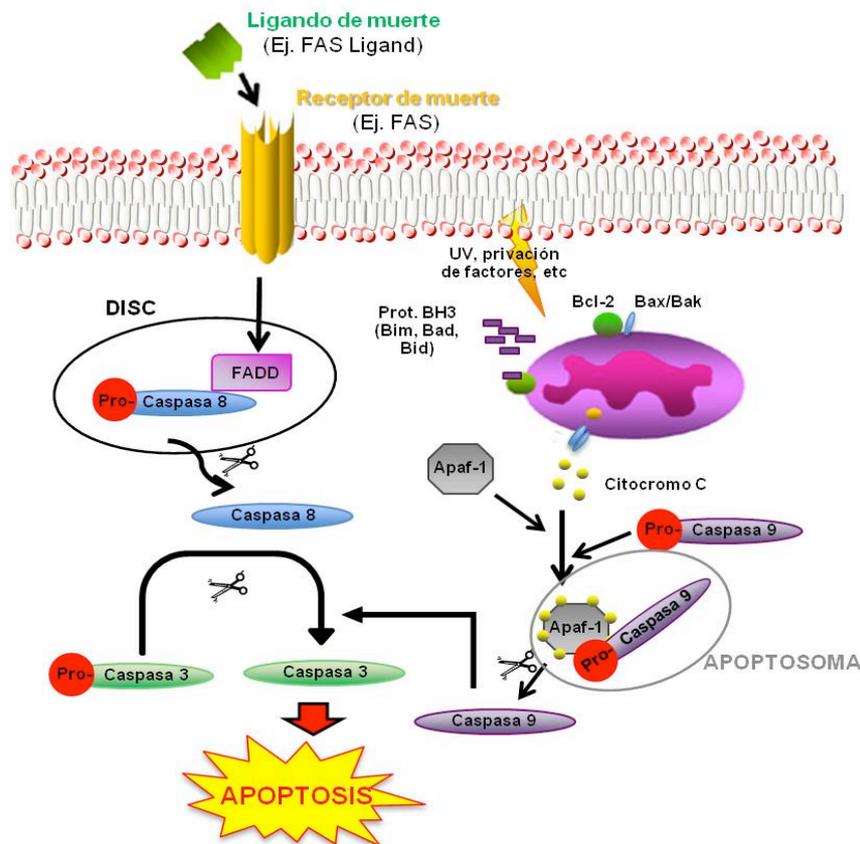


Figura 10. Apoptosis por vía extrínseca e intrínseca. La apoptosis a través de la vía extrínseca comienza cuando ligandos de receptores de muerte (por ejemplo, FasL) se asocian a sus receptores induciendo su oligomerización y permitiendo el reclutamiento de proteínas adaptadoras con dominios de muerte 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) (Ashkenazi and Dixit 1998). La vía intrínseca puede ser activada por diversos estímulos, como privación de factores de crecimiento o tras estrés oxidativo, que alteran el balance entre miembros anti- y pro-apoptóticos de la familia Bcl-2 a favor de estos últimos. Esto hace que se activen Bax y Bak 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 procaspasa-9, en el cual se produce la activación de la caspasa iniciadora de esta vía (caspasa-9 iniciadora en la vía mitocondrial (Hakem, Hakem et al. 1998), seguida por la activación de caspasas efectoras (Shi 2002)

4.2 La familia de proteínas Bcl-2

Se considera que, la progresión hacia la apoptosis depende del balance entre las proteínas pro- y anti-apoptóticas de la célula. Los miembros de la familia Bcl-2, juegan un importante papel en este proceso. Se clasifican funcionalmente en proteínas pro-supervivencia y proteínas pro-apoptóticas (Youle and Strasser 2008).

Los miembros pro-supervivencia: (como Bcl-2 y Bcl-XL), interaccionan e inhiben proteínas pro-apoptóticas. La reducción de su expresión produce un aumento en la apoptosis (Veis, Sorenson et al. 1993; Opferman, Letai et al. 2003) y su sobreexpresión induce supervivencia celular (Danial 2007). Los miembros pro-apoptóticos se dividen a su vez en proteínas tipo Bax/Bak, que aumentan la permeabilidad de la membrana mitocondrial, y las proteínas con dominios BH3 (como Bad y Bim), que inducen apoptosis gracias a su elevada afinidad por los miembros pro-

supervivencia de la familia Bcl-2, mediante la cual producen su inhibición (Borner 2003).

4.3 Las caspasas

Las caspasas constituyen una familia de cisteín proteasas que actúan en la fase ejecutora de la apoptosis proteolizando componentes celulares, lo cual finalmente conduce a la destrucción y muerte celular. Son sintetizadas como zimógenos sin actividad enzimática y tienen tres dominios diferentes: un prodominio, una subunidad p20 y una subunidad p10. Para su activación es necesario un corte que separa el prodominio y otro que libera las subunidades p20 y p10. Se clasifican en dos grupos, casapas iniciadoras (casapa-1, -2, -4, -5, -8, -9, -10, -11, -12), que se unen a grandes complejos moleculares para activar a más caspasas, y casapas efectoras (casapa-3, -6, -7), activadas por caspasas iniciadoras y que llevan a cabo el corte de múltiples sustratos (Earnshaw, Martins et al. 1999).

4.4 La apoptosis en el contexto de las CDs

Los diferentes tipos celulares del sistema inmune mantienen su número relativamente constante después del desarrollo, dado que esta homeostasis es imprescindible para mantener un equilibrio funcional en este sistema (Hildeman, Jorgensen et al. 2007). Para que cualquier tipo celular sea capaz de mantener un tamaño poblacional constante es importante que su tasa de muerte celular programada esté en equilibrio con la de renovación celular. En el caso de las CDs, y dado que existe gran heterogeneidad en cuanto a las propiedades funcionales y fenotípicas de cada una de las subpoblaciones existentes, esta tasa de reciclaje celular depende del tipo de CD del que hablemos. Por ejemplo, se ha descrito, mediante marcaje con BrdU, que la vida media de las CDs en el bazo es de aproximadamente dos días (Kamath, Pooley et al. 2000), mientras que las células de Langerhans tienen una cinética de renovación más lenta (Kamath, Henri et al. 2002).

La adecuada regulación de la duración de la vida media en las CDs es muy importante. Se ha comprobado que ratones modificados genéticamente en los cuales la supervivencia de las CDs se encuentra incrementada, por ejemplo reduciendo la expresión de Bim en las células, presentan, en general, una mayor activación de linfocitos T y/o B (Nopora 2002; Chen 2006; Chen 2007). En algunos casos incluso aumenta la producción de anticuerpos anti-nucleares y los ratones desarrollan síntomas de autoinmunidad (Chen 2006; Chen 2007). Por otro lado, también se ha observado que ratones *Bcl2*^{-/-} y *Bcl-x_L*^{-/-}, en los cuales aumenta la apoptosis de las CDs, muestran un defecto en la activación de la respuesta inmune adaptativa (Jung, Unutmaz et al. 2002; Hou and Van Parijs 2004).

Multitud de factores, tanto intrínsecos como extrínsecos, regulan la vida media de las CD_s. Durante su maduración, por ejemplo, se produce un incremento en la expresión de: (i) proteínas anti-apoptóticas de la familia de Bcl-2, como Bcl-x_L, (Park, Lee et al. 2002), (ii) inhibidores de la señalización de receptores de muerte, como cFLAR (Leverkus, Walczak et al. 2000), (iii) proteínas inhibidoras de apoptosis, IAPs (Park, Lee et al. 2002) o receptores de quimioquinas inductores de señales pro-supervivencia, como CCR7 (Escribano, Delgado-Martín et al. 2009). El incremento de este tipo de moléculas favorecería la supervivencia de las CD_{mad}. La formación de la sinapsis inmunológica entre una CD y un linfocito T también altera la vida media de las CD_s, ya que induce la activación de Akt que, a su vez, regula la translocación del NF- κ B, factor transcripcional pro-supervivencia, al núcleo y la de FoxO1, factor pro-apoptótico, al citoplasma de la célula, evitando así que la CD sufra apoptosis mientras dura la sinapsis (Riol-Blanco, Delgado-Martin et al. 2009). El empleo por parte de la CD de todos estos mecanismos apunta a la necesidad de que la vida media de las CD_s esté estrechamente regulada.

5- LA QUIMIOTAXIS

La quimiotaxis es la función celular mediante la cual las células detectan diferencias en la concentración de moléculas quimioatrayentes y responden a dichas diferencias mediante la polarización celular y la migración hacia la fuente del quimioatrayente (Iglesias and Devreotes 2008). Este proceso es crucial para los organismos eucariotas. En los mamíferos juega un papel fundamental durante el desarrollo embrionario y en el correcto funcionamiento del sistema inmune, así como en la regeneración de los tejidos. La quimiotaxis también es importante en procesos patológicos como la metástasis y las enfermedades inflamatorias.

La quimiotaxis supone la coordinación de determinados procesos independientes. Para migrar siguiendo un gradiente extracelular, la célula debe detectar el quimioatrayente presente a su alrededor e identificar la dirección en la que se encuentra la mayor concentración. Este proceso, denominado “detección del gradiente”, puede producirse incluso cuando las concentraciones de quimioatrayente difieren hasta en sólo un 1% a lo largo de la célula (Zigmond 1977). Así, cuando las células son expuestas a un gradiente quimiotáctico de determinadas proteínas, como los componentes de las rutas de señalización dependientes de proteínas G, se translocan preferentemente a la zona de la célula más cercana a la fuente del quimioatrayente (frente de avance) (Parent, Blacklock et al. 1998). Gracias a las señales desencadenadas en el frente de avance, que regulan la reorganización del citoesqueleto, la célula se polariza y extiende, en la dirección de la migración, protrusiones en forma de pseudópodos o filopodios que son estabilizadas mediante la adhesión a la matriz celular o gracias a la unión a células adyacentes. Estas adhesiones sirven como lugares de tracción para facilitar el movimiento celular y se van desensamblando en la parte trasera

INTRODUCCIÓN

de la célula a medida que se produce su avance, permitiendo así la migración (Lauffenburger and Horwitz 1996).

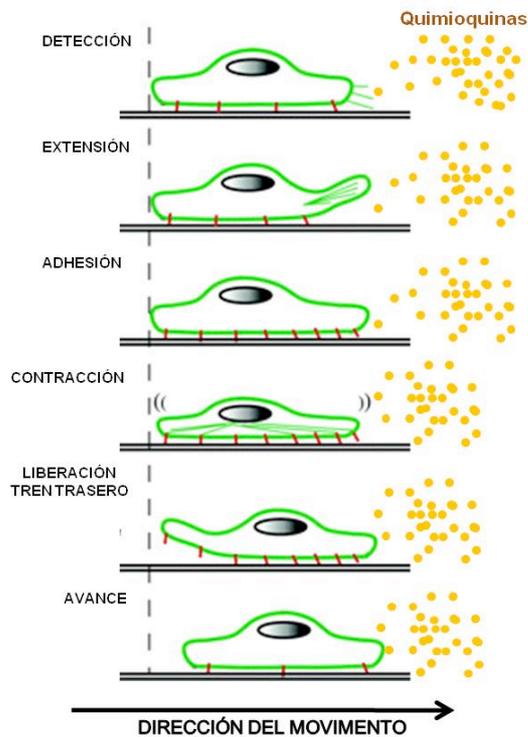


Figura 11. Fases de la quimiotaxis. En una primera fase la célula detecta, mediante sus receptores de membrana, la existencia de moléculas quimioatrayentes en el medio. Posteriormente se produce la polarización de determinados elementos celulares, que permitirá la polimerización de las fibras de actina para que la célula pueda lanzar protrusiones en la dirección de la mayor concentración del quimioatrayente. Después, gracias a las moléculas de adhesión que poseen en su membrana, como las integrinas, las células se adhieren a la matriz extracelular y, mediante la contracción de las fibras mediada por la miosina, y la liberación de las adhesiones generadas en la parte trasera de la célula, ésta puede avanzar por la matriz extracelular hacia la fuente del gradiente quimiotáctico.

5.1 La quimiotaxis en las CDs

Un movimiento eficiente de los leucocitos es imprescindible para el correcto funcionamiento del sistema inmune. En respuesta a una infección o daño, factores locales como quimioquinas y citoquinas inducen la migración de dichos leucocitos para orquestar la respuesta inmune contra la agresión. Dentro del sistema inmune, las CDs se ven particularmente afectadas por estas señales dado que durante su vida deben migrar en múltiples ocasiones: (i) como progenitores deben salir desde la médula ósea y entrar en el torrente sanguíneo (ii) desde la sangre tienen que migrar hacia los tejidos correspondientes a cada subpoblación de CDs, (iii) deben moverse través de dichos tejidos para recoger los antígenos que posteriormente presentarán, (iv) necesitan acceder a los vasos linfáticos que desembocan en los ganglios, (v) deben migrar a los ganglios y encontrarse con los linfocitos T a los que presentarán su carga antigénica (Banchereau 1998; Alvarez, Vollmann et al. 2008). En todas estas fases de la vida de las CDs desde que se produce una infección hasta la llegada de estas células a los ganglios los gradientes quimiotácticos y los receptores de quimioquinas juegan un papel crucial.

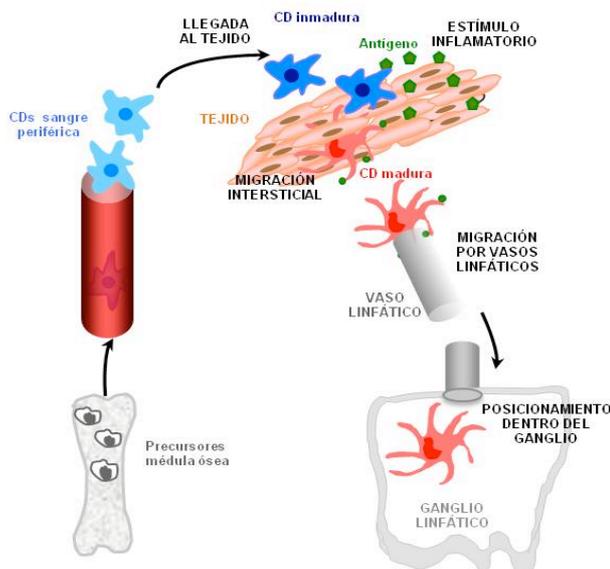


Figura 12. Procesos migratorios durante el ciclo de vida de las CDs. Las CDs salen de la médula ósea como precursoras, pasan al torrente sanguíneo desde el que llegan a los tejidos en forma de CDs inm. Allí pueden ser activadas por diversos estímulos inflamatorios, lo que hace que se “despeguen” del tejido en el que se encuentran. Por migración intersticial llegan a los vasos linfáticos, a través de los cuales llegan a los ganglios. Allí, los gradientes de las diferentes quimioquinas presentes facilitarán su posicionamiento en las diferentes zonas del ganglio

1. Activación en los tejidos: este proceso ocurre en respuesta a una gran variedad de estímulos pro-inflamatorios. Se ha comprobado que la inmensa mayoría de los estímulos que inducen esta movilización lo hacen a través de IL-1 β y TNF- α , citoquinas que probablemente aumenten la expresión en la membrana de las CDs de moléculas de adhesión y receptores de quimioquinas (Alvarez, Vollmann et al. 2008).
2. Salida de los tejidos: la elevada persistencia de las CDs en algunos tejidos sugiere la existencia de un microambiente tisular que mantiene a las CDs retenidas (Holt, Haining et al. 1994; Ruedl, Koebel et al. 2000), por ejemplo a través de la presencia de los ligandos de los receptores de quimioquinas inflamatorias CXCR1, CCR5, CCR1 y CCR2 expresados por las CDs inm. Se ha comprobado durante el proceso de maduración estos receptores dejan de expresarse en la superficie de las CDs, promoviendo así la salida de estas células fuera de los tejidos en los que estaban retenidas por los ligandos de estos receptores (Sallusto, Schaerli et al. 1998).
3. Migración intersticial: en esta fase las CDs deben migrar a través de tejidos ricos en proteínas de la matriz extracelular, para lo cual, durante la maduración, aumentan la expresión de enzimas proteolíticas como las metaloproteinasas MMP-2 y MMP-9 (Ratzinger, Stoitzner et al. 2002). Además, la entrada y migración hacia los vasos linfáticos aumenta su eficiencia debido al incremento que se produce durante la maduración de las CDs en la expresión del receptor CCR7, cuyo ligando CCL21 se encuentra a lo largo de los vasos y también, junto con su otro ligando CCL19, en el interior de los ganglios (Martín-Fontecha, Sebastiani et al. 2003). También se ha sugerido más recientemente

que el aumento de la expresión del receptor CXCR4 tras la maduración de las CD4 contribuye a su migración hacia los ganglios, en los que su ligando CXCL12 se expresa constitutivamente (Kabashima 2007). Recientemente se ha observado además, que también se requiere que las CD4 expresen la quimioquina CCL17 para que se produzca la migración, dependiente de CXCR4 y CCR7, de estas células a los ganglios (Stutte, Quast et al. 2010).

4. Migración a través de los vasos linfáticos y llegada a los ganglios. Además de las quimioquinas secretadas por las células endoteliales y transportadas por la linfa tras una infección, también juega un papel fundamental el propio flujo linfático y la fisiología del vaso linfático (los gradientes de presión hidrostática, las propiedades contráctiles intrínsecas de los vasos y la contracción de la musculatura esquelética circundante (Swartz 2001)).

Una vez llegadas al seno subcapsular del ganglio linfático se piensa que CCR7 guía a las CD4 al interior del córtex del ganglio y hace que se posicionen, entre otras localizaciones, alrededor de las venas endoteliales altas, localización rica en CCL19 y CCL21, donde las CD4 se apostarán a la espera de la llegada de los linfocitos T vía sanguínea (Förster, Schubel et al. 1999; Bajénoff, Granjeaud et al. 2003). Se ha observado que las CD4 de diferentes procedencias se localizan en distintas zonas del ganglio (Kissenpfennig, Henri et al. 2005). El hecho de que CXCL12 se exprese en la médula ganglionar y en las zonas foliculares puede contribuir a la distribución de las CD4 (Gonzalez, Bermejo et al. 2010).

La quimiotaxis, por tanto, es imprescindible para que estas células puedan desplazarse de forma adecuada a y en los ganglios linfáticos y para que la respuesta inmune se produzca adecuadamente.

6- SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS

Como ya se ha comentado, la unión de una quimioquina a su receptor induce un cambio conformacional en éste que desencadena una cascada de señalización intracelular dependiente principalmente de las proteínas G heterotriméricas, ya sea de la subunidad α ó del dímero $\beta\gamma$. Esta señalización, que resulta en la inducción de respuestas como la quimiotaxis, el aumento de la supervivencia o la diferenciación celular, incluye diversas rutas cuyos componentes varían en función del receptor o del tipo celular. Abajo se comentarán las moléculas señalizadoras más comunes en el contexto de los receptores de quimioquinas.

6.1 Las PI3K

Las PI3Ks (*PhosphoInositide 3-Kinases*) constituyen una familia de enzimas encargadas de la modificación de lípidos de membrana. Esta familia la componen tres clases de quinasas, denominadas clase I, clase II y clase III en función de su especificidad por el sustrato y de su estructura, y comparten su capacidad de fosforilar el anillo de inositol de los fosfoinosítidos (PIs) en la posición 3' OH (Hawkins, Jackson et al. 1992). Los productos lipídicos de esta modificación funcionan como segundos mensajeros de señales intracelulares mediante su unión o activación de sus proteínas diana. Mientras que se conoce poco de las PI3K de las clases II y III, el efecto de las PI3KI en el sistema inmune está bien documentado. Su desregulación está ligada a un gran número de enfermedades como cáncer, diabetes o autoinmunidad (Katso, Okkenhaug et al. 2001).

- Clase III: El único miembro de esta familia es Vps34 y contiene una subunidad reguladora de 150 KDa con actividad serina quinasa intrínseca. Tras activarse fosforila el lípido PI dando lugar a PI(3)P. Esta PI3K está implicada en diversos procesos de tráfico vesicular (Vanhaesebroeck and Waterfield 1999).
- Clase II: Consta de PI3K-C2 α , PI3K-C2 β y PI3K-C2 γ , que están constitutivamente unidas a regiones de membrana. Sus sustratos son PI y PI(4)P, cuya fosforilación resulta en los segundos mensajeros PI(3)P y PI(3,4)P₂ respectivamente.
- Clase I: Consta de una subunidad catalítica, p110 (α , β , γ o δ), y una subunidad reguladora. Los miembros de esta familia 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 (Kapeller 1994). 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 interaccionar 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, Laguinge et al. 1998; Krugmann, Hawkins et al. 1999). Se considera que, mientras que las PI3K I_A señalizan principalmente activadas por receptores con actividad tirosín-quinasa (receptores de antígenos, moléculas de adhesión y receptores de citoquinas entre otros) (Deane and Fruman 2004), la PI3K- γ se activa tras la estimulación de GPCRs (receptores de quimioquinas y

INTRODUCCIÓN

de esfingosina 1 fosfato), y más concretamente del dímero $\beta\gamma$ de la proteína G (Suire, Condliffe et al. 2006). Sin embargo, también se ha observado que PI3K- β puede ser activada por GPCRs (Guillermet-Guibert, Bjorklof et al. 2008). La subunidad p110 siempre presenta un dominio de unión a Ras, por lo que todas las PI3K de clase I pueden ser activadas por Ras-GTP.

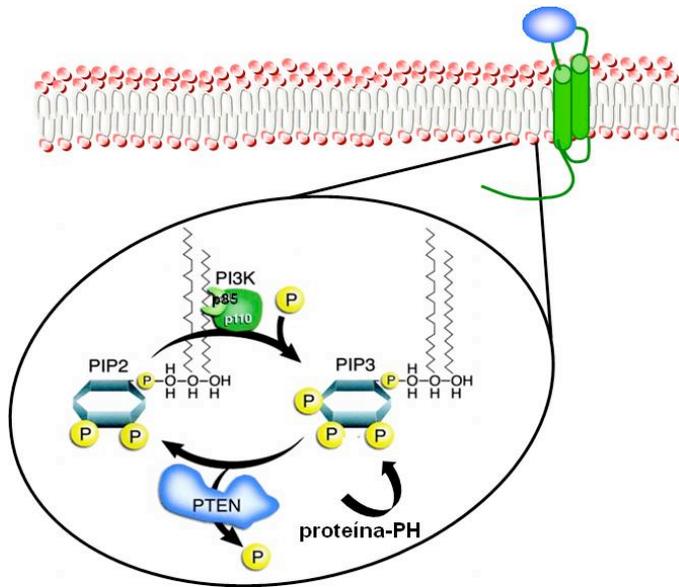


Figura 13. Ciclo de las PI3K. Cuando la PI3K se activa fosforila al fosfoinosítido PIP2 y lo convierte en PIP3, capaz de unir y, por lo tanto, reclutar a la membrana, a proteínas que contengan el dominio PH. La fosfatasa PTEN elimina un fosfato de PIP3 y lo convierte en PIP2 de nuevo.

Tanto $PI(4,5)P_2$ como $PI(3,4,5)P_3$ tienen alta afinidad por los dominios PH (*Pleckstrin Homology*) (Bottomley, Salim et al. 1998) presentes en numerosas proteínas, de modo que al unirse a ellos pueden modificar la actividad de dichas proteínas o inducir su relocalización a zonas específicas de la membrana plasmática. Ése es, por ejemplo, el caso de la quinasa Akt/PKB, uno de los efectores más conocidos de PI3K, la cual es reclutada en la membrana gracias a la unión de su dominio PH a los PIs (Manning and Cantley 2007).

6.2 Akt

Akt, o PKB (*Protein Kinase B*), es una serina-treonina quinasa que forma parte de la familia de proteínas quinasas AGC (proteína quinasa A, proteína quinasa G y proteínas quinasas C). Existen tres isoformas de Akt distintas: Akt1/PKB α , Akt2/PKB β y Akt3/PKB γ . Las tres proteínas poseen una estructura similar, con un dominio PH en el extremo N-terminal, que se une preferentemente $PI(3,4,5)P_3$ y $PI(3,4)P_2$, un dominio con actividad serina/treonina quinasa y un dominio regulador en el extremo C-terminal. Akt posee dos residuos específicos, uno en el dominio quinasa (Thr308) y otro en el extremo C-terminal (Ser473), que necesitan ser fosforilados para que se active completamente (Franke 2008) (ver Figura 14)

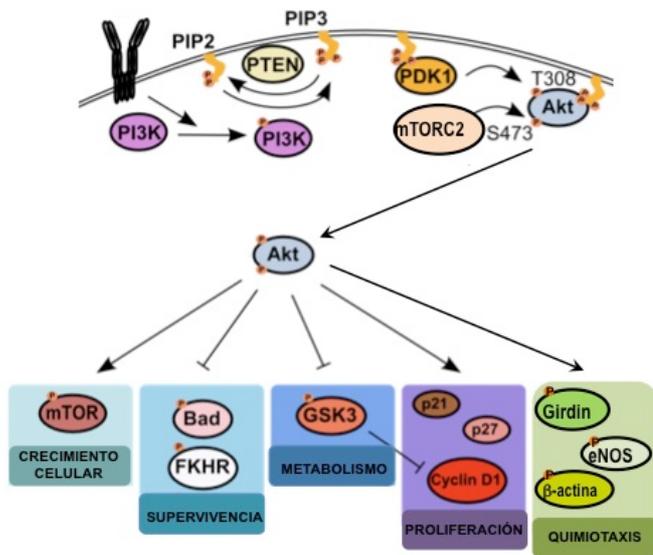


Figura 14. Esquema del mecanismo de activación de Akt. Una vez activas las PI3Ks, éstas fosforilan los fosfoinosítidos PIP2 presentes en la membrana y los convierten en PIP₃, lo que favorece el reclutamiento a la membrana de Akt. Esto produce un cambio conformacional en Akt que expone los dos residuos que deben ser fosforilados. PDK1, que también es reclutada a la membrana. Esta quinasa fosforila a Akt en Thr308 y posteriormente mTORC2 la fosforila en su Ser473 para activar Akt completamente (Sarbasov, Guertin et al. 2005). Una vez activa, Akt puede fosforilar multitud de efectores, mediante los que regula el crecimiento celular, la supervivencia y la quimiotaxis.

La actividad de Akt ha sido muy estudiada en diversos tipos celulares y se ha demostrado su implicación en multitud de procesos a través de la fosforilación de sus proteínas diana, como la regulación del crecimiento celular (Wullschleger, Loewith et al. 2006), la proliferación (Cross, Alessi et al. 1995; Viglietto, Motti et al. 2002; Welcker, Singer et al. 2003) o la captación de nutrientes (Ej: glucosa) y el metabolismo celular en respuesta a factores de crecimiento (Ej: insulina) (Kohn, Summers et al. 1996). También se ha analizado ampliamente la implicación de Akt en las dos funciones celulares que atañen a este trabajo, la supervivencia y la migración.

Akt regula la inducción de supervivencia mediada por factores de crecimiento y otros estímulos (Marte and Downward 1997). Entre sus sustratos se encuentra BAD, un miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2 cuya su fosforilación por Akt impide su función (Datta, Dudek et al. 1997). También se ha observado que la fosforilación de la caspara-9 por Akt inhibe su actividad (Cardone, Roy et al. 1998). Otro de los sustratos de Akt, es NF-κB (Nuclear Factor-κB), un factor de transcripción que regula la expresión de proteínas anti-apoptóticas (Romashkova and Makarov 1999). También GSK3 (Glycogen Synthase Kinase 3), una serina-treonina quinasa que ejerce efectos pro-apoptóticos en las CD, es otra de las dianas fosforiladas e inhibidas por Akt para regular la supervivencia celular (Escribano, Delgado-Martín et al. 2009). También se ha observado que los factores de transcripción de la familia de FoxO (Forkhead bOX class O) son fosforilados e inhibidos por Akt como parte de la señalización pro-supervivencia inducida por esta quinasa (Escribano, Delgado-Martín et al. 2009; Riol-Blanco, Delgado-Martín et al. 2009).

En cuanto a la migración, se ha descrito la implicación de la ruta PI3K/Akt en dicho proceso en multitud de sistemas como *Dictyostilium* (Meili 1999), células

endoteliales durante la angiogénesis (Morales-Ruiz 2000) y leucocitos (Sotsios 2000), en ocasiones siendo Akt hallada en el frente de avance de las células migrantes (Servant, Weiner et al. 2000). A causa de esta relocalización de Akt asociada a la formación de los lamelipodios necesarios para la motilidad celular se especula con la posibilidad de que Akt se sirva de la modificación del citoesqueleto de actina para regular la migración de las células. Además, aunque todavía se sabe poco sobre la ruta señalizadora bajo Akt de la que esta quinasa puede servir para regular la migración, se han descrito algunos sustratos que mediarían esta reorganización citoesquelética inducida por Akt, como Girdin, una proteína de unión actina (Enomoto, Murakami et al. 2005), la enzima eNOS (*Endothelial Nitric Oxide Synthase*), capaz de unirse a β -actina e implicada en la formación de uniones célula-célula (Montagnani, Chen et al. 2001; Govers, Bevers et al. 2002), o la propia β -actina, cuya fosforilación directa por Akt previa estimulación con IL-6 ha sido descrita recientemente (Ho, Kuo et al. 2011).

6.3 Erk1/2

Erk1 y Erk2, del inglés *Extracellular Regulated Kinase*, forman parte del grupo de las Erk/MAPK, el primero de los tres grupos de la familia MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) descubierto (Crews, Alessandrini et al. 1992). También forman parte de esta familia las MAPK del grupo de JNK y las del grupo de p38 (Widmann, Gibson et al. 1999). A pesar de que el grupo de las Erk lo componen 8 miembros (Erk1- Erk8), Erk1 y Erk2 son los más estudiados, mientras que la expresión y funcionalidad de los otros miembros del grupo no ha sido descrita en detalle aún. Erk1 y Erk2, que se expresan en todos los tejidos de los mamíferos, son idénticos en un 83% y las diferencias se encuentran tan sólo fuera de su dominio quinasa. Por ello y porque el papel específico de cada una de las dos quinasas no ha sido desentrañado aún es por lo que habitualmente se hace referencia a ambas proteínas a la vez, denominándolas Erk1/2. Sí se ha observado, sin embargo, que no son completamente redundantes en las funciones que regulan dado que, aunque Erk2 puede mantener la mayoría de las funciones fisiológicas en ausencia de Erk1, los ratones mutantes para Erk2 sufren letalidad embrionaria (Saba-El-Leil 2003).

Hay una gran cantidad de estímulos extracelulares que pueden modular la cascada de señalización de Erk1/2, como factores de crecimiento, suero, ligandos de GPRCs, citoquinas y estrés osmótico entre otros (Chen, Gibson et al. 2001). Las cascadas de señalización de las MAPK comprenden tres niveles de activación quinasas secuenciales, de modo que primero las MAPKKKs fosforilarían a las MAPKKs, las cuales, por último, activarían a las MAPKs (Chang 2001). Una vez activado, Erk1/2 fosforilará preferentemente sustratos que contengan la secuencia consenso Pro-Xaa-Ser/Thr-Pro (Gonzalez, Raden et al. 1991). Hasta ahora se han identificado más de 150 sustratos de Erk1/2, que incluyen desde factores de transcripción a quinasas, fosfatasa, proteínas del citoesqueleto, receptores, entre otros. Así, en función del tipo, duración y

magnitud del estímulo que lo active y también de la localización subcelular de Erk1/2, esta quinasa puede controlar multitud de respuestas celulares, como proliferación, migración, diferenciación, supervivencia y apoptosis (Yoon and Seger 2006).

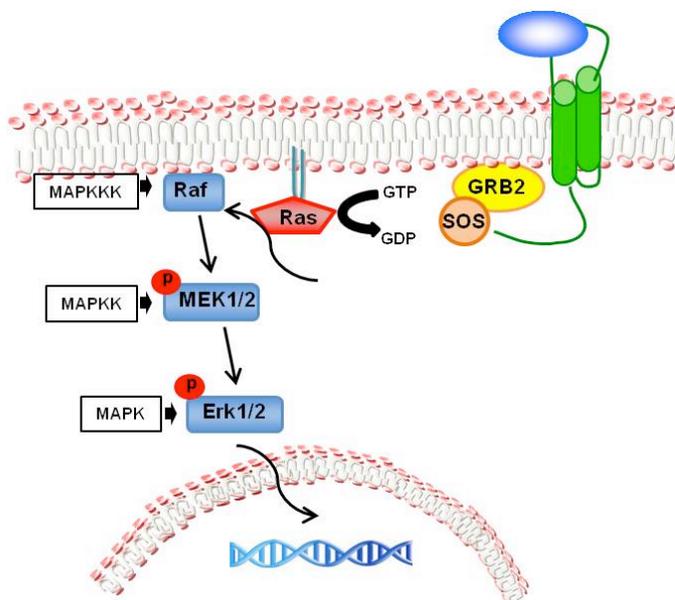


Figura 15. Modelo de la activación de Erk1/2. Tras la estimulación del receptor, los miembros de la familia de serina-treonina quinasas Raf (Raf-1, A-Raf y B-Raf), son reclutadas a la membrana por la pequeña GTPasa Ras, donde serán activados por Ras-GTP y otras quinasas unidas a la membrana, como c-Src (Marais, Light et al. 1998). Una vez activados fosforilarán dos residuos de serina en MEK1 y MEK2, los cuales a su vez fosforilarán a Erk1 y Erk2 (Chen, Gibson et al. 2001)

Se ha descrito que la activación de Erk1/2 inhibe la apoptosis inducida por estímulos como $TNF\alpha$, FasL, TRAIL, radiación, estrés osmótico y oxidativo y privación de factores de crecimiento, entre otros (Lu and Xu 2006). Entre los sustratos de Erk1/2 implicados en la regulación de la supervivencia celular se encuentran Bim (Biswas and Greene 2002), RSK (*p90 ribosomal S6 kinase*), que también es capaz de fosforilar de forma inhibitoria a Bad, otra proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2 (Scheid, Schubert et al. 1999), e incluso la caspa 9, cuya fosforilación en la treonina 125 por parte de Erk1/2 resulta en la inhibición de su actividad (Allan, Morrice et al. 2003). Erk1/2 también ha sido implicada en inducción de apoptosis de varios tipos celulares, como neuronas y linfocitos T, en respuesta a multitud de estímulos (Cheung and Slack 2004; Cagnol and Chambard 2010; Teixeira and Daniels 2010).

Erk1/2 regula también la migración de diferentes tipos celulares (Vial, Sahai et al. 2003; Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al. 2005), tanto mediante la regulación de la dinámica de las adhesiones focales (debido, por ejemplo, a la fosforilación de la Calpaína (Glading, Chang et al. 2000)) como través de su efector MLCK, el cual, una vez activado por Erk1/2, fosforila la cadena ligera de la miosina, promoviendo así la polimerización de las fibras de actina y la generación de protrusiones en la membrana del frente de avance (Klenke 1997; Webb, Donais et al. 2004).

6.4 FoxO

En mamíferos, la familia de factores de transcripción de FoxO (*Forkhead bOX O*) está constituida por FoxO1 (FKHR), FoxO3a (FKHRL1), FoxO4 (AFX) y FoxO6. Los miembros de esta familia incluyen un dominio FKH (*ForkHead*) de unión a ADN y por la presencia de tres secuencias consenso que pueden ser fosforilados por Akt [RXRXXX(S/T)] (Huang and Tindall 2007; van der Horst and Burgering 2007).

Existen múltiples mecanismos de regulación de la actividad de FoxO, muchos de los cuales se basan en el control de su localización. Por ejemplo, la vía de PI3K/Akt resulta en la inhibición de FoxO induciendo su traslocación al citoplasma. Cuando se activa Akt, esta quinasa 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, Bonni et al. 1999; Brunet, Kanai et al. 2002). Tras la fosforilación de FoxO en el núcleo 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. En condiciones de estrés se activan quinasas como JNK o MST1, que son capaces de inducir la actividad de FoxO porque estimulan su disociación de las 14-3-3, lo cual facilita su transporte al núcleo (Huang and Tindall 2007; van der Horst and Burgering 2007).

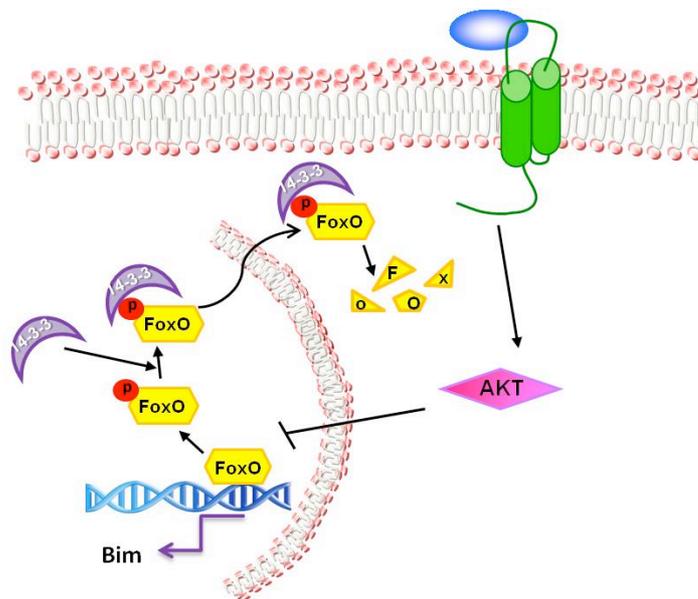


Figura 16. Modelo de inhibición de FoxO. En condiciones pro-apoptóticas FoxO se localiza en el núcleo donde puede transcribir genes pro-apoptóticos como Bim. En presencia de factores pro-supervivencia se produce la activación de Akt, que se transporta al núcleo y fosforila a FoxO. Esta fosforilación genera sitios de unión para las proteínas 14-3-3, cuya asociación a FoxO conduce a su translocación y retención en el citoplasma, donde puede ser degradado, impidiéndose de esta manera que lleve a cabo su actividad transcripcional.

La familia FoxO regula la expresión de genes implicados en un gran número de procesos celulares como la apoptosis, ciclo celular, reparación de ADN, estrés oxidativo, diferenciación celular o metabolismo de glucosa, aunque en esta tesis doctoral nos centraremos exclusivamente en su papel como regulador de la apoptosis. En este contexto se ha descrito que FoxO es capaz de transactivar factores implicados en apoptosis tanto por vía extrínseca (por ejemplo incrementando la expresión de FasL)

(Brunet, Bonni et al. 1999), como por vía intrínseca (por ejemplo regulando la expresión de Bim) (Dijkers, Medema et al. 2000).

6.5 mTOR y TORC1

La proteína mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) es una serina-treonina quinasa de alto peso molecular (289 kDa), homóloga a la inicialmente descrita TOR de levaduras (Brown, Albers et al. 1994), que pertenece a la familia de las proteínas relacionadas con las PI3Ks, o PIKK (*Phosphatidylinositol Kinase-related Kinase*). Se expresa ubicua y constitutivamente y está implicada, mediante la fosforilación de sus sustratos, en multitud de funciones como la prevención de la apoptosis y la autofagia, la reorganización del citoesqueleto de actina, la biogénesis ribosomal y la iniciación de la transcripción entre otras funciones (Delgoffe and Powell 2009). La importancia fisiológica de mTOR se demuestra por el hecho de que los ratones deficientes en dicha quinasa sufren letalidad embrional (Gangloff, Mueller et al. 2004; Murakami, Ichisaka et al. 2004)

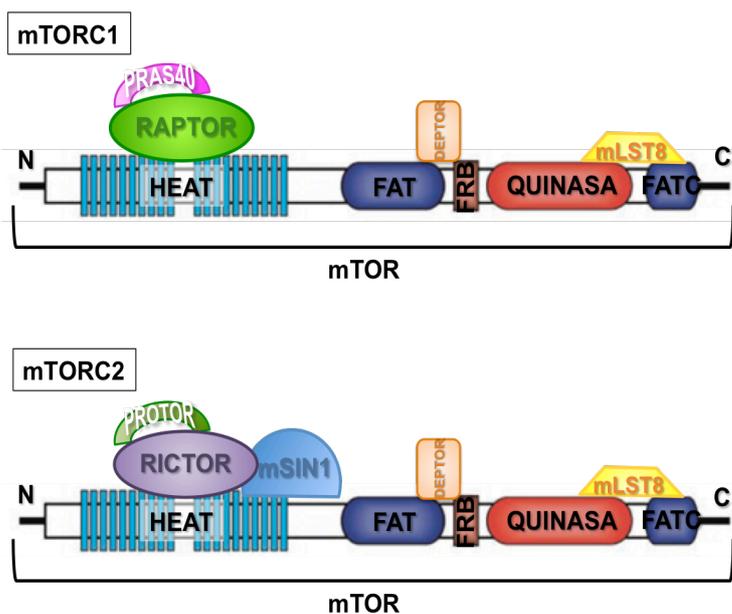


Figura 17. Estructura de mTOR y organización de mTORC1 y mTORC2. mTOR contiene varios dominios estructurales muy conservados, como 20 dominios HEAT (llamados así por encontrarse en las proteínas *Huntingtin*, *Elongation factor 3*, *PR65/A* y *TOR*) agrupados en su N terminal y probablemente implicados en uniones proteína-proteína, a los que sigue un dominio FAT (presente en los miembros de la familia PIKK *FRAP*, *ATM* y *TRRAP*) que también se encuentra en el extremo C terminal de la proteína con la denominación FATC. El dominio quinasa de mTOR está localizado entre este C terminal y el dominio FRB (*FKBP12/Rapamycin Binding*) de unión de la Rapamicina (Zoncu, Efeyan et al. 2011).

mTOR se encuentra formando parte de dos complejos proteicos diferentes, el complejo 1 (mTORC1) y el complejo 2 (mTORC2), que poseen elementos comunes y elementos exclusivos. Además de mTOR, las proteínas mLST8 (*mammalian Lethal with SEC13 protein 8*, también conocida como G β L) y DEPTOR (*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*) son comunes a los dos complejos, mientras que RAPTOR (*Regulatory-Associated Protein of mTOR*) y PRAS40 (*40 kDa PRo-rich AKt Substrate*, también conocida como *AKT1S1*) son específicos de mTORC1 y las proteínas RICTOR (*Rapamycin-Insensitive Companion of mTOR*), mSIN1 (también llamada MAPKAP1, es decir, *Mitogen-Activated protein Kinase-Associated Protein 1*) y PROCTOR (*PROtein Observed with RICTOR*) son exclusivas de mTORC2 (Foster

INTRODUCCIÓN

and Fingar 2010). Otra característica diferencial de estos dos complejos es su sensibilidad al inhibidor Rapamicina, un potente macrólido con propiedades antifúngicas secretado por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. A pesar de la capacidad de esta molécula de unirse al dominio FRB de mTOR, previo anclaje al receptor intracelular FKBP12 (*FK506-Binding Protein 12 kDa*), la Rapamicina es capaz de inhibir la actividad quinasa de mTOR cuando se encuentra formando parte del complejo mTORC1, mientras que su efecto sobre mTORC2 parece ser dependiente del tipo celular y del tiempo de tratamiento (Guertin and Sabatini 2009).

El complejo mTORC1 integra diversas señales intra y extracelulares que promueven procesos celulares anabólicos e inhiben procesos catabólicos. De esta manera, factores de crecimiento o nutrientes (Ej. Amino ácidos) promueven la activación de mTORC1 y, por lo tanto, también procesos dependientes de este complejo como son la síntesis de proteínas, el crecimiento y proliferación celular entre otros. Sin embargo, cuando los niveles de estos factores son insuficientes o la célula detecta señales de estrés la actividad de mTORC1 se reduce con objeto de mantener las tasas celulares de biosíntesis en niveles subóptimos. Además, esta reducción de la actividad de mTORC1 promueve la autofagia, un proceso celular que se da en respuesta a la escasez de nutrientes y por el cual la célula consigue la energía que necesita mediante el metabolismo de sus propios constituyentes para la obtención de aminoácidos y otras moléculas (Hosokawa, Hara et al. 2009).

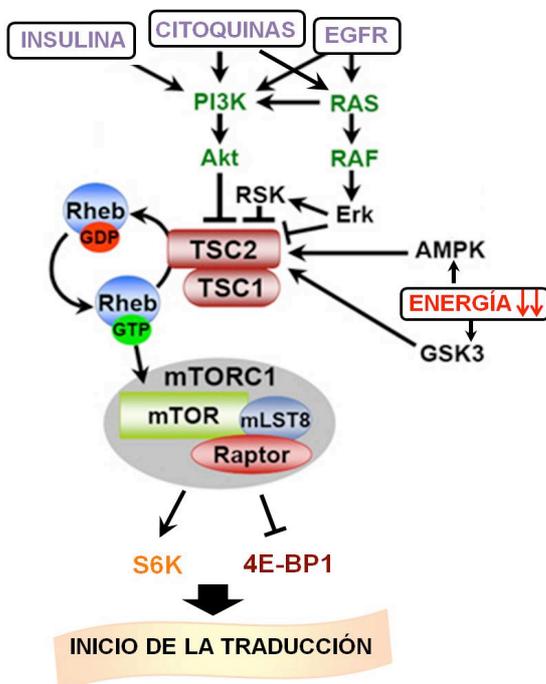


Figura 18. Esquema de los reguladores y efectores de mTORC1. Cuando la célula es estimulada con factores de crecimiento, aminoácidos o citoquinas, se activan diversas vías de señalización que convergen en el dímero TSC1/TSC2, al que inhiben. Una vez inhibido, este dímero deja de actuar como acelerador de la actividad GTPasa de Rheb, de manera que esta pequeña GTPasa se mantiene unida a GTP (activa) y puede, a su vez, activar a mTORC1. Cuando este complejo se encuentra activo es capaz de fosforilar y activar a S6K para que esta quinasa pueda, a su vez, fosforilar a la S6 ribosomal, y también a 4E-BP1, de forma que se libere del factor iniciador de la traducción eIF4B. Ambos eventos promueven el inicio de la traducción de ARNm y, por lo tanto, la síntesis de proteínas. En cambio, cuando la célula sufre de escasez de nutrientes, aumentan los niveles de AMP, lo cual es detectado por AMPK y por GSK3, que se activan y fosforilan a TSC2 en residuos que aumentan su actividad inhibidora de mTORC1, frenando así la síntesis proteica.

La regulación de la actividad de mTORC1 se lleva a cabo a través del heterodímero TSC1/TSC2 (*Tuberose Sclerosis Complex*). Este dímero inhibe a mTORC1, debido a que funciona como GAP (*GTPase Activating Protein*) de la pequeña GTPasa Rheb (*Ras homolog enriched in brain*) que es una potente activadora

de mTORC1. Así, TSC1/TSC2 promueven el paso de Rheb desde su estado activo (GTP-Rheb) a inactivo (GDP-Rheb), impidiendo de esta manera su acción sobre mTORC1 (Zhang, Gao et al. 2003). Se considera que el dímero TSC1/TSC2 es el principal regulador de mTORC1 ya que gran parte de las vías señalizadoras que controlan la actividad de este complejo, ya sea inhibiéndolo o activándolo, lo hacen alterando la función de TSC1/TSC2. En el caso de la inhibición, tanto Akt, efector de la vía de las PI3Ks, como Erk1/2 y p90^{rsk} (RSK), efectores de la vía de Ras/MAPK, fosforilan a TSC2 en residuos que bloquean su actividad (Huang and Manning 2008). También la quinasa AMPK ejerce su función reguladora de mTORC1 mediante la fosforilación de TSC2, pero en este caso lo hace en un residuo que aumenta su actividad, inhibiendo de esta manera a mTORC1. Se ha visto además que esta fosforilación de TSC2 mediada por AMPK facilita una posterior fosforilación activadora por parte de GSK3 β (Inoki, Ouyang et al. 2006).

mTORC1 tiene principalmente dos clases de efectores, que son las quinasas ribosomales S6K1 y S6K2 (a las que denominaré genéricamente S6K), y las proteínas de unión al iniciador de la transcripción eIF4E, 4E-BP1 y 4E-BP2 [*eIF4E (eukaryotic translation initiation factor 4E)-binding proteins 1 y 2*]. La fosforilación de S6K en el residuo Thr389 por mTORC1 activa a esta quinasa y la permite fosforilar a la proteína ribosómica S6 y el factor eIF4B para promover la transcripción del ARNm. Además, mTORC1 también puede actuar sobre la expresión de proteínas a nivel transcripcional mediante la fosforilación de 4E-BP1 en diversos motivos, que hace que se libere del factor eIF4E, el cual se encuentra unido al ARNm, y permite así el comienzo de la transcripción (Foster and Fingar 2010).

INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

En esta Tesis Doctoral nos planteamos como objetivo general el estudio de las funciones reguladas por la quimioquina CXCL12 en las células dendríticas maduras (CDs mad). Más concretamente nos propusimos estudiar los mecanismos moleculares empleados por dicha quimioquina para controlar la quimiotaxis y la supervivencia de estas células.

Los objetivos específicos que nos planteamos fueron los siguientes:

- 1) Analizar *in vitro* las funciones reguladas por la quimioquina CXCL12 en las CDs mad humanas.
- 2) Identificar en las CDs maduras el receptor quimiotáctico que controla los efectos de CXCL12
- 3) Estudiar *in vivo* las funciones que controla CXCL12 en las CDs mad mediante el empleo de CDs extraídas de ratón.
- 4) Identificar las moléculas señalizadoras mediante las cuales CXCL12 regula la quimiotaxis y la supervivencia en las CDs humanas y caracterizar las vías de señalización de que forman parte.

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos generales

Las quimioquinas CXCL12, CXCL11 (usados a 12,5 nM), CCL21 y CCL19 (usadas a 18 nM) y el TNF α (usado a 50 ng/ml) se adquirieron de PeproTech (Rocky Hill, NJ). rhIL-4 (IL4 humano recombinante) y rhGM-CSF se obtuvieron de Immunotools y se usaron a 1000 U/ml.

Los colorantes vitales CMFDA (5-clorometilfluoresceín diacetato) y CFSE (carboxifluoresceín diacetato succinimidil éster) son de Molecular Probes. FLIVOTM es un péptido inhibidor de caspasas, Val-Ala-Asp (OMe)-fluorometil ketona (VAD-FMK), conjugado a diferentes fluoróforos que puede ser empleado *in vivo*. Sulforodamina B (SR)-FLIVO (SR, λ_{abs} 565 nm; λ_{em} >600 nm) es una forma de FLIVO conjugada a Sulforodamina B que se obtuvo de Immunochemistry Technologies, LLC. El inhibidor general de PI3K (LY294002, utilizado a 100 μ M), el inhibidor específico de Akt1/2 (usado a 5 μ M), el antagonista de CXCR4 (AMD3100, usado a 10 μ M), la toxina pertúsica (usada a 100 ng/ml), la poli-L-lisina (PLL), el Hoechst 33342, la albúmina de suero bovino (BSA), el LPS (lipopolisacárido, usado a 100 ng/ml), el dextrano conjugado a FITC (Fluoresceína-5-isotiocianato) y los anticuerpos anti- α tubulina y anti- β actina se adquirieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). El compuesto bloqueante de CXCR7 (CCX733, usado a 10 μ M) fue proporcionado bajo un acuerdo de Material Transfer Agreement (MTA) por ChemoCentryx (Mt. View, CA). El ioduro de propidio (IP), los inhibidores específicos de PI3K α (PIK-75, usado a 250 nM), PI3K β (TGX-221, usado a 1 μ M) y PI3K γ (AS-605240, usado a 10 μ M), los inhibidores de Erk1/2 (UO126 y PD98059, usado ambos a 5 μ M) son de Calbiochem (Nottingham, UK). El inhibidor de isoforma PI3K δ (IC87114, 20 μ M) se obtuvo, bajo un acuerdo de Material Transfer Agreement (MTA), de ICOS Corporation (Bothell, WA). El inhibidor del complejo mTORC1 (Rapamicina, utilizada a 100 nM) se obtuvo de Tocris Bioscience (Ellisville, MO).

La anexina V conjugada a FITC, los anticuerpos conjugados a PE anti-CCR7 y anti-CD83 y el anticuerpo anti-CXCR4 son de BD Pharmingen (San Diego, CA). Los anticuerpos para analizar la expresión de CXCR7 por citometría de flujo fueron proporcionados por el Dr. Marcus Thelen (Institute for Research in Biomedicine, Bellinzona, Suiza) y por el Dr. Thomas Schall (Departamento de Fisiología, Universidad de Vanderbilt Nashville, TN).

El anticuerpo anti-Bim se obtuvo de Affinity BioReagents (Golden, CO). Los anticuerpos anti- β ARK y anti-G α_i son de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Los anticuerpos anti PI3K p110 β , anti-FoxO1, anti-FoxO3, anti-fosfo-FoxO1 (fosfo-Ser256 y fosfo-Thr24), anti-fosfo-FoxO3 (fosfo-Ser253), anti-fosfo-Erk1/2 (reconoce fosfo-Thr202 y fosfo-Tyr204 en Erk1, y fosfo-Thr185 y fosfo-Tyr187 en Erk2), anti-TSC2, anti-fosfo-TSC2 (fosfo-Thr1462), anti-fosfo-p70 S6K (fosfo-Thr389), anti-fosfo-

MATERIALES Y MÉTODOS

Akt (fosfo-Ser473), anti-mTOR, anti-fosfo-mTOR (fosfo-Ser 2448) y anti-fosfo-4E-BP1 (fosfo-Thr37 y 46) son de Cell Signaling Technology (Beverly, MA).

Animales

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 siguiendo las especificaciones del Comité de Ética del Centro de Investigaciones Biológicas con respecto al 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*, *Cambrex*) a una concentración de $0,8-1 \times 10^6$ células/ml. Posteriormente se induce su diferenciación hacia célula CDs añadiendo GM-CSF (1000 U/ml) e IL4 (1000 U/ml). 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 (Sallusto 1994). 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 5 mM 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 posteriormente se centrifuga esta suspensión a 1500 rpm. El precipitado celular de resuspende en buffer de MACS (2mM EDTA y 0,5% BSA en PBS) 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 10% FBS a una concentración de 1×10^6 células/ml (Aliberti, Reis e Sousa et al. 2000; Ivankovic-Dikic, Gronroos et al. 2000).

3. Linfoblastos

Los linfoblastos fueron obtenidos a partir de las células CD14 negativas resultantes de la purificación de monocitos de “*Buffy coats*” (ver apartado 1 de “**Cultivos celulares**”). Estas células se trataron con 10 $\mu\text{g/ml}$ de fitohemaglutinina (PHA-L, Pharmacia, Barcelona) durante 48 horas en medio RPMI 10% FCS. Los linfoblastos T humanos obtenidos proliferaron en dicho medio suplementado con 50 U/ml de IL-2 y fueron empleados en los experimentos transcurridos 10-12 días de su obtención (Cabañas and Hogg 1993; Qin, Rottman et al. 1998).

RT-PCR

El ARN total de las células fue extraído empleando el kit RNeasy Mini Kit de Qiagen. A partir de dicho ARN se obtuvo el ADNc mediante el kit de síntesis de ADNc High Fidelity (Roche, Mannheim, Alemania). El ADN resultante fue amplificado por PCR empleando la Taq polimerasa de Roche y los siguientes oligonucleótidos: para CXCR7 5'-TGGTCAGTCTCGTGCAGCAC-3' y 5'-GCCAGCAGACAAGGAAGACC-3', (Infantino, Moepps et al. 2006) y para la GAPDH que se empleó como control, 5'-GGCTGAGAACGGGAAGCTTGTC-3' y 5'-CGGCCATCACGCCACAGTTTC-3. Las mezclas fueron incubadas a 95°C durante 5 min para la desnaturalización inicial, y posteriormente se aplicaron 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, anillado a 58°C durante 45 segundos y extensión a 72°C durante otros 45 segundos. La reacción terminó tras una fase final de extensión de 10 min a 72°C. Los productos de la PCR se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa.

Análisis de la quimiotaxis

La quimiotaxis en respuesta a las quimioquinas CXCL12, CXCL11 ó CCL21 se determinó contando el número de células que migraban a través de cámaras de *Transwell* que incluyen filtros de policarbonato de 5 μm de diámetro (Costar, Europe) insertadas en placas de 24 pocillos. En la cámara superior se colocaron 10^5 CDs en 100 μl de RPMI 0.1% BSA, y en la cámara inferior 600 μl del mismo medio incluyendo o no la quimioquina a la concentración indicada. Tras 120 min, las CDs que migraron hacia la cámara inferior se contaron por citometría de flujo empleando el software *CellQuest* (BD Biosciences, San Diego, CA). Para medir la quimiotaxis se calculó el porcentaje de CDs que se obtuvieron en la cámara interior en presencia de la quimioquina con respecto del número de células de partida.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cuando se usaron inhibidores, las CDs fueron pretratadas durante 1 hora a 37° C (excepto en el caso de la PTX, cuyo tiempos de pretratamiento fue de 2 horas). En los experimentos con cámaras de tipo *Transwell*, el inhibidor se colocó tanto en la cámara superior como en la inferior a lo largo de todo el experimento de quimiotaxis.

Análisis de la adhesión

Para realizar los ensayos de adhesión primero se inmovilizaron 0.25 µg/ml de fibronectina en PBS sobre placas (de 96 pocillos fondo plano) durante 12 h a 4° C. Las placas se bloquearon 1 h con BSA 1% a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con PBS. Las CDs en cultivo se lavaron en RPMI 0.1% BSA 20 mM Hepes y se depositaron en los pocillos a razón de 50x10³ CD/pocillo. Posteriormente se dejaron adherir, en presencia o en ausencia de CXCL12 o de MgCl₂ (20 mM), que fue empleado como control positivo. Tras 30-40 min de adhesión, las CDs no adheridas se lavaron con PBS. Tras los lavados las CDs que permanecieron adheridas se fijaron con formaldehído al 3% en PBS durante 10 minutos, se permeabilizaron con metanol al 2% en PBS durante 2 minutos y se tiñeron con una solución de cristal violeta 0.5% metanol 20% durante 90 segundos. Tras eliminar el exceso de colorante y redissolver el cristal violeta en una solución 1:1 de citrato sódico 0.1 M pH 4.2 y etanol absoluto, la adhesión se cuantificó mediante un lector de ELISA midiendo la absorbancia a 540 nm.

Análisis de la velocidad migratoria y de la fugotaxis

Para analizar si la motilidad de las células es alterada por la quimioquina CXCL12 empleamos un método cualitativo y otro cuantitativo.

Por un lado realizamos ensayos de *Checkerboard* (Martinet, Martinet et al. 1994). Este tipo de ensayo permite dilucidar si un determinado tratamiento induce quimiocinesis, es decir, incrementa la motilidad de las CDs. Para ello se colocaron las células en las mismas condiciones indicadas anteriormente pero incluyendo la quimioquina en las cámaras superior e inferior. Se considera que la quimioquina induce quimiocinesis si el número de células que migra cuando la quimioquina se encuentra en ambas cámaras es estadísticamente superior a la migración basal en ausencia de quimioquinas.

Alternativamente, la velocidad de migración se cuantificó mediante el uso del equipo de microscopía multidimensional AF6000 LX de Leica. Para este fin, a las CDs (en RPMI 0.1% BSA), se les permitió adherirse sobre fibronectina (0.25 µg/ml) durante 30 minutos. Tras ese tiempo, el movimiento de las células fue registrado mediante una cámara monocroma Hamamatsu CCD C9100-02 de alta resolución conectada a un microscopio de óptica invertida Leica DMI6000B durante 3 horas más. Se midieron las trayectorias de más de al menos 30 células en cada condición utilizando el programa

WCIF ImageJ (Wayne Rasband National Institutes of Health, USA), y se calculó la velocidad de movimiento de cada célula en $\mu\text{m}/\text{seg}$.

Para analizar la quimiotaxis se utilizó el sistema de *Transwell* añadiendo quimioquina solamente en la cámara superior y se contabilizó el número de células que migraron al pocillo inferior al cabo de 120 minutos.

Análisis de la endocitosis

Para determinar si las quimioquinas inducían endocitosis en las CDs se llevó a cabo un ensayo que permite medir la captación de dextrano-FITC por parte de las mismas. Para la realización de dicho ensayo las CDs, a razón de 75×10^3 células por punto, se mantuvieron en RPMI 10% FCS con 20 mM HEPES y se añadió el marcador endocítico (dextrano conjugado a FITC) a una concentración final de 1 mg/ml, así como las quimioquinas que correspondiesen. Al cabo de los tiempos indicados en cada caso la reacción se paró añadiendo PBS frío y poniendo las células en hielo. Las CDs fueron entonces lavadas dos veces con PBS frío y resuspendidas en ese mismo buffer para su posterior análisis por citometría de flujo. Se tomó como valor de la endocitosis ocurrida en cada condición al producto de la Intensidad Media de Fluorescencia multiplicado por el porcentaje de CDs que adquirieron el dextrano. La medida de la señal obtenida tras la incubación de las CDs con el FITC-dextrano en hielo sirvió como valor del ruido de fondo de la reacción.

Western Blot

Las CDs (50×10^3 células por punto) fueron incubadas durante 30 minutos en RPMI para reducir el nivel de actividad basal de las moléculas señalizadoras estudiadas. A continuación fueron estimuladas o no a los tiempos indicados con la quimioquina indicada. La estimulación se detuvo solubilizando las células en tampón de carga 2 \times 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% Tween 20) pH 7.5, se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en TBST 5% BSA. Antes y después de incubar las membranas una hora con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (1:5000 en TBST, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 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.

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 las tinciones con FITC y CFSE se analizaron en el canal FL1 y para tinciones realizadas con PE y IP empleamos el canal FL2. El análisis posterior se llevó a cabo con el programa CXP Analysis (Beckman Coulter).

Microscopía de fluorescencia y confocal

Tanto el análisis de las tinciones con Hoechst 33342 para detectar apoptosis como el estudio de la localización nuclear o citoplasmática de GFP (pGFP 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.).

Vectores de expresión, siRNAs y nucleofecciones

El vector de expresión de GFP, pEGFP-C1 se obtuvo de Clontech (BD Biosciences, Palo Alto, CA). La construcción que codifica FoxO1 fusionado a GFP fue proporcionada por el Dr. Ferry G. Unterman (VA Chicago Health Care System, Chicago, USA). 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. β Ark-CT es una construcción que incluye un minigen que codifica la parte carboxilo terminal de la quinasa del receptor β adrenérgico y que actúa como péptido inhibidor de la señalización a partir de $G\beta\gamma$ (Koch, Hawes et al. 1994). Está subclonado en el vector de expresión pRK5 y tanto β Ark-CT como el propio vector de expresión fueron cedidos por el Dr. Robert Lefkowitz (Howard Hughes Medical Institute, Duke University, NC).

Los ARNs de interferencia (siRNA; *small interfering RNA*) dirigidos contra FoxO1 y FoxO3 son de Santa Cruz Biotechnology.

Las CDs fueron nucleofectadas con 5 µg de los cDNAs antes indicados o con 0,8 µg de siRNA. La nucleofección se realizó utilizando el nucleofector y el kit de nucleofección de CDs (Lonza, Basel, Suiza) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Ensayos de apoptosis

Se indujo apoptosis en las CDs mediante la privación suero (que incluye factores de crecimiento, citoquinas y otros factores inductores de supervivencia). Para ello empleamos el mismo número de CDs viables de partida (determinado mediante exclusión de la tinción con Tripán Blue). Para inducir apoptosis estas CDs son incubadas en RPMI durante las horas indicadas. Los tratamientos, ya sean con quimioquinas o con inhibidores, se añaden a las CDs incubadas en RPMI desde el comienzo del experimento. Tras el tiempo indicado en cada caso 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 (Loo 1998). 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 PFA al 4% durante 15 min, se permeabilizaron con metanol frío durante 10 minutos más, 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 Anexina-V-FITC. Incubamos durante 15-20 minutos a temperatura ambiente 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 (IP) a una concentración final de 1 µg/ml, y consideramos sólo las CDs que son Anexina-V+/IP-. El análisis de esta tinción se realiza mediante citometría de flujo (Sanchez-Sanchez 2004).

Ensayos de quimiotaxis y apoptosis en ratón

1. Análisis *ex vivo* de la quimiotaxis de las CDs a los ganglios poplíteos

Tras obtener las CDs de bazo como se explicó anteriormente, éstas fueron teñidas con el colorante vital CFSE (5 μM) 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 a una concentración de 2×10^6 CDs/ 25 μl RPMI. Se realizaron inyecciones subcutáneas en las almohadillas plantares traseras de ratones C57BL/6, inyectándose 2×10^6 CDs en cada pata junto con LPS (100 ng/ml) así como con AMD 3100 (4mg/kg de ratón) en el caso de los ratones “problema”, o con el mismo volumen de PBS en el caso de los ratones control. Después de 18 horas, que es el tiempo necesario estimado para que las CDs inyectadas lleguen a los ganglios poplíteos (Mempel, Henrickson et al. 2004), los animales fueron sacrificados y se extrajeron los ganglios poplíteos. Estos ganglios se disgregaron en PBS 5 mM EDTA para obtener una suspensión celular. Mediante citometría de flujo se analizó el porcentaje de células CFSE+ con respecto al número total de células presentes en los ganglios en cada caso.

2. Análisis *in vivo* de la apoptosis de las CDs en los ganglios poplíteos

De la misma manera que para el ensayo anterior, las CDs procedentes de bazos de ratones fueron teñidas con el colorante vital CMFDA, a una concentración de 5 μM , durante 30 minutos, y posteriormente inyectadas en las almohadillas plantares junto con 100 ng/ml de LPS. Tras 18h, cuando las CDs se encontraban ya en los ganglios poplíteos, se realizó una inyección intraperitoneal de 4mg/kg de AMD 3100 ó de PBS en los animales tratados y en los de control, respectivamente. Tras 22 horas, tanto los animales tratados como los controles fueron inyectados con SR-FLIVO por vía intravenosa. Una hora 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 minutos), se lavaron con PBS y se montaron entre dos cubreobjetos de vidrio con medio de montaje para muestras fluorescentes (Prolong Gold, Molecular Probes).

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 μm tomando imágenes cada 2 μm . 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 (Riol-Blanco, Delgado-Martin et al. 2009). De este modo evitamos posibles mediciones erróneas como consecuencia de un cruce de canales.

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 los valores con una $p < 0,05$. “N” indica el número de experimentos independientes llevados a cabo.

MATERIALES Y MÉTODOS

RESULTADOS

1. CXCL12 regula quimiotaxis y supervivencia en las CDs pero no velocidad migratoria, fugotaxis, endocitosis ni maduración.

Con el fin de estudiar las funciones reguladas por la quimioquina CXCL12 en las CDs obtuvimos monocitos a partir de sangre periférica de donantes sanos y los diferenciamos hacia CDs maduras (ver “**Materiales y Métodos**”). Con estas células llevamos a cabo ensayos de quimiotaxis en respuesta a un gradiente de CXCL12 mediante el sistema de *Transwell* (ver “**Materiales y Métodos**”). En cada experimento tomamos como medida de la quimiotaxis el porcentaje de CDs que habían migrado hacia el pocillo inferior en presencia de CXCL12 con respecto al número total de CDs empleadas. En todos los experimentos realizados el porcentaje de migración hacia CXCL12 (quimiotaxis) fue significativamente mayor que el porcentaje de migración basal de las CDs. Concretamente las CDs migraron de media 49 ± 5 veces más siguiendo el gradiente de la quimioquina (**Figura 1Ai**). Para descartar que el efecto observado fuese causado por una posible alteración en la adhesión de las CDs inducida por CXCL12, se realizaron ensayos de adhesión estática de estas células sobre una matriz de fibronectina (FN) (ver “**Materiales y Métodos**”). Dado que no se observó efecto alguno de CXCL12 sobre la adhesión de estas células (**Figura 1Aii**) se puede interpretar que los resultados obtenidos en los ensayos de *Transwell* se deben exclusivamente al efecto de la quimioquina sobre la quimiotaxis de las CDs. Este resultado corrobora en nuestro modelo experimental las observaciones publicadas por otros grupos (Kabashima 2007; Ouwehand, Santegoets et al. 2008).

Se ha visto en el caso del receptor CCR7 que una misma quimioquina es capaz de controlar tanto la dirección de la migración de las CDs (quimiotaxis) como la velocidad de su movimiento (Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al. 2005). Para analizar si CXCL12 también era capaz, de la misma manera, de regular la velocidad de la migración de las CDs utilizamos dos estrategias diferentes, una cualitativa y otra cuantitativa. En primer lugar recurrimos al denominado ensayo de tipo “*Checkerboard*”, consistente en añadir CXCL12 tanto en el pocillo inferior como en el pocillo superior del sistema de *Transwell* ya descrito (ver “**Materiales y Métodos**”). De esta manera, aunque las CDs están inmersas en quimioquina, no se establece ningún gradiente. Si la presencia de la quimioquina en ambas cámaras hubiese aumentado la migración de las CDs con respecto a su migración basal, estaríamos hablando de un aumento de la motilidad, o quimiocinesis, de dichas células inducido por la quimioquina (**Figura 1Bi**), como ocurre cuando dicho experimento se realiza con CCL21, un ligando de CCR7. En el caso de CXCL12 este aumento no se produce, lo cual indica que esta quimioquina no induce quimiocinesis en las CDs.

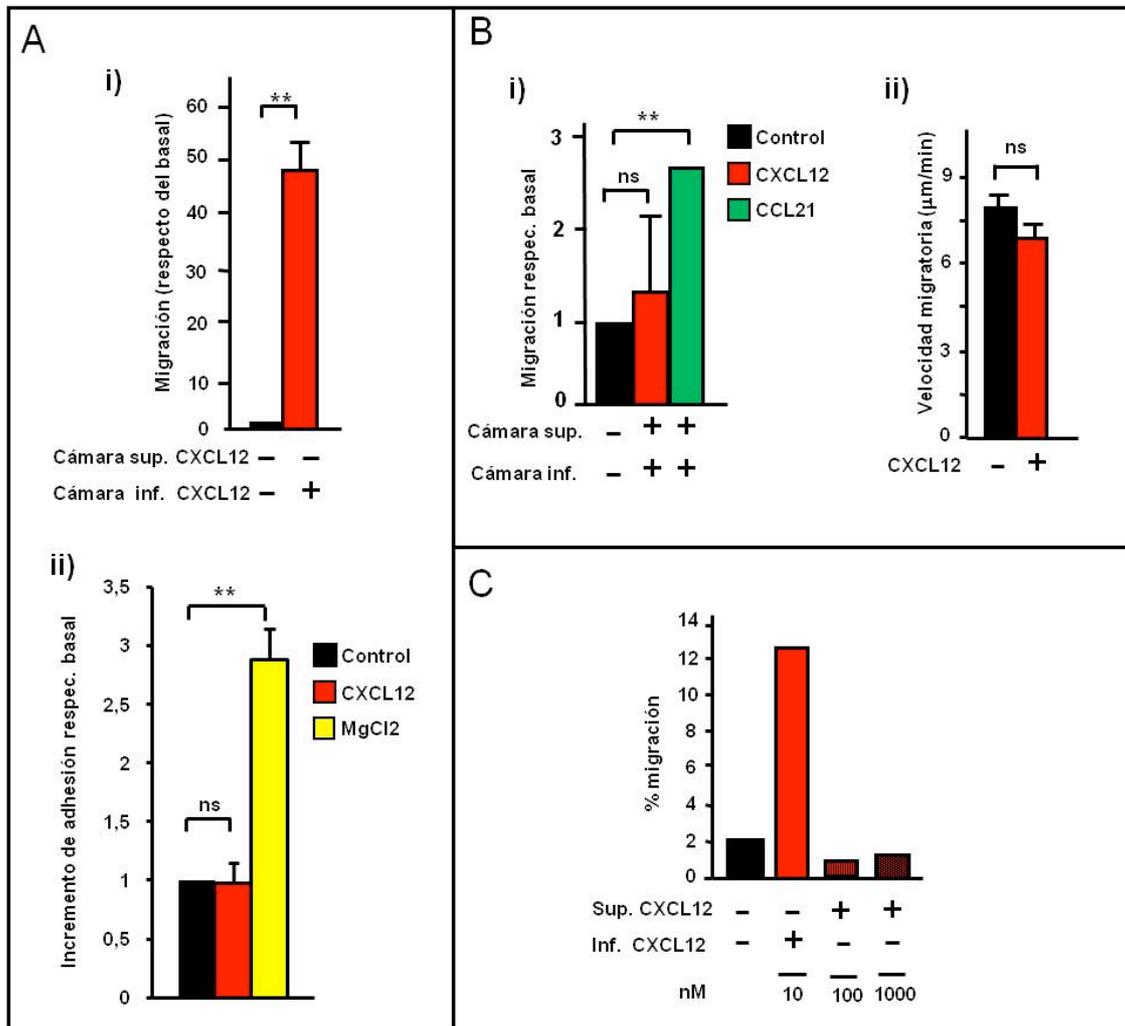


Figura 1. CXCL12 regula la quimiotaxis pero no la motilidad ni la fugotaxis de las CD. **A** **(i)** Se realizó un ensayo tipo *Transwell* (ver “**Materiales y Métodos**”) con o sin CXCL12 en el pocillo inferior. Tras 120 min, las CD que migraron hacia la cámara inferior se contaron mediante citometría (representación de la media \pm SEM del aumento de la migración de las CD en presencia de CXCL12 con respecto a la migración basal. $**p \leq 0.01$. N=60 experimentos). **(ii)** Se resuspendieron las CD en RPMI 0,1% BSA y se colocaron en pocillos tapizados con FN durante 40 min en presencia o no de CXCL12. Se añadió MgCl2 como control positivo. Tras lavar con PBS y fijar con formaldehído se tiñeron las células con cristal violeta y se midió la absorbancia a 540 nm de cada pocillo (se representa la media \pm SEM de los valores relativos de absorbancia. $**p \leq 0.01$. N=3 experimentos). **B** Para analizar la motilidad celular se empleó primero **(i)** un ensayo en *Transwell* de *Checker Board* añadiendo CXCL12 ó CCL21 como control también en el pocillo superior (se representa la media \pm SEM del aumento de porcentaje de migración con respecto al basal. $**p \leq 0.01$. N=3 experimentos) y también se midió, mediante videomicroscopía, **(ii)** la velocidad de migración de las CD adheridas a fibronectina en presencia o ausencia de CXCL12 (se representa la media \pm SEM de la velocidad migratoria medida en μm por minuto. N=3 experimentos). **C** Se analizó la posible fugotaxis de las CD respecto de CXCL12 mediante un análisis tipo *Transwell* en el que se añadieron también dos concentraciones de CXCL12 sólo en los pocillos superiores (en la gráfica se muestra el porcentaje de células que migran al pocillo inferior en un experimento representativo. N=3 experimentos).

Para complementar esta observación realizamos experimentos de videomicroscopía en los que las CD, a las que se les había permitido adherirse sobre una matriz de FN, eran estimuladas con CXCL12 ó con PBS, que fue empleado como control. Registramos las trayectorias de cada CD mediante un videomicroscopio y analizamos las imágenes obtenidas para cuantificar la velocidad a la que se movían las

células en cada caso (**Figura 1Bii**). El resultado fue que la velocidad media de las células, de 8 $\mu\text{m}/\text{minuto}$, no variaba de forma significativa en presencia de CXCL12.

Se ha observado en diferentes poblaciones de células T que CXCL12 es capaz de inducir fagotaxis, es decir, de hacer que las células migren en contra del gradiente de esta quimioquina (Poznansky, Olszak et al. 2000; Vianello, Kraft et al. 2005). Quisimos comprobar si CXCL12 inducía el mismo tipo de quimiorrepulsión en las CDs, para lo cual empleamos de nuevo el sistema de *Transwell* ya mencionado. En este caso la quimioquina, en dos concentraciones diferentes, fue colocada sólo en el pocillo superior, de manera que si se hubiese producido una quimiorrepulsión causada por CXCL12 el número de CDs contabilizadas en el pocillo inferior habría sido mayor que en el control sin quimioquina (**Figura 1C**). Sin embargo, la migración de las CDs no varió en ningún caso, lo que indica que CXCL12 no regula fagotaxis en estas células.

Otra de las funciones de las CDs maduras que se ha visto que puede ser regulada por quimioquinas es su capacidad endocítica (Yanagawa and Onoe 2003). Esta característica es de vital importancia para que las CDs inmaduras puedan llevar a cabo su cometido de captación de patógenos y presentación antigénica (Rossi and Young 2005), pero se ha observado que dicha capacidad se mantiene durante y tras la maduración de estas células (Drutman and Trombetta 2010; Platt, Ma et al. 2010). Quisimos saber si también CXCL12 podía modular esta función en las CDs maduras, para lo cual analizamos la cantidad de dextrano conjugado a FITC que las CDs eran capaces de captar a 37°C tras estimularlas durante 5 ó 30 minutos con CXCL12 (**Figura 2A**). Tomamos como control positivo el aumento de la endocitosis de este péptido tras la estimulación de las CDs con CCL19, quimioquina que incrementa la capacidad endocítica de las CDs (Yanagawa and Onoe 2003), y pudimos observar que la cantidad de marcaje FITC-dextrano en las CDs en presencia de CXCL12 era similar al detectado en las células sin tratar, lo que indica que la estimulación de las CDs con esta quimioquina no altera su capacidad endocítica.

Kabashima y colaboradores (Kabashima, Sugita et al. 2007) han observado que CXCL12 regula la maduración de su modelo de CDs de ratón, de modo que quisimos analizar si un fenómeno similar se producía en las CDs humanas derivadas de monocito. Para ello tomamos CDs inmaduras tras 7 días de cultivo en medio completo con las citoquinas GM-CSF e IL-4 y añadimos una dosis sub-óptima del estímulo madurativo (12,5 ng/ml de TNF α) junto con CXCL12 ó con CCL19, que se ha observado que induce la maduración de las CDs, como control positivo (Marsland, Bättig et al. 2005). Tras 15 horas de cultivo se midió mediante citometría de flujo la expresión en la membrana celular de algunos marcadores fenotípicos de maduración de CDs como son las proteínas CD83, CD86 y CCR7 (**Figura 2B**). A diferencia de lo que ocurre tras la estimulación con CCL19, la presencia de CXCL12 no altera la expresión en membrana de dichos marcadores, que se mantienen en niveles equivalentes al control sin quimioquina, lo que sugiere que en las CDs humanas CXCL12 no regula la maduración.

RESULTADOS

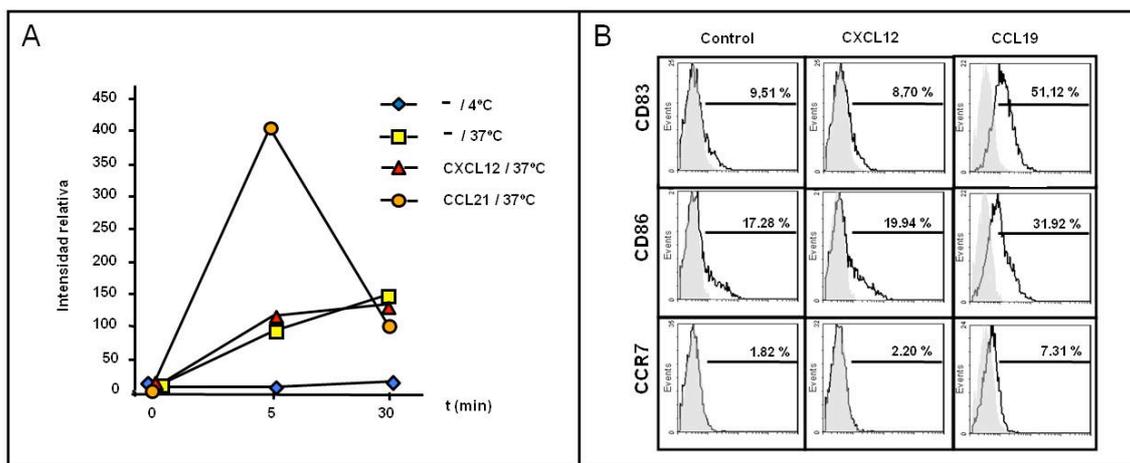


Figura 2. CXCL12 no regula la endocitosis ni la maduración de las CD. **A)** Las CD fueron incubadas a 37°C con FITC-dextrano (un péptido sintético marcado con el colorante FITC que las CD pueden capturar por la vía endocítica) durante los tiempos indicados y en presencia o en ausencia de CXCL12. Se empleó la quimioquina CCL19, que induce endocitosis en las CD, como control positivo. Como control negativo se incubaron las CD con FITC-dextrano a 4°C. El valor de “Intensidad relativa de fluorescencia” se obtiene de multiplicar la intensidad media por el porcentaje de células marcadas en cada caso (se muestra un experimento representativo. N=3 experimentos). **B)** Para analizar el grado de maduración de las CD se incubaron las CD inmaduras con los anticuerpos que reconocen las proteínas de membrana CCR7, CD86 y CD83, cuya expresión aumenta en las CD maduras, y se analizó la expresión de dichos marcadores mediante citometría en presencia o en ausencia de CXCL12. Se empleó la quimioquina CCL19, que induce la maduración de las CD, como control positivo (se muestra un experimento representativo. N=2 experimentos).

Otros grupos han demostrado el papel de CXCL12 en la supervivencia de varios tipos celulares, incluyendo diferentes tipos de células cancerosas (Yan Zhou 2002; Kryczek, Wei et al. 2007), células madre (Lataillade, Clay et al. 2002) y leucocitos (Suzuki 2001; Vlahakis 2002). A la vista de estos datos decidimos estudiar si también en las CD humanas maduras derivadas de monocito la quimioquina CXCL12 inducía protección ante la apoptosis inducida por la privación de los nutrientes y otros factores inductores de la supervivencia presentes en el suero. Para ello se transfirieron las células del medio completo a un medio carente de suero (RPMI solo), al que se añadió CXCL12 ó un volumen similar de PBS en el caso del control. Tras un periodo de 40 horas de privación de suero se analizó el porcentaje de CD que habían sufrido apoptosis.

Existen varias estrategias para la detección de células apoptóticas, todas ellas basadas en el análisis de características morfológicas o bioquímicas asociadas a este proceso (Saraste 2000). Elmore clasificó los ensayos de detección de apoptosis en 6 tipos en función del indicador de apoptosis analizado: (i) alteraciones citomorfológicas, (ii) fragmentación del ADN, (iii) detección de caspasas, sustratos proteolizados, reguladores e inhibidores, (iv) alteraciones de la membrana, (v) detección de apoptosis en muestras completas de tejido (vi) ensayos mitocondriales. (Elmore 2007). Nosotros hemos optado por métodos de dos tipos. En el primero nos basamos en la observación de modificaciones en la morfología del núcleo (tipo (i)), como es el cambio en la condensación y la fragmentación de la cromatina, que puede ser observado mediante tinción con Hoechst 33342 (**Figura 3A**). Esta técnica es una de las más fiables dado que

la condensación nuclear es exclusiva del proceso apoptótico, por lo que fue la técnica de elección en el resto de la presente tesis. Tras cuantificar el número de CDs que presentaban núcleos condensados o fragmentados después de la privación de suero pudimos observar que el porcentaje de células en proceso de apoptosis en presencia de CXCL12 era un 48,3% con respecto del control, es decir, CXCL12 indujo una reducción de casi un 52% en la apoptosis en estas células.

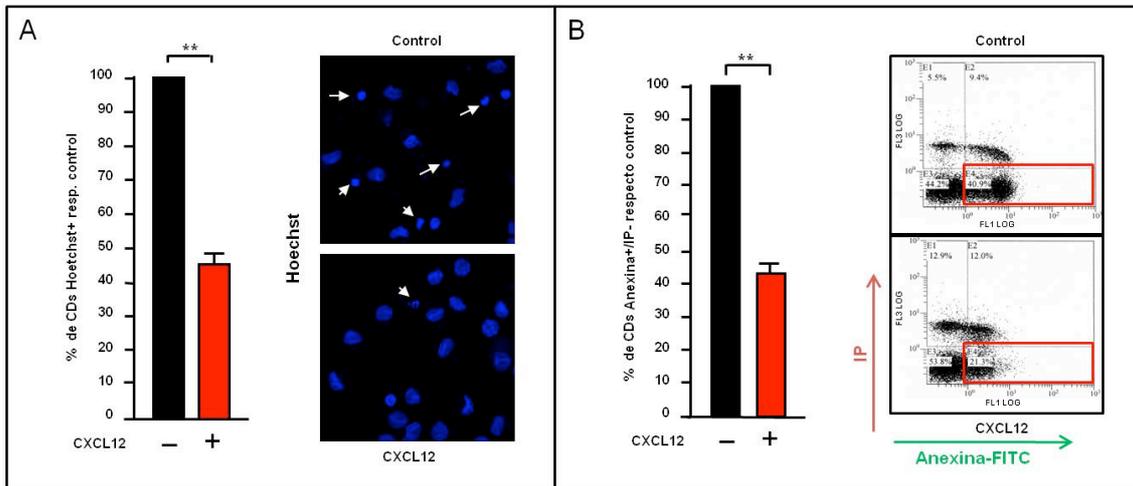


Figura 3. CXCL12 regula la supervivencia de las CDs. Las CDs se mantuvieron en RPMI durante 40 horas en presencia o en ausencia de CXCL12. La apoptosis de las CDs tras ese período se analizó de dos formas. **A)** Mediante tinción con Hoetchst, se contabilizó la cantidad de núcleos fragmentados o condensados, indicadores de muerte celular por apoptosis (se representa la media \pm SEM del porcentaje de CDs con núcleos apoptóticos en presencia de CXCL12 con respecto al control sin quimioquina. $**p \leq 0.01$. N=12 experimentos). **B)** Tras la tinción de las CDs con Anexina FITC e Ioduro de Propidio (IP) se analizaron por citometría las CDs teñidas y se consideraron apoptóticas aquellas que presentaban tinción para Anexina pero no para IP (se representa la media \pm SEM del porcentaje de CDs Anexina+ y IP- con respecto del control sin quimioquina. $**p \leq 0.01$. N=3 experimentos).

También se cuantificó la presencia de fosfatidil serina (PS) en la cara externa de la membrana plasmática de las células mediante el estudio de la unión de anexina V-FITC analizada por citometría de flujo (**Figura 3B**) (detección de alteraciones en la membrana, tipo (iv)). El porcentaje de CDs FITC positivas fue, consistentemente con lo obtenido anteriormente, menor en el caso de las células cultivadas en presencia de CXCL12 que en el control, en este caso un 43,8% con respecto al 100% del control, es decir, se produjo una reducción de más del 56% en la apoptosis de las CDs.

Los resultados obtenidos mediante las técnicas descritas demuestran que, en las CDs humanas derivadas de monocitos, la quimioquina CXCL12 induce protección ante la apoptosis generada por la eliminación de los factores presentes en el suero. Durante el desarrollo de esta tesis resultados similares fueron publicados por Hernández-López y colaboradores en CDs tímicas humanas (Hernández-López 2008), y por Kabashima y colaboradores en CDs de ratón derivadas de médula ósea (Kabashima, Sugita et al. 2007).

La conclusión, por tanto, de este apartado es que la quimioquina CXCL12 induce tanto quimiotaxis como aumento de la supervivencia de las CDs humanas

RESULTADOS

derivadas de monocito, pero no regula la adhesión en ausencia de flujo, la velocidad migratoria, la fagotaxis, la capacidad endocítica o la maduración de estas células.

2. La quimiotaxis y la supervivencia dependientes de CXCL12 en las CD_s humanas están reguladas por CXCR4 pero no por CXCR7

Como se ha comentado en la introducción, CXCL12 puede unirse a dos receptores, CXCR4 y el más recientemente descubierto CXCR7 (Balabanian, Lagane et al. 2005). Quisimos clarificar cuál de los dos receptores estaba implicado en cada una de las dos funciones que CXCL12 regula en las CD_s.

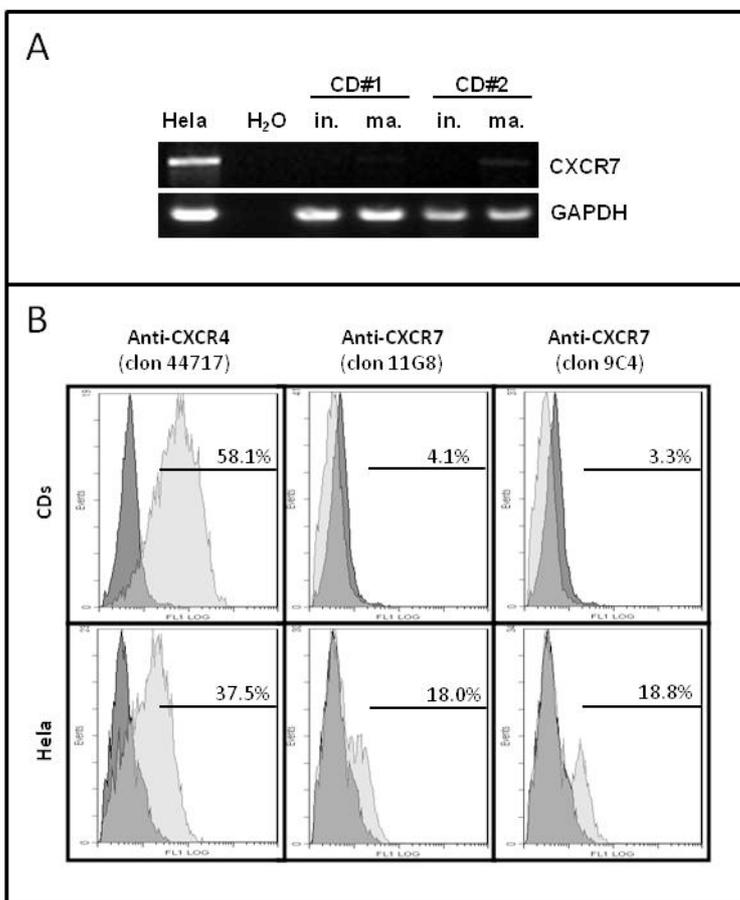


Figura 4. CXCR7 no se expresa en las CD_s. A) Se extrajo el ARN de CD_{inm}, de CD_{mad} de 2 donantes independientes y de células HeLa y fue sometido a retrotranscripción. El ADN resultante, o similar volumen de agua como control negativo del proceso, se amplificó empleando unos oligonucleótidos diseñados contra la secuencia génica de CXCR7. Se amplificó GAPDH como control de que los niveles de ADN eran similares en todos los casos. B) Las CD_s fueron incubadas con un anticuerpo que detecta CXCR4 y con dos anticuerpos diferentes que reconocen específicamente CXCR7. La expresión de ambos receptores fue analizada por citometría. Se empleó la línea celular HeLa, que sí expresa CXCR7, como control positivo. Se presenta la expresión de cada uno de los receptores (gris claro) comparada con el marcaje obtenido empleando un anticuerpo irrelevante (gris oscuro). (Experimento representativo. N=3 experimentos).

Dada la controversia con respecto a CXCR7 que encontramos en la literatura, tanto en cuanto al tipo de señalización que desencadena como a las funciones que regula e incluso a si se expresa o no en determinado tipo celular, decidimos empezar con el estudio de su nivel de expresión en nuestro modelo celular. Durante el desarrollo de esta tesis se ha publicado un trabajo del doctor T.J. Schall y colaboradores, en el que afirman que CXCR7 no se expresa en leucocitos humanos o de ratón (Berahovich, Zabel et al.); sin embargo, en dicha publicación no se hace referencia a la presencia o no de CXCR7 en CD_s, y a la vista los datos de Infantino y colaboradores (Infantino, Moepps et al.

2006) decidimos primeramente analizar mediante PCR la presencia del ARN mensajero de CXCR7 en las CDs. Para ello, extrajimos el ARN de CDs inmaduras y maduras, así como de células Hela, que fueron empleadas como control positivo. Mediante un ensayo de retrotranscripción obtuvimos el ADN correspondiente y, posteriormente, amplificamos dicho ADN por PCR empleando unos oligonucleótidos específicos para la secuencia de CXCR7. Como se observa en la **Figura 4B**, al correr el resultado de la amplificación en un gel de agarosa pudimos comprobar que las CDs humanas, a diferencia de las células Hela, expresan muy poco o nada CXCR7.

Dado que este resultado estaba en clara oposición a lo observado por Infantino y colaboradores, quisimos comprobar también si podíamos detectar CXCR7 en la membrana de las CDs humanas. Para ello incubamos por un lado CDs maduras y por otro células Hela, que nos sirvieron como control positivo de expresión de CXCR7, con un anticuerpo anti-CXCR4, con dos anticuerpos anti-CXCR7 diferentes (cedidos generosamente por los doctores T. Schall y M. Thelen) y con un anticuerpo control, y medimos el marcaje en cada caso mediante citometría de flujo. Como se puede observar en la **Figura 4B**, el receptor CXCR4 se expresa abundantemente en la membrana de los dos tipos celulares mostrados, mientras que ninguno de los dos anticuerpos anti-CXCR7 detecta este receptor en la membrana de las CDs.

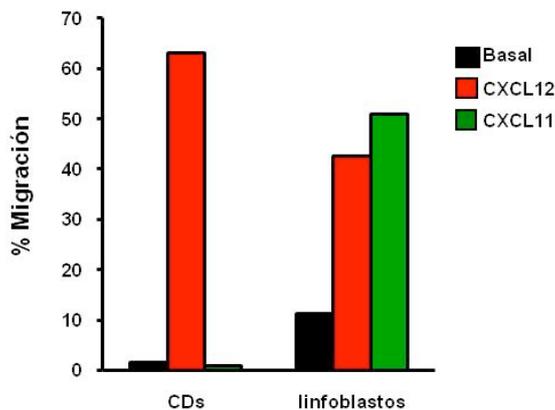


Figura 5. CXCL11 no induce quimiotaxis en las CDs. Se dejaron las células a razón de 1×10^6 CDs/ml de RPMI 0,1% ó de 5×10^6 linfoblastos/ml de RPMI 0,1% y se dejaron migrar ambos tipos celulares durante 2 horas hacia las quimioquinas indicadas (se representa el porcentaje de migración con respecto al número inicial de células en cada caso. Experimento representativo. N=3 experimentos).

Este resultado sugería que el responsable de los efectos de CXCL12 sobre las CDs era el receptor CXCR4. Quisimos corroborar completamente esa afirmación realizando pruebas funcionales. Se sabe que CXCR7 sirve de receptor también a la quimioquina CXCL11 (Burns 2006), la cual, además, puede unirse al receptor quimiotáctico CXCR3 (Cole 1998). Sirviéndonos del hecho de que este último receptor no se expresa en las CDs derivadas de monocito (Vanbervliet 2003), realizamos ensayos de quimiotaxis con CXCL11. De producirse una inducción de la migración de las CDs hacia esa quimioquina dicho efecto estaría necesariamente mediado por CXCR7. Sin embargo, en ninguno de los 3 ensayos de *Transwell* realizados con CXCL11 se vio migración de las CDs hacia esa quimioquina (**Figura 5**), a pesar de que el efecto que causó CXCL11 sobre la migración de los linfoblastos, que sí expresan CXCR3

RESULTADOS

(Stanford and Issekutz 2003), demuestra la funcionalidad de esta quimioquina. Este resultado, por tanto, es coherente con la ausencia de detección de CXCR7 en la membrana de las CD.

Además, también empleamos la estrategia de bloquear la unión de la quimioquina a cada uno de sus receptores en ensayos de quimiotaxis y de apoptosis con CXCL12 y analizar cómo se alteraban dichas funciones en cada caso. Los resultados obtenidos fueron coherentes con lo esperado. Mientras el bloqueante de la unión de CXCL12 a CXCR4, AMD3100 (Fricker 2006), bloqueó la quimiotaxis de las CD en respuesta a CXCL12 por completo, el bloqueante de CXCR7, CCX733 (Hattermann, Held-Feindt et al. 2010), no produjo ningún efecto sobre dicha función (**Figura 6A**), lo que indica que todo el efecto producido por CXCL12 en este sentido es debido a CXCR4. El hecho de que la quimiotaxis de las CD en respuesta a CCL21, ligando de CCR7, no se altere tras emplear ninguno de los inhibidores confirma la especificidad de los inhibidores empleados y descarta un posible efecto de dichos antagonistas sobre la motilidad celular.

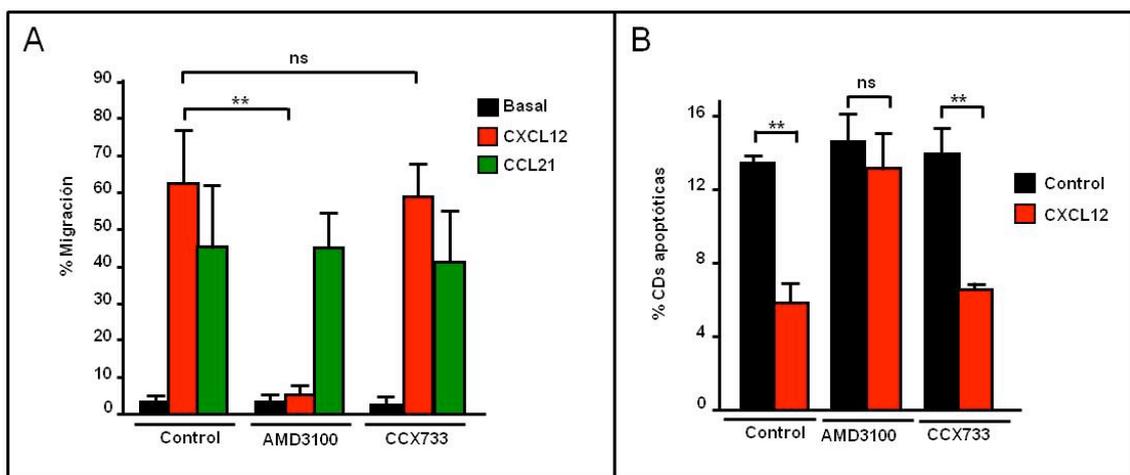


Figura 6. CXCR4, pero no CXCR7, regula la quimiotaxis y la supervivencia de las CD. Las CD fueron incubadas una hora con 10 μ M de AMD3100, de CCX733 o un volumen equivalente de DMSO en el caso del control A) Se analizó la quimiotaxis de las CD hacia CXCL12 ó hacia CCL19, que fue empleado como control de que la migración de las CD era correcta en todos los casos (se representa la media \pm SEM de los porcentajes de migración de 4 experimentos realizados. $**p < 0.01$). B) Tras el tratamiento con los bloqueantes, el suero fue eliminado y las CD mantenidas en cultivo en presencia o no de CXCL12 durante 40 horas. La cantidad de CD's apoptóticas se analizó mediante cuantificación de núcleos teñidos con Hoetchs (se representa la media \pm SEM del porcentaje de CD's apoptóticas en cada caso. $**p < 0.01$. N=3 experimentos)

En el caso de la regulación de la supervivencia recurrimos a la misma estrategia de emplear los bloqueantes de ambos receptores para analizar el efecto sobre la inhibición que CXCL12 tiene de la apoptosis de las CD inducida por la privación de suero. En la **Figura 6B** se puede observar que la presencia de CXCL12 protege de la apoptosis a las células que fueron cultivadas en ausencia de suero. Además, dicha protección se anula cuando las CD se incuban también con AMD3100, lo que permite atribuir todo el efecto protector a CXCR4. Sin embargo, la protección no varía cuando se tratan las CD con el inhibidor de CXCR7. Este resultado indica que la protección

inducida por CXCL12 frente a la apoptosis en las CDs está mediada por CXCR4 y no por CXCR7.

La conclusión final de este apartado es que la presencia de CXCR7 no se detecta en la membrana de las CDs y que además los efectos ejercidos por CXCL12 sobre la quimiotaxis y la supervivencia son reguladas por CXCR4.

3. CXCR4 regula la migración de las CDs de ratón al ganglio y también su supervivencia *in vivo*.

Hasta ahora hemos estado hablando exclusivamente del papel de CXCL12 y su receptor CXCR4 en las CDs humanas. Quisimos averiguar si este comportamiento se reproducía de la misma manera en las CDs de ratón y si CXCL12, a través del receptor CXCR4, regulaba la supervivencia y la quimiotaxis de las CDs en un ambiente complejo como el ganglio linfático (GL) *in vivo*. Inyectamos CDs extraídas de los bazo de ratones C57BL/6 en las almohadillas plantares de otros tantos ratones aceptores con objeto de comprobar el efecto del bloqueante de CXCR4, AMD3100, sobre el número de CDs que llega a los ganglios poplíteos y sobre su viabilidad en términos de resistencia a la apoptosis.

Para ello, primeramente se marcaron las CDs humanas con el colorante intravital verde CFSE y se inyectaron en las almohadillas plantares traseras junto con 4 mg/(kg de ratón) de AMD3100 ó PBS en el caso del control. Tras las 18 horas necesarias para que las CDs lleguen a los ganglios (Mempel, Henrickson et al. 2004; Riol-Blanco, Delgado-Martin et al. 2009) se extrajeron los ganglios poplíteos y se disgregaron. En todos los experimentos realizados se halló un menor número de células marcadas en los ganglios en los que las CDs se inyectaron acompañadas de AMD3100 (**Figura 7A**), siendo la media del porcentaje de células verdes con respecto al número de células ganglionares analizadas de 0,11% en el control, y de 0,03% en las inyectadas con AMD3100, como se observa en la **Figura 7B**.

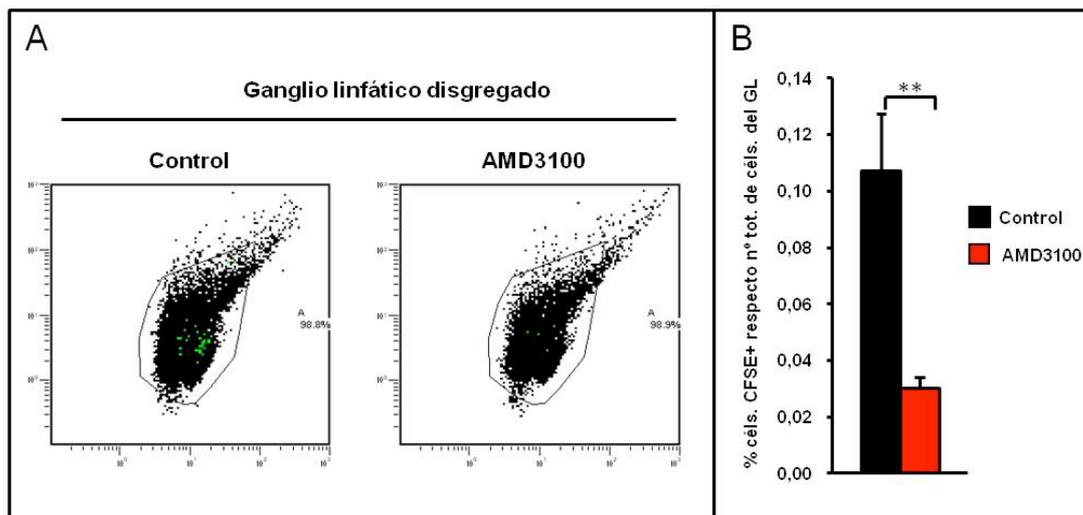


Figura 7. CXCR4 regula la migración de las CDs al ganglio *in vivo*. Inyectamos por vía subcutánea (s.c.) 2×10^6 CDs marcadas con CFSE en las almohadillas plantares traseras de ratones aceptores resuspendidas en un volumen de PBS que contenía 4 mg/(kg de ratón) de AMD3100 y 100 ng/ml de LPS, ó sólo PBS y LPS en el caso del control. 18 horas después se extrajeron los ganglios y se disgregaron. **A)** La suspensión celular resultante se analizó mediante citometría para cuantificar el porcentaje de células verdes presentes en el ganglio en cada caso. **B)** Se representa la media \pm SEM del porcentaje de CDs CFSE+ halladas en el ganglio respecto al total de células del ganglio (** $p < 0,01$. N=4 experimentos).

Para analizar la apoptosis empleamos un modelo de análisis de la supervivencia *in vivo* que hemos puesto a punto en el laboratorio y que nos permite cuantificar, como se observa en la **Figura 8A**, la cantidad de apoptosis que sufren en el ganglio las CDs previamente marcadas e inyectadas en el ratón (Escribano, Delgado-Martín et al. 2009; Riol-Blanco, Delgado-Martin et al. 2009). Inyectamos CDs extraídas de bazo de ratones y marcadas con CMFDA, en las almohadillas plantares traseras de ratones C57BL/6. Tras 18 horas les inyectamos intraperitonealmente el bloqueante AMD3100 ó un volumen similar de PBS en el caso de los ratones control. Al cabo de 22 horas les inyectamos, por vía intravenosa, SR-FLIVO, un agente unido a un fluoróforo rojo que detecta las caspasas activas. Tras extraer los ganglios poplíteos éstos se examinaron mediante microscopía multifotón y los resultados del examen fueron cuantificados con el software de confocal de Leica, con el que se obtuvo el valor de la intensidad de la tinción roja (caspasas activas) para cada célula marcada en verde (CDs-CMFDA inyectadas) (**Figura 8Aii**). La representación de los resultados obtenidos en tres experimentos diferentes (**Figura 8B**) muestra que la media del ratio de la intensidad roja con la intensidad de verde fue siempre mayor en el caso de los ganglios de los ratones que habían sido tratados con AMD3100, de manera que la media de dicho ratio, de 0,35 en el caso del control, pasa a ser de 0,55 en el caso de los ratones inyectados con AMD3100. Este resultado indica que las CDs en las que CXCR4 se encontraba bloqueado tenían mayor cantidad de caspasas activas y, por consiguiente, fueron más apoptóticas que las CDs en las que CXCL12 podía inducir señalización.

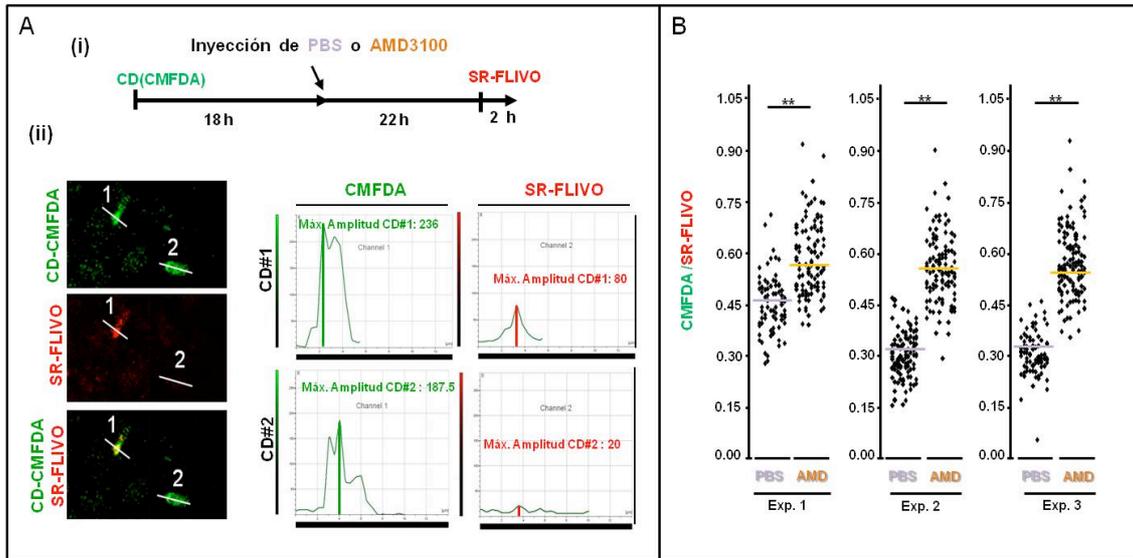


Figura 8. CXCR4 regula la supervivencia de las CDs *in vivo*. **A)** Explicación del procedimiento de medición de apoptosis *in vivo*. **(i)** Inyectamos por vía subcutánea (s.c.) 2×10^6 CDs marcadas con CMFDA en presencia de 100 ng/ml de LPS en las almohadillas plantares traseras de ratones aceptores. 18 horas después inyectamos intraperitonealmente (i.p.) 4 mg/(kg de ratón) de AMD3100 ó de PBS, como control. Después de 22 horas inyectamos SR-FLIVO por vía intravenosa (i.v.) para teñir las CDs apoptóticas. Tras 2 horas los animales son sacrificados y los ganglios poplíteos extraídos y escaneados mediante microscopía multifotón. **(ii)** Análisis de las imágenes obtenidas. A la izquierda 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*. A la derecha 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 de la izquierda. 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”). **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 PBS o AMD3100 en 3 experimentos independientes. $**p < 0,01$.

En conjunto estos resultados nos indican que también en las CDs murinas CXCL12 regula simultáneamente la quimiotaxis y la supervivencia a través del receptor CXCR4.

4. La estimulación de las CDs maduras humanas con CXCL12 induce la activación de Akt y Erk1/2 dependiente de Gi, el dímero $G_{\beta\gamma}$ y de PI3K

Una vez conocidas las funciones en las que está implicado el eje CXCL12/CXCR4 en las CDs quisimos profundizar en los mecanismos moleculares de que se sirve dicha quimioquina para regular estos procesos. Se sabe que la quinasas Akt está implicada tanto en la regulación de la quimiotaxis como de la supervivencia en diferentes tipos celulares (Marte 1997; Sasaki and Firtel 2006) por lo que fue la primera molécula cuya implicación decidimos estudiar. Para comprobar si CXCL12 inducía la activación de Akt estimulamos las CD con la quimioquina durante diferentes tiempos y luego lisamos las células y analizamos los lisados mediante *Western Blot* empleando un anticuerpo que reconocía específicamente la forma de Akt fosforilada en la serina 473

RESULTADOS

(forma activa de Akt). Como se observa en la figura **Figura 9A**, CXCL12 induce una activación temprana y sostenida de Akt que comienza en el primer minuto de estimulación, llega a su máximo a los 3 minutos y va decayendo hasta llegar a niveles basales una hora después.

También la MAPK Erk1/2 se ha descrito como moduladora de la quimiotaxis y la supervivencia de varios tipos celulares, incluidas las CDs (Klenke 1997; Lai, Chaudhary et al. 2001; Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al. 2005; Lu 2006), por lo que también quisimos estudiar el efecto que CXCL12 producía sobre la fosforilación activadora de esta proteína a lo largo del tiempo. De la misma manera que ocurría con Akt, la estimulación de las CDs con la quimioquina inducía una fosforilación temprana de Erk1/2 que se mantenía hasta una hora después.

Dado que los receptores de quimioquinas suelen inducir señalización a través de proteínas G de la familia Gi (Thelen 2001), quisimos comprobar si esto ocurría también en el caso de CXCR4. Para ello las CDs fueron pretratadas con toxina pertúsica (PTX), una toxina que ADP-ribosila e inhibe específicamente las señales dependientes de Gi. (Van Dop, Yamanaka et al. 1984). Posteriormente, las células control y las pretratadas con PTX fueron estimuladas o no con CXCL12. A continuación se estudió el efecto de dicha estimulación sobre la activación de Akt y Erk1/2. Como se observa en la **Figura 9Bi**, el tratamiento con la toxina inhibió completamente la fosforilación de ambas quinasas, lo cual indica que las proteínas G_i median su activación inducida por CXCL12.

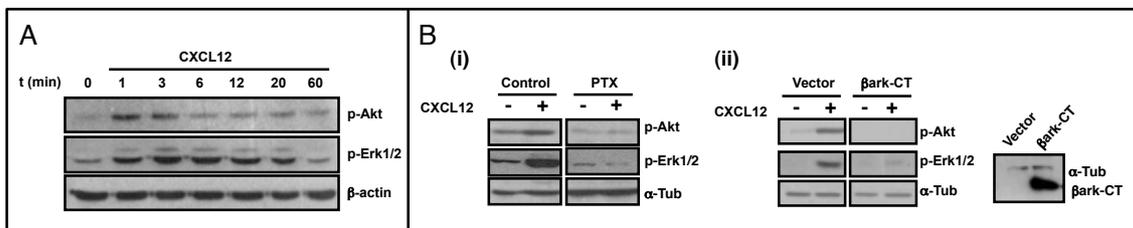


Figura 9. Las quinasas Akt y Erk1/2 son estimuladas por CXCL12 vía dímero $G_{\beta\gamma}$ de las proteínas G_i . **A)** Tras mantener las CDs en RPMI durante 30 minutos se las estimuló las con CXCL12 durante los tiempos indicados. Para determinar la activación de Akt y Erk1/2 por *Western Blot* se emplearon anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de Akt y de Erk1/2 y también contra la β -actina para controlar la carga (experimento representativo. N=4 experimentos). **B) (i)** Las CDs fueron tratadas con 100 ng/ml de PTX durante 2 horas y después transferidas a RPMI durante 30 minutos. Posteriormente se las estimuló con CXCL12 durante 3 minutos y se analizó la fosforilación de Akt y Erk1/2 utilizando anticuerpos específicos para las formas activadas de ambas quinasas y α -tubulina como control de carga (experimento representativo. N=4 experimentos). **(ii)** Se nucleofectaron las CDs con la construcción β ark-CT, capaz de inhibir al dímero $G_{\beta\gamma}$ de las proteínas G. Tras 15 horas las CDs transfectadas se transfirieron a RPMI durante 30 minutos y posteriormente fueron estimuladas con CXCL12 durante 3 minutos. Se analizó mediante *Western Blot* la fosforilación de Akt y de Erk1/2 y se empleó u anticuerpo anti α -tubulina como control de carga. También se muestra la expresión del péptido empleando un anticuerpo específico de β ark-CT (experimento representativo. N=4 experimentos).

Se ha descrito ampliamente que la señalización inducida por este tipo de receptores depende del dímero $G_{\beta\gamma}$ y no de la subunidad α de las proteínas G (Arai 1997; Neptune 1997; Neptune 1999); sin embargo, el uso de PTX no permite dilucidar

cuál de los dos está controlando la activación de Akt y Erk1/2 porque esta droga impide la disociación de las subunidades α y $\beta\gamma$, y, por tanto, bloquea a ambos componentes. Para diseccionar el papel específico de $G_{\beta\gamma}$ nucleofectamos las CDs con β ARK-CT, una construcción que codifica la parte carboxilo-C-terminal de GRK2. Este péptido funciona como un inhibidor de la señalización a partir de $G_{\beta\gamma}$ porque secuestra e inhibe a este dímero (Koch, Hawes et al. 1994). A continuación se estimularon o no las CDs con la quimioquina CXCL12 durante 3 minutos. Al analizar la activación de Akt y Erk1/2 en ambos casos observamos que en las células en las que el dímero $G_{\beta\gamma}$ estaba inhibido no se detectaba apenas fosforilación de ninguna de las dos quinasas dependiente de CXCL12 (**Figura 9Bii**). En la figura también se puede comprobar los niveles de expresión de β ark-CT después de la nucleofección.

Como se ha mencionado en la introducción, las quinasas de la familia PI3K median la señalización inducida por receptores de quimioquinas (Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al. 2005). Mediante el uso del inhibidor general de PI3K LY294002 quisimos comprobar si la fosforilación de Akt y Erk1/2 dependiente de CXCL12 en las CDs estaba sujeta a la actividad de esa familia de quinasas, para lo cual tratamos a las células con LY294002 y después las estimulamos o no con CXCL12. En la **Figura 10A** se puede observar que la fosforilación activadora tanto de Akt como de Erk1/2 se anula tras la inhibición de PI3K. Una vez demostrada la implicación de esta familia de quinasas en la señalización dependiente de CXCL12 quisimos acotar qué isoformas, dentro de la familia de las PI3K de clase I, estaban implicadas en dicha señalización. Para ello recurrimos al empleo de inhibidores específicos de cada una de las PI3K de la clase IA (PI3K- α , - β y - δ) y de la PI3K IB (PI3K- γ) y pretratamos a las CDs de la misma manera que hicimos con el inhibidor general LY294002 (**Figura 10B**).

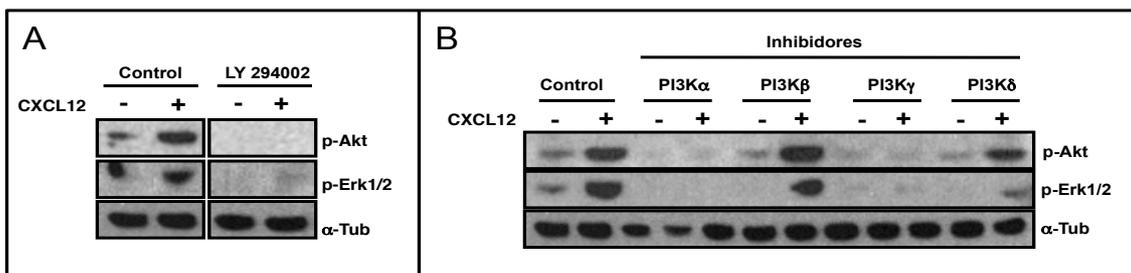


Figura 10. La fosforilación de Akt y Erk1/2 inducida por CXCL12 depende de PI3K α , γ y δ . **A)** Las CDs se trataron durante una hora con 100 μ M del inhibidor general de PI3Ks LY294002 y posteriormente estimuladas durante 3 minutos con CXCL12. Se analizó por *Western Blot* la fosforilación de Akt y Erk1/2 y se empleó la α -tubulina como control de carga (experimento representativo. N=4 experimentos). **B)** Se trataron las CDs con los inhibidores específicos de las PI3K- α , - β , - γ y - δ a las concentraciones indicadas (ver “**Materiales y Métodos**”) durante una hora y luego se les estimuló con CXCL12 durante 3 minutos. Se analizó por *Western Blot* la fosforilación de Akt y Erk1/2 y se empleó la un anticuerpo anti α -tubulina para analizar la carga (experimento representativo. N=4 experimentos).

De esta manera comprobamos que tanto la PI3K- α como la - γ son esenciales en la activación de Akt y Erk1/2 inducida por CXCL12, ya que al inhibir su actividad se anula casi por completo la fosforilación de ambas quinasas, y que la PI3K- δ juega un

RESULTADOS

papel menos importante en esta señalización. Sin embargo, la inhibición de la actividad de la PI3K- β , a pesar de la elevada expresión de esta proteína en las CDs (no mostrado) no causó ningún efecto sobre la activación de Akt ni sobre la de Erk1/2.

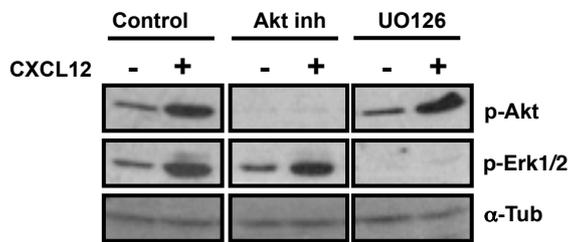
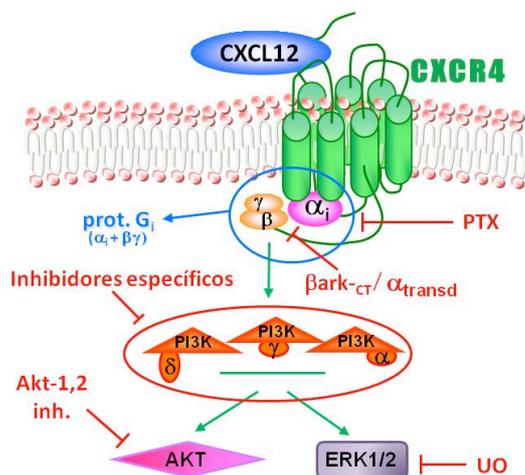


Figura 11 No existe una relación jerárquica entre Akt y Erk1/2 en las CDs. Las CDs se trataron durante una hora con 5 μ M del inhibidor de Erk1/2 (UO126) y del inhibidor de Akt, (Akt1,2 inhibidor), y posteriormente estimuladas durante 3 minutos con CXCL12. Se analizó por *Western Blot* la fosforilación de Akt y Erk1/2 y se empleó la α -tubulina como control de carga (experimento representativo. N=4 experimentos).

Por último, para establecer si las actividades de Akt y de Erk1/2 eran interdependientes, es decir, si se encontraban formando parte de la misma ruta de señalización, como se ha comprobado en otros casos (Curnock 2002), empleamos inhibidores específicos de las dos quinasas (Akt 1/2 inhibitor para Akt y UO126 para Erk1/2) y, tras estimular o no las CDs con CXCL12, analizamos la actividad de las dos quinasas en cada caso. Los resultados mostrados en la **Figura 11** indican que la inhibición de Akt no altera la actividad de Erk1/2 y que el bloqueo de esta última tampoco tiene efecto sobre la fosforilación de Akt, es decir, no existe una relación jerárquica entre ellas tras la estimulación de las CDs con CXCL12.



Modelo 1. Modelo de las vías de señalización inducidas por CXCL12. La estimulación de las CDs con CXCL12 induce la activación de vías de señalización intracelulares. En primer lugar se activan proteínas G heterotriméricas de la familia α_i . Esta activación induce la disociación de las subunidades de la proteína G. El dímero $G_{\beta\gamma}$ de estas proteínas activa la vía de las vía de PI3K($\alpha/\gamma/\delta$). Estas quinasas inducen la activación tanto de Akt como de la MAPK Erk1/2. Ambas quinasas forman parte de rutas independientes.

5. CXCL12 induce activación del complejo mTORC1 a través de Akt y de Erk1/2

Siguiendo con el análisis de la señalización intracelular inducida por CXCL12 y dado que se conoce que Akt regula positivamente al complejo mTORC1, quisimos comprobar si CXCL12 inducía la activación de dicho complejo en las CDs. Akt activa a mTORC1 mediante la fosforilación inhibitoria en la treonina 1462 de la GTPasa TSC2, molécula que cuando está activa inhibe a la pequeña GTPasa Rheb, es decir, la mantiene

en la forma GDP-Rheb. En su forma activa, es decir, unida a GTP, la pequeña GTPasa Rheb activa a mTORC1, lo que quiere decir que TSC2 inhibe a dicho complejo (Thomson 2009). Para analizar si CXCL12 regula mTORC1 estimulamos las células con CXCL12 durante diferentes tiempos y luego analizamos la fosforilación de moléculas vinculadas mTORC1 a diferentes niveles, como son la GTPasa TSC2, la propia mTOR y las dianas de este complejo, S6K y 4E-BP1. En la **Figura 12A** se puede observar que la estimulación de las CDs con CXCL12 indujo una rápida fosforilación inhibitoria de TSC2. Consistentemente con esta cinética, se observa el aumento de la fosforilación de la treonina 389 de S6K y de las treoninas 37 y 46 de 4E-BP1, ambas proteínas diana de mTORC1. Por último, también comprobamos que CXCL12 indujo la fosforilación de mTOR en la serina 2448, un residuo que es “retro-fosforilado” por la quinasa S6K tras su activación por mTORC1 (Ma 2009).

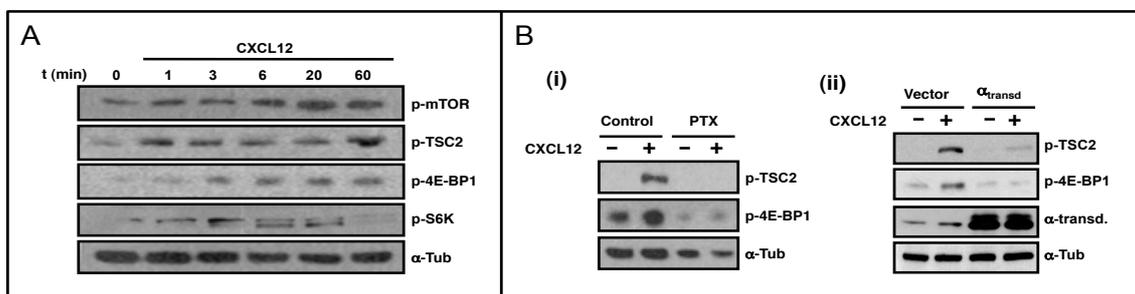


Figura 12. La actividad de mTORC1 es estimulada por CXCL12 vía dímero βγ de las proteínas Gi. **A)** Tras mantener las CDs en RPMI durante 30 minutos las células se estimularon con CXCL12 durante los tiempos indicados. Para determinar la actividad del complejo mTORC1 se emplearon anticuerpos específicos para la forma fosforilada de TSC2, las formas fosforiladas de las proteínas diana del complejo, 4E-BP1 y S6K, y la forma de mTOR fosforilada por S6K. Se empleó un anticuerpo anti α-tubulina como control de carga. **B) (i)** Las CDs fueron tratadas con 100 ng/ml de PTX durante 2 horas y después transferidas a RPMI durante 30 minutos. Posteriormente se las estimuló con CXCL12 durante 3 minutos y se analizó la actividad de mTORC1 utilizando anticuerpos específicos para las formas fosforiladas de TSC2 y 4E-BP1 y un anticuerpo anti α-tubulina como control de carga. **(ii)** Se nucleofectaron las CDs con la α_{transducina}. Tras 15 horas se transfirieron a RPMI durante 30 minutos y fueron estimuladas con CXCL12 durante 3 minutos. Se analizó la fosforilación de TSC2 y de 4E-BP1 y se analizaron los niveles de α-tubulina como una medida de la carga. Se muestra la expresión del péptido mediante un anticuerpo anti α_{Transducina} (en cada caso se muestra un experimento representativo. N= 4 experimentos).

Para analizar la implicación de los elementos señalizadores estudiados hasta ahora en la activación de mTORC1 procedimos como se indicó anteriormente y, para empezar, inhibimos la señalización dependiente de Gi mediante el tratamiento con PTX, y de βγ mediante la nucleofección de las CDs con α_{Transducina}. Como se muestra en la **Figura 12B**, ambos tratamientos anularon el aumento de la fosforilación inducido por la estimulación de las CDs con CXCL12 tanto de TSC2, como de 4E-BP1.

De la misma manera, mediante el uso de los inhibidores de las diferentes isoformas de PI3K, procedimos a estudiar cuál era la contribución de cada una de ellas al aumento de la actividad del complejo mTORC1 mediado por CXCL12. Tras el tratamiento de las CDs con los inhibidores y su posterior estimulación con la quimioquina, estudiamos mediante *Western Blot* tanto el nivel de fosforilación inhibitoria de TSC2 como la de 4E-BP1 y comprobamos así que cada una de las isoformas contribuye a la actividad de mTORC1 de modo similar al efecto que ejercen

RESULTADOS

sobre Akt y Erk1/2 (**Figura 13A**). Así, las isoformas PI3K- α y - γ tienen un gran efecto sobre la actividad de mTORC1 debido a que inducen la fosforilación inhibitoria de TSC2, la PI3K- δ también contribuye, pero en menor medida, y la actividad de PI3K β no influye sobre la actividad del complejo.

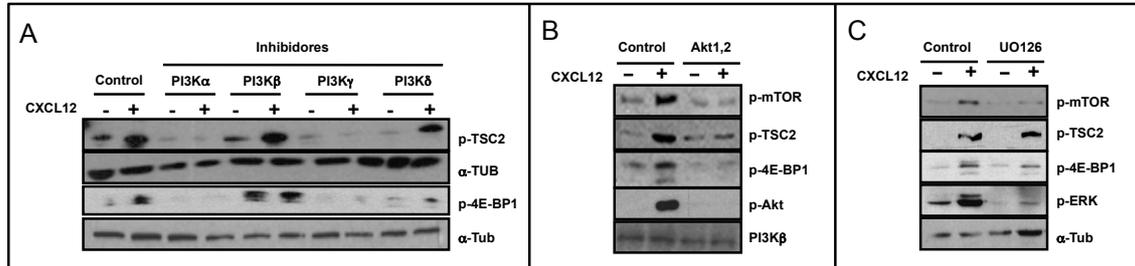


Figura 13. La activación de mTORC1 inducida por CXCL12 depende de PI3K- α , - γ , - δ , Akt y de Erk1/2. A) Se trataron las CDs con los inhibidores específicos de las PI3K- α , - β , - γ y - δ a las concentraciones indicadas (ver “Material y Métodos”) durante 1 hora y luego se las estimuló con CXCL12 durante 3 minutos. Se analizó la actividad de mTORC1 con anticuerpos para forma fosforiladas de TSC2 y de 4E-BP1 y se empleó el α -tubulina como control de carga. B) Las CDs fueron tratadas durante 1 hora con 5 μ M del inhibidor de Akt o de Erk1/2 (C) y luego fueron estimuladas 3 minutos con CXCL12. Se emplearon anticuerpos específicos contra las formas fosforiladas de TSC2 y 4E-BP1 para analizar la actividad de mTORC1, un anticuerpo contra la forma fosforilada y activa de Akt (B) o de Erk1/2 (C) como control de la actividad del inhibidor y la α -tubulina como control de carga (en cada caso se muestra un experimento representativo de 4 realizados).

También empleamos el inhibidor de Akt para comprobar que la actividad de mTORC1 estimulada por CXCL12 dependía de esta quinasa. Como se observa en la **Figura 13B**, cuando no hay actividad de Akt no se produce fosforilación de TSC2 y, por lo tanto, al no estar esta molécula inhibida, tampoco se induce la fosforilación de 4E-BP1 dependiente de CXCL12 ni de mTOR en el residuo fosforilado por S6K. Dado que se ha descrito que Erk1/2 también puede regular la actividad de mTORC1 (Ma, Chen et al. 2005) y sabemos que esta quinasa se activa en las CDs cuando éstas se estimulan con CXCL12, quisimos comprobar si Erk1/2 influía sobre mTORC1. Con este fin analizamos el efecto de la inhibición de la actividad de Erk1/2 sobre la fosforilación de la diana de mTORC1, 4E-BP1. Para ello tratamos las CDs con el inhibidor de Erk1/2, UO126, y estudiamos tanto la fosforilación de 4E-BP1 y mTOR como la de TSC2 tras estimular o no las células con CXCL12. Como se puede ver en la **Figura 13C**, mientras que la fosforilación de TSC2 en la treonina 1462 no se altera tras el tratamiento con el inhibidor, la inhibición de la actividad de Erk1/2 produce una disminución de la fosforilación de 4E-BP1 y del residuo de mTOR que es diana de la quinasa S6K. Estos resultados indican que Erk1/2 modula la actividad del complejo mTORC1.

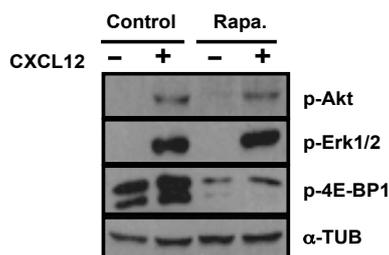
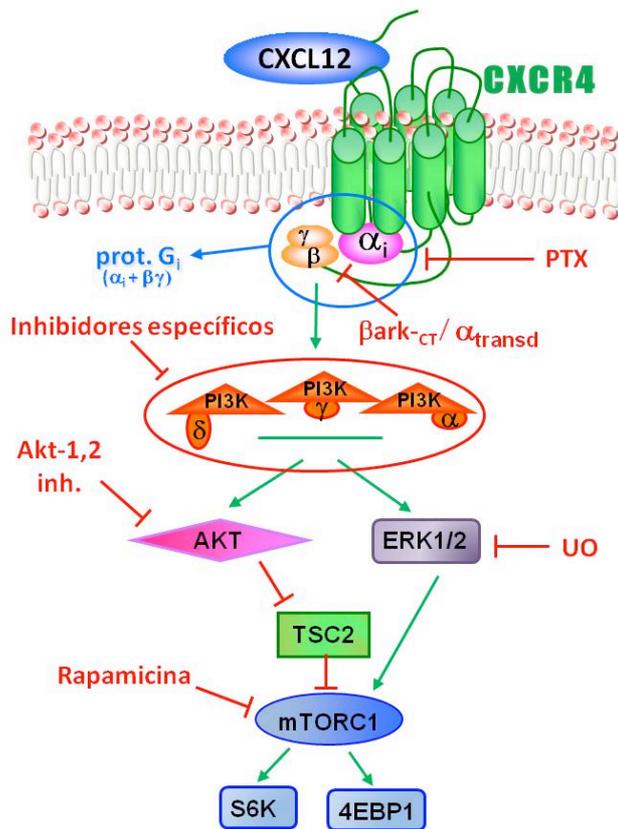


Figura 14. mTORC1 no regula a Akt ni a Erk1/2. Se trataron las CDs con 100 nM del inhibidor del complejo mTORC1 Rapamicina durante 1 hora y luego se las estimuló con CXCL12 durante 3 minutos. Se analizó la activación de Akt y Erk1/2 mediante sendos anticuerpos específicos y también se empleó un anticuerpo contra la forma fosforilada de 4E-BP1 para comprobar la eficacia del inhibidor. Como control de carga se analizó el α -tubulina (experimento representativo. N=3 experimentos).

Por último empleamos el inhibidor específico de mTORC1 Rapamicina, para comprobar si la vinculación entre Akt y mTORC1 y entre Erk1/2 y mTORC1 era mutua o tenía “una sola dirección”. Pretratamos a las CDs con Rapamicina y después estimulamos o no a las células con CXCL12. En la **Figura 14** podemos comprobar que aunque la Rapamicina inhibe la actividad de mTORC1 medida en función de la fosforilación de 4E-BP1, no hay efecto de este complejo sobre la fosforilación de Akt y Erk1/2 dependiente de CXCL12.



Modelo 2. Modelo de las vías de señalización inducidas por CXCL12. La estimulación de las CDs con CXCL12 induce la activación proteínas G heterotrómicas de la familia α_{i0} . Esta activación induce la disociación de las subunidades de la proteína G. El dímero $\beta\gamma$ activa a Akt y a Erk1/2. Akt induce la fosforilación inhibidora del inhibidor de mTORC1, TSC2, lo que resulta en una activación de este complejo y en un aumento de la fosforilación de sus proteínas diana 4E-BP1 y S6K. Erk1/2 también induce la activación de mTORC1, aunque no influye en la fosforilación de TSC2 por Akt.

6. Los componentes señalizadores G_i , $G_{\beta\gamma}$, PI3K- α / γ / δ , Akt, Erk1/2 y mTORC1 contribuyen a la regulación de la quimiotaxis y la supervivencia inducida por CXCL12 en las CDs humanas.

Una vez conocida la cascada de señalización inducida por CXCL12 y sabiendo que la estimulación de las CDs con dicha quimioquina induce quimiotaxis y supervivencia, quisimos averiguar cuáles de las moléculas descritas regulaban cada una de las dos funciones observadas. Para ello tratamos a las CDs con los inhibidores ya empleados anteriormente y estudiamos el efecto de la inhibición de cada una de las proteínas de la ruta sobre la migración y la apoptosis de las CDs.

RESULTADOS

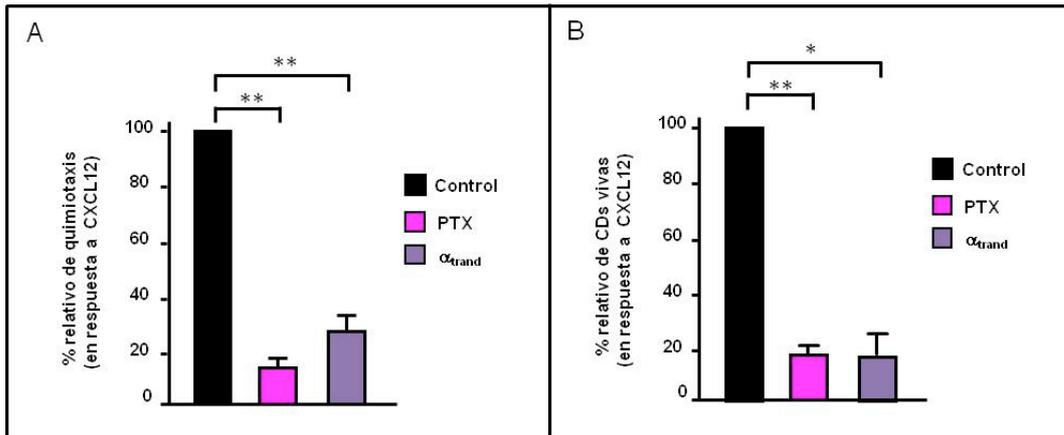


Figura 15. El dímero $\beta\gamma$ de las proteínas G_i regula la quimiotaxis y la supervivencia de las CD's inducida por CXCL12. Las CD's fueron tratadas con 100 ng/ml de PTX durante 2 horas o nucleofectadas con la construcción que codifica a la $\alpha_{\text{Transducina}}$ durante 15 horas. **A)** Se transfirieron las células a RPMI 0,1% BSA y se les sometió a quimiotaxis a través de *Transwells* hacia CXCL12 durante 2 horas más (se representa la media \pm SEM de los porcentajes de migración hacia CXCL12 de las CD's tratadas con respecto del control sin tratamiento. N=3 experimentos. ** $p < 0,01$). **B)** Tras el tratamiento, el suero de las CD's fue eliminado y las CD's dejadas en cultivo en presencia o no de CXCL12 durante 40 horas. La cantidad de CD's apoptóticas se analizó mediante cuantificación de núcleos teñidos con Hoetchs (se representa la media \pm SEM del porcentaje de CD's vivas en presencia de CXCL12 tras el tratamiento con los inhibidores con respecto al control sin tratamiento. N= 3 experimentos. ** $p < 0,01$. * $p < 0,05$).

Comenzamos estudiando las primeras moléculas de la ruta, las proteínas G_i , para lo cual tratamos a las CD's con PTX por un lado para inhibir toda la señalización dependiente de proteínas G_i , y por otro las nucleofectamos con $\alpha_{\text{Transducina}}$ para bloquear a $G_{\beta\gamma}$. Realizar ensayos de migración en *Transwell* con dichas células y, como se observa en la **Figura 15A**, comprobamos que ambos tratamientos reducían significativamente el porcentaje de migración de las CD's hacia CXCL12. Dicho porcentaje disminuyó un 87% en el caso de la PTX y en un 70% cuando se bloqueó $G_{\beta\gamma}$. También quisimos demostrar el papel de estos componentes señalizadores en la regulación de la supervivencia mediada por CXCL12, para lo cual indujimos apoptosis a las CD's anteriormente descritas mediante privación de suero. Tiñendo las células con Hoetchs, analizamos la cantidad de CD's que presentaban núcleos apoptóticos tras la estimulación con CXCL12 tanto en el caso de las células tratadas con la PTX como en las que fueron nucleofectadas con la $\alpha_{\text{Transducina}}$. Al representar el porcentaje de CD's vivas que quedaron tras la privación de suero en presencia de CXCL12 con respecto de dicho porcentaje en el control sin tratamiento se puede observar (**Figura 15B**) que la protección inducida por CXCL12 ante la apoptosis se ve reducida un 81,3% cuando se anula la señalización dependiente de proteínas G_i mediante la PTX, y que esta disminución es idéntica en el caso del bloqueo del dímero $\beta\gamma$ con la $\alpha_{\text{Transducina}}$.

También quisimos analizar el papel que jugaban cada una de las isoformas de PI3K anteriormente mencionadas en la regulación de la apoptosis y la quimiotaxis. Para ello tratamos a las CD's con los inhibidores específicos de la PI3K- α , - β , - γ y - δ y sometimos a dichas células a los ensayos de migración e inducción de apoptosis ya descritos. Los resultados en el caso de los ensayos de *Transwell* muestran (**Figura 16A**) que al inhibir la actividad de la isoforma - α de las PI3K la migración hacia CXCL12 se

ve disminuida un 88%, mientras que cuando se bloquea la actividad de la PI3K- β la quimiotaxis de las CDs no se ve alterada significativamente. También la inhibición de las PI3K- δ y - γ tiene efecto sobre la quimiotaxis de las CDs inducida por CXCL12, aunque en menor medida que el causado por el bloqueo de la isoforma - α , ya que en el caso de la isoenzima - γ se produce una inhibición del 53% y en el de la - δ la inhibición es tan sólo del 35%. Similares resultados se observan al analizar los efectos de estos inhibidores sobre la supervivencia inducida por CXCL12 (Figura 16B).

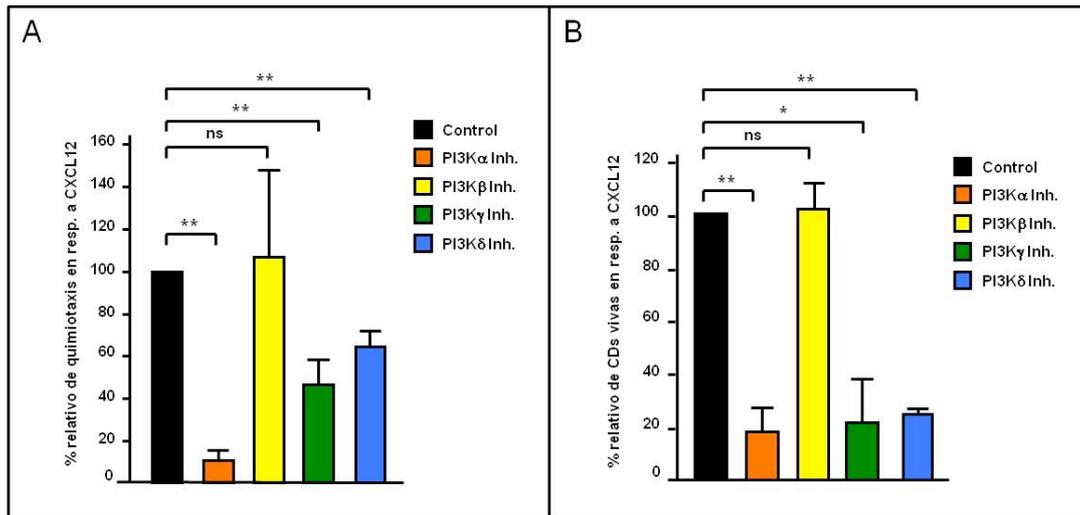


Figura 16. PI3K- α , - γ y - δ regulan la quimiotaxis y la supervivencia de las CDs inducida por CXCL12. Se trataron las CDs con los inhibidores específicos de las PI3K- α , - β , - γ y - δ a las concentraciones indicadas (ver “Materiales y Métodos”) durante 1 hora. **A)** Se sometió a las CDs a quimiotaxis a través de *Transwells* hacia CXCL12 durante 2 horas más (se representa la media \pm SEM de los porcentajes de migración hacia CXCL12 de las CDs tratadas con respecto del control sin tratamiento. N=4 experimentos. ******p<0,01). **B)** Tras el tratamiento, el suero de las CDs fue eliminado y las CDs mantenidas en cultivo en presencia o no de CXCL12 durante 40 horas. La cantidad de CDs apoptóticas se analizó mediante cuantificación de núcleos teñidos con Hoetchs (se representa la media \pm SEM del porcentaje de CDs vivas en presencia de CXCL12 tras el tratamiento con los inhibidores con respecto al control sin tratamiento. N=4 experimentos *****p<0,05, ******p<0,01).

Así, cuando las CDs fueron previamente tratadas con el inhibidor de PI3K- α el porcentaje de células vivas en presencia de CXCL12 con respecto del control sin tratamiento fue de tan sólo un 19,7%, efecto similar al obtenido cuando en las CDs la actividad de la isoforma - γ estaba bloqueada. La PI3K- δ también juega un papel importante en la regulación de esta función ya que cuando ésta es inhibida la protección inducida por CXCL12 disminuye aproximadamente un 75%. Sin embargo y también de forma similar a lo que ocurría con la quimiotaxis, la inhibición de la actividad de la PI3K- β no produjo ningún efecto significativo sobre la supervivencia mediada por CXCL12.

Empleamos la misma estrategia para estudiar la implicación de las quinasas Akt y Erk1/2 en la regulación de las dos funciones controladas por CXCL12. Respecto a Akt, podemos observar en la **Figura 17A** que cuando dicha quinasa se encuentra inhibida la quimiotaxis dependiente de CXCL12 disminuye hasta el 35,7% con respecto al control, lo que indica que Akt juega un papel importante en la regulación de la

RESULTADOS

quimiotaxis de las CDs hacia CXCL12. Además, al someter a las células tratadas con el inhibidor de Akt a privación de suero para inducir apoptosis y comparar su supervivencia en presencia y ausencia de CXCL12, se observa (**Figura 17B**) que la ausencia de la actividad de la quinasa Akt disminuye la resistencia inducida por CXCL12 a la apoptosis en un 82,5%, lo cual apunta a que esta quinasa también es fundamental en la regulación de esta segunda función.

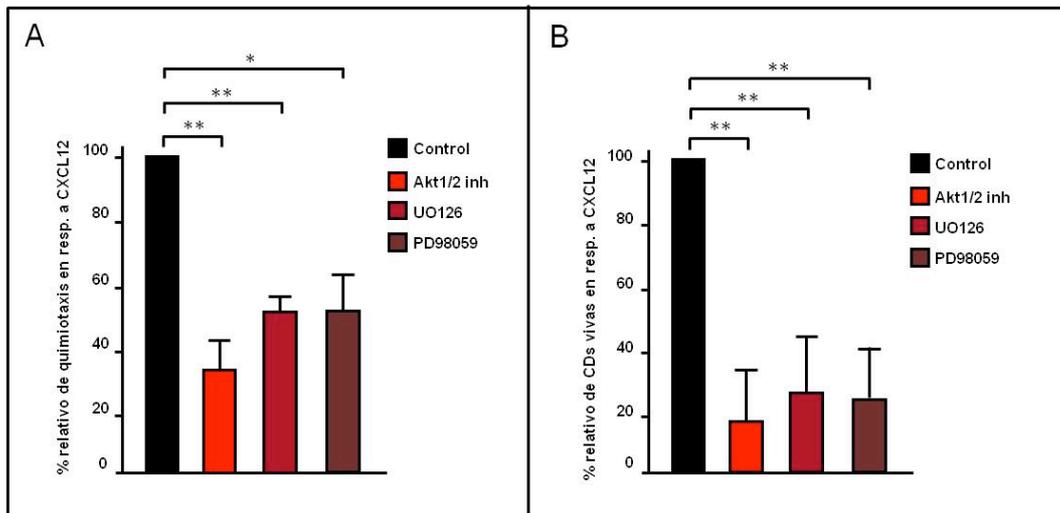


Figura 17. Akt y Erk1/2 regulan la quimiotaxis y la supervivencia de las CDs inducida por CXCL12. Se trataron las CDs con 5 μ M de los inhibidores específicos de Akt (Akt1,2 inhibidor) y de Erk (UO126 y PD98059) durante 1 hora **A**) Se sometió a las CDs a quimiotaxis a través de *Transwells* hacia CXCL12 durante 2 horas más (se representa la media \pm SEM de los porcentajes de migración hacia CXCL12 de las CDs tratadas con respecto del control sin tratamiento. N=6 experimentos. * p <0,05, ** p <0,01). **B**) Tras el tratamiento, el suero de las CDs se mantuvieron en cultivo en presencia o no de CXCL12 durante 40 horas. La cantidad de CDs apoptóticas se analizó mediante cuantificación de núcleos teñidos con Hoetchs (se representa la media \pm SEM del porcentaje de CDs vivas en presencia de CXCL12 tras el tratamiento con los inhibidores con respecto al control sin tratamiento. N=6 experimentos. ** p <0,01).

Por otro lado, en lo que respecta a la contribución de Erk1/2 a la quimiotaxis de las CDs dependiente de CXCL12, el empleo del inhibidor específico UO126 redujo en un 45% la migración de las células hacia la quimioquina frente a las células control sin tratar. Esta implicación de Erk1/2 en la quimiotaxis de las CDs regulada por CXCL12 se corroboró al emplear, en ensayos similares, PD98059, otro inhibidor específico de Erk1/2 (**Figura 17A**). Estos mismos tratamientos se aplicaron a las CDs para realizar los ensayos de medición de apoptosis con y sin CXCL12. Los resultados fueron, de nuevo, similares con ambos inhibidores, y mostraron que Erk1/2 contribuye de forma importante a la ampliación de la supervivencia de las CDs dependiente de CXCL12. Como se observa en la **Figura 17B**, cuando Erk1/2 se encuentra inhibida la cantidad de células vivas en presencia de CXCL12 disminuye, con respecto al control sin tratamiento, hasta un 26,7% en el caso del UO126, y hasta el 25,3% con el PD98059.

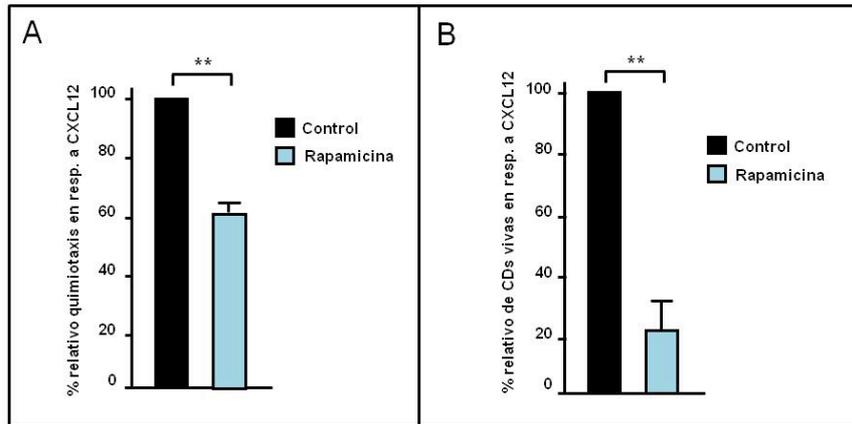


Figura 18. mTORC1 regula la quimiotaxis y la supervivencia de las CD45 inducida por CXCL12. Se trataron las CD45 con 100 nM de el inhibidor del complejo mTORC1 Rapamicina durante 1 hora A) Se analizó la quimiotaxis de las CD45 hacia CXCL12 mediante *Transwells* durante 2 horas más (se representa la media \pm SEM de los porcentajes de migración hacia CXCL12 de las CD45 tratadas con respecto del control sin tratamiento. N=7 experimentos. ** $p < 0,01$). B) Tras el tratamiento, las CD45 fueron mantenidas en cultivo en presencia o no de CXCL12 durante 20 horas. La cantidad de CD45 apoptóticas se analizó mediante cuantificación de núcleos teñidos con Hoetchs (se representa la media \pm SEM del porcentaje de CD45 vivas en presencia de CXCL12 tras el tratamiento con el inhibidor con respecto al control sin tratamiento. N=6 experimentos. ** $p < 0,01$).

Por último quisimos analizar el papel del complejo mTORC1, cuya actividad está regulada tanto por Akt como por Erk1/2, en la regulación de las dos funciones mediadas por CXCL12 que estamos estudiando. Para ello empleamos Rapamicina, un inhibidor que bloquea la actividad de mTORC1. Pudimos comprobar así que las CD45 que previamente habían sido tratadas con este inhibidor presentaban un menor porcentaje de migración con respecto a la quimiotaxis hacia CXCL12 que observada en las CD45 control (sin tratar) (Figura 18A). Concretamente la migración de las CD45 que tenían inhibida la actividad de mTORC1 disminuía hasta el 70%, un descenso menor al ocasionado por los inhibidores de Akt o de Erk1/2. Sin embargo, al emplear la Rapamicina en ensayos de apoptosis en los que las CD45 permanecían 20 horas sin suero en presencia o ausencia de CXCL12 observamos (Figura 18B) que el porcentaje de células que no presentaban núcleos apoptóticos en presencia de CXCL12 disminuía desde el 100% del control sin tratamiento, al 25,7%, lo que indica que la actividad del complejo mTORC1 es importante para que CXCL12 induzca supervivencia en las CD45.

Es importante señalar que ninguno de los tratamientos mencionados (ni la expresión de $\alpha_{\text{Transducina}}$ ni la incubación con ninguno de los inhibidores) produjo efecto significativo sobre la migración basal de las CD45, lo cual está indicando que el efecto final sobre la migración hacia CXCL12 se debe exclusivamente a la alteración de la quimiotaxis y no de la motilidad celular.

En suma, todos y cada uno de los elementos señalizadores activados por CXCL12 estudiados hasta el momento en las CD45, están implicados en la regulación de la quimiotaxis y la supervivencia inducida por CXCL12 en estas células.

RESULTADOS

7. Los miembros de la familia FoxO regulan la apoptosis, pero no la quimiotaxis en respuesta a CXCL12, en las CD_s humanas, y su actividad en estas células es inhibida por CXCL12

Como ya se ha comentado, los miembros de la familia de factores de transcripción FoxO (*Forkhead box O*), poseen en su estructura varias secuencias consenso para Akt (van der Horst 2007). Su fosforilación por Akt hace que estos factores se transloquen del núcleo al citoplasma, lo cual impide que regulen la expresión de proteínas pro-apoptóticas como Bim (Dijkers 2000). En el caso de las CD_s, se ha comprobado que cuando se disminuyen los niveles de FoxO1 en estas células mediante la nucleofección con un siRNA específico para esta molécula, también se reduce la expresión de Bim en las células (Riol-Blanco, Delgado-Martin et al. 2009). Teniendo esto en cuenta, quisimos investigar el comportamiento de los miembros de la familia FoxO tras la estimulación de las CD_s con CXCL12. Para empezar, estimulamos a las CD_s con CXCL12 a diferentes tiempos y analizamos si había fosforilación de FoxO1 y FoxO3 en los sitios fosforilados por Akt. Así, comprobamos que se inducía fosforilación en la serina 256 de FoxO1 y en la serina 253 de FoxO3 a los 5 minutos de la estimulación con CXCL12 (Figura 19A). Coherentemente con esta inhibición, en la figura también se observa cómo al eliminar el suero del medio de cultivo de las CD_s se produce un aumento progresivo de la expresión de la proteína pro-apoptótica Bim que se impidió al estimular a las CD_s con la quimioquina (Figura 19B).

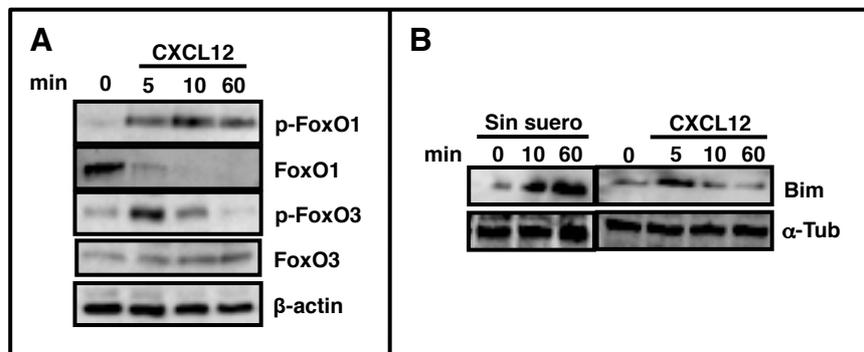


Figura 19. La estimulación de las CD_s con CXCL12 induce la fosforilación inhibitoria de FoxO1 y FoxO3 y evita la expresión de Bim A) Tras mantener las CD_s en RPMI durante 30 minutos se estimularon las células con CXCL12 durante los tiempos indicados. Para determinar la fosforilación de FoxO1 y FoxO3 por *Western Blot* se emplearon anticuerpos específicos para dichas formas de las proteínas. Para analizar los niveles totales de FoxO1 y FoxO3 tras la estimulación se emplearon anticuerpos específicos para FoxO1 y FoxO3. Se analizó la β-actina para determinar los niveles de carga (experimento representativo. N=3 experimentos). B) Se mantuvieron las células sin suero hasta 60 minutos en presencia o no de CXCL12 y se fueron tomando muestras de CD_s y lisándolas a los tiempos indicados. Se determinaron los niveles de Bim por *Western Blot* mediante un anticuerpo específico anti-Bim y se empleó la α-tubulina como control de carga (experimento representativo. N=3 experimentos).

Una vez detectado que CXCL12 inducía la fosforilación de FoxO1 y FoxO3, quisimos estudiar la implicación de estos factores de transcripción en las funciones reguladas por la quimioquina en las CD_s. Para ello redujimos la cantidad de FoxO1 y FoxO3 en las CD_s mediante siRNAs específicos para cada una de las dos proteínas y posteriormente analizamos el efecto de dicha reducción sobre la apoptosis por privación

de suero y sobre la quimiotaxis. Como se observa en la **Figura 20A**, cuando en las CDs hay menor cantidad de FoxO1 y FoxO3 disminuye el porcentaje de células apoptóticas cuantificadas en función de la morfología de sus núcleos teñidos con Hoetchs. Sin embargo, a pesar de que en todos los casos se produjo una buena disminución de la cantidad de FoxO1 y FoxO3 respectivamente (**Figura 20C**), no se apreció efecto alguno sobre la quimiotaxis de las CDs hacia CXCL12 (**Figura 20B**). Estos datos nos están indicando que FoxO1 y FoxO3 no están implicados en la regulación de la quimiotaxis mediada por CXCL12 pero sí juegan un papel importante en la supervivencia de las CDs, dado que inducen apoptosis.

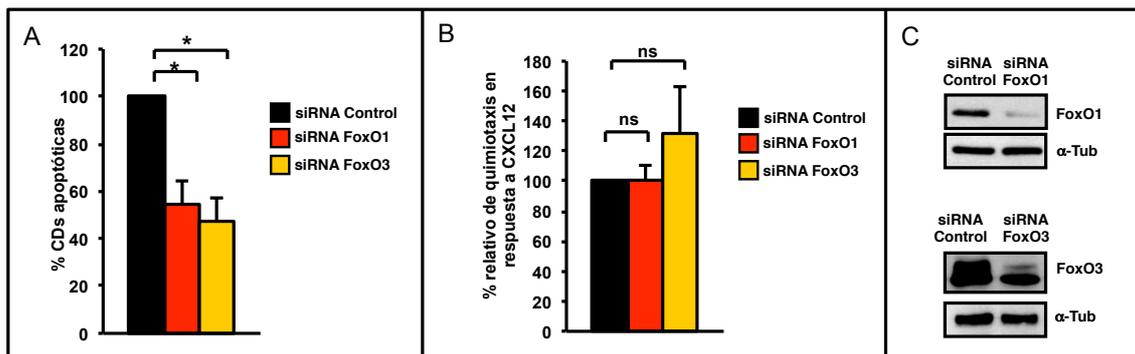


Figura 20. FoxO1 y FoxO3 inducen apoptosis en las CDs pero no influyen en su migración hacia CXCL12. Se nucleofectaron las CDs con ARNs de interferencia (siRNA) específicos para FoxO1 o FoxO3 y con un ARN aleatorio como control. Tras mantener en cultivo 40 horas a las CDs se realizaron los experimentos. **A)** Se tiñeron las CDs con Hoetchs para analizar su viabilidad. (se representa la media del porcentaje de células apoptóticas con respecto a las CDs nucleofectadas con el siRNA control. N= 3 experimentos. * $p < 0,05$). **B)** Se transfirieron las CDs a RPMI 0,1% BSA y se les permitió migrar hacia CXCL12 mediante un sistema de *Transwell* durante 2 horas. (se representa la media \pm SEM de los porcentajes de migración hacia CXCL12 respecto del control. N= 3 experimentos). **C)** Las CDs de las tres condiciones fueron lisadas y los niveles de FoxO1 y FoxO3 con respecto al control fueron analizados por *Western Blot* mediante el empleo de sendos anticuerpos específicos. Se empleó un anticuerpo anti α -tubulina para analizar el nivel de la carga.

Llegados a este punto nos pareció interesante estudiar cómo CXCL12 regulaba a FoxO1. Dado que se ha descrito que la fosforilación en la Ser 256 de esta proteína induce su translocación desde el núcleo al citoplasma, quisimos analizar si la estimulación de las CDs con CXCL12 producía ese efecto en este factor de transcripción. Para ello nucleofectamos las CDs con una construcción que codificaba la proteína FoxO1 conjugada a GFP, o con el vector GFP en el caso del control. Estas células fueron sometidas a privación de suero durante 3 horas, suficiente para que FoxO1 aparezca mayoritariamente en el núcleo, y luego puestas en presencia o ausencia de CXCL12 durante una hora más. Como se observa en la **Figura 21**, casi el 70% de las células transfectadas que fueron estimuladas con CXCL12 presentan claramente GFP-FoxO1 citoplásmico, a diferencia de las CDs control, en las cuales la fluorescencia verde es mayoritariamente nuclear. Por otro lado, las CDs nucleofectadas con el vector GFP muestran en ambos casos fluorescencia citoplásmica.

RESULTADOS

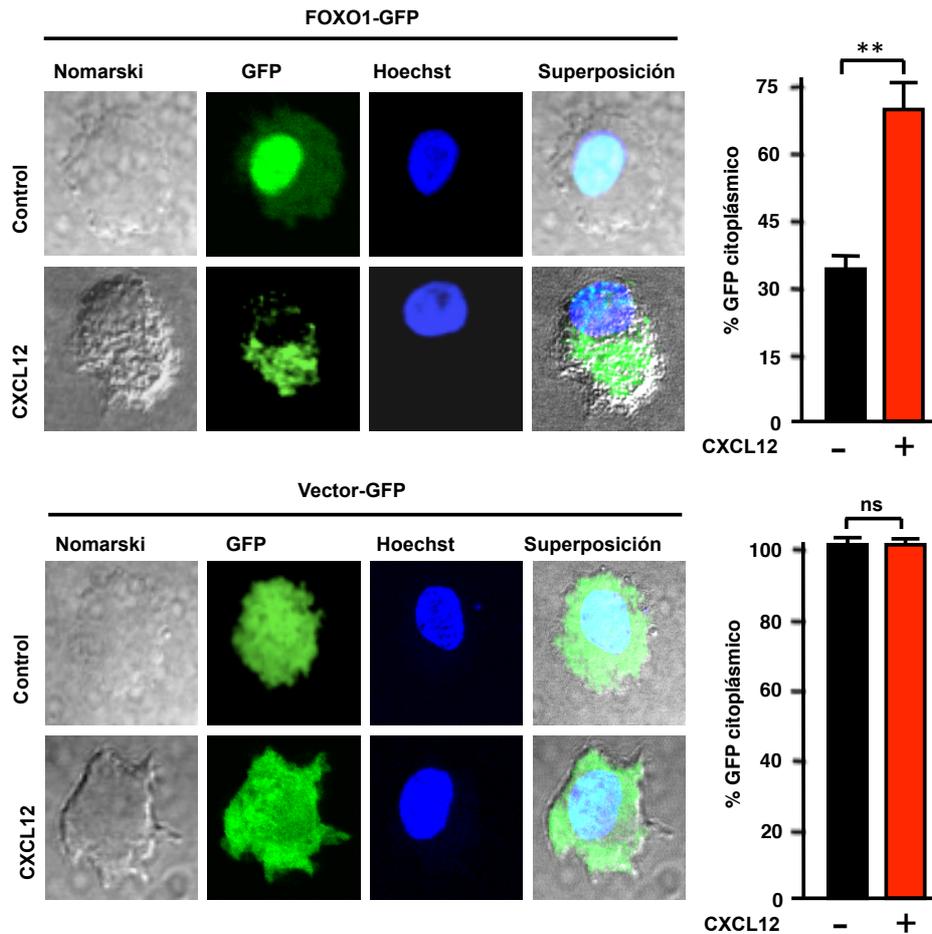


Figura 21. CXCL12 induce la translocación de FoxO1 desde el núcleo al citoplasma. Las CDs fueron nucleofectadas con pGFP o FoxO1-GFP, 15-18 horas después de la transfección las células fueron transferidas a RPMI durante otras 3 horas y después puestas en presencia o no de CXCL12 durante 1 hora para inducir la translocación de FoxO1 al núcleo. Posteriormente 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. **A)** Se muestran imágenes representativas de CDs control y tratadas con CXCL12 y **B)** una gráfica que representa el porcentaje de CDs que presentan GFP localizada en el citoplasma (Se representa la media \pm SEM de 3 experimentos realizados. ****** $p < 0,01$).

Una vez caracterizada la funcionalidad de FoxO1 en las CDs tras su estimulación con CXCL12, con el fin de caracterizar de forma detallada la ruta que lleva a su inhibición analizamos cuáles de los componentes señaladores hasta ahora descritos se encontraban regulando la fosforilación inhibidora de FoxO1. Al igual que ocurre con las moléculas descritas hasta el momento, tanto la inhibición de la señalización de las proteínas Gi con PTX, como el bloqueo del dímero $\beta\gamma$ mediante la expresión de la construcción β ark-CT anulan la fosforilación de FoxO1 inducida por CXCL12 (**Figura 22AyB**). En la figura también se puede observar que el tratamiento de las CDs con los inhibidores de las PI3K- α , γ y δ , pero no con el inhibidor de la PI3K- β , anuló la fosforilación de FoxO1 en la Ser 256 mediada por CXCL12 (**Figura 22C**).

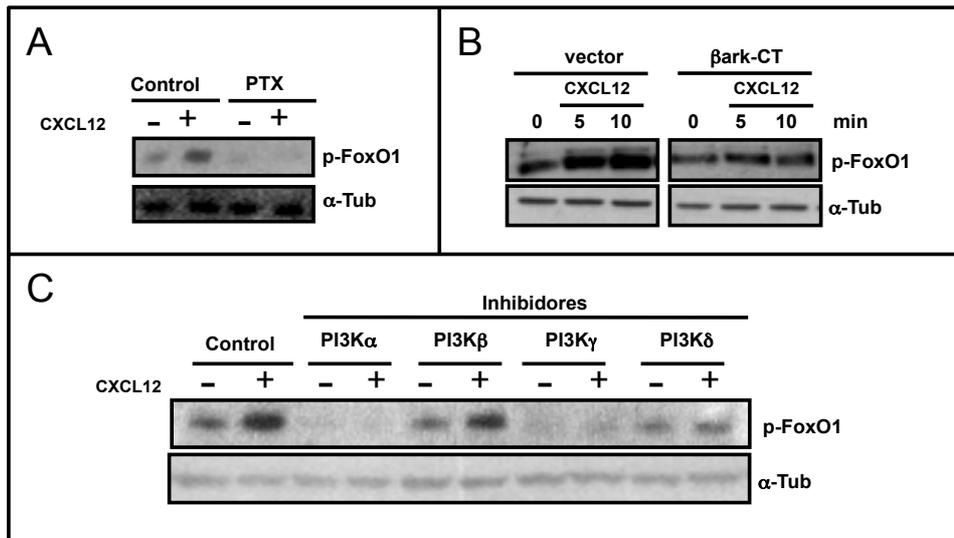


Figura 22. La inhibición de FoxO1 inducida por CXCL12 depende del dímero $\beta\gamma$ de las proteínas Gi y de PI3K- α , - γ , - δ . **A)** Las CDs fueron tratadas con 100 ng/ml de PTX durante 2 horas y después transferidas a RPMI durante 30 minutos. Posteriormente se las estimuló con CXCL12 durante 5 minutos y se analizó la inhibición de FoxO1 mediante un anticuerpo específico para su forma fosforilada e inhibida. Se utilizó un anticuerpo anti α -tubulina como control de carga. **B)** Se nucleofectaron las CDs con β ark-CT, capaz de inhibir a $G_{\beta\gamma}$. Tras 15 horas se transfirieron a RPMI durante 30 minutos y fueron estimuladas con CXCL12 durante los tiempos indicados. Se analizó mediante *Western Blot* la fosforilación inhibitoria de FoxO1 y se empleó un anticuerpo anti α -tubulina para analizar la carga (en cada caso se muestra un experimento representativo. N=4 experimentos).

Como era esperable, dado que el residuo cuya fosforilación estamos analizando es fosforilado por Akt, cuando tratamos a las CDs con el inhibidor específico de esta quinasa y estimulamos a las células con CXCL12, no detectamos fosforilación en la Ser 256 de FoxO1 (**Figura 23A**). Dada su implicación en la regulación de la supervivencia de las CDs, también quisimos estudiar si la acción de otras quinasa sobre FoxO1, como son mTORC1 y Erk1/2 podría interferir en la fosforilación inhibitoria dependiente de CXCL12 de esta proteína. Para ello tratamos a las CDs con los inhibidores específicos de ambas quinasa, es decir, Rapamicina, para bloquear mTORC1, y UO126 para anular la actividad de Erk1/2. En ambos casos podemos observar que no hay efecto alguno sobre la fosforilación en la Ser 256 de FoxO1 tras la estimulación con CXCL12 (**Figura 23B y C**). Adicionalmente, y como forma alternativa de medir la actividad de FoxO1, analizamos los niveles de la proteína pro-apoptótica Bim en caso de ausencia de actividad de Akt, Erk1/2 ó mTORC1. En la **Figura 23** se puede observar que, mientras que la inhibición de Akt, coherentemente con su efecto sobre FoxO1, disminuye los niveles de Bim, esta reducción no se produce cuando se bloquea Erk1/2 ó mTORC1, de lo que se puede deducir que ambas ejercen su efecto sobre la supervivencia de las CDs de manera independiente de FoxO1 o, al menos, que no alteran la actividad inductora de la expresión de Bim de este factor.

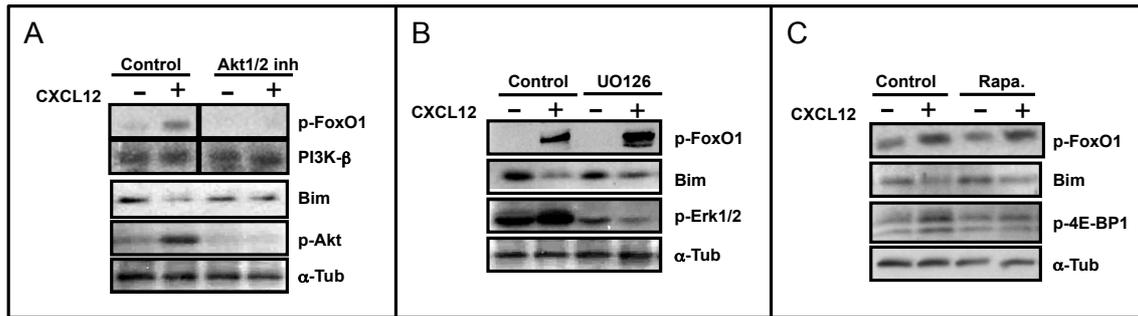
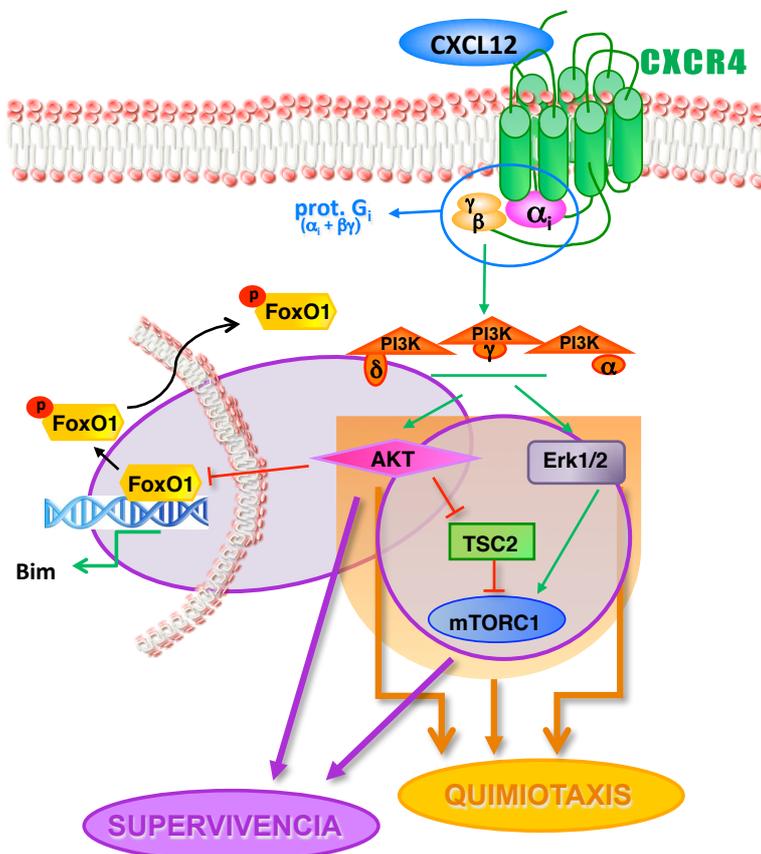


Figura 23. La fosforilación inhibitoria de FoxO1 inducida por CXCL12 depende Akt pero no de Erk1/2 ni de mTORC1 A) Las CDs fueron tratadas durante 1 hora con 5 μ M del inhibidor de Akt (A) o de Erk1/2 (B) o con 100 nM del inhibidor de mTORC1 Rapamicina (C) posteriormente fueron estimuladas durante 10 minutos con CXCL12. Se emplearon anticuerpos específicos contra la forma fosforilada e inhibida de FoxO1 para analizar esta proteína, un anticuerpo contra la forma fosforilada y activa de Akt (A), de Erk1/2 (B) o de 4E-BP1(C) como control de la actividad de cada inhibidor y un anticuerpo anti PI3K β o α -tubulina para analizar los niveles de carga. Además se empleó un anticuerpo anti Bim como reflejo de la actividad de FoxO1 (en cada caso se muestra un experimento representativo. N=3 experimentos).

En suma se puede concluir que la estimulación de las CDs con la quimioquina CXCL12 induce una fosforilación inhibitoria de FoxO1 y FoxO3, los cuales en su estado activo inducen apoptosis en estas células pero no afectan a la quimiotaxis mediada por CXCL12, y que, concretamente, la fosforilación de FoxO1 por Akt dependiente de las proteínas G_i , del dímero $\beta\gamma$ y de las PI3K- α , - γ y - δ induce su translocación desde el núcleo al citoplasma. De esta manera que no puede llevar a cabo su función de regulación de la expresión de genes pro-apoptóticos como Bim.



Modelo 3. Regulación molecular de las dos funciones controladas por CXCL12 en las CDs. La estimulación de las CDs con CXCL12 induce la activación, a través del dímero $\beta\gamma$, de las proteínas G heterotrimericas de la familia α_i , de Akt y de Erk1/2. Ambas quinasas activan a mTORC1. La inhibición tanto de Akt como de Erk1/2 inhibe la quimiotaxis de las CDs en respuesta a CXCL12 de forma aditiva. mTORC1 también afecta a esta función, pero su efecto es menor. Los tres componentes, sin embargo, contribuyen de forma similar a la regulación de la supervivencia de las CDs inducida por CXCL12, pero sólo Akt actúa sobre el factor de transcripción FoxO1, al que inhibe impidiendo así la expresión de Bim dependiente de FoxO y, por lo tanto, evitando la apoptosis de las CDs.

DISCUSIÓN

Para que las CD4s puedan activar a los linfocitos T vírgenes e iniciar la respuesta inmunológica, deben migrar a través de los vasos linfáticos hasta los ganglios linfáticos, donde se produce la presentación antigénica. Puesto que la quimioquina CXCL12 se expresa tanto en los vasos linfáticos aferentes como en los propios ganglios linfáticos (Pablos 1999; Gonzalez, Bermejo et al. 2010), nos planteamos que esta quimioquina pudiera regular las funciones de las CD4s en su camino hacia los ganglios. Por tanto nos propusimos analizar qué funciones de las CD4s humanas eran reguladas por CXCL12 y cuáles eran las moléculas que podían regular dichas funciones. Nuestros resultados indican que CXCL12 regula la quimiotaxis y la supervivencia de las CD4s mad *in vitro* e *in vivo*. Además, en este trabajo demostramos que para regular la supervivencia y la quimiotaxis CXCL12 emplea una jerarquía de moléculas que incluye elementos comunes, cada uno de los cuales es capaz de regular las dos funciones inducidas por CXCL12, y también moléculas que regulan sólo una función (ver **Modelo 3** en “**Resultados**”).

Para el estudio funcional del efecto de CXCL12 sobre las CD4s humanas, derivamos monocitos obtenidos de sangre de donantes a CD4s inm mediante su cultivo con GM-CSF e IL-4 y, posteriormente, indujimos su maduración añadiendo TNF- α . Ensayos de migración en *Transwell* realizados con estas células demostraron que, de acuerdo con observaciones previas, la quimioquina CXCL12 induce una potente respuesta quimiotáctica en las CD4s humanas (Sozzani, Luini et al. 1997; Humrich, Humrich et al. 2006). Sin embargo, esta quimioquina no aumenta la motilidad o velocidad migratoria de las células, como ocurre con estas mismas células cuando son estimuladas con CCL19 ó CCL21, los ligandos de CCR7 (Riol-Blanco, Sanchez-Sanchez et al. 2005), ni tampoco induce movimiento celular en la dirección contraria a su gradiente (fugotaxis), como se ha demostrado que ocurre cuando ciertas poblaciones de linfocitos T son expuestos a altas concentraciones de CXCL12 (Vianello, Kraft et al. 2005). También, en concordancia con datos previos de otros grupos, obtenidos en este caso en CD4s murinas (Kabashima, Sugita et al. 2007), los ensayos de medición de apoptosis de las CD4s humanas en ausencia de suero mostraron que la estimulación con CXCL12 disminuye la mortalidad de estas células tras el estímulo apoptótico que supone la privación de los factores presentes en el suero. A diferencia de otro trabajo previo (Kabashima, Sugita et al. 2007), observamos que CXCL12 no alteraba la maduración de las CD4s humanas. La diferencia entre el modelo celular humano empleado en nuestro experimentos y el murino empleado por Kabashima *et al.* puede explicar esta discrepancia con respecto al papel que juega CXCL12 en la maduración de las CD4s.

La endocitosis forma parte de las funciones imprescindibles de las CD4s en estado inmaduro y, por lo tanto, existía la convicción de que la capacidad endocítica de estas células disminuía con el proceso de maduración (Steinman 1991); sin embargo, se ha observado que las CD4s mad siguen capturando antígenos tras dicho proceso (Drutman and Trombetta 2010; Platt, Ma et al. 2010) y que, además, esta capacidad se ve

incrementada al estimular a las CDs mad murinas con las quimioquinas CCL19 y CCL21 (Yanagawa and Onoe 2003). Teniendo en cuenta estos resultados quisimos analizar si la quimioquina CXCL12 podía estar regulando también esa función en las CDs mad humanas. Sin embargo, los ensayos de endocitosis de FITC-dextrano realizados en estas células muestran que CXCL12 no regula su capacidad endocítica.

Dado que CXCL12 puede unirse a los receptores CXCR4 y CXCR7 (Balabanian, Lagane et al. 2005), era posible que los efectos sobre la supervivencia y la quimiotaxis de las CDs mad humanas inducidos por esta quimioquina estuvieran mediados por cualquiera de los dos receptores, o por los dos a la vez. Puesto que existe un gran controversia con respecto al tema de la expresión (Berahovich, Zabel et al. ; Sanchez-Martin, Estecha et al. 2011) y de la capacidad para transmitir señales intracelulares de CXCR7 en leucocitos (Thelen and Thelen 2008; Rajagopal, Kim et al. 2010), decidimos analizar la presencia de ARN mensajero para este receptor en las CDs inmaduras y maduras mediante su estimulación con TNF α . Para ello, primero extrajimos el ARN total de ambos tipos de CDs. También obtuvimos el ARN de células Hela con objeto de emplearlas como control de que la amplificación del ADN de CXCR7 se realizaba correctamente, puesto que se ha observado que dichas células sí expresan una cantidad considerable del receptor. El ADN obtenido tras la retrotranscripción del ARN mensajero fue amplificado empleando para ello los oligonucleótidos específicos para CXCR7 (Infantino, Moepps et al. 2006). En ninguno de los dos donantes de CDs empleados se amplifica CXCR7 en el caso de las células inmaduras, que fueron empleadas como control negativo del proceso, y en las CDs mad sólo se detectan niveles ínfimos de expresión en uno de los donantes.

Un resultado negativo como el obtenido en el caso de la PCR de CXCR7 no tiene por qué ser definitivo, ya que puede atribuirse a fallos en la técnica o limitaciones en el nivel de detección de la misma. Además, dado que no existe una relación proporcional entre la cantidad de ARN mensajero y la de proteína traducida, es posible que una pequeña cantidad de mensajero sea suficiente para la traducción de unos niveles de proteína que sean funcionales. Por ello decidimos ascender del nivel “ARN mensajero” al de “proteína” y analizar la presencia de este receptor en la membrana de las CDs mad humanas. Con este fin empleamos dos anticuerpos anti-CXCR7 diferentes (Burns 2006; Infantino, Moepps et al. 2006; Berahovich, Penfold et al. 2010). A pesar de que ambos anticuerpos reconocen CXCR7 en la membrana de las células Hela, no detectaron la presencia de dicho receptor en las CDs humanas, con lo que concluimos que el efecto que CXCL12 sobre las funciones de las CDs era atribuible a CXCR4. Sin embargo, dado que nuestros datos contradecían observaciones previas (Infantino, Moepps et al. 2006), y para excluir que CXCR7, expresado a niveles muy bajos, pudiera aún ser capaz de ejercer alguna función en las CDs, decidimos tratar las células con el bloqueante de CXCR4 (AMD3100) (Donzella 1998) y con el de CXCR7 (CCX733, cedido por el Dr. T. Schall (Hattermann, Held-Feindt et al. 2010)) y repetir los ensayos de quimiotaxis y de supervivencia las CDs mad humanas para determinar la

contribución de cada uno de los receptores a la regulación de las dos funciones inducidas por CXCL12 en estas células. Los resultados obtenidos con dichos agonistas muestran que al bloquear la unión de CXCL12 a CXCR4 se anula completamente la quimiotaxis y la supervivencia inducida por CXCL12, lo que permite atribuir todo el efecto de la quimioquina a su unión con CXCR4. Además, la inhibición de CXCR7 no afecta ni a la quimiotaxis ni a la supervivencia de las CD4. Todo esto está indicando que el único receptor que emplea CXCL12 para regular estas dos funciones en las CD4 humanas es CXCR4.

Para estudiar la importancia *in vivo* de la regulación de estas dos funciones de las CD4 mediada por CXCL12 en la respuesta inmune usamos un modelo murino. Estos ensayos nos han permitido demostrar que la unión de CXCL12 a CXCR4 es importante para la migración de las CD4 a los ganglios linfáticos a través de los vasos. Previamente otros grupos habían apuntado a la necesidad de que CXCL12 y su receptor CXCR4 interactúen para que las CD4 cutáneas puedan llegar a los ganglios (Kabashima 2007). Sin embargo, los ensayos realizados en este caso no definían qué etapa de la migración desde la piel hasta los nódulos linfáticos estaba afectada por la interferencia con CXCR4. Por ejemplo, previamente se había descrito que se necesitaba la interacción de CXCL12 y CXCR4 para que las CD4 migraran desde la epidermis a la dermis (Ouweland, Santegoets et al. 2008). Por añadidura, en la interpretación de estos experimentos previos tampoco se había tenido en cuenta el papel que CXCL12 jugaba en la protección de las CD4 frente a la apoptosis, a pesar de que los ensayos se realizaron a tiempos largos (hasta 72 horas). Nuestros datos, sin embargo, aportan información sobre el efecto que ejerce el bloqueo de CXCR4 en la migración a través de los vasos linfáticos hasta los ganglios, puesto que las CD4, resuspendidas en el propio bloqueante (AMD3100), fueron inyectadas directamente en dichos vasos. El hecho de que no se haya observado efecto de CXCL12 sobre capacidad adhesiva ni sobre la velocidad migratoria de las CD4 (ver Fig. 1 en “Resultados”) sugiere que la quimiotaxis es la función afectada por el tratamiento con AMD3100. Además, los ensayos donde se emplea el detector de células apoptóticas SR-FLIVO para analizar *in vivo* la muerte de las CD4 que han llegado a los ganglios, muestran por primera vez que, en los ganglios en los que la presencia de AMD3100 bloqueaba la unión de CXCL12 con su receptor, las CD4 que habían migrado tras ser inyectadas presentaban un 35% más de apoptosis que las CD4 con una señalización CXCR4-dependiente normal. Estos datos tienen varias implicaciones, la primera es que *in vivo* la unión de CXCL12 con CXCR4 protege de la apoptosis a las CD4 en el ganglio. Además, de la cuantificación de los efectos observados se desprende que la aportación cualitativa de la señalización vía CXCR4 *in vivo* a la supervivencia de las CD4 es menor que la que se observa para la migración de dichas células a los ganglios. Por todo ello podemos inferir que la diferencia observada entre la llegada de las CD4 sin tratar y las CD4 en presencia de AMD3100 a los ganglios se debe principalmente al efecto de CXCL12 sobre la quimiotaxis, y en menor medida, a su efecto inductor de supervivencia.

Una vez comprobada la importancia funcional de la regulación de las CDs mediada por CXCL12, analizamos los mecanismos mediante los cuales CXCR4 podía integrar molecularmente la señalización necesaria para regular dos funciones en las CDs mad humanas. Con este fin se emplearon diferentes herramientas farmacológicas, dominantes negativos y siRNAs, cuando esta última estrategia fue posible ya que, a pesar de nuestros repetidos intentos, sólo hemos podido reducir un pequeño número de dianas moleculares en las CDs mediante dicho procedimiento. Estas estrategias nos han permitido, primeramente, definir parte de la señalización que desencadena la unión de CXCL12 a CXCR4 en las CDs mad humanas. Como se ha observado con otros receptores de quimioquinas, una parte importante de las señales inducidas por CXCL12 en estas células ocurre a través de la activación del dímero $G_{\beta\gamma}$ de las proteínas Gi (Arai 1997; Neptune 1999; Escribano, Delgado-Martín et al. 2009). En este caso, la estimulación de las CDs mad humanas con CXCL12 induce una activación de las quinasas Akt y Erk1/2 dependiente de dicho dímero. Además, el empleo de los inhibidores específicos de las isoformas de la PI3K- α , - β , - γ y - δ muestra que, contrariamente al concepto general aceptado que mantiene que PI3K- α y - δ median la señalización dependiente de receptores tirosina y PI3K- γ aquella dependiente de GPCRs (Sotsios 2000; Curnock 2002), en nuestro modelo celular las tres isoenzimas transducen las señales desencadenadas por CXCR4. Sólo la actividad de la isoforma PI3K- β parece no jugar un papel en dicha señalización. El empleo de los inhibidores específicos de Akt y Erk1/2 nos han permitido también descartar una posible relación jerárquica entre estas dos quinasas, que componen, por lo tanto, dos rutas independientes (**Modelo 3**).

El complejo mTORC1 se ha descrito ampliamente como un efector importante de Akt en la mediación de algunas de las funciones que regula esta última quinasa. Como ya se ha comentado, la fosforilación por parte de Akt de TSC2, integrante del complejo TSC1/TSC2, en el residuo Thr1462 anula la actividad inhibitoria que este complejo ejerce sobre la GTPasa activadora de mTORC1, Rheb, activando así a dicho complejo. Sin embargo, en la regulación de mTORC1 participan un gran número de vías señalizadoras además de la integrada por Akt. Por todo ello nos pareció interesante estudiar si este complejo podía formar parte de las vías de señalización activadas por CXCL12 para regular las funciones que controla en las CDs mad humanas. Nuestros datos muestran que al estimular las CDs mad humanas con CXCL12 se induce la fosforilación tanto de los dos efectores mejor descritos de mTORC1, 4E-BP1 y S6K, como la fosforilación de mTOR en un residuo fosforilado por S6K, además del residuo de TSC2 que es fosforilable e inhibible por Akt. Todo ello demuestra el efecto activador que ejerce sobre mTORC1 la estimulación de las CD mad con CXCL12. El componente central de mTORC1 es la quinasa mTOR, que es la principal responsable de la fosforilación de las proteínas diana de complejo. Esta proteína tiene un alto peso molecular y posee multitud de residuos cuya fosforilación puede ser indicativa de la actividad de mTORC1 (Holz and Blenis 2005), del complejo mTORC2 (Copp, Manning et al. 2009) o ser reguladores negativos (Sekulifá, Hudson et al. 2000). Esta dificultad de adscribir la fosforilación de determinado residuo de la quinasa mTOR a la

actividad de mTORC1 sumada al hecho de que también la modificación de algunas de las otras proteínas que componen dicho complejo influyen en su actividad (Carriere, Romeo et al. 2011) nos ha convencido de la idoneidad de emplear a sus dianas, fundamentalmente 4E-BP1, como medida de su actividad en los sucesivos ensayos. De esta manera hemos podido comprobar que la Rapamicina tenía efecto inhibitor sobre mTORC1 en cada uno de los ensayos realizados con ese inhibidor, y demostrar que este complejo no se encuentra regulando a Akt y Erk1/2. Sin embargo, estas dos quinasas sí regulan la actividad de mTORC1 puesto que el empleo de los inhibidores específicos de ambas bloquea la fosforilación de 4E-BP1 y del residuo de mTOR fosforilado por S6K. El empleo de un anticuerpo que reconoce la treonina 1462 fosforilada de TSC2, correspondiente a la forma inhibida de esta proteína, indica que la acción inhibitor de Akt se ejerce a través del dímero TSC1/TSC2. Erk1/2 podría regular mTORC1 fosforilando/inhibiendo directamente TSC2 (Ma, Chen et al. 2005) controlando esta última molécula a través de su efector RSK (Roux, Ballif et al. 2004) o mediante la modificación de alguna de las proteínas del complejo (Carriere, Romeo et al. 2011). El empleo de inhibidores específicos de RSK o de anticuerpos que reconociesen los residuos de TSC2 o Raptor fosforilados por Erk1/2 podría definir mejor el mecanismo mediante el cual esta quinasa regula la actividad de mTORC1. La conclusión en cualquier caso es que las dos vías de señalización inducidas por CXCL12 estudiadas hasta ahora convergen en la activación de mTORC1.

En la presente Tesis Doctoral también hemos analizado cuál es la contribución de cada una de las moléculas que componen las rutas señalizadoras inducidas por CXCL12 a la regulación de la supervivencia y la quimiotaxis de las CD4⁺ T cells. Mediante el empleo de las herramientas ya mencionadas hemos demostrado que, sorprendentemente, todas las proteínas activadas por CXCL12 descritas hasta ahora están implicadas en la regulación tanto de la supervivencia como de la quimiotaxis en respuesta a esta quimioquina. En ambos casos, y coherentemente con observaciones anteriores, dicha respuesta se ve seriamente afectada por la inhibición de la señalización mediada por el dímero $G_{\beta\gamma}$ de las proteínas Gi. En el caso de la quimiotaxis hacia CXCL12, la inhibición de la PI3K- α anula, de forma similar a lo observado con el bloqueo de la señalización Gi-dependiente, esta respuesta de las CD4⁺ T cells, mientras que el papel de las PI3K- γ y - δ en la regulación de la quimiotaxis es menor. El empleo de inhibidores específicos de Akt y Erk1/2 nos permite afirmar no sólo que ambas quinasas están implicadas en la regulación de la quimiotaxis de las CD4⁺ T cells en respuesta a CXCL12, sino que probablemente son los únicos efectores de PI3K- α a este respecto, puesto que, formando parte de rutas independientes, la suma de sus efectos equivale al efecto causado por la inhibición de PI3K- α . De hecho, aunque no se muestra en esta tesis, el empleo de ambos inhibidores de forma conjunta en ensayos de quimiotaxis hacia CXCL12 dio como resultado una inhibición equivalente a la obtenida cuando la PI3K- α se encontraba inactiva. En cuanto al papel de mTORC1 en la respuesta quimiotáctica de estas células a CXCL12, el empleo de Rapamicina muestra que la implicación del complejo en dicha regulación es menor que la de Akt y Erk1/2. Dado que ambas

quinasas se encuentran por encima de mTORC1 en la ruta de señalización, este menor efecto de mTORC1 indica que tanto Akt como Erk1/2 pueden estar empleando otros efectores además de mTORC1 para regular la quimiotaxis, como Girdin/GIV en el caso de Akt o RSK en el de Erk1/2.

La misma estrategia fue empleada para determinar el papel de los elementos señalizadores descritos en la regulación de la supervivencia de las CDs inducida por CXCL12. En este caso, tanto la actividad de la isoforma PI3K- α , - δ y - γ parecen ser imprescindibles para que dicha señalización tenga lugar, ya que el bloqueo de cualquiera de las isoenzimas mencionadas anula casi por completo el efecto protector de apoptosis de CXCL12. De nuevo, sin embargo, la actividad de la PI3K- β no parece ser necesaria para que CXCL12 realice su función en las CDs. Una posible explicación para la aparente ausencia de contribución de esta isoforma de PI3K a las funciones de las CDs es que PI3K- β esté, como se ha descrito anteriormente, ejerciendo su función de forma independiente de su actividad quinasa (Jia, Liu et al. 2008; Matheny and Adamo 2010). Dado que el empleo de inhibidores sólo anula la actividad catalítica de la quinasa, la única manera de comprobar el posible efecto de PI3K- β independientemente de su actividad quinasa en las CDs sería su eliminación mediante la nucleofección de un siRNA específico. Sin embargo, en este caso, el empleo de varios tipos diferentes de siRNAs para PI3K- β no consiguió disminuir los niveles de proteína en las CDs en ningún caso.

A diferencia de lo que ocurre en la regulación de la quimiotaxis, la inhibición tanto de la actividad de Akt, de Erk1/2 y de mTORC1 tuvo un efecto similar y muy potente sobre la supervivencia de las CDs inducida por CXCL12. Del empleo de los inhibidores específicos de estas moléculas en experimentos de inducción de apoptosis en las CDs se desprende que la aportación de Akt y de Erk1/2 a la regulación de la supervivencia inducida por CXCL12 es similar y a su vez equivalente al efecto que tiene sobre dicha función la PI3K. Este resultado puede implicar que PI3K ejerce su acción sobre la regulación de la supervivencia a través exclusivamente de estas dos quinasas. El hecho de que el bloqueo de Akt y de Erk1/2, a pesar de formar parte de rutas independientes, inhiba de forma tan potente la supervivencia de las CDs inducida por CXCL12 probablemente esté indicando que estas dos quinasas están compartiendo efectores que se encuentren más abajo en la vía señalizadora. Uno de estos efectores comunes es mTORC1. Se ha visto que la inhibición de este complejo reduce la supervivencia de las CDs en respuesta a CXCL12 en un porcentaje similar a lo observado en el caso de Erk1/2. Podría ser, entonces, que el efecto protector de la apoptosis de Erk1/2 tras la estimulación de las CDs con CXCL12 se debiese, en gran medida, a su regulación de mTORC1, y que este complejo fuese, por lo tanto, su efector más importante en las CDs.

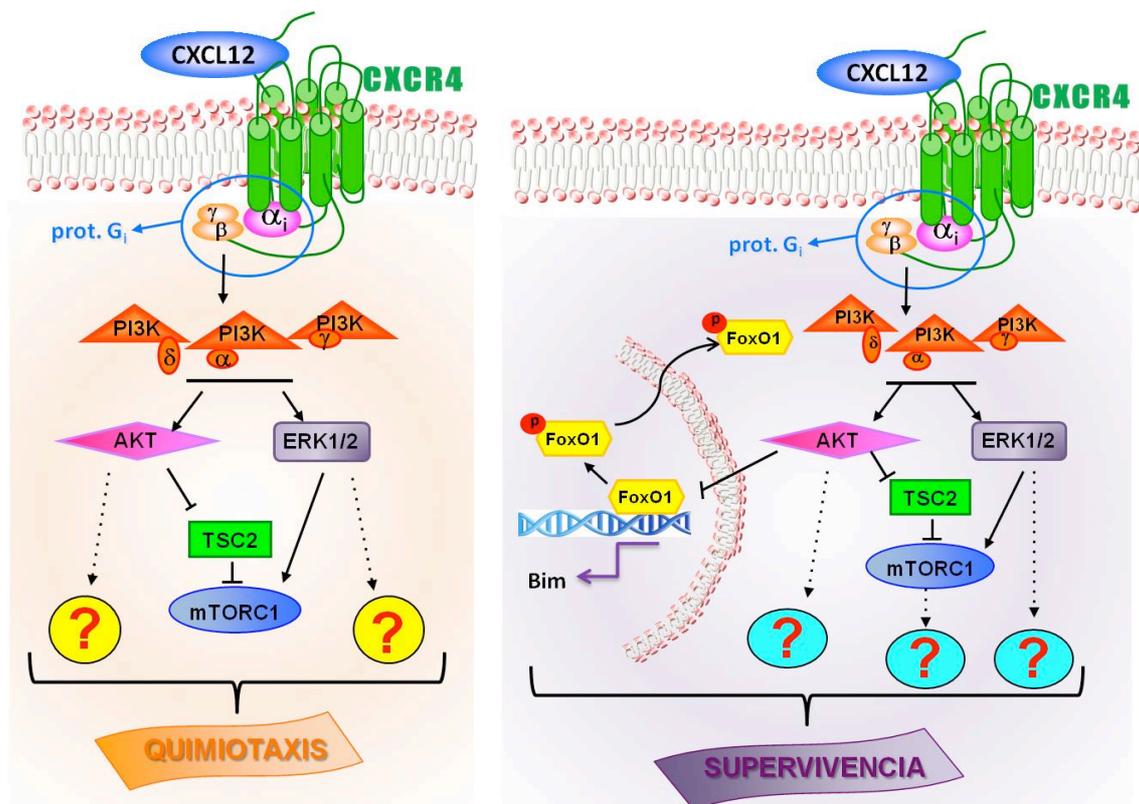
Unos de los efectores de Akt más caracterizados en su regulación de la supervivencia celular son los factores de transcripción de la familia de FoxO (revisado

por (Huang and Tindall 2007)). De hecho, la implicación de FoxO1 en la apoptosis en las CD4⁺ humanas ya se había observado previamente, así como su papel en la inducción de la supervivencia que se produce en estas células durante la sinapsis inmunológica y tras la estimulación con CCR7 (Escribano, Delgado-Martín et al. 2009; Riol-Blanco, Delgado-Martín et al. 2009). En este trabajo demostramos que también en los efectos protectores de la apoptosis inducidos por CXCL12, la inhibición de FoxO1, y en este caso de también de FoxO3, son eventos importantes. Además, no sólo mostramos que al estimular las CD4⁺ con CXCL12 ambos factores son fosforilados en sendos residuos inhibidores, sino que también sugerimos un mecanismo por el cual esta quimioquina se vale de la inhibición de FoxO1 para inducir la supervivencia de dichas CD4⁺. Como se observa en la **Figura 21 de “Resultados”**, y en línea con observaciones previas (Brunet, Bonni et al. 1999), tras la supresión de suero (estímulo apoptótico para las CD4⁺) la estimulación de las células con CXCL12 desplaza a FoxO1 del núcleo - donde en condiciones de estrés se encuentra contribuyendo en la expresión de proteínas pro-apoptóticas- al citoplasma, donde no puede realizar su actividad de inducción de la apoptosis. Una de las proteínas cuya expresión está estrechamente regulada por este factor de transcripción es Bim (Dijkers 2000), lo cual es coherente con la observación de que, a la vez que CXCL12 induce la fosforilación inhibidora de FoxO, bloquea el aumento de expresión de la pro-apoptótica Bim ocasionado por la privación de suero de las CD4⁺. Este aumento de expresión que, como podemos comprobar en la **Figura 19 de “Resultados”**, se produce sólo unos minutos después de eliminar el suero del medio de las CD4⁺, se anula cuando bloqueamos la actividad de Akt, la quinasa encargada de fosforilar a FoxO1 en su residuo inhibidor Ser 256, con un inhibidor específico. Estos resultados indican que la expresión de Bim puede reflejar aproximadamente la actividad de FoxO1 en el núcleo.

Siguiendo con el propósito de definir lo más detalladamente posible los mecanismos señalizadores inducidos por CXCL12 en las CD4⁺, y tras situar a FoxO1 como efector de Akt en su papel regulador de la supervivencia inducida por esta quimioquina en las CD4⁺, recurrimos a la relación FoxO1/Bim para analizar el efecto que sobre FoxO1 podían ejercer otros efectores de las rutas descritas hasta ahora, véase Erk1/2 y mTORC1. Así, tras demostrar que la actividad de Erk1/2 ó mTORC1 no es necesaria para que se produzca la fosforilación de FoxO1 mediada por Akt, comprobamos que la actividad de este factor, medida en función de la disminución de la expresión de Bim inducida por CXCL12, no estaba en modo alguno regulada por Erk1/2 ó por mTORC1. Estos resultados pueden explicar el mayor efecto sobre la supervivencia de las CD4⁺ inducida por CXCL12 observado tras inhibir a Akt, en comparación con la inhibición de Erk1/2 ó de mTORC1, puesto Akt tiene como efector de su actividad anti-apoptótica a FoxO1 además de a mTORC1, lo cual aumenta su contribución a la regulación de la supervivencia con respecto a la contribución de Erk1/2 ó mTORC1.

DISCUSIÓN

Empleando siRNAs específicos para FoxO1 y FoxO3 hemos comprobado que estos dos factores de transcripción juegan un papel en la regulación de la apoptosis de las CDs, pero no en la quimiotaxis en respuesta a CXCL12, ya que mientras al disminuir los niveles de cada uno de los FoxOs mencionado se reduce el número de CDs apoptóticas, la migración de estas células hacia la quimioquina no se ve alterada. El estudio de FoxO realizado en este trabajo también revela, que, bajo el control de las moléculas señalizadoras estudiadas hasta ahora, cada una de las cuales estaba implicada tanto en la regulación de la supervivencia como de la quimiotaxis de las CDs en respuesta a CXCL12, probablemente existan efectores específicos que puedan regular cada una de las funciones mencionadas.



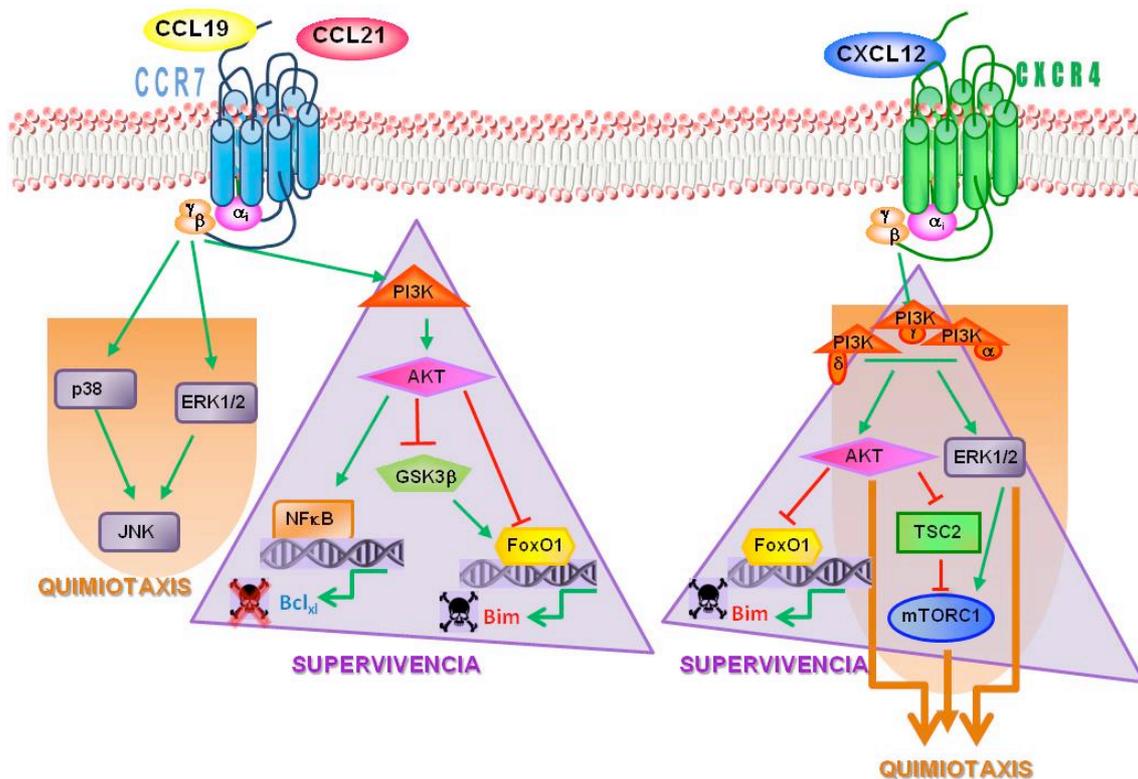
Modelo 1. Mecanismos de regulación de las funciones controladas por CXCL12 en las CDs. Los datos obtenidos en este trabajo indican que Akt y Erk1/2 son proteínas que se regulan de manera independiente pero que convergen en la regulación de mTORC1. En el caso de la regulación de la quimiotaxis en respuesta a CXCL12, la suma de los efectos de Akt y de Erk1/2 explica todo el efecto de PI3K sobre esta función. Sin embargo, mTORC1 parece jugar un papel menos importante que las quinasas que lo regulan, por lo que estas quinasas deben tener otros efectores además del complejo mTORC1 mediante los que controlar la quimiotaxis. En el caso de la regulación de la supervivencia, sin embargo, la acción de Akt, mTORC1 y Erk1/2 es muy similar. Sin embargo, también se demuestra que Akt se sirve, además de la regulación de mTORC1, de la inhibición de FoxO1 para regular la supervivencia de las CDs en respuesta a CXCL12. No es descartable que tanto Akt como mTORC1 o Erk1/2 tengan otros efectores mediante los cuales controlen exclusivamente esta función, de forma independiente de la quimiotaxis.

Es inevitable que surja, a la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, la comparación entre la función y los mecanismos señalizadores de CXCR4 con aquellos descritos en CCR7, otro receptor de quimioquinas cuya funcionalidad en CDs ha sido caracterizada en este grupo. A este respecto, lo primero que llama la atención es que, a pesar de que ambos receptores de quimioquinas sean capaces de integrar

simultáneamente tanto una señalización reguladora de quimiotaxis como otra que controla la supervivencia de las CD₈ mad, el receptor CCR7 es aparentemente mucho más polivalente que CXCR4, puesto que además de las dos funciones mencionadas CCR7 también regula la velocidad migratoria, la capacidad endocítica y la maduración de las CD₈ mad (Sanchez-Sanchez, Riol-Blanco et al. 2006). A grandes rasgos, la manera que ambos receptores tienen de integrar las señales provenientes de sus respectivos ligandos es completamente diferente. Mientras CCR7 regula simultáneamente varias funciones mediante el empleo de distintos módulos señalizadores independientes y especializados en una función diferente, CXCR4 se vale de rutas de señalización con algunos elementos comunes a dichas rutas y otros diferenciales, cada uno de los cuales regula varias funciones simultáneamente. Además, las dos vías de señalización inducidas por CXCL12 estudiadas hasta ahora convergen en la activación del complejo mTORC1, lo cual supone otra diferencia con respecto a lo observado en el caso del receptor CCR7, entre cuyas rutas señalizadoras no se detectaron elementos comunes a partir de la proteína G.

Por otro lado, si observamos cada una de los mecanismos moleculares empleados por ambos receptores podemos apreciar que, a pesar de que muchas de sus componentes coinciden, como PI3K, Akt, Erk1/2, éstos se organizan de forma diferente. Una diferencia fundamental, por ejemplo, es el hecho de que PI3K y Akt regulen tanto la quimiotaxis como la supervivencia inducida por la unión de CXCR4 a su ligando, mientras que sólo participan en una de las funciones reguladas por los ligandos de CCR7, que es la supervivencia. En ambos casos, sin embargo, Akt se sirve de la inhibición de FoxO1 para proteger a las CD₈ frente a la apoptosis. La activación de ambos receptores induce también la fosforilación activadora de Erk1/2, sin embargo esta activación difiere en ambos casos; mientras que CXCL12 induce dicha fosforilación a través de PI3K, la activación de Erk1/2 dependiente de los ligandos de CCR7 no está regulada por esta familia de quinasas. Además, Erk1/2 sólo regula supervivencia en las CD₈ cuando éstas son estimuladas con CXCL12, no con CCL19 ni con CCL21.

Estos resultados apuntan a la existencia de una especificidad o “firma molecular” en el tipo de señales transducidas por cada receptor de quimioquinas, ya que, mientras un receptor es capaz de regular diversas funciones compartimentalizando diferentes moléculas señalizadoras en módulos especializados, como es el caso de CCR7, otra forma de regulación de las funciones mediadas por un receptor de quimioquinas puede ser la de la integración de varias moléculas señalizadoras en diferentes vías que puedan regular dichas funciones simultáneamente. El conocimiento, de este modo, del tipo de señalización desencadenada por cada receptor concreto se hace imprescindible para la conseguir la modulación de cada una de esas funciones de forma independiente.



Modelo 2. Comparación entre las rutas señaladoras inducidas por los ligandos de CCR7 y por el ligando de CXCR4 para regular la quimiotaxis y la supervivencia en las CD_s maduras humanas. En este modelo se presentan dos ejemplos de lo que podemos llamar “firma molecular diferenciada” de los receptores de quimoquinas, Podemos observar cómo CXCR4 y CCR7, tras la unión de sus respectivos ligandos, inducen la activación de los mismos elementos señaladores organizados de diferente manera para regular las mismas funciones en las CD_s humanas

CONCLUSIONES

- 1) La quimioquina CXCL12 regula la quimiotaxis y la supervivencia en las CD_s mad humanas derivadas de monocitos. CXCL12 no regula en estas células la adhesión en ausencia de flujo, la velocidad migratoria, la motilidad, la endocitosis o la maduración.
- 2) CXCL12 emplea CXCR4, y no CXCR7, para regular la quimiotaxis y la supervivencia de las CD_s humanas.
- 3) El uso de AMD3100, un inhibidor selectivo de CXCR4, en las CD_s murinas, reduce en un 70% el número de CD_s que llegan a través de los vasos linfáticos a los ganglios poplíteos, lo que indica que CXCL12 regula la migración de las CD_s *in vivo*.
- 4) La administración de AMD3100 a ratones cuando las CD_s murinas han llegado a los ganglios linfáticos aumenta en un 35% la apoptosis de dichas células, lo que sugiere que CXCL12 regula la supervivencia de las CD_s *in vivo*.
- 5) La estimulación de las CD_s humanas con CXCL12 induce activación de Akt y de Erk1/2. Estas quinasas forman parte de rutas independientes, aunque ambas están reguladas por el dímero $\beta\gamma$ de las proteínas G de la familia Gi y PI3K- α , - γ y - δ .
- 6) La estimulación de las CD_s mad humanas con CXCL12 induce la activación, mediada por Akt y Erk1/2, de mTORC1.
- 7) En las CD_s mad humanas, tanto la quimiotaxis como la supervivencia inducidas por CXCL12 están controladas por el dímero $\beta\gamma$ de las proteínas Gi, PI3K α , γ , δ , Akt, Erk1/2 y mTORC1.
- 8) La estimulación de las CD_s mad humanas con CXCL12 induce la fosforilación inhibidora de FoxO1 y su translocación al citosol. Esta fosforilación de FoxO1 está controlada por Akt y depende, por tanto, del dímero $G_{\beta\gamma}$ de las proteínas Gi y de PI3K- α , - γ y - δ . La fosforilación de este residuo de FoxO1 inducida por CXCL12 es independiente de la actividad de Erk1/2 ó mTORC1.
- 9) La expresión de la proteína pro-apoptótica Bim, que está bajo el control de FoxO1 en las CD_s mad humanas, se induce cuando dichas células son sometidas a privación de suero y, consecuentemente, FoxO1 se transloca al núcleo. El incremento de Bim se inhibe cuando, tras la estimulación con CXCL12, Akt fosforila a FoxO1 y este factor se desplaza al citoplasma.

CONCLUSIONES

- 10) La actividad de Erk1/2 y de mTORC1 no es necesaria para que CXCL12 bloquee la expresión de Bim en condiciones de privación de suero en las CDs mad humanas.
- 11) FoxO1 y FoxO3 regulan la apoptosis de las CDs mad humanas, pero no su quimiotaxis en respuesta a CXCL12.

BIBLIOGRAFÍA

- Aliberti, J., C. Reis e Sousa, et al. (2000). "CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8[alpha]+ dendritic cells." Nat Immunol 1(1): 83-87.
- Alvarez, D., E. H. Vollmann, et al. (2008). "Mechanisms and Consequences of Dendritic Cell Migration." Immunity 29(3): 325-342.
- Allan, L. A., N. Morrice, et al. (2003). "Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK." Nat Cell Biol 5(7): 647-654.
- Allen, S. J., S. E. Crown, T.M. Handel (2007). "Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism." Annu Rev Immunol. 25: 787-820.
- Arai, H., Tsou C.L., Charo I.F. (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): 14495-14499.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science 281(5381): 1305-1308.
- Baekkevold, E. S., Yamanaka T., Palframan R.T., Carlsen H.S., Reinholt F.P., von Andrian U. H., Brandtzaeg P., and Haraldsen G. (2001). "The Ccr7 Ligand ELC (Ccl19) Is Transcytosed in High Endothelial Venules and Mediates T Cell Recruitment." J Exp Med. 193(9): 1105-1112.
- Baggiolini, M. (1998). "Chemokines and leukocyte traffic." Nature. 392(6676): 565-568.
- Bajénoff, M., S. Granjeaud, et al. (2003). "The Strategy of T Cell Antigen-presenting Cell Encounter in Antigen-draining Lymph Nodes Revealed by Imaging of Initial T Cell Activation." The Journal of Experimental Medicine 198(5): 715-724.
- Balabanian, K., B. Lagane, et al. (2005). "The Chemokine SDF-1/CXCL12 Binds to and Signals through the Orphan Receptor RDC1 in T Lymphocytes." Journal of Biological Chemistry 280(42): 35760-35766.
- Banchereau, J., Steinman, R.M. (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature Reviews Immunology 392(6673): 245-252.
- Begley, L. A., J. W. MacDonald, et al. (2007). "CXCL12 Activates a Robust Transcriptional Response in Human Prostate Epithelial Cells." Journal of Biological Chemistry 282(37): 26767-26774.
- Berahovich, R. D., M. E. T. Penfold, et al. (2010). "Nonspecific CXCR7 antibodies." Immunology Letters 133(2): 112-114.
- Berahovich, R. D., B. A. Zabel, et al. (2011). "CXCR7 Protein Is Not Expressed on Human or Mouse Leukocytes." The Journal of Immunology 185(9): 5130-5139.
- Biswas, S. C. and L. A. Greene (2002). "Nerve Growth Factor (NGF) Down-regulates the Bcl-2 Homology 3 (BH3) Domain-only Protein Bim and Suppresses Its Proapoptotic Activity by Phosphorylation." Journal of Biological Chemistry 277(51): 49511-49516.
- Bleul, C. C., M. Farzan, et al. (1996). "The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry." Nature 382(6594): 829-833.
- Boldajipour, B., H. Mahabaleshwar, et al. (2008). "Control of Chemokine-Guided Cell Migration by Ligand Sequestration." Cell 132(3): 463-473.
- Borner, C. (2003). "The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions." Molecular Immunology 39(11): 615-647.
- Bottomley, M. J., K. Salim, et al. (1998). "Phospholipid-binding protein domains." Biochim Biophys Acta 1436(1-2): 165-183.
- Brelot, A., Heveker, Nikolaus, Montes, Monica Alizon, Marc (2000). "Identification of Residues of CXCR4 Critical for Human Immunodeficiency Virus Coreceptor and Chemokine Receptor Activities." Journal of Biological Chemistry 275(31): 23736-23744.
- Bromley, S. K., T. R. Mempel, et al. (2008). "Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic." Nat Immunol 9(9): 970-980.
- Brown, E. J., M. W. Albers, et al. (1994). "A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex." Nature 369(6483): 756-758.
- Brunet, A., A. Bonni, et al. (1999). "Akt Promotes Cell Survival by Phosphorylating and Inhibiting a Forkhead Transcription Factor." Cell 96(6): 857-868.

- Brunet, A., F. Kanai, et al. (2002). "14-3-3 transits to the nucleus and participates in dynamic nucleocytoplasmic transport." *J Cell Biol* 156(5): 817-828.
- Burns, J. M., B. C. Summers, Y. Wang, A. Melikian, R. Berahovich, Z. Miao, M. E. Penfold, M. J. Sunshine, D. R. Littman, C. J. Kuo, K. Wei, B. E. McMaster, K. Wright, M. C. Howard, and T. J. Schall. (2006). "A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development." *J Exp Med* 203: 2201-2213.
- Cabañas, C. and N. Hogg (1993). "Ligand intercellular adhesion molecule 1 has a necessary role in activation of integrin lymphocyte function-associated molecule 1." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90(12): 5838-5842.
- Cabrera-Vera, T. M., J. Vanhauwe, T. O. Thomas, M. Medkova, A. Preininger, M. R. Mazzoni and H. E. Hamm (2003). "Insights into G protein structure, function, and regulation." *Endocr Rev* 24(6): 765-781.
- Cagnol, S. and J.-C. Chambard (2010). "ERK and cell death: Mechanisms of ERK-induced cell death – apoptosis, autophagy and senescence." *FEBS Journal* 277(1): 2-21.
- Cardone, M. H., N. Roy, et al. (1998). "Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation." *Science* 282(5392): 1318-1321.
- Carriere, A., Y. Romeo, et al. (2011). "ERK1/2 Phosphorylate Raptor to Promote Ras-dependent Activation of mTOR Complex 1 (mTORC1)." *Journal of Biological Chemistry* 286(1): 567-577.
- Ceradini, D. J., A. R. Kulkarni, et al. (2004). "Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1." *Nat Med* 10(8): 858-864.
- Cole, K. E., C. A. Strick, T. J. Paradis, K. T. Ogborne, M. Loetscher, R. P. Gladue, W. Lin, G. J. Boyd, B. Moser, D. E. Wood, B. G. Sahagan, and K. Neote. (1998). "Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3." *J Exp Med* 187: 2009–2021.
- Copp, J., G. Manning, et al. (2009). "TORC-Specific Phosphorylation of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Phospho-Ser2481 Is a Marker for Intact mTOR Signaling Complex 2." *Cancer Research* 69(5): 1821-1827.
- Crews, C., A. Alessandrini, et al. (1992). "Erks: their fifteen minutes has arrived." *Cell Growth Differ* 3(2): 135-142.
- Cross, D. A. E., D. R. Alessi, et al. (1995). "Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B." *Nature* 378(6559): 785-789.
- Crump, M., Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, Virelizier JL, Baggiolini M, Sykes BD, Clark-Lewis I. (1997). "Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1." *EMBO J*. 16(23): 6996-7007.
- Curnock, A., Logan M.K. and Ward S.G. (2002). "Chemokine signalling: pivoting around multiple phosphoinositide 3-kinases." *Immunology* 105(2): 125-136.
- Cyster, J. G. (1999). "Chemokines and Cell Migration in Secondary Lymphoid Organs." *Science* 286(5447): 2098-2102.
- Chang, L. a. M. K. (2001). "Mammalian MAP kinase signalling cascades." *Nature*. 410(6824): 37-40.
- Chen, M., L. Huang, J. Wang (2007). "Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity." *Blood* 109(10): 4360-4367.
- Chen, M., Y. H. Wang, Y. Wang, L. Huang, H. Sandoval, Y. J. Liu, J. Wang (2006). "Dendritic cell apoptosis in the maintenance of immune tolerance." *Science* 311(5764): 1160-1164.
- Chen, Z., T. B. Gibson, et al. (2001). "MAP Kinases." *Chemical Reviews* 101(8): 2449-2476.
- Cheung, E. C. C. and R. S. Slack (2004). "Emerging Role for ERK as a Key Regulator of Neuronal Apoptosis." *Sci. STKE* 2004(251): pe45-.
- Danial, N. (2007). "BCL-2 family proteins: critical checkpoints of apoptotic cell death." *Clin Cancer Res*. 13(24): 7254-7263.
- Datta, S. R., H. Dudek, et al. (1997). "Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery." *Cell* 91(2): 231-241.

- Deane, J. A. and D. A. Fruman (2004). "Phosphoinositide 3-Kinase: Diverse Roles in Immune Cell Activation." Annual Review of Immunology 22(1): 563-598.
- Delgoffe, G. M. and J. D. Powell (2009). "mTOR: taking cues from the immune microenvironment." Immunology 127(4): 459-465.
- 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): 1201-1204.
- Donzella, G., Schols D, Lin SW, Esté JA, Nagashima KA, Maddon PJ, Allaway GP, Sakmar TP, Henson G, De Clercq E, Moore JP (1998). "AMD3100, a small molecule inhibitor of HIV-1 entry via the CXCR4 co-receptor." Nat Med 4(1): 72-77.
- Drutman, S. B. and E. S. Trombetta (2010). "Dendritic Cells Continue To Capture and Present Antigens after Maturation In Vivo." The Journal of Immunology 185(4): 2140-2146.
- Dudda, J. C. and S. F. Martin (2004). "Tissue targeting of T cells by DCs and microenvironments." Trends Immunol 25(8): 417-421.
- Earnshaw, W. C., L. M. Martins, et al. (1999). "Mammalian caspases: structure, activation, substrates, and functions during apoptosis." Annu Rev Biochem 68: 383-424.
- Eash, K. J., A. M. Greenbaum, et al. (2010). "CXCR2 and CXCR4 antagonistically regulate neutrophil trafficking from murine bone marrow." The Journal of Clinical Investigation 120(7): 2423-2431.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: a review of programmed cell death." Toxicol Pathol 35: 495-516.
- Enomoto, A., H. Murakami, et al. (2005). "Akt/PKB Regulates Actin Organization and Cell Motility via Girdin/APE." Developmental Cell 9(3): 389-402.
- Escribano, C., C. Delgado-Martín, et al. (2009). "CCR7-Dependent Stimulation of Survival in Dendritic Cells Involves Inhibition of GSK3 β ." The Journal of Immunology 183(10): 6282-6295.
- Fearon, D. T. and R. M. L. (1996). "The instructive role of innate immunity in the acquired immune response." Science 272(5258).
- Feng, Y., Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. (1996). "HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor." Science 272(5263): 872-877.
- Förster, R., A. Schubel, et al. (1999). "CCR7 Coordinates the Primary Immune Response by Establishing Functional Microenvironments in Secondary Lymphoid Organs." Cell 99(1): 23-33.
- Foster, K. G. and D. C. Fingar (2010). "Mammalian Target of Rapamycin (mTOR): Conducting the Cellular Signaling Symphony." Journal of Biological Chemistry 285(19): 14071-14077.
- Franke, T. F. (2008). "PI3K/Akt: getting it right matters." Oncogene 27(50): 6473-6488.
- Fricker, S. P. A., Virginia Cox, Jennifer Darkes, Marilyn C. Grujic, Ognjen Idzan, Stefan R. Labrecque, Jean Lau, Gloria Mosi, Renee M. Nelson, Kim L. Qin, Ling Santucci, Zeffy Wong, Rebecca S. Y. (2006). "Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: A specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4." Biochemical Pharmacology 72(5): 588-596.
- Gangloff, Y.-G., M. Mueller, et al. (2004). "Disruption of the Mouse mTOR Gene Leads to Early Postimplantation Lethality and Prohibits Embryonic Stem Cell Development." Mol. Cell. Biol. 24(21): 9508-9516.
- Gavrieli, Y., Y. Sherman, et al. (1992). "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." J Cell Biol 119(3): 493-501.
- Geissmann, F., Manz M.G., Jung S. y Sieweke M.H. (2010). "Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells." Science 327: 656-661.
- Gerrits, H., D. S. van Ingen Schenau, et al. (2008). "Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice." genesis 46(5): 235-245.
- Glading, A., P. Chang, et al. (2000). "Epidermal Growth Factor Receptor Activation of Calpain Is Required for Fibroblast Motility and Occurs via an ERK/MAP Kinase Signaling Pathway." Journal of Biological Chemistry 275(4): 2390-2398.
- Gonzalez, F. A., D. L. Raden, et al. (1991). "Identification of substrate recognition determinants for human ERK1 and ERK2 protein kinases." Journal of Biological Chemistry 266(33): 22159-22163.

- Gonzalez, N., M. Bermejo, et al. (2010). "SDF-1/CXCL12 Production by Mature Dendritic Cells Inhibits the Propagation of X4-Tropic HIV-1 Isolates at the Dendritic Cell-T-Cell Infectious Synapse." J. Virol. 84(9): 4341-4351.
- Govers, R., L. Bevers, et al. (2002). "Endothelial nitric oxide synthase activity is linked to its presence at cell-cell contacts." Biochem. J. 361(2): 193-201.
- Graham, G. J. (2009). "D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes." Eur J Immunol 39(2): 342-351.
- Guertin, D. A. and D. M. Sabatini (2009). "The Pharmacology of mTOR Inhibition." Sci. Signal. 2(67): pe24-.
- Guillemet-Guibert, J., K. Bjorklof, et al. (2008). "The p110 β isoform of phosphoinositide 3-kinase signals downstream of G protein-coupled receptors and is functionally redundant with p110 γ ." Proceedings of the National Academy of Sciences 105(24): 8292-8297.
- Hakem, R., A. Hakem, et al. (1998). "Differential requirement for caspase 9 in apoptotic pathways in vivo." Cell 94(3): 339-352.
- Hamm, H. E. (1998). "The many faces of G protein signaling." J Biol Chem. 273(2): 669-672.
- Hargreaves, D., PL Hyman, Lu TT, Ngo VN, Bidgol A, Suzuki G, Zou YR, Littman DR, Cyster JG. (2001). "A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements." J. Exp. Med. 194: 45-56.
- Hartmann, T. N., V. Grabovsky, et al. (2008). "A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells." Journal of Leukocyte Biology 84(4): 1130-1140.
- Hattermann, K., J. Held-Feindt, et al. (2010). "The Chemokine Receptor CXCR7 Is Highly Expressed in Human Glioma Cells and Mediates Antiapoptotic Effects." Cancer Research 70(8): 3299-3308.
- Hawkins, P. T., T. R. Jackson, et al. (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): 157-159.
- Hernández-López, C., Valencia J, Hidalgo L, Martínez VG, Zapata AG, Sacedón R, Varas A, Vicente A. (2008). "CXCL12/CXCR4 signaling promotes human thymic dendritic cell survival regulating the Bcl-2/Bax ratio." Immunol Lett 120((1-2)): 72-78.
- Hernandez, P., Gorlin RJ, Lukens JN, Taniuchi S, Bohinjec J, Francois F, Klotman ME, Diaz GA. (2003). "Mutations in the chemokine receptor gene CXCR4 are associated with WHIM syndrome, a combined immunodeficiency disease." Nat Genet 34(1): 70-74.
- Hildeman, D., T. Jorgensen, et al. (2007). "Apoptosis and the homeostatic control of immune responses." Current Opinion in Immunology 19(5): 516-521.
- Ho, Y.-P., C.-W. Kuo, et al. (2011). " β -Actin is a downstream effector of the PI3K/AKT signaling pathway in myeloma cells." Molecular and Cellular Biochemistry 348(1): 129-139.
- Holt, P., S. Haining, et al. (1994). "Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways." The Journal of Immunology 153(1): 256-261.
- Holz, M. K. and J. Blenis (2005). "Identification of S6 Kinase 1 as a Novel Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-phosphorylating Kinase." Journal of Biological Chemistry 280(28): 26089-26093.
- Hosokawa, N., T. Hara, et al. (2009). "Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1-Atg13-FIP200 Complex Required for Autophagy." Mol. Biol. Cell 20(7): 1981-1991.
- 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): 583-589.
- Hsia, J. A., et al. (1984). "ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effects on inhibitory agonist binding." J. Biol Chem. 259(2): 1086-1090.
- Huang, H. and D. J. Tindall (2007). "Dynamic FoxO transcription factors." J Cell Sci 120(Pt 15): 2479-2487.
- Huang, J. and B. D. Manning (2008). "The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth." Biochem J 412(2): 179-190.
- Humrich, J. Y., J. H. Humrich, et al. (2006). "Mature monocyte-derived dendritic cells respond more strongly to CCL19 than to CXCL12: consequences for directional migration." Immunology 117(2): 238-247.
- Iglesias, P. A. and P. N. Devreotes (2008). "Navigating through models of chemotaxis." Current Opinion in Cell Biology 20(1): 35-40.

- Igney, F. H. and P. H. Krammer (2002). "Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis." Nat Rev Cancer 2(4): 277-288.
- Infantino, S., B. Moepps, et al. (2006). "Expression and Regulation of the Orphan Receptor RDC1 and Its Putative Ligand in Human Dendritic and B Cells." The Journal of Immunology 176(4): 2197-2207.
- Inoki, K., H. Ouyang, et al. (2006). "TSC2 Integrates Wnt and Energy Signals via a Coordinated Phosphorylation by AMPK and GSK3 to Regulate Cell Growth." Cell 126(5): 955-968.
- Ivankovic-Dikic, I., E. Gronroos, et al. (2000). "Pyk2 and FAK regulate neurite outgrowth induced by growth factors and integrins." Nat Cell Biol 2(9): 574-581.
- Janowski, M. (2009). "Functional diversity of SDF-1 splicing variants." Cell Adh Migr 3(3): 243-249.
- Jia, S., Z. Liu, et al. (2008). "Essential roles of PI(3)K-p110[bgr] in cell growth, metabolism and tumorigenesis." Nature 454(7205): 776-779.
- Jin, Z. and W. S. El-Deiry (2005). "Overview of cell death signaling pathways." Cancer Biol Ther 4(2): 139-163.
- Jung, S., D. Unutmaz, et al. (2002). "In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens." Immunity 17(2): 211-220.
- Kabashima, K., N. Shiraiishi, K. Sugita, T. Mori, A. Onoue, M. Kobayashi, J.-i. Sakabe, R. Yoshiki, H. Tamamura, N. Fujii, K. Inaba, and Y. Tokura. (2007). "CXCL2-CXCR4 Engagement is Required for Migration of Cutaneous Dendritic Cells." Am. J. Pathol 171: 1249-1257.
- Kabashima, K., K. Sugita, et al. (2007). "CXCR4 engagement promotes dendritic cell survival and maturation." Biochemical and Biophysical Research Communications 361(4): 1012-1016.
- Kaifi, J. T., E. F. Yekebas, et al. (2005). "Tumor-Cell Homing to Lymph Nodes and Bone Marrow and CXCR4 Expression in Esophageal Cancer." Journal of the National Cancer Institute 97(24): 1840-1847.
- Kamath, A. T., S. Henri, et al. (2002). "Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs." Blood 100(5): 1734-1741.
- Kamath, A. T., J. Pooley, et al. (2000). "The Development, Maturation, and Turnover Rate of Mouse Spleen Dendritic Cell Populations." The Journal of Immunology 165(12): 6762-6770.
- Kapeller, R., Cantley LC. (1994). "Phosphatidylinositol 3-kinase." Bioessays 16(8): 565-576.
- Katso, R., K. Okkenhaug, et al. (2001). "Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer." Annu Rev Cell Dev Biol 17: 615-675.
- Kerr, J., Wyllie AH, Currie AR. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. ." Br J Cancer. 26(4): 239-257.
- Kim, K.-W., M.-L. Cho, et al. (2007). "Up-regulation of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) production in rheumatoid synovial fibroblasts through interactions with T lymphocytes: Role of interleukin-17 and CD40L-CD40 interaction." Arthritis & Rheumatism 56(4): 1076-1086.
- Kissenpfennig, A., S. Henri, et al. (2005). "Dynamics and Function of Langerhans Cells In Vivo: Dermal Dendritic Cells Colonize Lymph Node Areas Distinct from Slower Migrating Langerhans Cells." Immunity 22(5): 643-654.
- Klenke, R. L., S. Cai, A. L. Giannini, P. J. Gallagher, P. de Lorerolle, and D. A. Cheresh. (1997). "Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase." J. Cell Biol 137: 481-492.
- Koch, W. J., B. E. Hawes, et al. (1994). "Cellular expression of the carboxyl terminus of a G protein-coupled receptor kinase attenuates G beta gamma-mediated signaling." Journal of Biological Chemistry 269(8): 6193-6197.
- Kohn, A. D., S. A. Summers, et al. (1996). "Expression of a Constitutively Active Akt Ser/Thr Kinase in 3T3-L1 Adipocytes Stimulates Glucose Uptake and Glucose Transporter 4 Translocation." Journal of Biological Chemistry 271(49): 31372-31378.
- Krugmann, S., P. T. Hawkins, et al. (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): 17152-17158.
- Kryczek, I., S. Wei, et al. (2007). "Stroma-derived factor (SDF-1/CXCL12) and human tumor pathogenesis." Am J Physiol Cell Physiol 292(3): C987-995.

- Lai, C.-F., L. Chaudhary, et al. (2001). "Erk Is Essential for Growth, Differentiation, Integrin Expression, and Cell Function in Human Osteoblastic Cells." Journal of Biological Chemistry 276(17): 14443-14450.
- Lapidot, T., Dar A, Kollet O. (2005). "How do stem cells find their way home?" Blood 106(6): 1901-1910.
- Lataillade, J.-J., D. Clay, et al. (2002). "Stromal cell-derived factor 1 regulates primitive hematopoiesis by suppressing apoptosis and by promoting G0/G1 transition in CD34+ cells: evidence for an autocrine/paracrine mechanism." Blood 99(4): 1117-1129.
- Lauffenburger, D. A. and A. F. Horwitz (1996). "Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process." Cell 84(3): 359-369.
- Leist, M. and M. Jäättelä (2001). "Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms." Nat Rev Mol Cell Biol 2(8): 589-598.
- Leverkus, M., H. Walczak, et al. (2000). "Maturation of dendritic cells leads to up-regulation of cellular FLICE-inhibitory protein and concomitant down-regulation of death ligand-mediated apoptosis." Blood 96(7): 2628-2631.
- Levoye, A., K. Balabanian, et al. (2009). "CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling." Blood 113(24): 6085-6093.
- Li, M., Ransohoff RM. (2008). "Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: a migration from immunology to neurobiology." Prog Neurobiol. 84(2): 116-131.
- Libert, F., E. Passage, et al. (1991). "Chromosomal mapping of A1 and A2 adenosine receptors, VIP receptor, and a new subtype of serotonin receptor." Genomics 11(1): 225-227.
- Litman, G. W., Rast J.P., Fugmann S.D. (2010). "The origins of vertebrate adaptive immunity." Nature Reviews Immunology 10: 543-553.
- Loo, D., Rillema JR. (1998). "Measurement of cell death." Methods Cell Biol. 57: 251-264.
- Lu, Z. and S. Xu (2006). "ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis." IUBMB Life 58(11): 621-631.
- Luker, K. E., M. Gupta, J. M. Steele, B. R. Foerster, and G. D. Luker. (2009). "Imaging ligand-dependent activation of CXCR7." Neoplasia 11: 1022-1035.
- Ma, L., Z. Chen, et al. (2005). "Phosphorylation and Functional Inactivation of TSC2 by Erk: Implications for Tuberous Sclerosis and Cancer Pathogenesis." Cell 121(2): 179-193.
- Ma, Q., D. Jones, et al. (1998). "Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95(16): 9448-9453.
- Ma, X. M., and J. Blenis. (2009). "Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control." Nat Rev. Mol Cell Biol 10: 307-318.
- Manning, B. D. and L. C. Cantley (2007). "AKT/PKB signaling: navigating downstream." Cell 129(7): 1261-1274.
- Mantovani, A. (1999). "The chemokine system: redundancy for robust outputs." Immunol. Today 20: 254-257.
- Marais, R., Y. Light, et al. (1998). "Requirement of Ras-GTP-Raf Complexes for Activation of Raf-1 by Protein Kinase C." Science 280(5360): 109-112.
- Marsland, B. J., P. Böttig, et al. (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): 355-358.
- Martin-Fontecha, A., S. Sebastiani, et al. (2003). "Regulation of Dendritic Cell Migration to the Draining Lymph Node." The Journal of Experimental Medicine 198(4): 615-621.
- Martinet, Y., N. Martinet, et al. (1994). "Blood monocyte chemotaxis." Journal of Immunological Methods 174(1-2): 209-214.
- Matheny, R. W., Jr. and M. L. Adamo (2010). "PI3K p110[alpha] and p110[beta] have differential effects on Akt activation and protection against oxidative stress-induced apoptosis in myoblasts." Cell Death Differ 17(4): 677-688.
- McCandless, E., Piccio L, Woerner BM, Schmidt RE, Rubin JB, Cross AH, Klein RS. (2008). "Pathological expression of CXCL12 at the blood-brain barrier correlates with severity of multiple sclerosis." Am J Pathol. 172: 799-808.

- Medzhitov, R. (2001). "Toll-like receptors and innate immunity." Nature Reviews Immunology 1: 135-145.
- Meili, R., Ellsworth C, Lee S, Reddy TB, Ma H, Firtel RA. (1999). "Chemoattractant-mediated transient activation and membrane localization of Akt/PKB is required for efficient chemotaxis to cAMP in Dictyostelium." EMBO J. 18(8): 2092-2105.
- Mempel, T. R., S. E. Henrickson, et al. (2004). "T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases." Nature 427(6970): 154-159.
- Miao, Z., K. E. Luker, et al. (2007). "CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature." Proceedings of the National Academy of Sciences 104(40): 15735-15740.
- Miller, R. J. B., Ghazal Bhattacharyya, Bula J. (2008). "CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development." Journal of Neuroimmunology 198(1-2): 31-38.
- Mines, M., Ding Y, Fan GH (2007). "The many roles of chemokine receptors in neurodegenerative disorders: emerging new therapeutical strategies." Curr Med Chem 14(23): 2456-2470.
- Montagnani, M., H. Chen, et al. (2001). "Insulin-stimulated Activation of eNOS Is Independent of Ca²⁺ but Requires Phosphorylation by Akt at Ser1179." Journal of Biological Chemistry 276(32): 30392-30398.
- Morales-Ruiz, M., Fulton D, Sowa G, Languino LR, Fujio Y, Walsh K, Sessa WC. (2000). "Vascular endothelial growth factor-stimulated actin reorganization and migration of endothelial cells is regulated via the serine/threonine kinase Akt." Circ Res 86(8): 892-896.
- Murakami, M., T. Ichisaka, et al. (2004). "mTOR Is Essential for Growth and Proliferation in Early Mouse Embryos and Embryonic Stem Cells." Mol. Cell. Biol. 24(15): 6710-6718.
- Murga, C., L. Laguinje, et al. (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 kinase gamma." J Biol Chem 273(30): 19080-19085.
- Murphy, P. M., M. Baggiolini, et al. (2000). "International Union of Pharmacology. XXII. Nomenclature for Chemokine Receptors." Pharmacological Reviews 52(1): 145-176.
- Nagasawa, T., Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, Kishimoto T. (1996). "Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1." Nature 382(6592): 635-638.
- Naumann, U., E. Cameroni, et al. (2010). "CXCR7 Functions as a Scavenger for CXCL12 and CXCL11." PLoS ONE 5(2): e9175.
- Neptune, E. R., and H. R. Bourne. (1997). "Receptors induce chemotaxis by releasing the $\delta\gamma$ subunit of Gi, not by activating Gq or Gs." Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 14489-14494.
- Neptune, E. R., T. Liri, and H. R. Bourne. (1999). "Galphai is not required for chemotaxis mediated by Gi-coupled receptors." J Biol Chem 274: 2824-2828.
- Nopora, A., Brocker T. (2002). "Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo." J Immunol. 169(6): 3006-3014.
- Oberlin, E., A. Amara, et al. (1996). "The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1." Nature 382(6594): 833-835.
- Odemis, V., Lamp E, Pezeshki G, Moepps B, Schilling K, Gierschik P, Littman DR, Engele (2005). "Mice deficient in the chemokine receptor CXCR4 exhibit impaired limb innervation and myogenesis." J. Mol Cell Neurosci. 30(4): 494-505.
- Ohl, L., M. Mohaupt, et al. (2004). "CCR7 Governs Skin Dendritic Cell Migration under Inflammatory and Steady-State Conditions." Immunity 21(2): 279-288.
- Okada, T., V. N. Ngo, et al. (2002). "Chemokine Requirements for B Cell Entry to Lymph Nodes and Peyer's Patches." The Journal of Experimental Medicine 196(1): 65-75.
- Opferman, J. T., A. Letai, et al. (2003). "Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1." Nature 426(6967): 671-676.
- Ouweland, K., S. J. A. M. Santegoets, et al. (2008). "CXCL12 is essential for migration of activated Langerhans cells from epidermis to dermis." European Journal of Immunology 38(11): 3050-3059.

- Pablos, J., Amara A, Boulloc A, Santiago B, Caruz A, Galindo M, Delaunay T, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos F. (1999). "Stromal-cell derived factor is expressed by dendritic cells and endothelium in human skin." Am. J. Pathol. 15: 1577-1586.
- Parent, C. A., B. J. Blacklock, et al. (1998). "G Protein Signaling Events Are Activated at the Leading Edge of Chemotactic Cells." Cell 95(1): 81-91.
- Park, Y., S. W. Lee, et al. (2002). "Cutting Edge: CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by up-regulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositide-3'-OH kinase pathway." J Immunol 168(1): 5-8.
- Platt, C. D., J. K. Ma, et al. (2010). "Mature dendritic cells use endocytic receptors to capture and present antigens." Proceedings of the National Academy of Sciences 107(9): 4287-4292.
- Poznansky, M. C., I. T. Olszak, et al. (2000). "Active movement of T cells away from a chemokine." Nat Med 6(5): 543-548.
- Prindull, G. (1995). "Apoptosis in the embryo and tumorigenesis." Eur J Cancer 31A(1): 116-123.
- Probst, H. C., K. McCoy, et al. (2005). "Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4." Nat Immunol 6(3): 280-286.
- Qin, S., J. B. Rottman, et al. (1998). "The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions." The Journal of Clinical Investigation 101(4): 746-754.
- Rajagopal, S., J. Kim, et al. (2010). " β -arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7." Proceedings of the National Academy of Sciences 107(2): 628-632.
- Ratzinger, G., P. Stoitzner, et al. (2002). "Matrix Metalloproteinases 9 and 2 Are Necessary for the Migration of Langerhans Cells and Dermal Dendritic Cells from Human and Murine Skin." The Journal of Immunology 168(9): 4361-4371.
- Ricart, B. G., B. John, et al. (2011). "Dendritic Cells Distinguish Individual Chemokine Signals through CCR7 and CXCR4." The Journal of Immunology 186(1): 53-61.
- Riol-Blanco, L., C. Delgado-Martin, et al. (2009). "Immunological synapse formation inhibits, via NF- κ B and FOXO1, the apoptosis of dendritic cells." Nat Immunol 10(7): 753-760.
- Riol-Blanco, L., N. Sanchez-Sanchez, et al. (2005). "The Chemokine Receptor CCR7 Activates in Dendritic Cells Two Signaling Modules That Independently Regulate Chemotaxis and Migratory Speed." J Immunol 174(7): 4070-4080.
- Robishaw, J. D. and C. H. Berlot (2004). "Translating G protein subunit diversity into functional specificity." Curr Opin Cell Biol 16(2): 206-209.
- Rollins, B. J. (1997). "Chemokines." Blood. 90(3): 909-928.
- Romashkova, J. A. and S. S. Makarov (1999). "NF- κ B is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling." Nature 401(6748): 86-90.
- Rossi, M. and J. W. Young (2005). "Human Dendritic Cells: Potent Antigen-Presenting Cells at the Crossroads of Innate and Adaptive Immunity." The Journal of Immunology 175(3): 1373-1381.
- Roux, P. P., B. A. Ballif, et al. (2004). "Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(37): 13489-13494.
- Ruedl, C., P. Koebel, et al. (2000). "Anatomical Origin of Dendritic Cells Determines Their Life Span in Peripheral Lymph Nodes." The Journal of Immunology 165(9): 4910-4916.
- Saba-El-Leil, M., Vella FD, Vernay B, Voisin L, Chen L, Labrecque N, Ang SL, Meloche S. (2003). "An essential function of the mitogen-activated protein kinase Erk2 in mouse trophoblast development." EMBO Rep 4(10): 964-968.
- 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.
- Sallusto, F., Lanzavecchia A. (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): 1109-1118.

- Sallusto, F., P. Schaerli, et al. (1998). "Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation." European Journal of Immunology 28(9): 2760-2769.
- Sallusto, F. C. M., Danieli C., Lanzavecchia A. (1995). "Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products." J Exp Med 182: 389-400.
- Sanchez-Alcañiz, J. A., S. Haegel, et al. (2011). "Cxcr7 Controls Neuronal Migration by Regulating Chemokine Responsiveness." Neuron 69(1): 77-90.
- Sanchez-Martin, L., A. Estecha, et al. (2011). "The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression." Blood 117(1): 88-97.
- Sanchez-Sanchez, N., L. Riol-Blanco, G. de la Rosa, J. Garcia-Bordas, D. Martín, N. Longo, A. Cuadrado, C. Cabañas, P. Sanchez-Mateos, and J. L. Rodríguez-Fernández. (2004). "Chemokine Receptor CCR7 Induces Intracellular signaling that Inhibits Apoptosis of Mature Dendritic Cells." Blood 104: 619-625.
- Sanchez-Sanchez, N., L. Riol-Blanco, et al. (2006). "The Multiple Personalities of the Chemokine Receptor CCR7 in Dendritic Cells." The Journal of Immunology 176(9): 5153-5159.
- Saraste, A. and K. Pulkki (2000). "Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis." Cardiovascular Research 45(3): 528-537.
- Sarbassov, D. D., D. A. Guertin, et al. (2005). "Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex." Science 307(5712): 1098-1101.
- Sasaki, A. T. and R. A. Firtel (2006). "Regulation of chemotaxis by the orchestrated activation of Ras, PI3K, and TOR." European Journal of Cell Biology 85(9-10): 873-895.
- Savill, J. and V. Fadok (2000). "Corpse clearance defines the meaning of cell death." Nature 407(6805): 784-788.
- Schaerli, P. and B. Moser (2005). "Chemokines." Immunologic Research 31(1): 57-74.
- Scheid, M. P., K. M. Schubert, et al. (1999). "Regulation of Bad Phosphorylation and Association with Bcl-xL by the MAPK/Erk Kinase." Journal of Biological Chemistry 274(43): 31108-31113.
- Sekulifá, A., C. C. Hudson, et al. (2000). "A Direct Linkage between the Phosphoinositide 3-Kinase-AKT Signaling Pathway and the Mammalian Target of Rapamycin in Mitogen-stimulated and Transformed Cells." Cancer Research 60(13): 3504-3513.
- Serbina, N. V., Jia T., Hohl T.M., Pamer E.G. (2008). "Monocyte-mediated defense against microbial pathogens." Annu Rev Immunol 26: 421-452.
- Servant, G., O. D. Weiner, et al. (2000). "Polarization of Chemoattractant Receptor Signaling During Neutrophil Chemotaxis." Science 287(5455): 1037-1040.
- Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." Mol Cell 9(3): 459-470.
- Shirozu, M., T. Nakano, et al. (1995). "Structure and Chromosomal Localization of the Human Stromal Cell-Derived Factor 1 (SDF1) Gene." Genomics 28(3): 495-500.
- Sierro, F., C. Biben, et al. (2007). "Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7." Proceedings of the National Academy of Sciences 104(37): 14759-14764.
- Sotsios, Y., Ward SG. (2000). "Phosphoinositide 3-kinase: a key biochemical signal for cell migration in response to chemokines." Immunol Rev. 177: 217-235.
- Sozzani, S., W. Luini, et al. (1997). "Receptor expression and responsiveness of human dendritic cells to a defined set of CC and CXC chemokines." The Journal of Immunology 159(4): 1993-2000.
- Stanford, M. M. and T. B. Issekutz (2003). "The relative activity of CXCR3 and CCR5 ligands in T lymphocyte migration: concordant and disparate activities in vitro and in vivo." Journal of Leukocyte Biology 74(5): 791-799.
- Steinman, R. M. (1991). "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." Annu Rev Immunol 9: 271-296.
- Steinman, R. M. a. M. C. N. (2002). "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A 99(1): 351-358.
- Strasser, A., L. O'Connor, et al. (2000). "Apoptosis signaling." Annu Rev Biochem 69: 217-245.

- Stutte, S., T. Quast, et al. (2010). "Requirement of CCL17 for CCR7- and CXCR4-dependent migration of cutaneous dendritic cells." Proceedings of the National Academy of Sciences 107(19): 8736-8741.
- Suire, S., A. M. Condliffe, et al. (2006). "G[beta][gamma]s and the Ras binding domain of p110[gamma] are both important regulators of PI3K[gamma] signalling in neutrophils." Nat Cell Biol 8(11): 1303-1309.
- Sun, X., G. Cheng, et al. (2010). "CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression." Cancer and Metastasis Reviews 29(4): 709-722.
- Suzuki, Y. R., Monzur Mitsuya, Hiroaki (2001). "Diverse Transcriptional Response of CD4+ T Cells to Stromal Cell-Derived Factor (SDF)-1: Cell Survival Promotion and Priming Effects of SDF-1 on CD4+ T Cells." The Journal of Immunology 167(6): 3064-3073.
- Swartz, M. A. (2001). "The physiology of the lymphatic system." Advanced Drug Delivery Reviews 50(1-2): 3-20.
- Tachibana, K., Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, Nagasawa T. (1998). "The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract." Nature. 393(6685): 591-594.
- Tashiro, K., H. Tada, et al. (1993). "Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins." Science 261(5121): 600-603.
- Teixeiro, E. and M. A. Daniels (2010). "ERK and cell death: ERK location and T cell selection." FEBS Journal 277(1): 30-38.
- Thelen, M. (2001). "Dancing to the tune of chemokines." Nature Immunol 2: 129-134.
- Thelen, M. and S. Thelen (2008). "CXCR7, CXCR4 and CXCL12: An eccentric trio?" Journal of Neuroimmunology 198(1-2): 9-13.
- Thompson, C. B. (1995). "Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease." Science 267(5203): 1456-1462.
- Thomson, A. W., H. R. Turnquist, and G. Raimondi. (2009). "Immunoregulatory functions of mTOR inhibition." Nat Rev. Immunol 9: 324-337.
- Timmer, T. C., Baltus B., Vondenhoff M, Huizinga TW, Tak PP, Verweij CL, Mebius RE, van der Pouw Kraan TC. (2007). "Inflammation and ectopic lymphoid structures in rheumatoid arthritis synovial tissues dissected by genomic technology: identification of the interleukin-7 signaling pathways in tissues with lymphoid neogenesis." Arthritis Rheum 56(2492-2502).
- Trombetta, E. S., Mellman I. (2005). "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo." Annu Rev Immunol 23: 975-1028.
- Valentin, G., P. Haas, et al. (2007). "The Chemokine SDF1a Coordinates Tissue Migration through the Spatially Restricted†Activation†of Cxcr7 and Cxcr4b." Current Biology 17(12): 1026-1031.
- 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): 440-450.
- Van Dop, C., G. Yamanaka, et al. (1984). "ADP-ribosylation of transducin by pertussis toxin blocks the light-stimulated hydrolysis of GTP and cGMP in retinal photoreceptors." Journal of Biological Chemistry 259(1): 23-26.
- Vanbervliet, B., N. Bendriss-Vermare, C. Massacrier, B. Homey, O. de Bouteiller, F. Brière, G. Trinchieri, and C. Caux. (2003). "The inducible CXCR3 ligands control plasmacytoid dendritic cell responsiveness to the constitutive chemokine stromal cell-derived factor 1 (SDF-1)/CXCL12." J Exp Med 198(5): 823-830
- Vanhaesebroeck, B. and M. D. Waterfield (1999). "Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases." Exp Cell Res 253(1): 239-254.
- Veis, D. J., C. M. Sorenson, et al. (1993). "Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair." Cell 75(2): 229-240.
- Vial, E., E. Sahai, et al. (2003). "ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility." Cancer Cell 4(1): 67-79.
- Vianello, F., P. Kraft, et al. (2005). "A CXCR4-Dependent Chemorepellent Signal Contributes to the Emigration of Mature Single-Positive CD4 Cells from the Fetal Thymus." J Immunol 175(8): 5115-5125.

- Viglietto, G., M. L. Motti, et al. (2002). "Cytoplasmic relocalization and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer." *Nat Med* 8(10): 1136-1144.
- Vlahakis, S., Villasis-Keever A, Gomez T, Vanegas M, Vlahakis N, Paya CV. (2002). "G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways." *J Immunol*. 169: 5546-5554.
- Wang, Y., G. Li, et al. (2011). "CXCR4 and CXCR7 Have Distinct Functions in Regulating Interneuron Migration." *Neuron* 69(1): 61-76.
- Webb, D. J., K. Donais, et al. (2004). "FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly." *Nat Cell Biol* 6(2): 154-161.
- Webb, L., Ehrenguber MU, Clark-Lewis I, Baggiolini M, Rot A. (1993). "Binding to heparan sulfate or heparin enhances neutrophil responses to interleukin." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90: 7158-7162.
- Weber, M., Blair E, Simpson CV, O'Hara M, Blackburn PE (2004). "The chemokine receptor D6 constitutively traffics to and from the cell surface to internalize and degrade chemokines." *Mol. Biol. Cell* 15: 2492-2508.
- Welcker, M., J. Singer, et al. (2003). "Multisite Phosphorylation by Cdk2 and GSK3 Controls Cyclin E Degradation." *Molecular Cell* 12(2): 381-392.
- Widmann, C., S. Gibson, et al. (1999). "Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a Three-Kinase Module From Yeast to Human." *Physiological Reviews* 79(1): 143-180.
- Woo, I. S., S. H. Hong, et al. (2008). "Circulating Stromal Cell Derived Factor-1 α (SDF-1 α) is Predictive of Distant Metastasis in Gastric Carcinoma." *Cancer Investigation* 26(3): 256-261.
- Wullschleger, S., R. Loewith, et al. (2006). "TOR Signaling in Growth and Metabolism." *Cell* 124(3): 471-484.
- Yan Zhou, P. H. L., Chunhai Hao, and V. Wee Yong (2002). "CXCR4 Is a Major Chemokine Receptor on Glioma Cells and Mediates Their Survival " *J. Biol. Chem.* 277: 49481-49487.
- Yanagawa, Y. and K. Onoe (2003). "CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant up-regulation of Cdc42 and Rac activities." *Blood* 101(12): 4923-4929.
- Yoon, S. and R. Seger (2006). "The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions." *Growth Factors* 24(1): 21-44.
- Yoshitake, N., Fukui H, Yamagishi H, Sekikawa A, Fujii S, Tomita S, Ichikawa K, Imura J, Hiraishi H, Fujimori T. (2008). "Expression of SDF-1 alpha and nuclear CXCR4 predicts lymph node metastasis in colorectal cancer." *Br J Cancer* 98: 1682-1689.
- 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.
- Zahir, N. and V. M. Weaver (2004). "Death in the third dimension: apoptosis regulation and tissue architecture." *Curr Opin Genet Dev* 14(1): 71-80.
- Zhang, J. P., W. G. Lu, et al. (2007). "Study on CXCR4/SDF-1 α axis in lymph node metastasis of cervical squamous cell carcinoma." *International Journal of Gynecological Cancer* 17(2): 478-483.
- Zhang, Y., X. Gao, et al. (2003). "Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins." *Nat Cell Biol* 5(6): 578-581.
- Zigmond, S. H. (1977). "Ability of polymorphonuclear leukocytes to orient in gradients of chemotactic factors." *The Journal of Cell Biology* 75(2): 606-616.
- Zlotnik, A. (2008). "New insights on the role of CXCR4 in cancer metastasis." *The Journal of Pathology* 215(3): 211-213.
- Zlotnik, A. a. O. Y. (2000). "Chemokines: a new classification system and their role in immunity." *Immunity*. 12(2): 121-127.
- Zoncu, R., A. Efeyan, et al. (2011). "mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing." *Nat Rev Mol Cell Biol* 12(1): 21-35.
- Zou, Y., Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. (1998). "Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development." *Nature*. 393(6685): 595-599.

ANEXOS

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

Muchas de las abreviaturas y acrónimos proceden del inglés y se han mantenido.

ADN: Ácido Desoxi riboNucleico	eNOS: Endothelial Nitric Oxide Syntase
ADP: Adenosine DiPhosphate	Erk1/2: Extracellular signal-Regulated Kinase ½
AMPK: AMP-activated protein Kinase	FADD: Fas (TNFRSF6)-Associated via Death Domain
Apaf-1: Apoptosis Protease-inducing Factor 1	FAT: FRAP, ATM & TRRAP
ARN: Ácido RiboNucleico	FITC: Fluoresceína-5-IsoTiocianato
ARNm: Ácido RiboNucleico mensajero	FCS: Fetal Calf Serum
Bax: BCL2-associated X protein	FKH: Forkhead
Bcl-2: B cell lymphoma 2	FoxO: Forkhead box class O
Bcl-XL: B cell lymphoma extra large	GADPH: Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
BH: Bcl-2 Homology	GAG: Glucosaminoglicano
Bim: Bcl-2 interacting mediator of death	GAP: GTPase Activating Protein
BSA: Bovine Serum Albumin	GDP: Guanine DiPhosphate
CCL: Chemokine (CC motif) Ligand	GEF: GTPase Exchange Factor
CCR: Chemokine (CC motif) Receptor	GFP: Green Fluorescent Protein
CDK2: Cyclin-dependent kinase 2	GL: Ganglio Linfático
CDs: Células Dendríticas	GM-CSF: Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor
cFLAR: CASP8 and FADD-Like Apoptosis Regulator	GPCR: G protein-coupled Receptor
CMFDA: 5-chloromethylfluorescein diacetate	GRK: G protein-coupled Receptor Kinase
CPAs: Células Presentadoras de Antígeno	GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3
CXCL: Chemokine (CXC motif) Ligand	GTP: Guanine TriPhosphate
CXCR: Chemokine (CXC motif) Receptor	HEAT: Huntingtin, Elongation factor 3, PR65/A & TOR
DEPTOR: DEP domain-containing mTOR-interacting protein	HEPES: Acido N-2-HidroxiEtil Piperacin-N'-2-EtanoSulfónico
DISC: Death-Inducing Signaling Complex	HIF: Hypoxia Inducible Factor
DYRK: Dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation Regulated Kinase	IAP: Inhibitor of Apoptosis Protein
ECL: Extracelular	IFN: InterFeron
EDTA: EthyleneDiamineTetraacetic Acid	Ig: Inmunoglobulina
	IKK: IκB Kinase
	IL: InterLeukin
	IP: Ioduro de Propidio
	JNK: c-Jun N-terminal Kinase

ANEXO I

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

KDa: Kilodalton

LPS: Lipopolisacárido

MACS: Magnetic-Activated Cell
Sorting

MAPK: Mitogen-Activated Protein
Kinase

MEK: MAPKinase-Erk Kinase

MHC: Major Histocompatibility
Complex

MLCK: Miosin Light Chain Kinase

mLST8: mammalian Lethal with
SEC13 protein 8

MMP: Matrix MetalloProteinase

MST1: Mammalian Sterile20-like 1

mTOR: mammalian Target Of
Rapamycin

mTORC: mammalian Target Of
Rapamycin (mTOR) Complex

NF-κB: Nuclear Factor-κB

NK: Natural Killer

p70S6K: 70 kDa ribosomal protein S6
Kinase

p90rsk: 90-kDa ribosomal S6 kinase

PBMC: Periferal Blood Monocyte Cell

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PDK1: Phosphoinositide-Dependent
protein Kinase 1

PE: Phycoerythrin

PFA: Paraformaldehído

PH: Pleckstrin Homology

PI: Phosphatidylinositol

PIKK: Phosphatidylinositol Kinase-
related Kinase

PROCTOR: PRotein Observed with
RICTOR

PIP: Phosphatidylinosito Phosphate

PRAS40: 40 kDa PPro-rich Akt Substrate

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinase

PKB: Protein Kinase B

PLL: Poly-L-Lysine

PROCTOR: Protein Observed with
RICTOR

PS: Phosphatidyl Serine

PTX: Pertussis Toxin

RAPTOR: Regulatory-Associated
Protein of mTOR

RGS: Regulator of G-protein Signaling

RI: Respuesta immune

RICTOR: Rapamycin-Insensitive
Companion of mTOR

Rheb: Ras homolog enriched in brain

SDF: Stromal Derived Factor

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SEM: Standard Error of the Mean

SH: Src Homology

siRNA: small interfering Ribonucleic
Acid

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

TBS: Tris-Buffered Saline

TBST: Tris-Buffered Saline Tween

TCR: T Cell Receptor

TM: Transmembrana

TNF: Tumor Necrosis Factor

TRAIL: TNF-Related Apoptosis-
Inducing Ligand

TSC: Tuberosclerosis Complex

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia
Humana

WHIM: Warts,
Hypogammaglobulinemia, Infections,
and Myelokathexis

- Delgado-Martín C**, Escribano C, Pablos JL, Riol-Blanco L, Rodríguez-Fernández JL. (2011). “CXCL12 uses a hierarchy of bifunctional signaling molecules to simultaneously regulate chemotaxis and survival in mature dendritic cells”. *Enviado*
- Rey-Gallardo A, **Delgado-Martín C**, Gerardy-Schahn R, Rodríguez-Fernández JL, Vega MA. (2011) “Polysialic acid is required for Neuropilin-2a/b-mediated control of CCL21-driven chemotaxis of mature dendritic cells, and for their migration in vivo.” *Glycobiology*. Jan 2. [Epub ahead of print]
- Rey-Gallardo A, Escribano C, **Delgado-Martín C**, Rodríguez-Fernández JL, Gerardy-Schahn R, Rutishauser U, Corbi AL, Vega MA. (2010). “Polysialylated neuropilin-2 enhances human dendritic cell migration through the basic C-terminal region of CCL21”. *Glycobiology*. Sep;20(9):1139-46.
- Rodríguez-Fernández JL, Riol-Blanco L, **Delgado-Martín C**. (2010) “What is an immunological synapse?” *Microbes Infect*. Jun;12(6):438-45. Review.
- Rodríguez-Fernández JL, Riol-Blanco L, **Delgado-Martín C**. (2010) “What is the function of the dendritic cell side of the immunological synapse?” *Sci Signal*. Jan 19;3(105):re2. Review.
- Escribano C, **Delgado-Martín C**, Rodríguez-Fernández JL. (2009). “CCR7-dependent stimulation of survival in dendritic cells involves inhibition of GSK3 β ”. *J Immunol*. Nov 15;183(10):6282-95.
- Rodríguez-Fernández JL, Riol-Blanco L, **Delgado-Martín C**, Escribano-Díaz C. (2009). “The dendritic cell side of the immunological synapse: exploring terra incognita”. *Discov Med*. Oct;8(42):108-12. Review.
- Riol-Blanco L, **Delgado-Martín C**, Sánchez-Sánchez N, Alonso-C LM, Gutiérrez-López MD, Del Hoyo GM, Navarro J, Sánchez-Madrid F, Cabañas C, Sánchez-Mateos P, Rodríguez-Fernández JL (2009) “Immunological synapse formation inhibits, via NF-kappaB and FOXO1, the apoptosis of dendritic cells”. *Nat Immunol*. Jul;10(7):753-60. Erratum in: *Nat Immunol*. 2010 Jun;11(6):543.

ANEXO II

PUBLICACIONES

Immunological synapse formation inhibits, via NF- κ B and FOXO1, the apoptosis of dendritic cells

Lorena Riol-Blanco^{1,7}, Cristina Delgado-Martín¹, Noelia Sánchez-Sánchez¹, Luis M Alonso-C², María Dolores Gutiérrez-López³, Gloria Martínez del Hoyo⁴, Joaquín Navarro⁵, Francisco Sánchez-Madrid^{4,6}, Carlos Cabañas³, Paloma Sánchez-Mateos⁵ & José Luis Rodríguez-Fernández¹

The immunological synapse (IS) is a cell–cell junction formed between CD4⁺ T cells and dendritic cells (DCs). Here we show *in vitro* and *in vivo* that IS formation inhibits apoptosis of DCs. Consistent with these results, IS formation induced antiapoptotic signaling events, including activation of the kinase Akt1 and localization of the prosurvival transcription factor NF- κ B and the proapoptotic transcription factor FOXO1 to the nucleus and cytoplasm, respectively. Inhibition of phosphatidylinositol 3-OH kinase and Akt1 partially prevented the antiapoptotic effects of IS formation. Direct stimulation of the IS component CD40 on DCs leads to the activation of Akt1, suggesting the involvement of this receptor in the antiapoptotic effects observed upon IS formation.

Immune responses are initiated by the specific interaction of T cells and DCs in the lymph nodes^{1–3}. During this process a specialized cell–cell junction called immunological synapse is formed between these two cell types^{2–8}. We will use the terms IS(T cell) and IS(DC) to refer to the IS region on the T cell and DC side, respectively. The IS(DC) includes receptors such as the integrin LFA-1 ($\alpha_L\beta_2$)^{2–8} and the co-stimulatory molecule CD40 (A000031)⁹.

Despite the many studies on the IS^{2,10–12}, the functions of this structure are still controversial^{12,13}. The IS(T cell) influences T cell antigen receptor (TCR) signaling and T cell activation^{14,15}, as well as endocytosis of the TCR¹⁵, polarized secretion of T cell cytokines toward the antigen-presenting cell (APC)¹⁶ and the lineage commitment of naive CD4⁺ T cells¹⁷. Fewer studies have analyzed the IS(DC) and its possible contribution to the functions of the IS³. However, the existence of specific counter-receptors on the IS(DC) that mirror surface molecules on the IS(T cell)¹⁸, and the observed polarization of F-actin at the IS(DC)¹⁹, suggest that this region may behave as a signaling platform and may regulate DC functions.

Apoptosis is a process involved in development, elimination of damaged cells, and the maintenance of cell homeostasis^{20–23}. Many receptors inhibit apoptosis by inducing activation of phosphatidylinositol 3-OH kinase (PI(3)K) and its downstream effector kinase Akt1 (A000249)^{20,22}. Active Akt1 controls a variety of molecules, and its activity prevents apoptosis and extends cell survival^{20,22}. Among the important downstream effectors of Akt1 are Bcl-2 family members^{20,23}. Specifically, Akt1 promotes translocation of the transcription

factor NF- κ B to the nucleus, where NF- κ B induces transcription of genes encoding antiapoptotic Bcl-2 family members²⁴. Furthermore, Akt1 phosphorylates and inactivates the Forkhead box class O (FOXO) family of transcription factors, which includes FOXO1 (A000944), FOXO3a and FOXO4. Upon phosphorylation by Akt1, FOXO proteins are inactivated because they shuttle from the nucleus to the cytoplasm, where they are either retained by the 14-3-3 linker or degraded^{22,25,26}. FOXO members can activate transcription of genes encoding proapoptotic molecules, including proapoptotic Bcl-2 member Bim^{22,25,26}, a key regulator of apoptosis^{21,23}. Therefore, FOXO inactivation may also contribute to cell survival.

In the lymph node, antigen-loaded DCs induce activation of T cells that express cognate TCRs. Unlike T cells, which after activation and proliferation exit the lymph node, mature DCs undergo apoptosis in the lymph node^{21,27,28}. However, activation of T cells by DCs, after IS formation, requires several hours of contact between these cells^{4,6,7,29,30}. Thus, regulation of DC survival during this period is likely to be important. We hypothesized that the IS(DC) might operate as a molecular transducer of intracellular signals that inhibit DC apoptosis.

RESULTS

IS formation inhibits DC apoptosis *in vitro*

We wanted to test the hypothesis that IS formation confers extended survival upon DCs. Two observations facilitated the experimental investigation. First, after *in vitro* induction of IS formation in

¹Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain. ²Centro de Microscopía y Citometría, Universidad Complutense, Madrid, Spain. ³Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC, Madrid, Spain. ⁴Servicio de Inmunología, Hospital de La Princesa, Universidad Autónoma, Madrid, Spain. ⁵Laboratorio de Inmunooncología, Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain. ⁶Departamento de Biología Vascular e Inflamación, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain. ⁷Present address: Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. Correspondence should be addressed to J.L.R.-F. (rodrifer@cib.csic.es).

Received 19 February; accepted 12 May; published online 7 June 2009; doi:10.1038/ni.1750

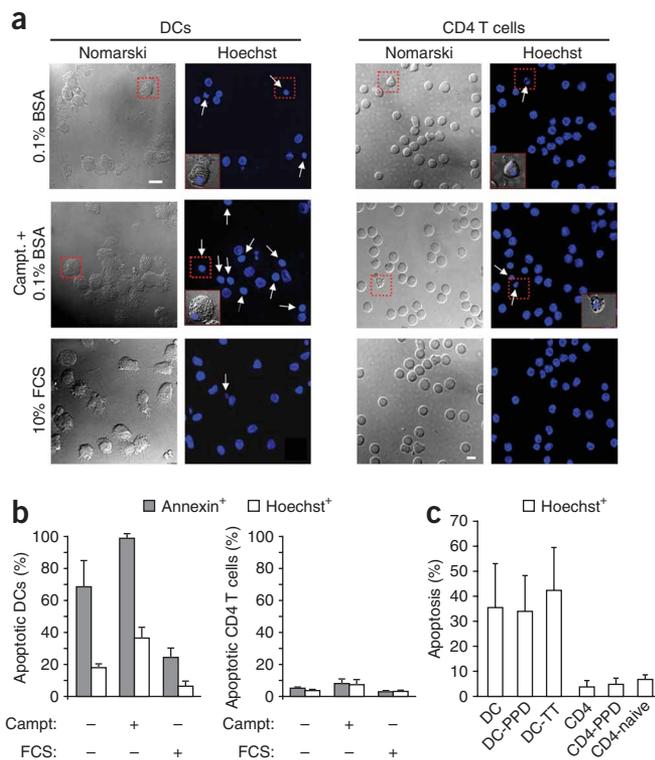


Figure 1 DCs show a higher tendency to become apoptotic than CD4 T cells. **(a,b)** Unpulsed DCs and polyclonal resting CD4 T cells stained with Hoechst to label the nuclei. Cells were washed in RPMI and then incubated for 10 h in 0.1% BSA in RPMI, in 0.1% BSA in RPMI plus camptothecin (Campt; 1 μ M) or in 10% FCS in RPMI. **(a)** Apoptotic DCs (arrows), with a characteristic condensed, fragmented, brighter nucleus than nonapoptotic DCs. Insets, merged views of Nomarski and Hoechst staining of representative apoptotic cells. Scale bars: DCs, 40 μ m; CD4 T cells, 10 μ m. **(b)** Percentage of DCs (left) or CD4 T cells (right) that present condensed or fragmented nuclei (Hoechst⁺) or annexin-FITC binding on the outer membrane (annexin⁺). Means \pm s.d., $n = 4$ independent experiments, ≥ 150 DCs and CD4 T cells per experiment. **(c)** Various DCs—unpulsed, pulsed with PPD (DC-PPD) or pulsed with tetanus toxoid (DC-TT)—and various CD4 T cells—polyclonal non-antigen-specific (CD4), polyclonal PPD-specific (CD4-PPD) or naive polyclonal non-antigen-specific (CD4-naive)—were washed in RPMI and transferred for 10 h to 0.1% BSA in RPMI. Cells were stained with Hoechst as in **a**. The percentage of cells with condensed or fragmented nucleus is shown. Means \pm s.d.; $n = 5$ independent experiments, ≥ 120 DCs and CD4 T cells per experiment.

complete medium (10% FCS in RPMI), transfer of DC–T cell conjugates to 0.1% BSA in RPMI did not affect, for at least 10 h, the percentage of conjugates forming IS (data not shown). Second, under serum-free conditions, DCs had a much higher susceptibility to apoptosis than did CD4⁺ T cells (Fig. 1). For example, when we maintained human DCs or CD4⁺ T cells in 0.1% BSA in RPMI for 10 h and then measured the percentage of cells displaying the apoptosis indicators nucleus condensation or phosphatidylserine externalization³¹, the percentage of apoptotic cells was significantly higher in DC than T cell populations (Fig. 1a,b). We also observed this greater tendency of human DCs to become apoptotic under serum-free conditions when antigen-loaded DCs were compared to antigen-specific or non-antigen-specific human CD4⁺ T cells (Fig. 1c).

To test whether IS formation protected DCs from apoptosis *in vitro*, we first induced IS formation between DCs and CD4⁺ T cells in complete medium by sedimenting, through centrifugation, a mixture of DCs and CD4⁺ T cells^{17,19}. Next we transferred single DCs and DC–T cell conjugates forming an IS to 0.1% BSA in RPMI for additional 10 h. At the end of this period, we analyzed by immunofluorescence the percentage of DCs that showed phosphatidylserine externalization or nuclear condensation. In a first set of experiments (Fig. 2a), we allowed allogeneic interactions between unpulsed human DCs and resting polyclonal memory CD45RO⁺CD4⁺ T cells (hereafter called CD4 T cells) or naive CD45RA⁺CD4⁺ T cells (CD4-naive). In a second set of experiments (Fig. 2b), we induced autologous interactions between purified protein derivative (PPD)-pulsed DCs and PPD-specific polyclonal CD4 T cells, PPD-pulsed DCs and non-antigen-specific polyclonal CD4 T cells, or tetanus toxoid-pulsed DCs and PPD-specific polyclonal CD4 T cells. The percentage of cells that underwent apoptosis was reduced almost 60% in DCs that formed IS, compared to single DCs (Fig. 2a,b). Taken together, these results indicate that IS formation protects DCs from apoptosis.

In the immunofluorescence experiments, we also observed consistent protection from apoptosis when DCs forming an IS were

compared to unengaged DCs in the same fields of view; that is, when all DCs were probably exposed to similar concentrations of soluble factors. However, to completely rule out the possibility that the observed protection was due to soluble factors secreted by the cells and not by IS formation, we performed experiments in which human T cells and DCs were separated by a Transwell membrane that allowed only the passage of soluble factors (Fig. 2c). A higher percentage of DCs incubated alone or separated from T cells by a membrane underwent apoptosis, compared to DCs that formed an IS (Fig. 2c). The results indicate that soluble factors are not sufficient to induce the observed inhibition of DC apoptosis. Protection from apoptosis was also observed when mouse splenic DCs pulsed with ovalbumin (OVA) peptide formed ISs with mouse OVA peptide-specific OTII CD4 T cells (Supplementary Figs. 1 and 2 online), indicating that the protective effect of the IS is conserved between these species. Finally, IS disruption induced by treatment with a blocking LFA-1-specific antibody³² led to an increase in the percentage of apoptotic DCs (Supplementary Fig. 3 online). As all types of IS analyzed here suppressed DC apoptosis, all subsequent experiments were carried out with human DCs and memory CD4 T cells that established allogeneic interactions, unless otherwise indicated.

IS formation inhibits apoptosis of DCs in lymph nodes

To identify apoptotic DCs inside the lymph node, we used FLIVO. This reagent³³, Val-Ala-Asp (O-methyl)-fluoromethylketone (VAD-FMK) conjugated to a fluorescent dye, binds irreversibly to caspases, including caspases 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8 and 9, that are activated during apoptosis²⁰. Thus FLIVO can be used as a probe to detect apoptotic cells³³. In this regard, FLIVO and Hoechst stain are equivalent in their ability to distinguish apoptotic from nonapoptotic cells³⁴ (Supplementary Fig. 4 online). As the fluorophore-conjugated forms of FLIVO are cell permeant and chemically stable, this reagent can be injected intravenously in mice to detect apoptotic DCs in the lymph nodes. Non-apoptotic DCs, which lack active caspases, remain largely unlabeled because fluorescent FLIVO diffuses out of these cells (Supplementary Fig. 5 online). In contrast, fluorescent FLIVO binds irreversibly to caspases upregulated in apoptotic cells, allowing the selective labeling of these cells in the lymph node (Supplementary Fig. 5). Fluorescently labeled DCs can be subsequently examined inside the lymph node by two-photon microscopy (Fig. 3 and Supplementary Fig. 5).

Using FLIVO, we analyzed whether IS formation was able to protect DCs from becoming apoptotic in the lymph node (Fig. 3a). C57BL/6 mice were injected subcutaneously in the hind footpad with

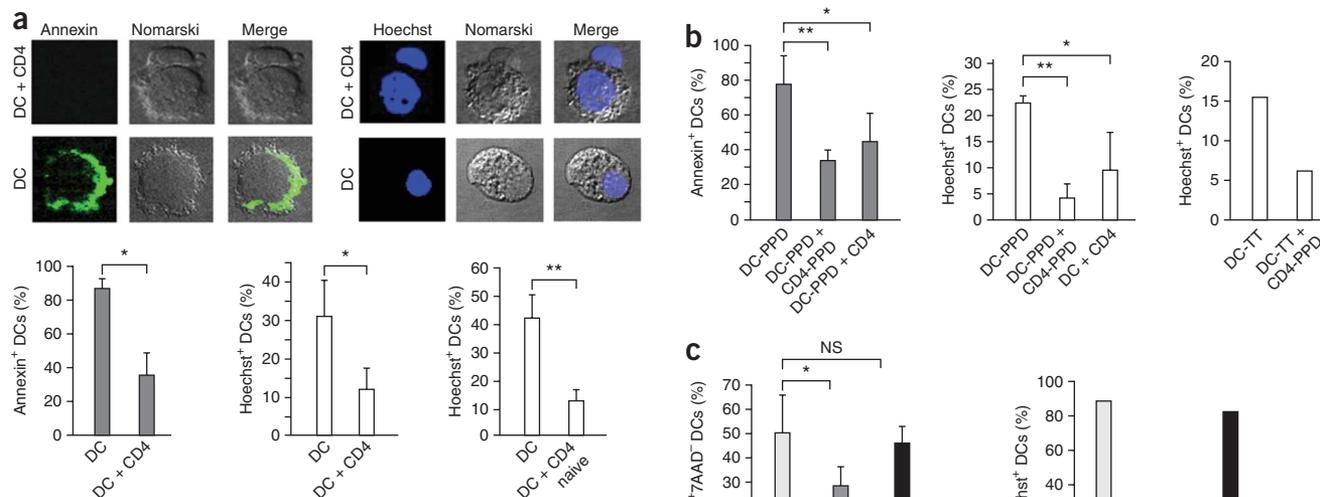


Figure 2 IS formation protects DCs from apoptosis in serum-free conditions. **(a,b)** DCs alone or DCs that were allowed to form an IS with CD4 T cells were maintained in complete medium for 2 h. Next the cells were transferred to 0.1% BSA in RPMI for 10 h. Cells were then plated on poly-L-lysine-coated dishes and stained with annexin-FITC or Hoechst. **(a)** Apoptosis upon allogeneic IS formation between unpulsed DCs and memory or naive CD4 T cells. Top, representative staining. Bottom, quantification; $n = 3$ independent experiments in each case, ≥ 100 DCs per experiment. Means \pm s.d. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. **(b)** Autologous IS were formed between PPD-pulsed DCs (DC-PPD) or tetanus toxoid-pulsed DCs (DC-TT) and memory PPD-specific (CD4-PPD) or memory PPD-specific (CD4-PPD) T cells. Means \pm s.d.; $n = 3$ independent experiments, ≥ 80 DCs per experiment. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. **(c)** Samples containing, respectively, DCs, a mixture of DCs and resting allogeneic polyclonal CD4 T cells (1:4 ratio), or CD4 T cells alone were sedimented by centrifugation and then left for 2 h in complete medium (10% FCS in RPMI). Samples were then washed, resuspended in 0.1% BSA in RPMI and placed in the upper or lower chamber of Transwell dishes containing 0.1% BSA in RPMI. After 10 h, DCs in the upper chamber either were stained with annexin and 7-amino-actinomycin D (7AAD) and analyzed by flow cytometry (left) or were stained with Hoechst and analyzed by immunofluorescence (right). For annexin⁺7AAD⁻ percentages, $n = 4$ independent experiments, flow cytometry of $\geq 10,000$ DCs per experiment. (mean \pm s.d.) * $P < 0.05$; NS, not significant. For Hoechst⁺ DC percentages, representative of $n = 3$ independent experiments, ≥ 80 Hoechst-stained DCs per experiment.

5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA)-labeled OVA_{323–339} peptide-pulsed splenic DCs. Eighteen hours later, when a substantial number of DCs were located in the lymph node⁷ (data not shown), mice were injected in the tail vein with SNARF1-labeled OTII CD4 T cells and left for another 17 h. After this period, mice were injected intravenously with sulforhodamine-conjugated FLIVO and, after 1 h, put to death. The popliteal lymph nodes were resected and subsequently analyzed by two-photon microscopy. Experiments performed in parallel showed that the percentage of apoptotic CD4 T cells in the lymph node was negligible under these conditions (**Fig. 3c,d**). However, in the same injection experiment and the same lymph node, compared to single DCs (that is, those not forming contacts with CD4 T cells), a lower percentage of apoptosis was observed in DCs forming an IS with T cells (**Fig. 3b,d**). To rule out the possibility that the extended DC survival observed was the consequence of the selection of healthier DCs that may preferentially form an IS in the same lymph node, we compared the total percentage of live DCs (that is, the percentage of live unengaged DCs plus the percentage of apoptosis live DCs forming an IS) in lymph nodes of mice that were injected only with CMFDA-DCs, and that consequently did not form ISs in the lymph nodes, to mice that were injected with both CMFDA-DCs and OTII CD4 T cells, and thus can form ISs in this location. IS formation resulted in a lower percentage of total apoptotic DC *in vivo* (**Supplementary Fig. 6** online). In sum, these results showed that IS formation inhibits the apoptosis of DCs in the lymph node.

IS formation induces activation of Akt1 at the IS(DC)

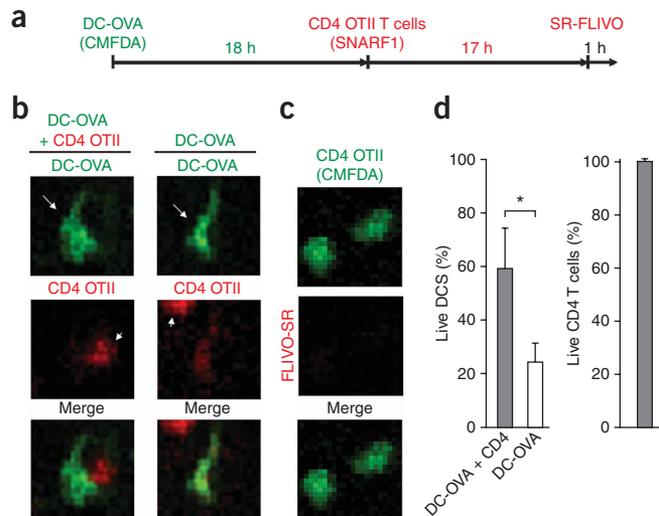
Next we induced IS formation between human DCs and CD4 T cells, and used a phosphotyrosine-specific mAb (Py20) and phalloidin-FITC

to analyze by immunofluorescence the presence of phosphorylated proteins and F-actin at the IS(DC). We observed an intense phosphotyrosine staining in the IS(DC) region of DCs that formed an IS, suggesting that this was an active signaling region (**Fig. 4a**). In agreement with previous results¹⁹, we observed strong F-actin staining at the IS(DC) region (**Fig. 4a**). Single DCs did not show accumulation of F-actin or phosphotyrosine in any particular region of the membrane (**Fig. 4a**). We also observed F-actin and phosphotyrosine accumulation at the IS(DC) when OVA peptide-pulsed mouse splenic DCs were allowed to form an IS with OVA peptide-specific OTII CD4 T cells (**Supplementary Fig. 7** online).

As Akt1 regulates cell survival in many cell types^{20,22}, we next analyzed whether IS formation could induce activation of Akt1 at the IS(DC) region. Using antibodies that stain phosphorylated, active Akt1, we observed by immunofluorescence that there was an intense staining of this active Akt1 at the IS(DC) region (**Fig. 4b**). In contrast, in single DCs, active Akt1 was distributed in a weakly stained rim around the membrane. Activation of Akt1 requires its translocation to the plasma membrane via its PH domain^{22,35,36}. To study whether IS formation induces mobilization of Akt to the IS(DC) region, we transfected human DCs either with a GFP vector or with a construct encoding the PH domain of Akt1 (Akt1-PH-GFP), which recognizes phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate on the membrane³⁵. The transfected DCs were mixed with allogeneic human CD4 T cells and plated onto fibronectin-coated dishes, and formation of IS between the T cells and the transfected DCs was followed by videomicroscopy. We then fixed the transfected DCs with paraformaldehyde and quantified the percentage of DCs that showed vector-GFP or Akt1-PH-GFP staining at the IS(DC). IS formation resulted in enhanced

Figure 3 IS formation protects DCs from apoptosis in lymph nodes.

(a) Experimental design. CMFDA-labeled splenic DCs pulsed with OVA peptide (green) were injected in the footpads of recipient mice. After 18 h, SNARF1-labeled OTII CD4 T cells (red) were injected through the tail vein. After another 17 h, the animals were injected intravenously with sulforhodamine-conjugated (SR)-FLIVO. After 1 h, popliteal lymph nodes were extracted, fixed and analyzed by two-photon microscopy. (b) Representative images of a single DC-OVA and a DC-OVA forming an IS with a SNARF1 CD4 OTII T cell (DC-OVA + CD4 OTII). In the image of the single DC, a SNARF1 CD4 T cell is also observed and is clearly distinguished by its intense red staining compared to the fainter red staining of SR-FLIVO in the DC. DCs, long arrows; CD4 T cells, short arrows. The DC forming an IS and the single DC shown had SR-FLIVO maximum amplitude values of 20 and 65, respectively (see **Supplementary Fig. 5**). Only cells with maximum amplitude < 30 were considered alive (see Online Methods). (c) Analysis performed as in **a,b** except that DCs were not injected and that T cells were labeled with CMFDA. Representative of three different experiments. Maximum amplitude of SR-FLIVO for both CD4 T cells shown was 20. (d) Quantification of analysis performed as in **a,b**. DCs or T cells with SR-FLIVO maximum amplitude < 30 were considered alive. Left, we compared unengaged DCs with DCs forming an IS in the same lymph node. Means \pm s.d.; $n = 4$ independent experiments, ≥ 100 DCs forming IS and ≥ 200 single DCs per experiment. $*P < 0.01$. Right, $n = 4$ independent experiments, ≥ 100 CD4 T cells per experiment.



translocation of Akt1-PH-GFP to the IS(DC) region, where it was maintained for at least 90 min (**Fig. 4c,d** and **Supplementary Fig. 8** online). In the DCs transfected with vector-GFP, the percentage of DCs that showed GFP in the IS(DC) region was much lower (**Fig. 4c,d**). These results indicate that IS(DC) formation induces signaling, including activation of Akt1, in this region.

As treatment of DC-T cell conjugates with the PI(3)K inhibitors LY294002 or wortmannin does not disrupt completely the IS formed between DCs and T cells³⁶, we took advantage of this observation to analyze the contribution of PI(3)K and Akt to the antiapoptotic function of the IS(DC). We reasoned that if PI(3)K and its downstream kinase Akt1 were the only contributors to the prosurvival effects of the IS(DC), then the inhibition of these kinases in DCs

would cause the DCs to undergo apoptosis even when forming an IS with T cells. To analyze this issue directly, single DCs and DCs that had formed an IS were transferred to serum-free medium. Subsequently, half of these cells were treated with LY294002 for 6 h and the other half were kept untreated for a similar period. Control experiments showed that treatment with LY294002 completely inhibited the phosphorylation of Akt1 in DCs (**Fig. 5a**). However, despite the treatment with LY294002, almost 60% of preexisting ISs remained intact. Untreated conjugates, by comparison, maintained 100% the ISs formed (data not shown). Consistent with previous experiments (**Figs. 1** and **2**), in untreated samples, DCs that formed an IS underwent $47 \pm 5.3\%$ less apoptosis than did single DCs (**Fig. 5b**). However, in the LY294002-treated samples, IS formation reduced the percentage of DCs

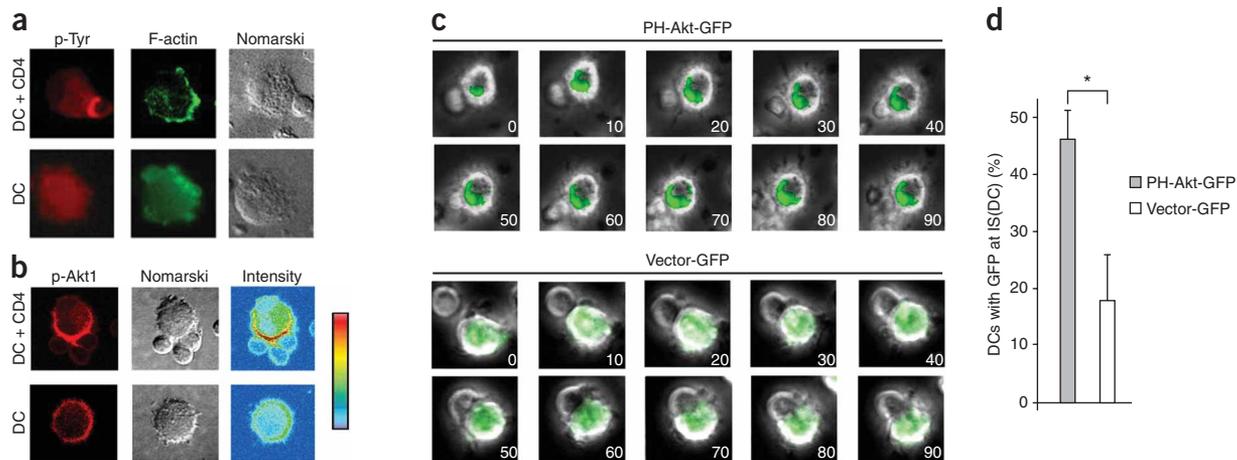


Figure 4 IS(DC) is a signaling region where Akt1 is activated. (a,b) Allogeneic DCs and CD4 T cells were cultured in complete medium (10% FCS in RPMI) for 2 h to allow IS formation. Cells were then transferred to 0.1% BSA in RPMI for another 2 h, then fixed, permeabilized and stained with anti-phosphotyrosine (p-Tyr) and phalloidin-FITC (F-actin; **a**) or an antibody specific for phosphorylated Akt1 (p-Akt1; **b**). 'Intensity' represents staining brightness from low (blue) to high (red). (c) DCs were transfected with either pEGFP-C1 vector (vector-GFP) or with a vector encoding a PH domain of Akt1 fused to GFP (PH-Akt-GFP). The DCs were shifted 18 h later to 0.1% BSA and allowed to interact with allogeneic CD4 T cells. The formation of IS between DCs and CD4 T cells was recorded by fluorescence videomicroscopy for the indicated time periods (min) to detect the presence of GFP. Representative of three experiments. (d) Percentage of DCs transfected with vector-GFP or PH-Akt-GFP forming an allogeneic IS with CD4 T cells that showed GFP staining at the IS(DC). Means \pm s.d.; $n = 3$ independent experiments, ≥ 30 single DCs and DCs forming synapses per experiment. $*P < 0.05$. (See also **Supplementary Fig. 8**).

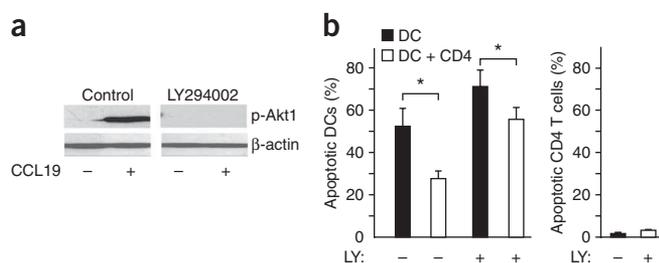


Figure 5 Akt1 facilitates apoptosis protection induced by IS(DC) formation. (a) Untreated DCs (control) or DCs pretreated with 100 μ M LY294002 for 1 h were left unstimulated (-) or were stimulated (+) with CCL19 (5 min) to activate Akt1 (ref. 31). DCs were lysed and phosphorylated Akt1 (p-Akt1) detected by immunoblot. β -actin, loading control. (b) Single DCs or DCs allowed to form allogeneic IS with polyclonal CD4 T cells were maintained 2 h in complete medium. Cells were then transferred to serum-free medium and single DCs or conjugates treated either with 100 μ M LY294002 (LY) or with vehicle (-) for 6 h. In parallel control experiments, single CD4 T cells in serum free medium were also treated for 6 h either with LY294002 or vehicle. At the end of this period, cells were fixed, permeabilized and stained with Hoechst. Graphs show the percentage of single DCs, DCs forming IS with CD4 T cells (DC + CD4) and single CD4 T cells with apoptotic nuclei. Means \pm s.d.; $n = 6$ independent experiments, ≥ 30 single DCs and DCs forming IS per experiment. * $P < 0.05$.

undergoing apoptosis by only $19.8 \pm 8\%$ compared to single DCs (Fig. 5b). These results suggest that the IS confers some degree of protection to the DCs even when Akt is completely inhibited. Despite the high concentration of the inhibitor used, the percentage of apoptotic CD4 T cells remained very low (Fig. 5b), consistent with results obtained by others³⁷, indicating that the apoptosis of DCs forming IS was not due to apoptosis of the T cells. In sum, these results indicate that Akt is important in the antiapoptotic effects of the IS, but that other, unidentified molecules must also contribute to these effects.

IS formation induces NF- κ B nuclear localization in DCs

NF- κ B promotes transcription of prosurvival genes in DCs^{22,24,31}. As activation of NF- κ B correlates with its translocation from the cytoplasm to the nucleus^{31,38}, we analyzed whether DCs that formed an IS displayed more of this transcription factor in the nucleus compared to single DCs. We transfected human DCs either with vector-GFP or with a construct encoding GFP-tagged p65, a subunit of the NF- κ B family

that is expressed in DCs^{31,38,39}. We then allowed the transfected DCs to form an IS with CD4 T cells. Although 38% of single DCs showed p65-GFP in the nucleus, this percentage rose to 79% in transfected p65-GFP DCs that formed an IS with T cells (Fig. 6). As a positive control, we stimulated p65-GFP transfected DCs with tumor necrosis factor (TNF)^{31,40}; 63% of TNF-stimulated DCs displayed strong nuclear GFP fluorescence (Fig. 6). In contrast, in most vector-GFP-transfected DCs, the fluorescent staining remained in the cytoplasm even in DCs that formed an IS with T cells (Fig. 6). Similar results were obtained when ISs were formed between p65-GFP-transfected human DCs and naive (CD45RA⁺) CD4 T cells. In this case, among the DCs that formed an IS, 72% displayed nuclear p65-GFP staining. In contrast, only 37% of single DCs showed nuclear p65-GFP fluorescence (data not shown).

FOXO1 controls Bim expression and DC apoptosis

To determine whether FOXO1 regulates apoptosis in human DCs, we knocked down this transcription factor by nucleofecting DCs with a short interfering RNA (siRNA) specific for FOXO1. Immunofluorescence and immunoblotting using anti-FOXO1 showed that, compared to DCs transfected with control siRNA, DCs transfected with FOXO1-specific siRNA had less FOXO1 protein (Fig. 7). When we transferred siRNA-control or siRNA-FOXO1 transfected DCs to serum-free medium and subsequently analyzed the percentage of apoptotic cells, we observed a significantly lower percentage of apoptosis in the DCs where FOXO1 was knocked-down (Fig. 7b). These results indicate that under serum-free conditions FOXO1 plays a proapoptotic role in DCs. Bim, a proapoptotic gene controlled by FOXO1^{21,22,25,26}, promotes apoptosis in DCs^{21,23}. Consistent with its proapoptotic role, we observed increased expression of Bim in control DCs cultured in serum-free medium (Fig. 7d). Densitometry showed that Bim expression in DCs cultured for 10 h in 10% FCS RPMI and 0.1% BSA RPMI was onefold and threefold, respectively, the basal Bim expression obtained at time 0 in DCs in 10% FCS RPMI (set as 1). Moreover, compared to siRNA-control DCs, siRNA-FOXO1 DCs expressed less Bim (Fig. 7c). Thus, under serum-free conditions, Bim may mediate the proapoptotic effects of FOXO1 in DCs.

As FOXO1 promotes apoptosis in DCs, we asked whether IS(DC) formation could inhibit FOXO1 in DCs. Inactivation of FOXO1 involves its translocation from the nucleus to the cytoplasm^{22,25,26}. Therefore, we analyzed whether IS formation induced cytoplasmic localization of FOXO1 in DCs. We transfected vector-GFP or

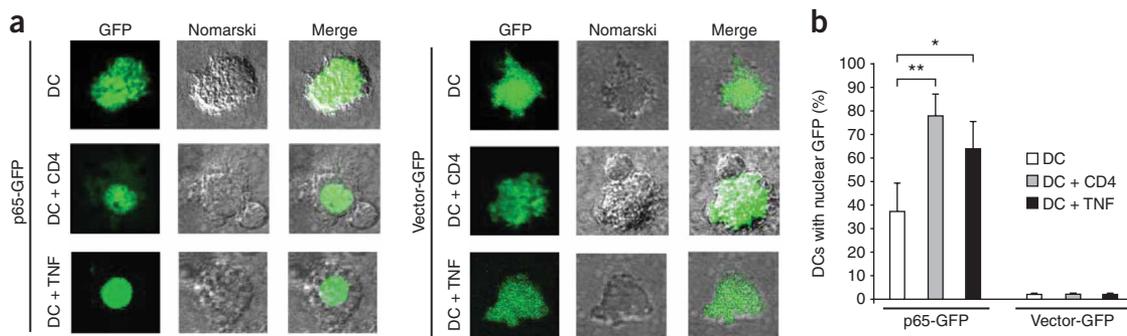


Figure 6 IS(DC) formation induces translocation of NF- κ B to the DC nucleus. (a) GFP fluorescence, Nomarski and merge views showing GFP localization. DCs were transfected with pEGFP-C1 vector (vector-GFP) or with p65-pEGFP (p65-GFP). DCs were washed 18 h later, resuspended in 10% FCS RPMI and left as single DCs (DC) or allowed to form IS with CD4 T cells for another 2 h (DC + CD4), then washed in RPMI and transferred to 0.1% BSA in RPMI for another 2 h. DCs stimulated for 2 h with TNF (DC + TNF) served as a positive control. Cells were then plated on poly-L-lysine-coated coverslips and fixed. Representative of three experiments. (b) Quantification of the percentage of DCs with nuclear vector-GFP or p65-GFP staining. Means \pm s.d.; $n = 5$ independent experiments, ≥ 50 single DCs or DCs forming IS per experiment. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

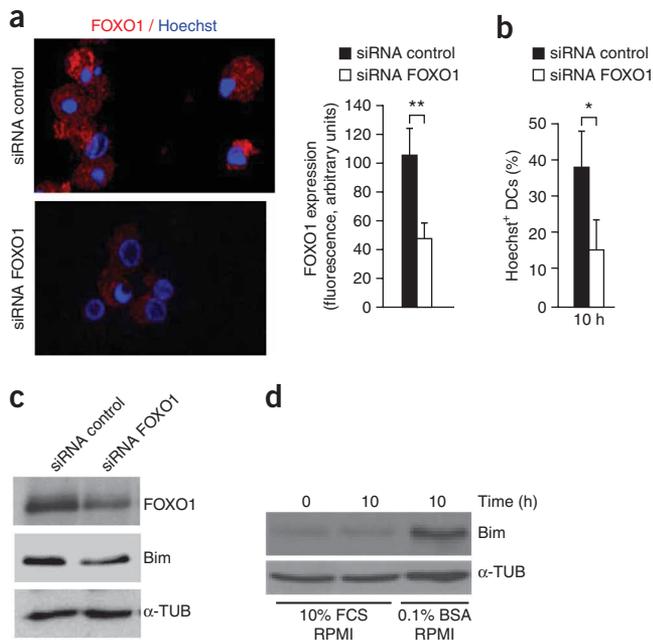


Figure 7 FOXO1 regulates DC survival. DCs were nucleofected either with random siRNA (control) or with a siRNA specific for FOXO1. **(a)** DCs in complete medium were stained, 24 h after nucleofection, with Hoechst and anti-FOXO1 and analyzed by immunofluorescence. Left, representative image. Right, graphs of fluorescence intensity of FOXO1 staining (see Online Methods); mean \pm s.d. ($n = 50$ cells). $*P < 0.01$. Performed three times with similar results. **(b)** DCs were nucleofected with siRNA as in **a**. Cells were next washed in RPMI and equal numbers of live cells (determined by trypan blue exclusion) transferred to 0.1% BSA in RPMI for 10 h. DCs were then stained with Hoechst. Graphs show the percentage of apoptotic Hoechst⁺ DCs after 10 h in 0.1% BSA in RPMI minus percentage of apoptotic Hoechst⁺ DCs at time 0 h. Means \pm s.d.; $n = 3$ independent experiments, ≥ 120 DCs per experiment. $*P < 0.05$. **(c)** Aliquots of samples used in **a** were lysed and FOXO1 and Bim detected by immunoblotting. α -TUB (α -tubulin), loading control. **(d)** DCs were washed in RPMI and then incubated for 10 h in 10% FCS or 0.1% BSA in RPMI. DCs were then lysed and Bim was detected by immunoblot. α -TUB (α -tubulin), loading control.

FOXO1-GFP into DCs⁴¹ and then allowed the transfected DCs to form an IS with T cells. Subsequently, we transferred the cells to serum-free medium and compared the percentage of FOXO1-GFP in the cytoplasm of single DCs versus DCs forming an IS. Thirty percent of single DCs presented FOXO1-GFP in the cytoplasm (**Fig. 8a,b**). In contrast, more than 70% of DCs forming an IS showed cytoplasmic FOXO1-GFP. A similar percentage of cells with cytoplasmic

FOXO1-GFP was found among DCs stimulated with FCS, which were used as positive controls (**Fig. 8a,b**). In the vector-GFP-transfected DCs, most of the staining remained in the cytoplasm under all conditions examined (**Fig. 8a,b**). The results obtained with the FOXO1-GFP-transfected cells were confirmed by staining for endogenous FOXO1 in untransfected DCs (**Fig. 8c**). These immunofluorescence experiments showed that the percentage of DCs with cytoplasmic FOXO1 increased from a 5% in single DCs to almost 15% in DCs that formed an IS (**Fig. 8c** and data not shown). Finally, we confirmed these results using biochemical experiments. DCs were transfected with vector-GFP or with FOXO1-GFP and then were maintained as single cells or allowed to form an IS with T cells. Single DCs or DCs forming an IS were subsequently transferred to serum-free medium for 2 h. After this treatment, we subjected vector-GFP and FOXO1-GFP transfected DCs, including single DCs or DCs

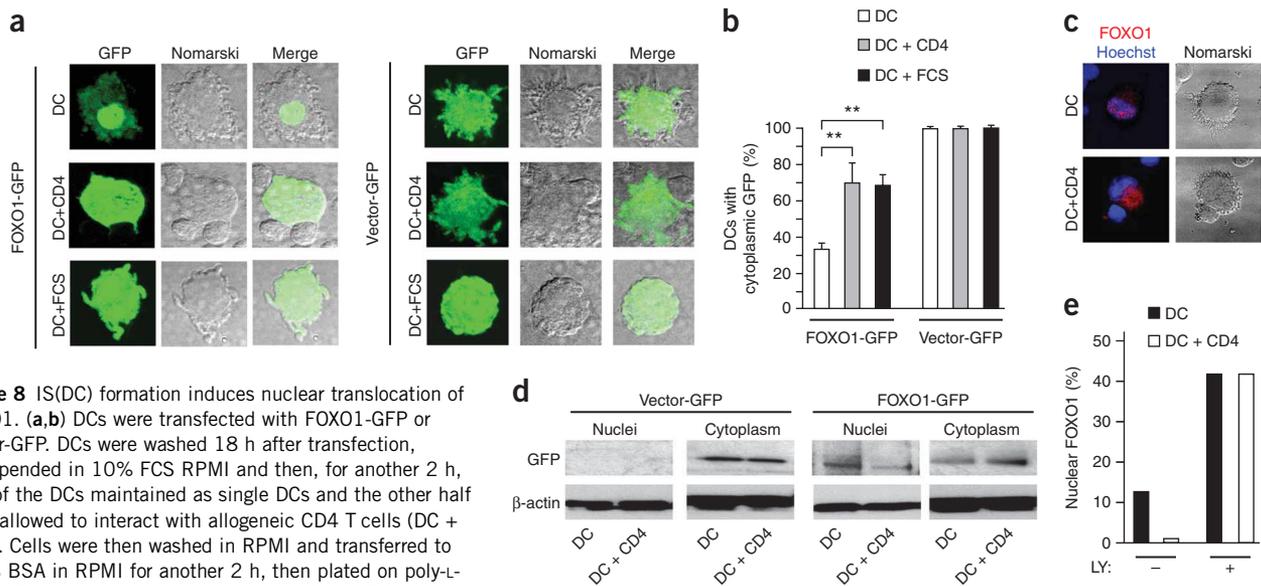


Figure 8 IS(DC) formation induces nuclear translocation of FOXO1. **(a,b)** DCs were transfected with FOXO1-GFP or vector-GFP. DCs were washed 18 h after transfection, resuspended in 10% FCS RPMI and then, for another 2 h, half of the DCs maintained as single DCs and the other half were allowed to interact with allogeneic CD4 T cells (DC + CD4). Cells were then washed in RPMI and transferred to 0.1% BSA in RPMI for another 2 h, then plated on poly-L-lysine (PLL)-coated coverslips and fixed. Single DCs cultured for 2 h with 10% FCS (DC + FCS) were a positive control. **(a)** GFP fluorescence, Nomarski and merge images. Representative of three experiments. **(b)** Percentage of vector-GFP and FOXO1-GFP DCs with cytoplasmic GFP staining. Means \pm s.d.; $n = 3$ independent experiments, ≥ 50 single DCs and DCs forming IS per experiment. $**P < 0.01$. **(c)** Single DCs or DCs allowed to form IS with CD4 T cells in complete medium were transferred to 0.1% BSA in RPMI for 2 h. Cells were then plated onto PLL-coated coverslips and stained with Hoechst and anti-FOXO1. Representative of three experiments. **(d)** Immunoblot. DCs were transfected and treated as in **a**, but instead of plating onto PLL-coated coverslips, cells were lysed and separated into nuclear and cytoplasmic fractions⁴². An antibody to GFP was used to detect FOXO1-GFP or vector-GFP in the nuclear and cytoplasmic fractions. β -actin, loading control. **(e)** An equal number of single DCs (DC) or DCs allowed to form IS as in **c** were transferred to 0.1% BSA in RPMI for 6 h in the presence or in the absence of LY294002 (LY; 100 μ M). DCs were then plated on PLL-coated coverslips and stained with Hoechst and anti-FOXO1. Graph shows the percentage of DCs with nuclear staining of FOXO1. Representative of two experiments, ≥ 50 single DCs and DCs forming synapses per experiment.

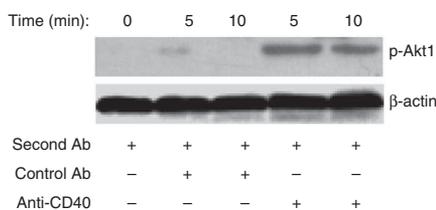


Figure 9 Stimulation of CD40 induces activation of Akt1. DCs were suspended in 0.1% BSA in RPMI and then treated with anti-CD40 or with a matched isotype control (control Ab). DCs were then treated with secondary anti-mouse (second Ab) for 5 or 10 min to induce clustering of CD40. The DCs were lysed and phosphorylated Akt1 was detected by immunoblot. β -actin, loading control. Representative of five independent experiments.

forming an IS, to a fractionation that yielded cytoplasmic and nuclear fractions of the cells⁴². These fractions were then analyzed by immunoblot with an antibody specific for GFP. In DCs that formed an IS, FOXO1 was localized largely in the cytoplasmic fraction, whereas in the single DCs, FOXO1 was present predominantly in the nuclear fraction (Fig. 8d).

Finally, we studied whether inhibition of Akt1 prevents FOXO1 translocation to the cytoplasm in DCs forming an IS. Single DCs or DCs that were previously induced to form IS were transferred to serum-free medium. Half of these cells were treated with the PI(3)K inhibitor LY294002 and the other half were kept untreated for a similar period. Immunofluorescence analysis revealed that when PI(3)K and downstream target Akt were inhibited, FOXO1 remained largely in the nucleus of the DCs, even when these cells formed an IS (Fig. 8e). These results suggest that Akt1 regulates the translocation of FOXO1 to the cytoplasm of DCs after IS formation (Supplementary Fig. 9 online).

CD40 contributes to IS(DC) antiapoptotic signaling

The IS(DC) includes receptors such as the integrin LFA-1 ($\alpha_1\beta_2$)¹² and the co-stimulatory molecule CD40⁹. Therefore, we studied the ability of LFA-1 and CD40 to induce Akt1 activation. We induced clustering of either CD40 or LFA-1 with specific antibodies and then analyzed the activation of Akt1. In contrast to LFA-1, which failed to induce activation of Akt1 (data not shown), cross-linking of CD40 induced Akt1 phosphorylation (Fig. 9). As stimulation of CD40 induces extended survival in DCs^{43–45}, these results suggest that CD40 may be an important contributor to the antiapoptotic signaling induced from the IS(DC) (Supplementary Fig. 9).

DISCUSSION

Several groups have shown that DCs become apoptotic and die in the lymph nodes^{27,28}. As the activation of a T cell in the lymph node involves the formation of an IS, a structure that reflects the long-lasting interaction that takes place between a DC and a T cell^{4,6,7,29,30}, we hypothesized that the IS(DC) could act as a molecular device that relays antiapoptotic signals to the DC. Here we have provided experimental evidence supporting this hypothesis, and we suggest a mechanism whereby IS formation may inhibit DC apoptosis.

The observation that DCs exhibit a higher susceptibility to apoptosis than CD4 T cells when placed under serum-free conditions facilitated the experimental testing of this hypothesis *in vitro*. Under serum-free conditions, the percentage of DCs undergoing apoptosis *in vitro* was reduced by almost 60% in the DCs that formed IS compared to single DCs. Apoptosis was probably mitochondrial (caspase 9 dependent²⁰) and not caused by death receptors (caspase 8 dependent²⁰) because it was inhibited by a caspase 9 inhibitor but was not affected by a caspase 8 inhibitor (data not shown). Consistent

with previous results, we also observed IS formation by DCs in the absence of antigen^{46,47}. IS formation conferred protection against apoptosis in both antigen-specific and non-antigen-specific DC–T cell conjugates. In addition, IS formation with naive or memory T cells suppressed DC apoptosis.

Consistent with a role for the IS(DC) as a signaling platform that regulates survival in the DC, we observed phosphotyrosine staining and Akt1 activation in this region. However, Akt1 does not seem to be the only molecule mediating the prosurvival effects of the IS(DC), because these effects were not completely abrogated when PI(3)K and Akt were inhibited. As Akt1 has also been shown to be activated at the IS(T cell)³⁶, it is possible that this kinase could regulate prosurvival signaling from the IS(T cell). Further supporting an antiapoptotic role for the IS(DC), two effectors of Akt1, namely NF- κ B and FOXO1, which transduce prosurvival and proapoptotic signals, respectively^{22,24–26}, were affected in opposite fashion upon IS(DC) formation. IS(DC) formation induced translocation of NF- κ B to the nucleus, where this factor may potentially regulate transcription of prosurvival genes, including Bcl-2 (refs. 21,24). IS(DC) formation also induced translocation of FOXO1 from the nucleus to the cytoplasm of the DCs, a process that inactivates this transcription factor and blocks its ability to upregulate expression of the proapoptotic Bcl-2 member Bim in DCs^{22,24–26}. Therefore, our results clearly indicate that IS(DC) formation results in the activation of intracellular signals that suppress DC apoptosis.

Among the surface receptors of the IS(DC), CD40 but not LFA-1 cross-linking potentially activated Akt1. As CD40 is known to induce survival in DCs^{43–45}, this result suggests that this receptor may contribute to the antiapoptotic effects induced by the IS(DC). However, additional surface receptors and signaling molecules should be analyzed to completely understand the mechanism(s) through which IS(DC) induce survival. Finally, our observation that IS formation protects DCs from apoptosis in the lymph node indicates that this mechanism also operates *in vivo*. In sum, our results indicate a new function for the IS that affects DCs and that can be important for proper activation of T cells and for subsequent immune responses.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper at <http://www.nature.com/natureimmunology/>.

Accession codes. UCSD-Nature Signaling Gateway (<http://www.signaling-gateway.org/>): A000031, A000249 and A000944.

Note: Supplementary information is available on the Nature Immunology website.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A.L. Corbí and V.S. Martínez for their support, G. de la Rosa for help in the initial stages of this project, C. Ardavin for OTII mice, J. Villarejo and I. Treviño for help in obtaining blood samples, R. Borstein for umbilical cords, J.A. Schmid (Medical University of Vienna) for the p65-GFP construct, T. Balla (US National Institutes of Health) for the PH (Akt)-GFP plasmid, T.G. Unterman for the FOXO1-GFP plasmid, N. Hogg (Cancer Research UK) for anti-LFA-1 α -subunit, P. Lastras for help with the cytometer, A. García-Sánchez for discussions and C. Escribano-Díaz for critical reading of the manuscript. Supported by (Ministerio de Educación y Ciencia (BFI-2001-0228 and SAF2005-00801), RETICS Program/Instituto de Salud Carlos III (RIER) (RD08/0075 to J.L.R.-F.), Ministerio de Sanidad (scholarship associated with PI021058 to L.R.-B.) and the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (fellowships FPI to C.D.-M. and FPU to N.S.-S.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

L.R.-B., C.D.-M. and J.L.R.-F. designed research; L.R.-B., C.D.-M., N.S.-S., L.M.A.-C. and G.M.d.H. performed research; L.M.A.-C., M.D.G.-L., G.M.d.H., J.N., F.S.-M., P.S.-M. and C.C., provided analytical tools; L.R.-B., C.D.-M. and J.L.R.-F. analyzed data; J.L.R.-F. wrote the paper.

Published online at <http://www.nature.com/natureimmunology/>
 Reprints and permissions information is available online at <http://npg.nature.com/reprintsandpermissions/>

1. Banchereau, J. & Steinman, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245–252 (1998).
2. Kupfer, A. & Kupfer, H. Imaging immune cell interactions and functions: SMAC and the immunological synapse. *Semin. Immunol.* **15**, 295–300 (2003).
3. Rodriguez-Fernandez, J.L. & Corbi, A.L. Adhesion molecules in human dendritic cells. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **6**, 1103–1111 (2005).
4. Stoll, S., Delon, J., Brotz, T.M. & Germain, R.M. Dynamic imaging of T-cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* **296**, 1873–1876 (2002).
5. Delon, J., Stoll, S. & Germain, R.M. Imaging of T-cell interactions with antigen presenting cells in culture and in intact lymphoid tissue. *Immunol. Rev.* **189**, 51–63 (2002).
6. Huppa, J.B., Gleimer, M., Sumen, C. & Davis, M.M. Continuous T-cell receptor signaling required for synapse maintenance and full effector potential. *Nat. Immunol.* **4**, 749–755 (2003).
7. Mempel, T.R., Henrickson, S.E. & von Andrian, U.H. T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* **427**, 154–159 (2004).
8. Benvenuti, F. *et al.* Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and duration of the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J. Immunol.* **172**, 292–301 (2004).
9. Boisvert, J., Edmondson, S. & Krummel, M.F. Immunological synapse formation licenses CD40–CD40L accumulation at T-APC contact sites. *J. Immunol.* **173**, 3647–3652 (2004).
10. Van der Merwe, P.A., Davis, S.J., Shaw, A.S. & Dustin, M.L. Cytoskeletal polarization and redistribution of cell surface molecules during T cell antigen recognition. *Semin. Immunol.* **12**, 5–21 (2000).
11. Dustin, M.L., Bromley, S.K., Davis, M.M. & Zhu, C. Identification of self through two-dimensional chemistry and synapses. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **17**, 133–157 (2001).
12. Van der Merwe, P.A. Formation and function of the immunological synapse. *Curr. Opin. Immunol.* **1**, 293–298 (2002).
13. Davis, D.M. & Dustin, M.L. What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol.* **25**, 323–327 (2004).
14. Grakoui, A. *et al.* The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221–227 (1999).
15. Lee, K.-H. *et al.* The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* **302**, 1218–1222 (2003).
16. Davis, S.J. & Van der Merwe, P.A. The immunological synapse: required for T-cell receptor signaling or directing T-cell effector function? *Curr. Biol.* **11**, R289–R291 (2001).
17. Maldonado, R.A., Irvine, D.J., Schreiber, R. & Glimcher, L.H. A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes. *Nature* **431**, 527–532 (2004).
18. Huppa, J.B. & Davis, M.M. T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 973–983 (2003).
19. Al-Alwan, M.M., Rowden, G., Lee, T.D.G. & West, K.A. The dendritic cell cytoskeleton is critical for the formation of the immunological synapse. *J. Immunol.* **166**, 1452–1456 (2001).
20. Strasser, A., O'Connor, L. & Dixit, V.M. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 217–245 (2000).
21. Hildeman, D., Jorgensen, T., Kappler, J. & Marrack, P. Apoptosis and the homeostatic control of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 516–521 (2007).
22. Downward, J. PI 3-kinase, Akt and cell survival. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 177–182 (2004).
23. Hou, W.S. & Van Parijs, L.A. Bcl-2-dependent molecular timer regulates the lifespan and immunogenicity of dendritic cells. *Nat. Immunol.* **5**, 583–589 (2004).
24. Karin, M. & Lin, A. NF- κ B at the crossroads of life and death. *Nat. Immunol.* **3**, 221–227 (2002).
25. Burgering, B.M.T. & Kops, G.J.P.L. Cell cycle and death control: long lived forkheads. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 352–360 (2002).
26. Birkenkamp, K.U. & Coffey, P.J. FOXO transcription factors as regulators of immune homeostasis: molecules to die for? *J. Immunol.* **171**, 1623–1629 (2003).
27. Ruedl, C., Koebel, P., Bachmann, M., Hess, M. & Karjalainen, K. Anatomical origin of dendritic cells determine their life span in peripheral lymph nodes. *J. Immunol.* **165**, 4910–4916 (2000).
28. Garg, S. *et al.* Genetic tagging shows increased frequency and longevity of antigen-presenting, skin derived dendritic cells *in vivo*. *Nat. Immunol.* **4**, 907–912 (2003).
29. Iezzi, G., Karjalainen, K. & Lanzavecchia, A. The duration of antigen stimulation determines the fate of naïve and effector cells. *Immunity* **8**, 89–95 (1998).
30. Celli, S., Lemaître, F. & Bousso, P. Real-time manipulation of T cell-dendritic cell interactions *in vivo* reveals the importance of prolonged contacts for CD4+ T cell activation. *Immunity* **27**, 625–634 (2007).
31. Sanchez-Sanchez, N. *et al.* Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells. *Blood* **104**, 619–625 (2004).
32. Sabatos, C.A. *et al.* A synopsis basis for paracrine interleukin-2 signaling during homotypic T cell interaction. *Immunity* **29**, 238–248 (2008).
33. Pozarowski, P. *et al.* Interactions of fluorochrome-labeled caspases inhibitors with apoptotic cells: a caution in data interpretation. *Cytometry A* **55**, 50–60 (2003).
34. Lovborg, H., Nygren, P. & Larsson, R. Multiparametric evaluation of apoptosis: effects of standard cytotoxic agents and cyanoguanidine CHS 828. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 521–526 (2004).
35. Várnai, P. & Balla, T. Visualization of phosphoinositides that bind pleckstrin homology domains: calcium- and agonist-induced dynamic changes and relationship to myo-³Hinositol-labeled phosphoinositide pools. *J. Cell Biol.* **143**, 501–510 (1998).
36. Costello, P.S., Gallagher, P.J. & Cantrell, D.A. Sustained and dynamic inositol lipid metabolism inside and outside the immunological synapse. *Nat. Immunol.* **3**, 1082–1089 (2002).
37. Vlahakis, S.R. *et al.* G protein-coupled chemokine receptors induce both survival and apoptotic signaling pathways. *J. Immunol.* **169**, 5546–5554 (2002).
38. Schmid, J.A. *et al.* Dynamics of NF κ B and I κ B α studied with green fluorescent protein (GFP) fusion proteins. Investigation of GFP-p65 binding to DNA by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* **275**, 17035–17042 (2000).
39. Sacconi, S., Pantano, S. & Natoli, G. Modulation of NF- κ B activity by exchange of dimers. *Mol. Cell* **11**, 1563–1574 (2003).
40. Chen, G. & Goeddel, D.V. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* **296**, 1634–1635 (2002).
41. Zhang, X. *et al.* Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms. Direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J. Biol. Chem.* **277**, 45276–45284 (2002).
42. Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M. & Schaffner, W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* **17**, 6419 (1989).
43. Kim, K.D., Choe, Y.K., Choe, I.S. & Lim, J.S. Inhibition of glucocorticoid-mediated, caspase-independent dendritic cell death by CD40 activation. *J. Leukoc. Biol.* **69**, 426–434 (2001).
44. Miga, A.J. *et al.* Dendritic cell longevity and T-cell persistence is controlled by CD154–CD40 interactions. *Eur. J. Immunol.* **31**, 959–965 (2001).
45. Hanks, B.A. *et al.* Re-engineered CD40 receptor enables potent pharmacological activation of dendritic-cell cancer vaccines *in vivo*. *Nat. Med.* **11**, 130–137 (2005).
46. Revy, P., Sospedra, M., Barbour, B. & Trautmann, A. Functional antigen-independent synapses formed between T cells and dendritic cells. *Nat. Immunol.* **2**, 925–931 (2001).
47. Kondo, T. *et al.* Dendritic cells signal T cells in the absence of exogenous antigen. *Nat. Immunol.* **2**, 932–938 (2001).

ONLINE METHODS

Reagents. GM-CSF was purchased from Immunotools. IL-4 was obtained from R&D Systems. Fluorescent dyes for cell labeling: CMFDA (5-chloromethyl-fluorescein diacetate) and SNARF1 (seminalphorhodafuor1) were obtained from Molecular Probes. Fluorophore-conjugated forms of FLIVO—carboxy-fluorescein (FAM)-FLIVO (λ_{abs} 492 nm; λ_{em} 520 nm) or sulforhodamine B (SR)-FLIVO (λ_{abs} 565 nm; λ_{em} > 600 nm)—were obtained from Immunochemistry Technologies. Purified protein derivative (PPD) was obtained from Statens Seruminstitut. [^3H]Thymidine was from Amersham. Tetanus toxoid was obtained from the National Institute for Biological Standards & Control (Hertfordshire, UK). CCL19, CCL21 and TNF were from PeproTech. Anti- β -actin (clone AC-15), anti- α -tubulin (clone DM1A), sheep anti-mouse IgG (whole molecule) F(ab')₂ fragment, LPS, BSA, poly-L-lysine (PLL), LY294002, FITC-phalloidin, Hoechst 33342, z-IETD-FMK (caspase-8 inhibitor), z-LEHD-FMK (caspase-9 inhibitor) and camptothecin were from Sigma. z-VAD-FMK was from Biomol. Annexin V-FITC, 7-amino-actinomycin D (7AAD), anti-Akt1 (2H10), anti-LFA-1 (M17/4) and the mAbs used in flow cytometry (anti-CD1a(clone HII49), anti-CD14 (clone M ϕ P9), anti-HLA-DR (clone L243 G46-6), anti-CD45 (clone HI100), anti-CCR7 (clone 3D12), anti-CD83 (clone HB15e) and rat anti-mouse Va2 (clone B20.1)) were from BD Bioscience. Polyclonal anti-FOXO1 (9462) and anti-phospho-Akt1 (P $\text{Ser}473$; 9271) were from Cell Signaling. Anti-GFP (R970-01) was from Invitrogen. Anti-Bim (OPA1-01021) was from Affinity BioReagents. Anti-mouse CD16/32 (14-0161) was from eBioscience. Anti-human CD40 (clone B-B20) was from Diaclone. Anti-LFA-1 α -subunit⁴⁸ was provided by N. Hogg (Cancer Research, UK). The OVA_{323–339} peptide (ISQAVHAAHAEINEAGR) was from Genscript.

Mice. C57BL/6 mice and OT II mice⁴⁹, having transgenic V α 2V β 5 TCRs specific for the OVA_{323–339} peptide in the context of IA^b, were maintained in the animal facility at the Centro de Investigaciones Biológicas (CIB). Mice were treated according to Animal Care Committee guidelines of the CIB.

Preparation of human DCs and PPD and tetanus toxoid-loaded DCs. CIB Ethical Committee approved experimentation involving human cells. The Centro de Transfusiones (Madrid) provided buffy coats after obtaining informed consent from all subjects. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from volunteer healthy donors, were isolated from buffy coats over a Lymphoprep (Nycomed). Monocytes isolated from the PBMCs by positive selection with anti-CD14 magnetic beads (Miltenyi) were used to derive DCs as described before^{31,50}. Briefly, monocytes were resuspended at $0.5\text{--}1 \times 10^6$ cells/ml and cultured in complete medium (10% FCS or 10% AB serum in RPMI, when allogeneic or antigen-specific interactions, respectively, were examined) containing GM-CSF (1,000 U/ml) and IL-4 (1,000 U/ml). Cells were cultured for 6–7 d, with cytokine addition every second day, then GM-CSF, IL-4 and 50 ng/ml TNF were added for a further 72-h period. In some experiments the DCs were matured with LPS, with similar results. Flow cytometry showed that the treatment yielded a homogeneous population of mature DCs (CD1a⁺C-D14^{low}/HLA-DR^{high}CCR7⁺CD83⁺ cells). In the experiments performed with antigen-loaded DCs, either 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of purified protein derivative (PPD) or 0.2 limes flocculation units of tetanus toxoid per ml were added along with TNF for 72 h. Analysis of DC markers showed that loading of PPD or tetanus toxoid did not modify the maturation induced by TNF.

Preparation of human polyclonal non-antigen-specific memory and naive CD4 T cells and PPD-specific CD4 T cells. Naive human CD45RA⁺C-D45RO⁻CD4 T cells were obtained from umbilical cord blood. Flow cytometry showed that 70–80% of the T cells were CD45RA⁺. Resting memory CD4 T cells were isolated from human PBMCs. CD4 T cells were selected using a CD4 negative-selection kit that includes a hapten-antibody 'cocktail' of anti-CD8, anti-CD11b, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD36, anti-CD56 (Miltenyi Biotech) and anti-hapten magnetic beads (Miltenyi). To prepare CD4⁺ PPD-specific clones, we previously selected donors whose T cells responded to PPD or tetanus toxoid antigens. For this purpose, PBMCs of selected donors were cultured with PPD (final concentration, 50 U/ml) for 6 d. After stimulation, cellular proliferation was evaluated by incorporation of [^3H]thymidine into DNA. PBMCs were seeded at 2×10^6 cells per well in triplicate U-bottom, 96-wells plates with RPMI-1640 containing 10% human AB serum. The results were expressed as lymphocyte stimulation index (LSI), which is the geometric

mean counts per minute (c.p.m.) of the cells incubated with antigen divided by the geometric mean c.p.m. of the cells with medium alone. As a positive control of proliferation we used pokeweed mitogen (Sigma) at 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Donors with LSI > 5 for PPD were selected for further experiments. To obtain CD4 PPD-specific T cell clones from samples from the selected donors, PBMCs were stimulated overnight with PPD, and antigen-specific IFN- γ -producing CD4⁺ T cells were isolated using a cell enrichment and detection kit (Miltenyi). Antigen-specific T cell clones were cultivated in 10% AB serum in RPMI with IL-2 (50 U/ml) addition every second day.

In vitro induction of IS formation between DC and CD4 T cells IS formation between human or mouse DCs and T cells was induced as reported before^{17,19}. Briefly, DCs and CD4 T cells (ratio 1 DC:5 CD4 T cells) were incubated in complete medium (10% FCS in RPMI for human cells that established allogeneic interactions and for mouse cells; 10% human AB serum in RPMI for human cells that established antigen-specific interactions). Subsequently, the cells were centrifuged (50g, 5 min) in a conical tube and then incubated in the corresponding complete medium for another 2 h to foster IS formation.

In vitro induction of apoptosis. Single DCs or DCs forming IS were transferred to 0.1% BSA in RPMI plus 20 mM HEPES for 10 h. At the end of this period, apoptotic parameters in the cells were examined either by staining of the nuclei with Hoechst 33342 or by analyzing phosphatidylserine externalization using annexin V staining. To stain the nuclei with Hoechst 33342, the DCs were fixed in 4% formaldehyde in PBS and then permeabilized in cold methanol for 20 min. The morphology of the nuclei was subsequently examined by immunofluorescence under an ultraviolet lamp³¹. To analyze phosphatidylserine externalization by immunofluorescence, cells were plated onto PLL-coated dishes and then stained directly (15 min, room temperature) with FITC-conjugated annexin V in 10 mM HEPES, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂ (ref. 31). To examine phosphatidylserine externalization by flow cytometry, unfixed DCs were stained with FITC-conjugated annexin V and 7AAD following the manufacturer's instructions, and the percentage of apoptotic cells (annexin⁺7AAD⁻) was determined³¹. The percentage of inhibition of apoptosis in control and LY294002-treated conjugates (Fig. 5b, left) was calculated as follows: % apoptosis of single DCs – % apoptosis of DCs forming IS / % apoptosis of single DCs.

Purification and labeling of mouse DCs and CD4 T cells. Mouse DCs were immunomagnetically purified (97% CD11c⁺) from spleens of donor mice (Miltenyi). CD4⁺ T cells from lymph nodes and spleens of OT-II transgenic mice were purified by negative immunomagnetic cell sorting (Miltenyi). Purity was typically more than 90%. Mouse DCs or CD4 OTII T cells used in the *in vivo* studies were labeled for 30 min at 37 °C with 5 μM CMFDA, CFSE or SNARF-1 in 01% BSA in PBS. Control experiments showed that OVA peptide-pulsed DCs induced activation and proliferation of OTII CD4 T cells *in vitro* (Supplementary Fig. 2).

Injection of DCs, CD4 T cells and FLIVO in C57BL/6 mice. CMFDA-labeled splenic DCs (2×10^6) were pulsed with OVA_{323–339} peptide (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in RPMI for 1 h. Subsequently, the DCs were suspended in 50 μl RPMI and injected subcutaneously along with LPS (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) into the hind footpad of recipient C57BL/6 mice (1×10^6 DCs per footpad). After 18 h, 5×10^6 SNARF1-labeled OT-II CD4⁺ T cells were injected into the tail vein of the mice. After another 17 h, the mice were injected intravenously with 8 μg of FLIVO dissolved in 20% DMSO and 80% PBS. Red SR-FLIVO or green FAM-FLIVO were injected when CMFDA or SNARF1 labeled DCs, respectively, were used. After another 60 min to allow the reagent to stain apoptotic DCs, mice were put to death. The popliteal lymph nodes were extracted from the mice, trimmed free of fat and then analyzed by two-photon microscopy.

Two-photon microscopy of lymph nodes. Isolated popliteal lymph nodes were fixed with paraformaldehyde (30 min), washed in PBS and then immersed in fluorescence mounting medium (Prolong Gold, Molecular Probes) between two glass coverslips to allow visualization from both sides of the lymph node. Imaging was carried out with a $\times 20$ magnification, oil-immersion objective (numerical aperture 1.20) in a Leica confocal inverted microscope (TCS-SP2 AOBs spectral system) equipped with a wideband, mode-locked Ti:sapphire two-photon excitation laser (Mai Tai, Spectra-Physics). Optimal two-photon

excitation of the three fluorochromes was achieved at 856 nm wavelength and spectral detection was at 510–540 nm (for CMFDA and FAM-FLIVO) and 560–600 nm (SNARF1 and SR-FLIVO). Detector slits were configured to minimize cross-talk between channels. Lymph nodes were thoroughly scanned from both sides up to a depth of 200–300 μm with a z spacing of 2 μm .

Analysis of apoptotic DCs in lymph nodes. A fluorescent-dye labeled form of FLIVO was injected intravenously in mice to label apoptotic DCs in the lymph nodes. Two-photon microscopy optical section stacks obtained from the analysis of the lymph node, showing DCs alone or forming IS, were examined for the presence of FLIVO staining using Leica Confocal Software (LCS) (Supplementary Fig. 5). To quantify the amount of FLIVO incorporated by the cells labeled with the fluorescent cell tracker probes (CMFDA or SNARF1), we used the LCS profile quantification tool. In each cell to be analyzed, we traced several linear regions of interest (ROI), and finally selected the ROI providing the maximum intensity of FLIVO staining for each cell. Subsequently, we obtained graphs with the intensity profiles of the SNARF1/FAM-FLIVO or the CMFDA/SR-FLIVO pair. Although in the description below we focus on the latter pair, which we used predominantly in this study, similar results were obtained when we used SNARF1/FAM-FLIVO in the experiments (data not shown). Analysis of the SR-FLIVO and CMFDA intensity profiles of multiple cells showed that there was no leakage between the two channels. Therefore, we decided to use the value of maximum amplitude of the SR-FLIVO, provided automatically by the LCS, as an index of the incorporation of SR-FLIVO and, consequently, of the apoptotic status of the cell analyzed (Supplementary Figs. 4 and 5). From this value we subtracted the value of SR-FLIVO channel background in the field where the cell was positioned, a background that was negligible in most cases. For the practical analysis shown in Figure 3, we considered a live DC or T cell to be any that showed a value of maximum amplitude of the SR-FLIVO channel equal or lower than 30 (Supplementary Fig. 5). This restrictive value was chosen based on the results shown in Supplementary Figures 4 and 5, which indicate that DCs or T cells that are negative for SR-FLIVO staining are also identified as live cells according to Hoechst staining. DCs or T cells that had maximum amplitude SR-FLIVO values above 30 were considered apoptotic. The percentages of protection obtained when we measured absolute values of maximum intensities of SR-FLIVO were similar to those obtained when we measured the ratio maximum amplitude SR-FLIVO over the maximum amplitude CMFDA (data not shown).

Immunofluorescence and confocal microscopy. Immunofluorescence was performed as described^{31,48,50}. Briefly, cells were plated at 37 °C for 30 min onto coverslips coated with PLL (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Then the cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PBS (10 min at room temperature) and permeabilized with 0.2% Triton X-100 (10 min at room temperature). When the cells were processed for immunofluorescence, they were first treated, to block antibody Fc receptor binding, either with 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of human IgG (15 min) in the case of human cells or with anti-mouse CD16/32 in the case of mouse cells, and then, to block nonspecific binding, with 1% BSA (15 min). Subsequently, the cells were stained with FITC or Texas red–conjugated phalloidin or with suitable primary or secondary antibodies. Before mounting, the samples were extensively washed with PBS and distilled water. Coverslips were mounted in fluorescence mounting medium (Dako). Laser-scanning confocal microscopy was performed with argon and helium/neon laser beams and an Ultra-spectral Leica TCS-SP2-AOBS inverted epifluorescence microscope using oil immersion objectives. GFP-labeled cells were analyzed with the FITC fluorescent channel. In Figure 7, to quantify Texas Red fluorescence intensity in the DCs

nucleofected with siRNA control or siRNA for FOXO1, regions of interest (ROI) were selected using a contour selection tool and then, within this ROI, fluorescence was quantified using the confocal microscope software. Set parameters were conserved during all acquisitions both for siRNA control and siRNA FOXO1. Red fluorescence intensity was quantified in 50 ROIs.

Flow cytometry. Flow cytometry was performed as described⁵⁰. Briefly, human and mouse cells were treated with human IgG (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) or anti-CD16/32 (0.5 μg per million cells), respectively, to block antibody binding to Fc receptors. Subsequently, cells were incubated at 4 °C with appropriate primary mAbs (anti-CD1a, anti-CD14, anti-HLA-DR, anti-CCR7, anti-CD83 or anti-CD69). The cells were then analyzed on a FACScan cytometer using CellQuest software. Background fluorescence was evaluated with an irrelevant, isotype-matched mAb.

Isolation of nuclear and cytoplasmic extracts. Extracts were prepared according to published methods⁴².

Cross-linking of LFA-1 and CD40. Cross-linking was performed as indicated before⁴⁸. Briefly, to induce cross-linking of LFA-1 or CD40, DCs in suspension were incubated in RPMI at 4 °C with anti-LFA-1 α -subunit or anti-CD40 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$), followed by the indicated periods at 37 °C in the presence of sheep anti-mouse F(ab')₂ fragment antibody (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Immunoblot. To analyze total and phosphorylated proteins, DCs (3×10^5 cells) were solubilized in lysis buffer (20 mM Tris HCl, pH 7.5, 120 mM NaCl, 1% NP-40, 10% glycerol, 1 mM sodium pyrophosphate, 20 mM NaF, 1 mM sodium orthovanadate, and a protease inhibitor cocktail (Sigma)). Subsequently, cells were extracted by boiling in SDS-PAGE sample buffer (100 mM Tris HCl, pH 6.8, 0.05 mM sodium orthovanadate, 0.5 mM EDTA, 3% SDS, 1 mM EDTA, 2% 2-mercaptoethanol, 5% glycerol). After extraction, all samples were separated by SDS-PAGE and immunoblotted. For the immunoblot analysis, samples fractionated by SDS-PAGE were electrotransferred to membranes. After blocking with 5% nonfat milk protein in TBS, membranes were incubated with antibodies dissolved in TBS plus 0.05% Tween 20 solution and 5% BSA. Subsequently, the membranes were incubated with suitable peroxidase-conjugated secondary antibodies (Santa Cruz Biotechnology), and immunoreactive bands were visualized using ECL reagents (Pierce).

Expression vectors, siRNAs and nucleofections. The pEGFP-C1 expression vector was from Clontech. PH-Akt1-GFP³⁵, GFP-p65-NF- κ B³⁸ and GFP-FOXO1 (ref. 41) have been described previously. Random control and human FOXO1 siRNAs were obtained from Santa Cruz Biotechnology (sc-35382). The plasmid DNAs and the siRNAs were transfected using the Amaxa nucleoporation system following the manufacturer's instructions.

Statistics. Significance of differences between two series of results was assessed using the Student's unpaired t -test. Values of $P < 0.05$ were considered significant.

48. Rodriguez-Fernandez, J.L. *et al.* Rho and ROCK modulate the tyrosine kinase PYK2 in T-cells through regulation of the activity of the integrin LFA-1. *J. Biol. Chem.* **276**, 40518–40527 (2001).

49. Barnden, M.J., Allison, J., Heath, W.R. & Carbone, F.R. Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based α - and β -chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* **76**, 34–40 (1998).

50. Riol-Blanco, L. *et al.* The neuronal protein Kidins220 localizes in a raft compartment at the leading edge of motile immature dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **34**, 108–118 (2004).

CCR7-Dependent Stimulation of Survival in Dendritic Cells Involves Inhibition of GSK3 β ¹

Cristina Escribano, Cristina Delgado-Martín, and José Luis Rodríguez-Fernández²

Chemokine receptor CCR7 regulates chemotaxis and survival in mature dendritic cells (DCs). We studied the role of glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) in the regulation of CCR7-dependent survival. We show that GSK3 β behaves as a proapoptotic regulator in cultured monocyte-derived human DCs and murine splenic DCs *in vitro*, and in lymph node DCs *in vivo*. In keeping with its prosurvival role, stimulation of CCR7 induced phosphorylation/inhibition of GSK3 β , which was mediated by the pro-survival regulator Akt1, but it was independent of ERK1/2, a key regulator of chemotaxis. Stimulation of CCR7 also induced translocation of two transcription-factor targets of Akt, prosurvival NF- κ B and proapoptotic FOXO1, to the nucleus and cytosol, respectively, resulting in DCs with a phenotype more resistant to apoptotic stimuli. We analyzed if GSK3 β was able to modulate the mobilizations of these transcription factors. Using pharmacological inhibitors, small interfering RNA, and a construct encoding constitutively active GSK3 β , we show that active GSK3 β fosters and hampers the translocations to the nucleus of FOXO and NF- κ B, respectively. Inhibition of GSK3 β resulted in the degradation of the NF- κ B inhibitor I κ B, indicating a mechanism whereby GSK3 can control the translocation of NF- κ B to the nucleus. GSK3 β and FOXO interacted *in vivo*, suggesting that this transcription factor could be a substrate of GSK3. The results provide a novel mechanism whereby active GSK3 β contributes to regulate apoptosis in DCs. They also suggest that upon stimulation of CCR7, Akt-mediated phosphorylation/inhibition of GSK3 β may be required to allow complete translocations of FOXO and NF- κ B that confer DCs an extended survival. *The Journal of Immunology*, 2009, 183: 6282–6295.

Dendritic cells (DCs)³ play a key role in the initiation of the immune response (1). Following encounter with foreign Ags, peripheral DCs undergo a differentiation process called maturation, which involves acquisition of high Ag-presenting ability and an increase in their migration to the lymph nodes (LNs) (1, 2). In the LNs the mature DCs activate clonal T cells that enter and scan the LNs searching for cognate Ags displayed onto the DCs. Finally, most DCs in the LN become apoptotic and die, terminating their life cycle in these areas (3–5).

The percentage of T cells that display a TCR specific for a cognate Ag displayed by a DC is very low (6), implying that the number and lifespan of the Ag-bearing DCs that eventually locate in the LNs “waiting” for the rare cognate T cells will predictably

have a direct effect on the immune response. In this regard, and consistent with this notion, it has been shown that mice with short-lived DCs, that is, that die before or soon after reaching the LNs, display impaired immune responses (7) and that moderate enhancement of the survival of the DCs leads to improvement in this response (8–10). However, it has also been observed that exaggerated extension of the lifespan of DCs leads to autoimmunity (11). Taken together, these results indicate that the lifespan of the DCs should be well controlled to allow an adequate and efficient immune response. Despite the recognized importance of the control of the survival of the DCs for the immune response, there is sparse information on the mechanisms that regulate DC survival and lifespan.

The chemokine receptor CCR7, which is up-regulated during maturation in DCs, efficiently directs these cells to the LNs (12). In this regard, the ligands of CCR7, namely CCL19 and CCL21, which are expressed in the lymphatic vessels that lead to the LNs (CCL21) and in the LN proper (CCL19 and CCL21), act as chemotactic cues that guide the DCs to the latter region (12–14). Apart from directing the migration to these regions, it is emerging that CCR7 is able to regulate a variety of functions in DCs, including survival (15–19). The specific signaling components that control CCR7-dependent survival in DCs are starting to be characterized (17, 20). Previously, we showed that CCR7-regulated survival is controlled by an independent signaling module (17, 20). In this regard, to control survival, CCR7 uses G-protein components G_i and G β γ dimers, the kinase Akt, and the transcription factor NF- κ B (17, 19, 20). Among these components we showed that Akt1 is a key regulator of the survival, but not other CCR7-mediated functions, like chemoattraction or migratory speed (17, 19–21). However, the downstream targets of Akt1 that explain the prosurvival effects of CCR7 in DCs are not completely defined. Akt1 targets that may potentially control survival include transcription regulators NF- κ B and FOXO and the kinase GSK3 β .

Department of Immunology, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain

Received for publication December 5, 2008. Accepted for publication September 7, 2009.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

¹ This work was partially supported by grants awarded to J.L.R.F. by Fundación Ramón Areces, Fundación Rodríguez Pascual, Ministerio de Educación y Ciencia (SAF2005-0081), RETICS Program/Instituto de Salud Carlos III (RIER) (RD08/0075), and Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-01468). C.E.D. and C.D.M. were recipients of I3P (Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Fondo Social Europeo) and FPI Fellowships, respectively, conferred by the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

² Address correspondence and reprint requests to Dr. José Luis Rodríguez-Fernández, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, C/Ramiro de Maeztu, 9, 28040 Madrid, Spain. E-mail address: rodrifer@cib.csic.es

³ Abbreviations used in this paper: DC, dendritic cell; α_{transd} , α -transducin; CMFDA, 5-chloromethylfluorescein diacetate; GSK3, glycogen synthase kinase-3; GSK3 β -CA, constitutively active GSK3 β ; GS, glycogen synthase; LN, lymph node; PI, propidium iodide; PLL, poly-L-lysine; PTX, pertussis toxin; siRNA, small interfering RNA; SR, sulforhodamine B.

Copyright © 2009 by The American Association of Immunologists, Inc. 0022-1767/09/\$2.00

NF- κ B plays prosurvival functions in DCs largely due to its ability to stimulate the transcription from antiapoptotic genes, including antiapoptotic Bcl2 family members (22, 23). In this regard, we have shown before that the stimulation of CCR7 rapidly leads to degradation of the NF- κ B inhibitor I κ B, and to the translocation of NF- κ B, which is cytosolic in serum-deprived DCs, to the nucleus, where it can regulate the transcription of prosurvival genes (17). Unlike NF- κ B, the Forkhead box class O (FOXO) family of transcription factors, which includes FOXO1, FOXO3a, and FOXO4 members, plays proapoptotic roles in DCs and other cell types (24). Under chronic stress conditions, FOXO members translocate to the nucleus of DCs, where they regulate the transcription of proapoptotic molecules, including Bim, which results in the induction of apoptosis in these cells (9, 11, 24–27). Upon phosphorylation by Akt1, FOXO family members shuttle from the nucleus to the cytoplasm, where they are retained by the 14-3-3 linker or degraded, preventing these transcription factors from up-regulating the expression of proapoptotic genes and resulting in DCs with a phenotype that it is more resistant to apoptotic stimuli (25–27).

A third downstream target of Akt1 is the serine-threonine kinase glycogen synthase kinase-3 (GSK3) (28), which is found in mammals in two highly homologous isoforms (GSK3 α and GSK3 β) (29–31). Although GSK3 is active under resting conditions, it can be rapidly inactivated by Akt and other kinases that inhibit its activity by phosphorylating Ser²¹, in GSK3 α , and Ser⁹, in GSK3 β (29–31). GSK3 was initially described only as a regulator of glycogen metabolism; however, it is now known to be involved in the control of multiple cellular processes, including the maintenance of cell cytoarchitecture and survival (29–31). Regarding the latter function, it has been shown that GSK3 plays proapoptotic or antiapoptotic roles depending on the cell type and context (32). In this regard, neuronal cells subjected to a variety of insults, including HIV-Tat, platelet-activating factor, staurosporine, genotoxic stresses, or trophic factor withdrawal, require GSK3 for apoptosis progression (32–35). In contrast, GSK3 is required for the survival of pancreatic and melanoma cancer cells and it also protects different cell types, including mouse embryo fibroblasts, Jurkat T cells, and differentiated hippocampal neurons, from the proapoptotic effects induced by the stimulation of TNF-family receptors in these cells (36–39).

The role that GSK3 β may play in relationship to the control of survival in mature DCs and the mechanisms involved in the regulation of this process have not been studied in detail. This is an important question considering that, as indicated above, the lifespan of the DCs affects importantly the immune response. We have studied this issue in the context of the CCR7-dependent signaling and function. Specifically, we have analyzed if GSK3 β is a component of the signaling module that regulates CCR7-dependent survival in DCs. Herein, we show in *in vitro* cultures of DCs and *in vivo* in LN DCs that GSK3 β behaves as a proapoptotic regulator in these cells. We also show that stimulation of CCR7 results in the phosphorylation/inhibition of GSK3 β in DCs. Our results also indicate that CCR7-dependent inhibition of GSK3 may be necessary to permit, at full extent, the translocation of transcription factors NF- κ B and FOXO, which are required to achieve more viable DCs. Considering the close relationship between DC lifespan and immunity, the results suggest that GSK3 β may be an interesting target to modulate the survival of DCs and the immune response.

Materials and Methods

Reagents and materials

CCL19, CCL21, and TNF- α were from PeproTech. GM-CSF and IL-4 were purchased from Immunotools. Fluorescent dye for cell labeling, that

is, 5-chloromethylfluorescein diacetate (CMFDA), was obtained from Molecular Probes. DePsipher was from R&D Systems. FLIVO is Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethyl ketone (VAD-FMK). Sulforhodamine B (SR)-FLIVO (SR, λ_{abs} 565 nm, λ_{em} >600 nm), a form of FLIVO conjugated to sulforhodamine B, was obtained from Immunochemistry Technologies. LiCl, inhibitor IX, AR-A014418, Akt1/2 inhibitor, LY294002, poly-L-lysine, pertussis toxin (PTX), Hoechst 33342, and the anti- β -tubulin and anti-lactate dehydrogenase Abs were from Sigma-Aldrich. Propidium iodide and UO126 were from Calbiochem. The anti-p65 Ab was from Abcam. The anti-Bim Ab was from Affinity BioReagents. Anti-ERK2, anti-G_{ott1}, recognizing α -transducin (α_{transd}), anti-I κ B, anti-GSK3 α , and anti-GSK3 β Abs were from Santa Cruz Biotechnology. Anti-Bcl-x₁, anti-glycogen synthase (GS), anti-FOXO1, anti-FOXO3, anti-phospho-FOXO1 (phospho-Ser²⁵⁶), anti-phospho-FOXO3 (phospho-Ser²⁵³), anti-Akt1, anti-phospho-GSK3 (recognizing phospho-Ser²¹ in GSK3 α and phospho-Ser⁹ in GSK3 β , corresponding to inhibited forms of these enzymes), anti-phospho-GS (phospho-Ser⁶⁴¹), anti-phospho-ERK1/2 (recognizing phospho-Thr²⁰² and phospho-Tyr²⁰⁴, corresponding to active forms of these enzymes), and anti-phospho-Akt1 (phospho-Ser⁴⁷³, corresponding to an active form of this kinase) were all from Cell Signaling Technology.

Mice

C57BL/6 mice (8 wk) were maintained in the animal facility at the Centro de Investigaciones Biológicas and treated according to Animal Care Committee guidelines.

Purification of murine DCs and labeling of the cells with fluorescent cell trackers

Murine DCs were purified (97% CD11c⁺) from spleens of donor mice using magnetic beads (Miltenyi Biotec), following the manufacturer's protocol. DCs used in the *in vivo* studies were labeled for 30 min at 37°C with 5 μ M of the fluorescent cell tracker probe CMFDA in 0.1% BSA in PBS.

Cells and culture conditions

Human PBMCs were isolated from buffy coats from normal donors over a Lymphoprep (Nycomed), and monocytes were induced to differentiate to DCs by adding GM-CSF and IL-4 for 7 days as indicated previously (17, 19, 40). Briefly, monocytes were resuspended at 0.5 to 1 \times 10⁶ cells/ml and cultured in complete medium (RPMI 1640 (Invitrogen) containing 10% heat-inactivated FCS, HEPES (25 mM), glutamine (2 mM), penicillin (100 U/ml), and streptomycin (100 μ g/ml)), including GM-CSF (1000 U/ml) and IL-4 (1000 U/ml). Cells were cultured for 6–7 days, with cytokine addition every second day to obtain a population of immature DCs (CD14^{low}, CD83⁻, CD1a⁺, HLA-DR⁺). To induce maturation of the DCs, the cytokines GM-CSF, IL-4, and TNF- α (50 ng/ml) were added to the cultures for a further 72 h period. Analysis by flow cytometry showed that the treatment yielded a homogeneous population of mature DCs (CD1a⁺, DC-SIGN⁺, CD14^{low/-}, HLA-DR^{high}, CD83⁺, CCR7⁺ expressing cells).

Assays of apoptotic damage *in vitro*

An equal number of viable DCs, determined by trypan blue dye exclusion method, were incubated in 0.1% BSA in RPMI 1640 plus 20 mM HEPES for 24 h in the presence or absence of CCL19 or CCL21 or the GSK3 inhibitors and then harvested. To detect externalization of phosphatidylserine on the outer layer of the cell membrane, the DCs were stained with FITC-conjugated annexin V and propidium iodide (PI), according to the manufacturer's instructions, and then the staining was assessed by flow cytometry. In these experiments were considered apoptotic those DCs that were annexin V⁺/PI⁻ (17). To analyze mitochondria membrane potential disruption, a parameter also associated to apoptosis (17), DCs were incubated with DePsipher and immediately analyzed by immunofluorescence, according to the manufacturer's protocol. Apoptotic nuclear morphology was assessed using Hoechst 33342 staining as indicated before (17, 24).

Immunoprecipitation

Immunoprecipitation was conducted as indicated before, with slight modifications (41). Cells (40 \times 10⁶ Jurkat cells or 8 \times 10⁶ DCs) were lysed in 1 ml of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.65), 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM sodium orthovanadate, 0.2% Nonidet P-40, 1 mM DTT, 50 μ g/ml aprotinin, 50 μ g/ml leupeptin, 5 μ g/ml pepstatin, and 1 mM PMSF). Lysates were clarified by centrifugation at 14,000 rpm for 10 min, and the pellets obtained were discarded. After centrifugation, lysates were subjected to preclearing with protein-A agarose (Santa Cruz Biotechnology). Subsequently, lysates were transferred to fresh tubes, and proteins were immunoprecipitated at 4°C overnight with rabbit polyclonal anti-GSK3 β or anti-FOXO3 Ab (1 μ g/ml). During the last 2 h,

protein-A agarose was added and the immunoprecipitates were washed three times with lysis buffer and then extracted in SDS-PAGE sample buffer (100 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0.05 mM sodium orthovanadate, 0.5 mM EDTA, 3% SDS, 1 mM EDTA, 2% 2-ME, and 5% glycerol) by boiling for 5 min. The immunoprecipitates were fractionated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and then analyzed for the presence of either FOXO or GSK3 β as indicated in the figure legends.

Cell lysis and Western blot analysis

To reduce the basal levels of activity of the molecules analyzed, the DCs (100×10^3 cells) were maintained in 0.1% BSA in RPMI 1640 for 30 min before starting the stimulation with chemokines. DCs were then stimulated or not with the corresponding chemokines for the indicated periods of time. The stimulation was terminated by solubilizing the cells in SDS-PAGE sample buffer and boiled. Cells were then fractionated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes. After blocking with 5% nonfat milk protein in TBS (pH 7.5), membranes were incubated with the indicated Abs in TBST (TBS plus 0.1% Tween 20) and visualized with appropriate HRP-conjugated secondary Abs (Bio-Rad) and an ECL substrate (Pierce) detection system. Quantification of the blots was performed using Multi Gauge software from Fujifilm.

Obtaining nuclear and cytoplasmic extracts

The extracts were prepared according to published methods (42). In the experiments the absence of lactate dehydrogenase, assessed by Western blotting, confirmed the lack of cytosolic contamination of the nuclear fraction.

Flow cytometry

Cytometry analysis was performed as described before (43).

Expression vectors, small interfering RNAs (siRNAs), and nucleofections

The pEGFP-C1 (GFP) expression vector was from Clontech; α_{transd} (17), GFP-p65 (44), and GFP-FOXO1 (45) have been described before. The constitutively active GSK3 β S9A, which includes hemagglutinin tagging, was obtained from Addgene. Random control and GSK3 β siRNAs were obtained from Applied Biosystems. Plasmids and siRNAs were transfected with the Amaxa nucleoporator system, following the manufacturer's instructions.

Analysis of the presence of GFP in the nucleus of the GFP-transfected DCs

GFP vector, FOXO1-GFP, or p65-GFP-transfected DCs (50×10^3 DCs) suspended in 0.1% BSA in RPMI 1640 were plated onto poly-L-lysine (PLL)-coated coverslips. The cells were then fixed in 4% paraformaldehyde in PBS (10 min at room temperature) and subsequently permeabilized with 0.2% Triton X-100 (10 min at room temperature). DCs were then stained with Hoechst (2 μ M) to assess the position of the nucleus. Coverslips were extensively washed with PBS and distilled water and then mounted in fluorescent mounting medium (Dako). Cells were analyzed using a Nikon Eclipse E800 microscope. GFP-expressing cells were analyzed using the FITC channel and Hoechst using UV light.

Injection of CMFDA-DC in C57BL/6 mice and obtaining the popliteal LNs

CMFDA-labeled splenic DCs (2×10^6) were dissolved in 25 μ l of RPMI 1640 and injected s.c. along with LPS (1 μ g/ml) into the hind footpad of recipient C57BL/6 mice (1×10^6 DCs per footpad). After 18 h, when the DCs have already reached the LNs (not shown and Ref. 46), treated or control animals were injected i.p., respectively, with the GSK3 inhibitor LiCl (50 μ mol in double-distilled water) or with NaCl (50 μ mol in double-distilled water). After injecting the mice with NaCl or LiCl, these salts were also included at a final concentration of 5 mM in the bottles of water provided to the animals. Two hours before the end of the experiment, animals were injected i.v. with SR-FLIVO, a reagent that binds irreversibly to caspases up-regulated in apoptotic cells, allowing a selective detection of the latter cells in the LNs by two-photon microscopy (see below and Ref. 24). Finally, the mice were sacrificed, and the popliteal LNs were extracted from the mice and subsequently subjected to two-photon confocal analysis to visualize among the injected CMFDA-DCs those that present SR-FLIVO staining (see below).

Two-photon microscopy and analysis of apoptotic CMFDA-DCs in the LNs

Isolated popliteal LNs were fixed with paraformaldehyde (30 min), washed in PBS, and then immersed in fluorescence mounting medium (ProLong Gold; Molecular Probes) between two glass coverslips to allow visualization from both sides of the LN. Imaging was conducted with a $\times 20$ magnification oil immersion objective (1.20 NA) in a Leica confocal inverted microscope (TCS-SP2 AOBs spectral system) equipped with a wideband mode-locked Ti:sapphire two-photon excitation laser (Mai Tai; Spectra-Physics). Optimal two-photon excitation of the three fluorochromes was achieved at 856 nm wavelength and spectral detection was at 510–540 nm (for CMFDA) and 560–600 nm (for SR-FLIVO). Detector slits were configured to minimize crosstalk between channels. LNs were thoroughly scanned from both sides up to a depth of 200–300 μ m with a z spacing of 2 μ m. Two-photon microscopy optical section stacks obtained from the analysis of the LNs were examined for the presence of SR-FLIVO staining using the Leica Confocal Software (24). To quantify the amount of SR-FLIVO incorporated by the DCs labeled with the fluorescent cell tracker probe CMFDA, we used the Leica Confocal Software profile quantification tool. In each cell to be analyzed we traced several lineal regions of interest and then selected the region of interest providing the maximum intensity of FLIVO staining for each cell. Subsequently, we obtained graphs with the intensity profiles of both the CMFDA and SR-FLIVO for each DC (24). SR-FLIVO or CMFDA channel background values in the fields where the cell was positioned were negligible in most cases. Although analysis of the SR-FLIVO and CMFDA intensity profiles of multiple cells showed that there was no leakage between both channels, we used the value of maximum amplitude of the SR-FLIVO over maximum amplitude of the CMFDA as an index of the incorporation of SR-FLIVO and, consequently, of the degree of apoptosis of the DCs analyzed (see Results and Ref. 24).

Statistics

Data are expressed as means \pm SEM, and significance of differences between two series of results was assessed using Student's unpaired t test. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

GSK3 β behaves as a proapoptotic signaling molecule in DCs

To analyze if GSK3 is pro- or antiapoptotic in mature DCs, the cells were maintained for 24 h, under conditions that induce apoptosis (0.1% BSA in RPMI 1640), with or without any of three selective GSK3 inhibitors, namely LiCl, AR-A014418, or inhibitor IX (47–49). Control DCs were maintained in complete medium (10% FCS/RPMI 1640). These agents blocked efficiently the phosphorylation of glycogen synthase (GS), a well-known GSK3 substrate, indicating that they all inhibited GSK3 activity (Fig. 1A). In control and inhibitor-treated DCs, apoptosis was assessed by estimating the cells that displayed condensed or fragmented nuclei (Fig. 1A), externalization of phosphatidylserine on the outer layer of the cell membrane (Fig. 1B), or loss of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) (Fig. 1C). As shown in Fig. 1, according to all of these apoptotic markers, DCs treated with the GSK3 inhibitors showed reduced percentages of apoptosis. As similar results were obtained with the three methods used, in subsequent experiments we measure apoptosis by analyzing the nucleus of the DCs upon staining with Hoechst.

Since the pharmacological inhibitors employed blocked both GSK3 α and GSK3 β , we used siRNA to reduce specifically the levels of GSK3 β (Fig. 1D, upper panel). When DCs with normal or reduced levels of GSK3 β were shifted to 0.1% BSA in RPMI 1640 and then, after 24 h, the cells were stained with Hoechst, we observed reduced percentages of apoptosis in the DCs that presented low levels of GSK3 β (Fig. 1D, lower panel). The result further confirms that GSK3 β plays a proapoptotic role in DCs. Finally, we selectively increased the level and activity of GSK3 β by transfecting these cells with a constitutively active GSK3 β (GSK3 β S9A, hereafter GSK3 β -CA). When we analyzed these cells, we observed that they displayed significantly higher percentage of apoptosis compared with the DCs transfected with vector

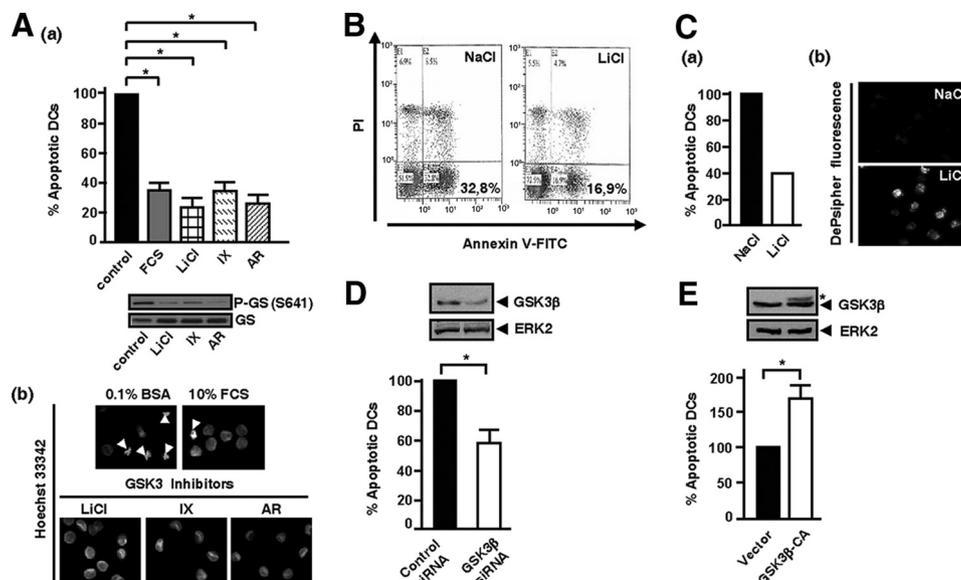


FIGURE 1. GSK3 β plays a proapoptotic role in DCs. *A, a, Upper.* DCs were suspended in 0.1% BSA in RPMI 1640 and then incubated for 24 h either in this medium alone (control) or in this medium plus 10% FCS or LiCl (20 mM) or inhibitor IX (4 μ M) or AR (10 μ M). Subsequently, the cells were fixed and stained with Hoechst 33342 to identify apoptotic DCs (i.e., DCs that present condensed or fragmented nuclei). The number represents percentage of apoptotic cells respect to the percentage of apoptotic DCs that were observed in the controls (0.1% BSA in RPMI 1640), to which was given an arbitrary number of 100. Four independent experiments were performed (at least 100 DCs were analyzed in each experiment). Results shown represent the means \pm SEM ($n = 4$). *, $p < 0.01$. *Lower.* Aliquots of DCs in 0.1% BSA in RPMI 1640 untreated (control) or treated with LiCl (20 mM), inhibitor IX (4 μ M), or AR (10 μ M) for 60 min were subjected to a Western blot with Abs that recognize GS phosphorylated in Ser⁶⁴¹ (P-GS(S641)), a residue that it is phosphorylated by GSK3, to show that the treatments inhibit GSK3 activity. To show equal loading, the membrane was stripped and probed with an Ab against GS. *b.* Photographs taken from representative samples of the Hoechst 33342-stained DCs quantified in *Aa*. Arrowheads indicate condensed or fragmented nuclei. *B.* DCs were suspended in 0.1% BSA in RPMI 1640 and then they were treated either with NaCl or LiCl as indicated in *A*. Subsequently, they were analyzed for the presence of annexin V (Annexin V-FITC) and PI staining by flow cytometry. To exclude potentially necrotic cells (PI⁺), only annexin⁺/PI⁻ cells were considered as apoptotic. A representative experiment out of two performed is shown. At least 30,000 DCs were analyzed in each experiment. The percentage of annexin⁺/PI⁻ DCs displayed by NaCl- or LiCl-treated DCs is also indicated. *C.* DCs were suspended in 0.1% BSA in RPMI 1640 and then treated with NaCl or LiCl as indicated in *A*. Subsequently, the DCs were stained with DePsipher, an agent that is sensitive to mitochondrial membrane potential changes. Healthy DCs stained with DePsipher give an intense red labeling under the fluorescent microscope. Apoptotic DCs, in contrast, give a very faint label. *a.* Quantification of apoptotic DCs. The numbers represent percentage of apoptotic cells with respect to the percentage of apoptotic DCs obtained in the presence of NaCl, which was given an arbitrary number of 100. At least 100 DCs were analyzed in each experiment. A representative experiment out of two performed is shown. *b.* Representative fields of NaCl- or LiCl-treated DCs stained with DePsipher. *D.* DCs were nucleofected either with random siRNA (Control siRNA) or with a siRNA specific for GSK3 β (GSK3 β siRNA). *Upper.* Thirty six hours after nucleofection, aliquots of the samples were extracted in 2 \times sample buffer and used to perform Western blotting with an anti-GSK3 β Ab. To confirm equal loading, blots were reprobed with an Ab reacting with ERK2. *Lower.* Samples of DCs nucleofected either with control or with GSK3 β siRNA were washed in RPMI 1640, and then equal numbers of live DCs, determined by trypan blue exclusion, were transferred to 0.1% BSA in RPMI 1640 for an additional 24 h. At the end of this period, the DCs were stained with Hoechst. The percentage of apoptotic DCs observed in the control siRNA nucleofected DCs was given an arbitrary value of 100, and the percentages of apoptotic DCs observed in siRNA GSK3 β -transfected DCs were referred to this value. Four independent experiments were performed (at least 100 DCs were analyzed in each experiment). Results shown represent the means \pm SEM ($n = 4$). *, $p < 0.01$. *E.* *Upper.* DCs were nucleofected either with pcDNA3 vector or with a plasmid encoding GSK3 β S9A, a constitutively active form of GSK3 β (GSK3 β -CA). Ten hours after transfection, aliquots of vector and GSK3 β -CA-transfected live DCs, determined by trypan blue exclusion, were taken to analyze GSK3 β levels by Western blotting using an anti-GSK3 β Ab. Note that the overexpressed GSK3 β S9A protein, marked with an asterisk, experiences a slight shift when analyzed by Western blotting using the anti GSK3 β Ab. ERK2 levels show equal loading of the gels. *Lower.* Ten hours after transfection the DCs were stained with Hoechst as in *D*. After determining the percentage of apoptotic DCs, the percentage of DCs observed in nucleofected vector DCs was given the arbitrary value of 100, and percentages of apoptotic DCs observed in GSK3 β -CA nucleofected DCs were referred to this value. Three independent experiments were performed (at least 100 DCs were examined in each experiment). Results shown represent the means \pm SEM ($n = 3$). *, $p < 0.01$.

plasmid. Taken together, the data shown demonstrate that GSK3 β behaves as a proapoptotic signaling molecule in mature DCs.

Stimulation of DCs with CCL19 or CCL21 induces phosphorylation/inactivation of GSK3 β

We showed before that stimulation of CCR7 in DCs protects these cells from apoptosis (17). As GSK3 β is proapoptotic in DCs, we asked whether stimulation of CCR7 in DCs induced phosphorylation/inactivation of this kinase. DCs were treated with CCL19 or CCL21 for various times and lysed. Subsequently, we examined the effect of the chemokines on GSK3 using the Ab that recognizes the phosphorylated/inactive form of GSK3 β (Ser⁹ phosphorylation) (50, 51). Hereafter, for simplicity, we refer to this form of

GSK3 β phosphorylated in Ser⁹ as phosphorylated/inhibited GSK3 β . Stimulation with CCL19 or CCL21 induced a rapid phosphorylation/inactivation of GSK3 β (Fig. 2A). Densitometric scanning showed that both chemokines induced an increase in the phosphorylation of GSK3 as early as 0.5 min after the addition of chemokines to intact cells (not shown), remained high between 1 and 15 min, and decayed to almost basal levels after 30 min (Fig. 2A). These levels were still low after 120 min of stimulation with both chemokines (not shown). Finally, we also observed that upon stimulating the DCs with CCL19 or CCL21, the phosphorylation of the GSK3 substrate GS was reduced (Fig. 2B), which further confirms that stimulation of CCR7 leads to the inhibition of the activity of GSK3. Collectively, the results show that consistent

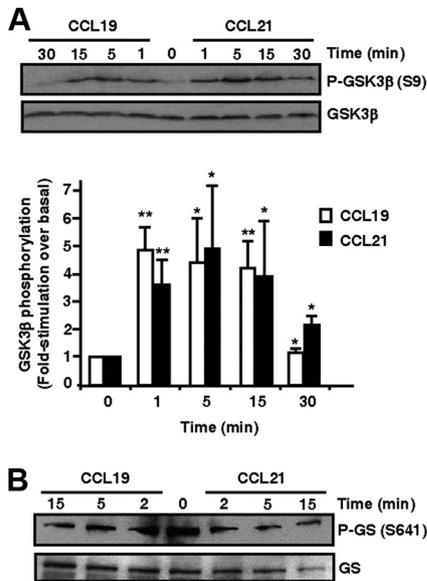


FIGURE 2. Stimulation of DCs with CCL19 or CCL21 induces phosphorylation/inhibition of GSK3 β . **A**, DCs (100,000 cells) suspended in 0.1% BSA in RPMI 1640 were stimulated for the indicated times with CCL19 or CCL21 (both at 18 nM), then lysed and analyzed by SDS-PAGE, followed by Western blotting with Abs against phospho-GSK3 β (Ser⁹), which represents a phosphorylated/inhibited form of this enzyme. To show equal loading, the membranes were reprobbed with Abs against GSK3 β . A representative experiment out of three performed is shown. Graph shows the quantification of the fold induction in phospho-GSK3 β (Ser⁹) over basal levels (time 0). Three independent experiments were performed. Results shown represent the means \pm SEM ($n = 3$). *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. **B**, DCs (100,000 cells) suspended as in **A** and stimulated with either CCL19 or CCL21 for the indicated times were extracted and then subjected to Western blotting with an Ab against phospho-GS (Ser⁶⁴¹) (P-GS). To show equal loading, the membrane was reprobbed with an Ab against total GS. A representative experiment out of three performed is shown.

with the prosurvival role of CCR7 in DCs (17), stimulation of this receptor induces phosphorylation/inhibition of proapoptotic GSK3 β .

Blocking of GSK3 inhibits the apoptosis of murine DCs in the LNs

We wanted to test if the reduced levels of apoptosis observed upon inhibition of GSK3 in the human monocyte-derived DCs could also be observed in the LNs, the setting in which DCs present Ags to T cells (1, 2). Before performing experiments *in vivo*, we analyzed *in vitro* if the treatment of cultured splenic DCs with GSK3 inhibitors also inhibited the apoptosis of these DCs. The treatment of the murine DCs with two different GSK3 inhibitors, namely LiCl and inhibitor IX, reduced significantly the apoptosis of the DCs, indicating that GSK3 is also proapoptotic in splenic DCs in culture (Fig. 3A). Furthermore, similar to the results obtained with human monocyte-derived DCs, we observed that stimulation of splenic DCs with murine CCL19 or CCL21 induced rapid phosphorylation/inhibition of GSK3 β (Fig. 3B).

It is accepted that most conventional DCs that arrive from peripheral tissues to the LNs become largely apoptotic and die in the latter areas (3–5). Making use of this information we analyzed if inhibition of GSK3 reduced the percentage of apoptotic DCs inside the LNs, implying that GSK3 is also proapoptotic *in vivo*. For this purpose, C57BL/6 mice were injected *s.c.* in the hind footpad with CMFDA-labeled splenic DCs. After 18 h, when a significant num-

ber of DCs were already positioned in the LN (46) (not shown), mice were injected *i.p.* with 50 μ mol of the GSK3 inhibitor LiCl. Control animals were injected with the same amount of NaCl (Fig. 3C). After an additional 22 h, the animals were injected *i.v.* with SR-FLIVO, an agent that selectively stains apoptotic DCs *in vivo* (see *Materials and Methods* and below), and after an additional 2 h, mice were sacrificed. The popliteal LNs were obtained and subsequently analyzed by two-photon microscopy.

FLIVO is a poly caspase binding inhibitor probe conjugated to a fluorescent dye that binds irreversibly to caspases activated during apoptosis, including caspase-1, -3, -4, -5, -6, -7, -8, and -9, implying that it can be used as a probe to detect apoptotic cells *in vitro* and *in vivo* (52). Previously it has been shown that FLIVO and Hoechst are equivalent regarding their ability to distinguish apoptotic from nonapoptotic DCs (24, 53). As the fluorescent-conjugated forms of FLIVO are cell permeant and chemically stable, this reagent can be injected *i.v.* in mice to detect apoptotic DCs in the LNs. Nonapoptotic DCs, which lack active caspases, remain largely unlabeled because fluorescent FLIVO diffuses out (24). In contrast, fluorescent FLIVO binds irreversibly to caspases up-regulated in apoptotic cells, which allows the selective labeling of the latter cells in the LNs (24). Fluorescent-labeled DCs can be subsequently examined inside the LN by two-photon microscopy (24). The presence of SR-FLIVO staining points out the presence of caspases in the DCs, implying that these cells are apoptotic (52, 53). Therefore, if the LiCl treatment protects the DCs from apoptosis in the LNs, then it would be expected that a global analysis of the SR-FLIVO staining in the LN DCs should result in a lower average of SR-FLIVO staining in DCs obtained from the LiCl-treated compared with the NaCl-treated animals (Fig. 3C). As shown in Fig. 3C, this is the case, showing that the inhibition of GSK3 β results in the reduction of the apoptosis of the DCs in the LNs.

GSK3 β is a target of the signaling module that regulates CCR7-dependent survival in DCs

Previously, we showed that a signaling module formed by G β / γ and Akt1 regulates the survival effects of CCR7 in DCs (17). We tested if these signaling molecules controlled also the CCR7-dependent phosphorylation/inhibition of GSK3 β (Fig. 4). To analyze if the G β family of G proteins played a role in the phosphorylation/inactivation of GSK3 β induced by stimulating the DCs with CCL19 and CCL21, the DCs were pretreated with the G β -selective inhibitor PTX. When we measured in control and PTX-treated DCs the increase in the phosphorylation over basal levels induced by stimulating the DCs with CCL19 (not shown) or CCL21 (Fig. 4A), we observed a clear inhibition of the phosphorylation of GSK3 β in the PTX-treated cells when compared with control DCs. These results clearly indicate the involvement of G β protein in the CCR7-mediated phosphorylation of GSK3 β . To determine the involvement of $\beta\gamma$ proteins, we transfected the DCs with α_{transd} , which sequesters G $\beta\gamma$ subunits and, consequently, inhibits the signaling mediated by this dimer (54). Overexpression of α_{transd} blunted the phosphorylation/inactivation of GSK3 β induced by stimulating the DCs with CCL19 (Fig. 4B) or CCL21 (not shown), indicating that $\beta\gamma$ regulates the signaling downstream of CCR7 that controls GSK3 β phosphorylation/inhibition.

As G β and $\beta\gamma$ mediate downstream of CCR7 the activation of Akt1 (17), we analyzed if the latter kinase regulates the phosphorylation/inhibition of GSK3 β . Inhibition of Akt by treating the DCs either with LY294002 (not shown) or with an Akt1 inhibitor (Fig. 4C) abrogated almost completely the phosphorylation/inhibition of GSK3 β induced by stimulating the DCs with CCL19 (Fig. 4C) or CCL21 (not shown), pointing out the important role of Akt in this

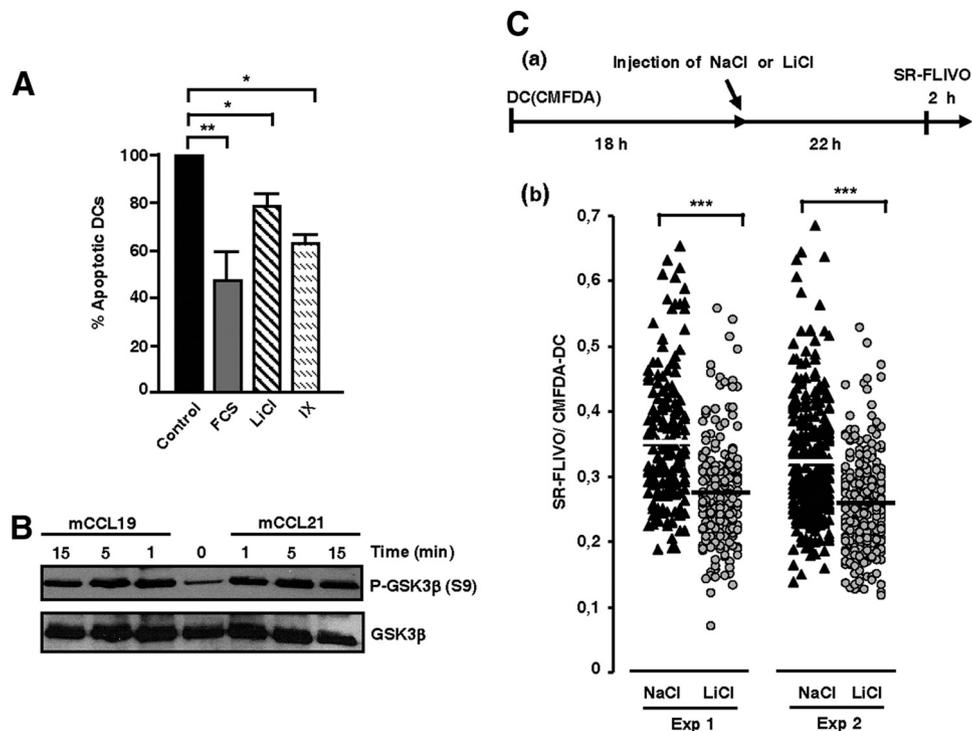


FIGURE 3. Inhibition of GSK3 β extends the survival of DCs in the LNs. *A*, An equal number of murine splenic DCs suspended in 0.1% BSA in RPMI 1640 were incubated for 24 h in the absence (control) or in the presence of 10% FCS, LiCl (20 mM), or inhibitor IX (4 μ M). Subsequently, the cells were fixed and stained with Hoechst 33342 to detect apoptotic DCs as indicated in the legend of Fig. 1A. The numbers represent percentage of apoptotic cells respect to the percentage of apoptotic DCs detected in 0.1% BSA in RPMI 1640, which were given an arbitrary value of 100. Three independent experiments were performed (at least 100 DCs were analyzed in each experiment). Results represent the means \pm SEM ($n = 3$). *, $p < 0.01$; **, $p < 0.005$. *B*, Splenic DCs (300,000 cells) suspended in 0.1% BSA in RPMI 1640 were stimulated for the indicated times with murine CCL19 or CCL21 (both at 20 nM), then lysed and analyzed by SDS-PAGE, followed by Western blotting with Abs against phospho-GSK3 β (Ser⁹) to detect phosphorylated/inhibited GSK3 β . To show equal loading, the membrane was reprobed with an Ab against GSK3 β . A representative experiment out of three performed is shown. *C*, *a*, Experimental protocol. CMFDA-labeled splenic DCs (DC(CMDA)) (2×10^6) were injected in the footpads of recipient mice. After 18 h, once the DCs have reached the LNs (not shown and Ref. 46), animals were injected i.p. with 50 μ mol of either LiCl or NaCl, in both cases dissolved in 50 μ l of double-distilled water. After 22 h, the animals were i.v. injected with SR-FLIVO to stain apoptotic DCs in the LNs. After an additional 2 h, the popliteal LNs were extracted, fixed, and subjected to two-photon analysis. *b*, SR-FLIVO staining presented by CMFDA-DCs obtained from the LNs of animals treated either with LiCl or with NaCl. The LNs of the mice were extracted and studied by two-photon microscopy as indicated in *Materials and Methods*. The stacks of optical images of the LNs were examined with the Leica Confocal Software, and values of the maximum amplitude of the SR-FLIVO and CMFDA channel were obtained (see *Materials and Methods* and Ref. 24). Data are presented as maximum intensity of SR-FLIVO over maximum intensity of CMFDA for each individual DC in a LN (see Ref. 24). Two different mice, corresponding to two different experiments, were analyzed. In the case of the NaCl-treated animals, 175 (Expt. 1) and 301 (Expt. 2) DCs were examined. In the case of the LiCl-treated animals, 205 (Expt. 1) and 319 (Expt. 2) DCs were examined. ***, $p < 4.366 \times 10^{16}$.

process. In contrast, inhibition of GSK3, by treating the DCs with LiCl or inhibitor IX, had no effect on the CCR7-dependent phosphorylation of Akt, further corroborating that GSK3 is downstream of Akt (Fig. 4D). Taken together, the results indicate that G α_i , G $\beta\gamma$, and Akt1 mediate downstream of CCR7 the phosphorylation/inactivation of GSK3 β . As G α_i , G $\beta\gamma$, and Akt1 were shown before to be components of a signaling module that mediates the prosurvival effects of CCR7 (17, 20), the results suggest that this signaling module inhibits GSK3 β to regulate CCR7-dependent survival in DCs.

GSK3 β phosphorylation is not regulated by key regulators of CCR7-mediated chemotaxis in DCs

We have shown before that in DCs the kinase ERK1/2, which is activated upon stimulation of CCR7, is a key regulator of CCR7-dependent chemotaxis, but not CCR7-dependent survival in DCs (17, 19, 20). In this regard, we had reported before that those stimuli that modulate chemotaxis affect also the phosphorylation of ERK1/2 (17, 19, 20). We analyzed whether interference with GSK3 β affected the activity of ERK1/2 or if inhibition of ERK1/2

may regulate the phosphorylation/inhibition of GSK3 β . We observed that inhibition of ERK1/2, by treating the DCs with UO126, did not affect CCL19-induced (Fig. 4E) or CCL21-induced (not shown) phosphorylation of GSK3 β (Fig. 4E), and the inhibition of GSK3 β , using inhibitor IX (not shown) or LiCl (Fig. 4F), did not alter the activation of ERK1/2. As GSK3 is not upstream or downstream of the key chemotactic regulator ERK1/2, the results indicate that following stimulation of CCR7 in DCs, ERK1/2 and GSK3 β are regulated independently from each other. These results add further support to the contention that GSK3 β is a specific target of the signaling module that regulates CCR7-dependent survival, but not the module that controls CCR7-dependent chemotaxis in DCs (20).

Stimulation of DCs with CCL19 or CCL21 induces translocation of FOXO from the nucleus to the cytosol

Previously, we showed that stimulation of CCR7 in DCs was able to induce translocation of prosurvival transcription factor NF- κ B from the cytosol, where it is located under proapoptotic conditions,

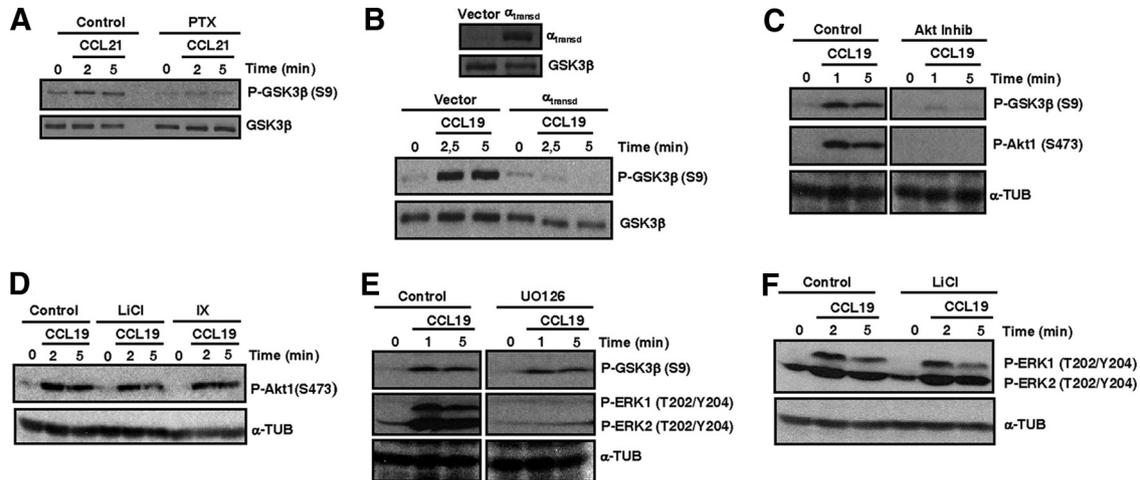


FIGURE 4. Signaling downstream of CCR7 regulating phosphorylation/inhibition of GSK3 β . *A*, DCs in complete medium were either untreated (Control) or were treated with PTX (100 ng/ml) for 180 min. Subsequently, the DCs were washed and suspended in 0.1% BSA in RPMI 1640. Then, control and PTX-treated DCs were stimulated with CCL21 (18 nM) for the indicated time periods and subsequently lysed and subjected to Western blot with Abs against phospho-GSK3 β (Ser⁹). To show equal loading, the membrane was probed with an Ab against total GSK3 β . A representative experiment out of four performed is shown. *B*, DCs were transfected either with pcDNA3 vector or with α_{transd} . Upper, Eighteen hours after transfection, aliquots of vector- and α_{transd} -transfected DCs were taken to analyze α_{transd} levels by Western blotting using a specific Ab. GSK3 β levels show equal loading of the gels. A representative experiment out of three performed is shown. Lower, Vector- and α_{transd} -transfected DCs were stimulated with CCL19 for the indicated time periods and then lysed, and aliquots were subjected to Western blot with an Ab against phosphorylated/inactive GSK3 β (Ser⁹). GSK3 β levels show loading of the gels. A representative experiment out of three performed is shown. *C*, DCs suspended in 0.1% BSA in RPMI 1640 were either left untreated (Control) or pretreated with Akt inhibitor (5 μ M) for 60 min. The DCs were subsequently stimulated with CCL19 for the indicated time periods and then lysed, and aliquots were subjected to Western blot with an Ab against phospho-GSK3 β (Ser⁹) or against phosphorylated/active Akt1 (Ser⁴⁷³) (p-Akt). α -Tubulin (α -TUB) levels show equal loading of the gels. A representative experiment out of three performed is shown. *D*, DCs suspended as in *C* were either left untreated (Control) or pretreated with LiCl (20 mM) or inhibitor IX (4 μ M) for 60 min. The DCs were stimulated with CCL19 and subjected to a Western blot with an Ab against phosphorylated/active Akt1 (Ser⁴⁷³) (p-Akt) as in *C*. α -TUB levels show equal loading of the gels. A representative experiment out of three performed is shown. *E*, DCs suspended as in *C* were either left untreated (Control) or were pretreated for 60 min with UO126 (5 μ M) to inhibit phosphorylation/activation of ERK1/2. The DCs were then stimulated with CCL19 (18 nM) for the indicated times. The DCs were then lysed and analyzed by Western blotting with Abs against phospho-GSK3 β (Ser⁹). To analyze the phosphorylation/activation of ERK1/2, membranes were also probed with Abs that recognize active ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴). To show equal loading, the membrane was stripped and re-probed with an Ab against α -TUB. *F*, DCs suspended as in *C* were either left untreated (Control) or were treated with LiCl (20 mM) for 60 min. The DCs were stimulated or not with CCL19 (18 nM) for the indicated time periods and then subjected to a Western blot with Abs against phospho-ERK1/2 (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴) as in *E*. To show equal loading, the membrane was probed with an Ab against α -TUB. A representative experiment out of three performed is shown.

to the nucleus, where it may exert prosurvival functions by up-regulating the transcription of prosurvival genes (22, 55, 56). FOXO is another transcription factor involved in the regulation of DC survival (25–27). Under proapoptotic conditions FOXO translocates to the nucleus of the DCs, where it may play proapoptotic roles, at least in part, by regulating the expression of the proapoptotic Bcl2 family member Bim (9, 11, 24, 57, 58). A common mechanism of inhibition of FOXO members is its phosphorylation by Akt and its subsequent translocation to the cytosol, where it is prevented from regulating its proapoptotic gene targets (25–27). We tested if CCR7, in keeping with its prosurvival role, could induce phosphorylation and translocation of FOXO to the cytoplasm. Stimulation of DCs with CCL19 (not shown) or CCL21 (Fig. 5A) induced rapid phosphorylation of FOXO1 (Ser²⁵⁶) and FOXO3 (Ser²⁵³), two residues that are phosphorylated by Akt (25, 26). Pretreatment of the DCs with a specific Akt inhibitor abrogated the phosphorylation of these residues, confirming that they are both phosphorylated by Akt (not shown). We also analyzed if stimulation of CCR7 was able to induce translocation of FOXO1 from the nucleus to the cytoplasm. For this purpose we transfected the DCs either with GFP-vector or with FOXO1-GFP. Subsequently, the transfected DCs were shifted to serum-free medium and then maintained for 6 h in the absence or in the presence of CCL19 (not shown) or CCL21 (Fig. 5B). The DCs that were maintained in the absence of serum displayed a sizable amount of FOXO1 in the nucleus. In contrast, in the DCs stimulated with

CCL21, there was a moderate but statistically significant reduction in the percentage of DCs that displayed nuclear FOXO1 (Fig. 5B). In the DCs transfected with vector-GFP, this molecule was found largely in the cytosol, and no changes were observed in its location upon stimulation (Fig. 5B). To confirm biochemically the prior results, untransfected DCs were transferred to serum-free medium and then maintained there in the absence or in the presence of CCL19 (not shown) or CCL21 for 6 h. Subsequently, the DCs were subjected to a fractionation where the cytosolic and nuclear fractions were obtained (42). These fractions were then analyzed by Western blot with Abs against either total FOXO1 or total FOXO3. When the DCs were stimulated with CCL19 (not shown) or CCL21 (Fig. 5C), consistent with the results obtained with the GFP-FOXO1-transfected DCs, FOXO1 and FOXO3 levels were reduced in the nuclear fractions, suggesting a translocation of these factors to the cytosolic fraction (Fig. 5C).

Since in the nucleus FOXO1 regulates the transcription of the proapoptotic Bcl2 member Bim (25, 26), we analyzed the level of expression of the latter molecule and if this level changes after stimulating the DCs with CCL19 (not shown) or CCL21 (Fig. 5D). Consistent with the inhibitory effect that the stimulation with CCL21 exerts on FOXO1, we also observed reduced levels of Bim in the chemokine-treated DCs (Fig. 5D). As we had shown before that stimulation of CCR7 leads to the translocation of NF- κ B to the nucleus (17), and since prosurvival Bcl2 family member Bcl-x_L is one potential target of NF- κ B, we analyzed if stimulation of CCR7

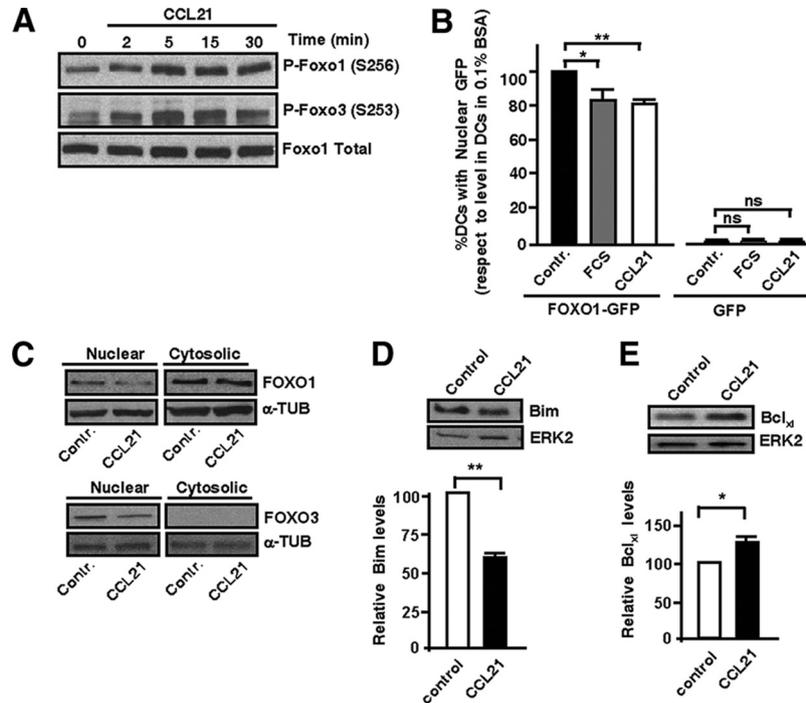


FIGURE 5. Stimulation of CCR7 induces phosphorylation of FOXO1 and its translocation from the nucleus to the cytoplasm. *A*, DCs were suspended in 0.1% BSA in RPMI 1640 and then stimulated with CCL19 or CCL21 (both at 18 nM) for the indicated times. The DCs were lysed in 2× sample buffer and the levels of phospho-FOXO1 (Ser²⁵⁶) and phospho-FOXO3 (Ser²⁵³) were analyzed by Western blotting. Blots were reprobed with an Ab reacting with total FOXO1 to show equal loading. The results shown are representative of four independent experiments. *B*, DCs were transfected either with FOXO1-GFP or vector-GFP (GFP). Eighteen hours after transfection, the DCs were suspended in 0.1% BSA in RPMI 1640 and subsequently either maintained untreated (Control) or stimulated with 10% FCS or CCL21 (18 nM) for an additional 6 h. Subsequently, the DCs were plated onto PLL-coated coverslips and fixed. The figure represents the quantification of the percentage of cells with GFP staining concentrated in the nucleus, corresponding either to vector-GFP- or to FOXO1-GFP-transfected DCs. Three independent experiments were performed (at least 100 DCs were examined in each experiment). Results shown represent the means ± SEM ($n = 3$). *, $p < 0.01$; **, $p < 0.005$; ns, no significant differences. *C*, DCs suspended in 0.1% BSA in RPMI 1640 were either maintained unstimulated (Control) or were stimulated with CCL21 (18 nM) for 6 h. Subsequently, DCs were used to obtain nuclear and cytosolic fractions (42). The fractions were boiled in 2× sample buffer and subjected to Western blotting. We used Abs against FOXO1 and FOXO3 to analyze the presence of these transcription factors in the nuclear or cytoplasmic fraction. FOXO3 was detected by Western blot in the cytosolic fraction only after long exposures (not shown). The presence of lactate dehydrogenase, assessed by Western blotting, was used to confirm the absence of cytosolic contamination in the nuclear fraction (not shown). To assess the levels of protein, loaded blots were reprobed with an Ab reacting with α -tubulin (α -TUB). *D*, DCs were suspended in 0.1% BSA in RPMI 1640 and then kept untreated or stimulated with CCL21 (18 nM) for 10 h. Subsequently, they were extracted as in *A*. *Upper*, The levels of Bim were analyzed by Western blotting. Blots were reprobed with an Ab reacting with ERK2 to show equal loading (a representative blot is shown). *Lower*, The relative levels of Bim in CCL21-stimulated DCs with respect to the levels in control DCs are shown. Three independent experiments were performed. Results shown represent the means ± SEM. **, $p < 0.001$ ($n = 3$). *E*, DCs were dissolved in 0.1% BSA in RPMI 1640, stimulated or not with CCL21 (18 nM), and extracted as in *D*. *Upper*, The levels of Bcl-x_L were analyzed by Western blotting. Blots were reprobed with an Ab reacting with ERK2 to show equal loading (a representative blot is shown). *Lower*, The relative levels of Bcl-x_L in CCL21-stimulated DCs with respect to levels in control DCs are shown. Three independent experiments were performed. Results shown represent the means ± SEM. *, $p < 0.05$ ($n = 3$).

also leads to the up-regulation of Bcl-x_L. This Bcl2 family member was also enhanced in the CCL19- (not shown) or CCL21-stimulated DCs (Fig. 5E). Collectively, the results indicate that stimulation of CCR7 in DCs induces phosphorylation/translocation of FOXO1 to the cytoplasm, with the consequent down-regulation of proapoptotic Bim, and also up-regulation of the NF- κ B-regulated molecule prosurvival Bcl-x_L. These changes in transcription factors and their targets may be all part of the molecular mechanisms used by CCR7 to induce survival in DCs.

Active GSK3 β inhibits the translocation of prosurvival transcription factor NF- κ B to the nucleus

As shown above, the kinase Akt1, apart from regulating CCR7-dependent translocations of NF- κ B to the nucleus (17) and FOXO1 to the cytosol (Fig. 5B), also phosphorylates/inhibits GSK3 β (Fig. 4C). In this regard, we put forward the hypothesis that this phosphorylation/inhibition of GSK3 β could be necessary because active GSK3 β may be hindering the effects that

Akt1 exerts on the translocations of FOXO and NF- κ B (see Fig. 8). We hypothesized that this could take place, on the one hand, by contributing to retain NF- κ B in the cytoplasm and, on the other hand, by fostering the translocation of FOXO to the nucleus (see Fig. 8). We reasoned that if indeed this were so, then this would imply that the inhibition of GSK3 β under resting conditions (i.e., when GSK3 is active) may reduce, in the case of FOXO, and increase, in the case NF- κ B, the translocation of these factors to the nucleus (see Fig. 8). To test this hypothesis, the DCs were transfected with p65-GFP, a subunit of the NF- κ B family expressed in DCs fused to GFP, or with vector-GFP. Subsequently, we shifted the cells to serum-free medium for 5 h, conditions under which GSK3 is active, either in the presence or in the absence of the GSK3 inhibitor LiCl. DCs stimulated with FCS, which induce translocation of p65-GFP to the nucleus, were used as positive controls (44). As shown in Fig. 6A, in the DCs treated with the inhibitor we observed that, compared with the untreated DCs, there was a significant increase in the percentage of transfected DCs that displayed p65-GFP in the nucleus. In the DCs transfected with

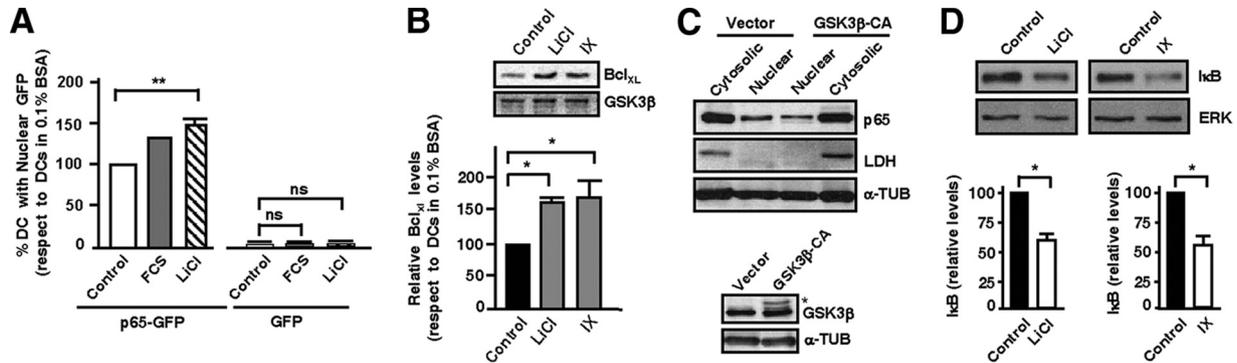


FIGURE 6. Active GSK3 β regulates the translocation of NF- κ B to the nucleus. *A*, DCs were transfected either with p65-GFP or vector-GFP (GFP). Eighteen hours after transfection, the DCs were washed and then suspended in 0.1% BSA in RPMI 1640. Subsequently, the DCs were either maintained untreated (Control) or were stimulated with either 10% FCS or LiCl (20 mM) for an additional 6 h. The DCs were then plated onto PLL-coated coverslips and fixed. The figure represents the quantification of the percentage of DCs with GFP staining concentrated in the nucleus, corresponding either to vector-GFP- or p65-GFP-transfected DCs with respect to control DCs (that were in 0.1% BSA in RPMI 1640), to which values were given an arbitrary number of 100. In the case of FCS the results shown are representative of two experiments with similar results. In the case on the other samples, three independent experiments were performed (at least 60 DCs were examined per experiment). Results shown represent the means \pm SEM. **, $p < 0.001$ ($n = 3$); ns, no significant differences. *B*, DCs were dissolved in 0.1% BSA in RPMI 1640, subsequently maintained for 6 h in the absence or presence of LiCl (20 mM) or inhibitor IX (4 μ M), and then extracted as indicated in Fig. 5*D*. *Upper*, The levels of Bcl- x_L were analyzed by Western blotting. Blots were reprobbed with an Ab reacting with GSK3 β to show equal loading (a representative blot is shown). *Lower*, The relative levels of Bcl- x_L , referred to the levels of this protein when the DCs were maintained in 0.1% BSA in RPMI 1640, are shown. Three independent experiments were performed. Results shown represent the means \pm SEM. *, $p < 0.01$ ($n = 3$). *C*, *Upper*, DCs were nucleofected either with pcDNA3 vector (Vector) or with GSK3 β -CA. Ten hours after transfection, a similar number of live vector and GSK3 β -CA-transfected DCs, as determined by trypan blue dye exclusion method, were used to obtain nuclear and cytosolic fractions (42). The fractions were boiled in 2 \times sample buffer and subjected to Western blotting. We used an Ab against p65 to analyze the presence of this transcription factor in the nuclear or cytoplasmic fraction. The presence of lactate dehydrogenase (LDH), assessed by Western blotting, confirmed the absence of cytosolic contamination in the nuclear fraction. To assess the levels of protein loaded, blots were reprobbed with an Ab reacting with α -tubulin (α -TUB). The results shown are representative of two independent experiments where similar results were obtained. *Lower*, Western blotting using an anti-GSK3 β Ab of aliquots of the vector and GSK3 β -CA-transfected DCs confirmed the expression of GSK3 β -CA (indicated with an asterisk). *D*, DCs were dissolved in 0.1% BSA in RPMI 1640 and then maintained for 90 min in the presence of LiCl (20 mM) or inhibitor IX (4 μ M). Subsequently, the DCs were extracted as in *C*. *Upper*, The levels of I κ B were analyzed by Western blotting. Blots were also probed with an Ab reacting with ERK2 to show equal loading (a representative blot out of three experiments performed is shown). *Lower*, Diagram bars showing the quantification of the levels of I κ B in DCs treated with LiCl and inhibitor IX. The relative levels of I κ B in the DCs treated with the GSK3 inhibitors are referred to the levels of I κ B observed in control untreated DCs. The results shown represent the means \pm SEM. *, $p < 0.05$ ($n = 3$).

GFP-vector, despite the stimulation with FCS or GSK3 inhibitors, the GFP staining remained largely cytosolic (Fig. 6*A*). Consistent with the observed increase in nuclear NF- κ B in the LiCl-treated DCs, we also observed an increase in the level of the NF- κ B target Bcl- x_L in these cells (Fig. 6*B*). In the next experiments, we transfected the DCs either with vector or with GSK3 β -CA and then performed a fractionation where we separated the nuclear and cytosolic fractions. In support of the notion that GSK3 β favors the retention of p65 in the cytosol, the transfection of the DCs with active GSK3 β lead to reduced levels of p65 in the nuclear fraction (Fig. 6*C*).

Degradation of I κ B, a cytoplasmic molecule that binds and inhibits NF- κ B, is required to allow the translocation of the latter transcription factor from the cytosol to the nucleus (17). We reasoned that it could be possible that active GSK3 β may inhibit the translocation of NF- κ B by preventing the degradation of I κ B. If this were the case, then we would expect that inhibition of GSK3 β should lead to reduced levels of I κ B. As shown in Fig. 6*D*, indeed inhibition of GSK3 β led to a reduction of I κ B, suggesting that active GSK3 β may contribute to maintain high levels of I κ B and that phosphorylation/inhibition of GSK3 β may foster the degradation of I κ B and the subsequent translocation of NF- κ B to the nucleus.

Active GSK3 β fosters the translocation of proapoptotic factor FOXO to the nucleus

To analyze whether active GSK3 β contributes to foster the translocation of FOXO to the nucleus, DCs transfected either with a vector-GFP or with a construct that encodes FOXO1-GFP (45)

were shifted to serum-free medium (5 h) in the absence or in the presence of the GSK3 inhibitor LiCl. As shown in Fig. 7*A*, the percentage of LiCl-treated DCs that displayed FOXO1 in the nucleus was reduced compared with the control untreated DCs. In the DCs transfected with GFP-vector, the staining remained largely in the cytosol under all of the conditions used (Fig. 7*A*). Treatment with the inhibitors of GSK3 did not alter the phosphorylation/activation of Akt (see Fig. 4*D*), implying that the effects of these pharmacological agents on the translocation of NF- κ B and FOXO1 was not the result of an indirect inhibition of Akt. To further confirm the effects of the inhibitors on the location of FOXO, we used a siRNA to reduce the levels of GSK3 β and then analyzed the effect that this down-modulation exerted on the translocation of FOXO (Fig. 7*B*). To accurately calculate the degree of reduction in the amount of nuclear FOXO3 in the DCs that presented reduced levels of GSK3 β upon nucleofecting the DCs with siRNA for this kinase, the levels of FOXO3 measured in the immunoblots were normalized with respect to that of α -tubulin. As shown in Fig. 7*B*, compared with the DCs nucleofected with siRNA control, the DCs transfected with GSK3 β siRNA presented a significant reduction in the amount of nuclear FOXO. These data confirm the results obtained with the pharmacological inhibitors and further support the notion that DCs that present reduced levels of GSK3 β also display lower levels of nuclear FOXO3. As inhibition of GSK3 clearly reduces the percentage of FOXO in the nucleus, these results are also consistent with the hypothesis that active GSK3 fosters the translocation of FOXO to this region. In keeping with observed reduction in the levels of FOXO in the

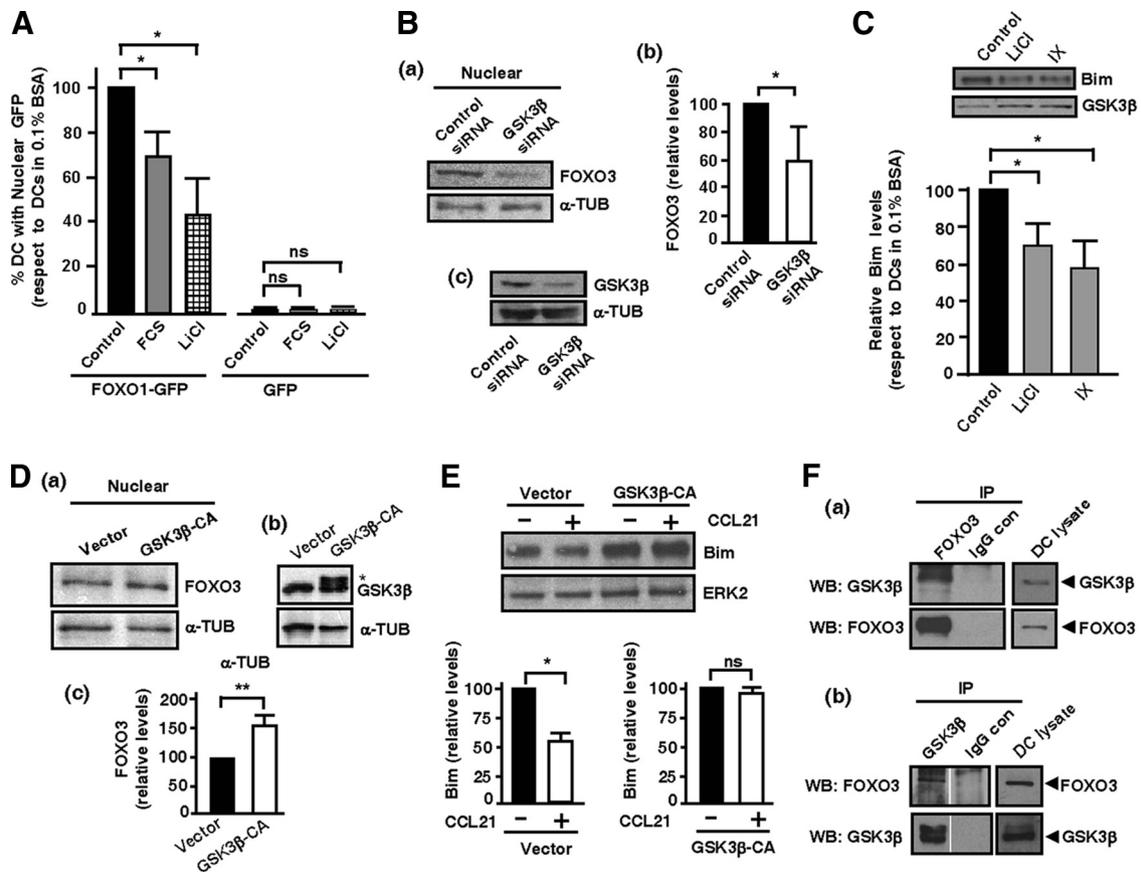


FIGURE 7. Inhibition and overexpression of GSK3 β hinders and favors, respectively, the translocation of FOXO to the nucleus. **A**, DCs were transfected either with FOXO1-GFP or vector-GFP (GFP). Eighteen hours after transfection, the DCs were suspended in 0.1% BSA in RPMI 1640 and subsequently either maintained untreated (Control) or stimulated with 10% FCS or LiCl (20 mM) for an additional 6 h. Subsequently, the DCs were plated onto PLL-coated coverslips and fixed. The figure represents the quantification of the percentage of cells with nuclear GFP staining (corresponding either to vector-GFP- or FOXO1-GFP-transfected DCs) with respect to the percentage presented by control DCs, which were given an arbitrary value of 100. Three independent experiments were performed (at least 50 DCs were examined per experiment). Results shown represent the means \pm SEM. *, $p < 0.05$ ($n = 3$); ns, no significant differences. **B**, DCs were nucleofected either with random siRNA (Control siRNA) or with a siRNA specific for GSK3 β (GSK3 β siRNA). **a**, Control or GSK3 β siRNA-transfected DCs were used to obtain nuclear fractions (42). The fractions were boiled in 2 \times sample buffer and subjected to Western blotting. We used an Ab against FOXO3 to analyze the presence of this transcription factor in the nuclear or cytosolic fractions. Absence of lactate dehydrogenase, assessed by Western blotting, indicated the lack of cytosolic contamination in the nuclear fraction (not shown). α -Tubulin (α -TUB) loading controls are also shown. A representative experiment out of three performed is shown. **b**, The relative levels of nuclear FOXO3 in the siRNA GSK3 β nucleofected DCs, with respect to the nuclear levels observed in the siRNA control nucleofected DCs, which were given an arbitrary value of 100, obtained in three independent experiments are shown. Results shown represent the means \pm SEM. *, $p < 0.03$ ($n = 3$). **c**, Representative Western blot showing reduced levels of GSK3 β upon nucleofection with a siRNA specific for GSK3 β . Aliquots of the DCs nucleofected with random siRNA or with a siRNA specific for GSK3 β were extracted in 2 \times sample buffer and used to perform a Western blotting with an anti-GSK3 β Ab. To confirm equal loading, blots were probed with an Ab reacting with α -TUB. **C**, DCs were dissolved in 0.1% BSA in RPMI 1640 and then maintained for 10 h in the presence of LiCl (20 mM) or inhibitor IX (4 μ M). Subsequently, the DCs were extracted as in **B**. **Upper**, The levels of Bim were analyzed by Western blotting. Blots were also probed with an Ab reacting with GSK3 β to show equal loading (a representative blot is shown). **Lower**, The relative levels of Bim with respect to the levels of this molecule in DCs maintained in 0.1% BSA in RPMI 1640. A representative result out of three independent experiments performed is shown. Results shown represent the means \pm SEM. *, $p < 0.01$ ($n = 3$). **D**, DCs were transfected either with pcDNA vector (Vector) or with GSK3 β -CA. Eighteen hours after transfection, a similar number of live vector and GSK3 β -CA-transfected DCs (as determined by trypan blue dye exclusion method) were used to obtain nuclear fractions (42). These fractions were boiled in 2 \times sample buffer and subjected to Western blotting. **a**, We used an Ab against FOXO3 to analyze the presence of this transcription factor in the nuclear fraction of vector- and GSK3 β -CA-transfected DCs. To assess the levels of protein loaded, blots were reprobed with an Ab reacting with α -tubulin (α -TUB). **b**, Western blotting using an anti-GSK3 β Ab of aliquots of samples shown in **a** confirmed the expression of GSK3 β -CA (indicated with an asterisk). **c**, Relative levels of nuclear FOXO3 in GSK3 β -CA-transfected DCs with respect to the nuclear levels of FOXO3 in vector-transfected DCs, which were given an arbitrary value of 100. Results obtained in three independent experiments are shown. Results shown represent the means \pm SEM. **, $p < 0.01$ ($n = 3$). **E**, **Upper**, DCs were transfected either with pcDNA vector (Vector) or with GSK3 β -CA. Six hours after transfection, the DCs were stimulated or not with CCL21 for an additional 6 h. Aliquots of the samples were extracted in 2 \times sample buffer and used to perform a Western blotting with an anti-Bim Ab. To confirm equal loading, blots were reprobed with an Ab reacting with ERK2. **Lower**, The relative levels of Bim with respect to the level obtained in the chemokine untreated DCs, which were given an arbitrary value of 100, obtained in three independent experiments are shown. Results shown represent the means \pm SEM. *, $p < 0.05$ ($n = 3$); ns, no significant differences. **F**, DCs were lysed and specific Abs were used to immunoprecipitate (IP) either FOXO3 (**a**) or GSK3 β (**b**). IgG controls (IgG con) were also used to confirm the specificity of the immunoprecipitations. The immunoprecipitates were separated by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and then subjected to a Western blot (WB) analysis with Abs against GSK3 β and FOXO3. DC lysates were also used to confirm the specificity of the Abs used.

nucleus, in the inhibitor-treated DCs we also observed lower levels of the FOXO target Bim (Fig. 7C). Finally, we tested if overexpression of GSK3 β -CA may lead to an increase in the level of FOXO3 in the nucleus. For this purpose, we transfected the DCs with GSK3 β -CA and then, after 10 h of transfection, subjected the DCs to a fractionation where we obtained the nuclear fractions. As shown in Fig. 7D, we observed a small but significant increase in the level of FOXO3 in the nucleus.

Data shown in Fig. 7A–D indicate that active GSK3 β favors the translocation of FOXO1/3 to the nucleus. This implies that if this kinase is maintained artificially active, predictably it will oppose, even upon stimulation of CCR7, the effects that Akt exerts inducing, on the one hand, translocation of FOXO to the cytosol and, on the other hand, the consequent down-regulation of the FOXO target Bim (Fig. 5D; see also Fig. 8). To test this prediction experimentally, we analyzed if active GSK3 β interferes with the down-modulation of Bim (Fig. 7E). DCs transfected with vector or with GSK3 β -CA were shifted to serum-free medium and then stimulated or not with CCL19 (not shown) or CCL21 (Fig. 7E). Subsequently, we analyzed in vector and GSK3 β -CA-transfected DCs the levels of Bim. As expected, stimulation of vector-transfected DCs with CCL21 caused a reduction in the levels of Bim (Fig. 7E). In contrast, when the GSK3 β -CA-transfected DCs were stimulated with CCL21, Bim levels were not reduced (Fig. 7E). Taken together, the results presented above are consistent with the notion that active GSK3 β fosters the translocation of FOXO to the nucleus. Moreover, these results further emphasize the importance of blunting the activity of GSK3 β , a process that is mediated by Akt when CCR7 is stimulated, to allow this receptor to exert its pro-survival effects (see also Fig. 8).

FOXO interacts with GSK3 β in vivo

To gain further insight into the mechanism whereby GSK3 β may affect the translocation of FOXO to the nucleus, we analyzed if these two molecules are able to interact with each other. For this purpose the cells were lysed and then immunoprecipitated with either anti-GSK3 β - or anti-FOXO3-specific Abs. Subsequently, the immunoprecipitated samples were analyzed by Western blot for the presence of either FOXO3 or GSK3 β (Fig. 7F). Preliminary experiments in Jurkat cell where GSK3 β was immunoprecipitated clearly indicated that FOXO3 was able to interact with the kinase (not shown). As shown in Fig. 7F, immunoprecipitation of FOXO3 or GSK3 β in DCs coimmunoprecipitated GSK3 β or FOXO3, respectively. These results indicated that both molecules were able to associate in DCs in vivo.

Discussion

The immune response is highly sensitive to changes in the lifespan of the DCs, leading to moderate increases in the latter parameter to improvement in the immune response and exaggerated extensions to autoimmunity (7, 9–11, 59). Therefore, a better knowledge of the signaling mechanisms that control DC survival and lifespan can be useful to modulate the function of these cells in the immune system and eventually the immune response. The serine-threonine kinase GSK3 β behaves as an antiapoptotic or proapoptotic regulator depending on the cell type and context (32–39). Despite the potential importance of knowledge on this issue in the context of the immune response, a detailed analysis of the role of GSK3 β in the regulation of survival of DCs has not been performed. Herein, using pharmacological inhibitors, specific siRNAs, and constitutive active forms of GSK3 β to experimentally modulate the levels and activity of this kinase, we show that GSK3 β behaves as a proapoptotic regulator in cultured human monocyte-derived and murine splenic DCs. Notably, in experiments where DCs main-

tained in complete medium (10% FCS/RPMI 1640) were also treated with the inhibitors of GSK3, we also observed reduced percentage of apoptosis (not shown). This implies that even in complete medium not all GSK3 is inhibited, and consequently further inhibition of this kinase results in protective effects on the DCs, which emphasizes the proapoptotic nature of GSK3 in DCs. Furthermore, and importantly, using intravital markers to label the DCs, and SR-FLIVO, a reagent that allows marking selectively apoptotic DCs in the LNs, in combination with two-photon microscopy, we also show that GSK3 behaves as a proapoptotic regulator in LN DCs. Taken together, the results point out that GSK3 plays proapoptotic roles in DCs. They also imply that GSK3 should be tightly controlled to prevent it from inducing apoptosis in DCs.

Consistent with the previously described prosurvival role of CCR7 in DCs (17), we also found that stimulation of these cells with the CCR7 ligands CCL19 or CCL21 induces Akt-dependent phosphorylation/inhibition of GSK3 β . Previously, we have reported that in DCs CCR7 uses signaling modules formed by G β / β γ /Akt/NF- κ B and G β / β γ /ERK1/2 to regulate survival and chemotaxis, respectively (17, 19, 20). In the present work we also find that Akt phosphorylates/inhibits proapoptotic FOXO1/3 and proapoptotic GSK3 β as part of the mechanisms whereby CCR7 inhibits apoptosis in DCs. In the case of FOXO, this transcription factor is a proapoptotic regulator in DCs. This proapoptotic role is exerted, at least in part, through the regulation of the proapoptotic Bcl2 family member Bim, which is under the control of FOXO1/3 in DCs (9, 11, 24–27).

Importantly, we found that the CCR7-mediated phosphorylation/inhibition of FOXO1/3 and GSK3 β is independent of the key chemotactic regulator ERK1/2 (19). In this regard, selective inhibition of GSK3 β did not affect ERK1/2 phosphorylation (Fig. 4), and inhibition of ERK1/2 did not affect FOXO1/3 (not shown) or GSK3 β phosphorylation (Fig. 4). Inhibition of ERK1/2 did not affect Akt phosphorylation either (19). Taken together, these results indicate that GSK3 and FOXO1/3 are both specific targets of a signaling module that regulates CCR7-dependent survival (17, 19, 20). The results further emphasize the fact that although CCR7-dependent chemotaxis and survival share some upstream components, additional specific downstream signaling molecules are used to selectively regulate these two functions in DCs. In the context of the study of the specific signaling molecules that regulate the survival of DCs, we also studied if β -catenin may be regulated by CCR7. β -catenin is an interesting molecule to study in this context because, on the one hand, it regulates survival in different cell types, even after stimulation with chemokines (60), and, on the other hand, GSK3 inhibition results in β -catenin cytoplasmic accumulation in multiple contexts (29–31, 60). However, despite the observed CCR7-dependent phosphorylation/inhibition of GSK3, this inhibition did not cause up-regulation of β -catenin (not shown) in DCs, suggesting that this molecule is not regulated by CCR7 and further emphasizing the specificity of the signals that regulate CCR7-dependent survival in these cells.

Downstream of CCR7, active Akt induces, on the one hand, translocation of prosurvival NF- κ B to the nucleus (17) and an increase in the levels the NF- κ B target Bcl-x_L (61) (Fig. 5E), and, on the other hand, mobilization of proapoptotic FOXO1/3 to the cytosol and down-modulation of the FOXO1/3 target Bim (25, 26) (Fig. 5D). In previous experiments, as in all of the experiments presented herein, similar results were obtained when studying the regulation of FOXO 1 and FOXO3, suggesting that the control of these factors presents a high degree of redundancy in these cells.

As GSK3 is also a molecule phosphorylated/inhibited by Akt, we asked if active GSK3 β could oppose the effects of Akt on

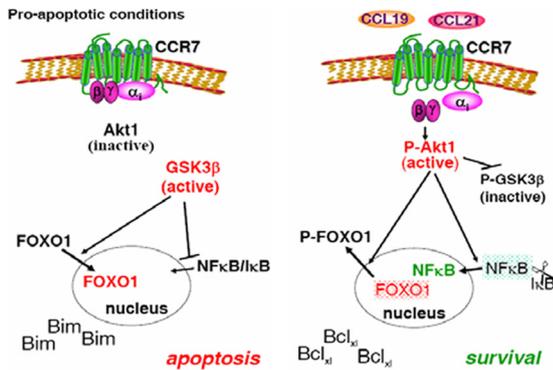


FIGURE 8. Model showing the interactions between Akt and GSK3 β to regulate the locations of NF- κ B and FOXO1 in DCs. *Left panel*, Under apoptotic conditions, Akt1 is inactive and GSK3 β is active. Active GSK3 β fosters the translocation of FOXO1 to the nucleus and also contributes to retain NF- κ B in the cytosol. In the case of NF- κ B, active GSK3 β probably contributes to keep high the levels of the NF- κ B inhibitor, I κ B (see *Discussion*). FOXO may exert its proapoptotic functions by regulating the expression of proapoptotic Bcl2 family member Bim, which eventually contributes to the apoptosis of the DCs. *Right panel*, Stimulation of CCR7 with chemokines CCL19 or CCL21 causes G $_i$, β γ -mediated activation of Akt1. This kinase phosphorylates FOXO1, which leads to its mobilization to the cytoplasm. Akt1 also activates I κ B kinase, which phosphorylates the NF- κ B inhibitor I κ B, leading to its degradation and allowing the translocation of NF- κ B to the nucleus, where this factor regulates transcription of anti-apoptotic Bcl2 family member Bcl-x $_L$. Following its phosphorylation/inhibition by Akt, GSK3 β ceases hindering the translocations of FOXO1 and NF- κ B described in the *left panel*, allowing the complete translocation of these two factors to the cytosol and to the nucleus, respectively. Upon its translocation to the cytosol, phosphorylated FOXO is retained or degraded. Nuclear NF- κ B can regulate transcription of pro-survival Bcl2 family member Bcl-x $_L$. The final outcome is that DCs are more resistant to apoptotic stimuli.

NF- κ B and FOXO1/3. Consistent with this notion, we found that under conditions where Akt was not stimulated, inhibition of GSK3 β , using pharmacological inhibitors or siRNAs, induced a moderate translocations of NF- κ B to the nucleus (Fig. 6A) and reduced the amount of FOXO1/3 that was able to translocate to this region (Fig. 7, A and B). Consistent with these changes, inhibition of GSK3 also leads to an increase in the levels of Bcl-x $_L$ (Fig. 6B) and to a reduction in the levels of Bim (Fig. 7C), which are under the control of NF- κ B and FOXO1/3, respectively (see also Fig. 8). Regarding the observed effect of GSK3 β on FOXO1/3, in the course of the final stages of preparation of this manuscript, we became aware of a recent paper (62) where, using a siRNA library that target kinases and phosphatases, the authors showed that the knockdown of GSK3 caused a reduction in the transcriptional activity of FOXO1 in *Drosophila* S2 cells. These results imply that our observation that active GSK3 may up-regulate FOXO is not exclusive of DCs (62). Taken together, our results suggest that active GSK3 β hinders the effects that active Akt exerts in the translocation of NF- κ B and FOXO (Fig. 8). Indeed, in further support of this conclusion, when we stimulate DCs that express constitutively active GSK3 β with CCL21, we observed that the FOXO1 target Bim was not down-modulated, suggesting that active GSK3 opposes the changes that active Akt elicits in FOXO (Fig. 7E). In total, our data are consistent with the notion that upon stimulation of CCR7, the phosphorylation/inhibition of GSK3 β , mediated by Akt, could be required to allow full translocation of NF- κ B and FOXO (see Fig. 8).

In other cells where GSK3 β plays proapoptotic roles, several mechanisms have been suggested to explain how this molecule

may induce apoptosis, including the promotion of the action of the proapoptotic regulator p53, destabilization of antiapoptotic bcl-2 family member Mcl-1, induction of mitochondria outer membrane permeabilization, and caspase activation (63–65). Our finding showing that GSK3 β may affect the regulation of transcription factors involved in the control of survival in DCs may be added to the previously reported mechanisms indicating how GSK3 may contribute to induce apoptosis.

Concerning the mechanisms whereby active GSK3 β may regulate the translocation to the nucleus of NF- κ B, it has been reported that in astrocytes GSK3 β may inhibit I κ B kinase (IKK) by selectively interacting with NEMO (also called IKK γ subunit), a subunit that is required for the activity of the IKK complex (66). Thus, the interaction between GSK3 β and NEMO in these cells prevents the degradation of I κ B and results in the inhibition of the translocation of NF- κ B to nucleus (66). In DCs, we found that inhibition of GSK3 β led to the degradation of the NF- κ B inhibitor I κ B (Fig. 6D), which suggests that active GSK3 β may inhibit the translocation of NF- κ B to the nucleus by contributing to keep high levels of I κ B. We do not know if active GSK3 in DCs also associates to NEMO, inhibiting in this way IKK, or if other mechanisms are acting in these cells. In the context of the signaling induced from CCR7, our results suggest that the induction of phosphorylation/inhibition of GSK3 β upon stimulation of this receptor may contribute to the down-regulation of I κ B and to the nuclear translocation of NF- κ B.

The mechanisms whereby GSK3 may regulate the translocation of FOXO to the nucleus are not clear at present. Interestingly, we have observed by immunoprecipitation studies that GSK3 β associates in vivo with FOXO3 (Fig. 7E), which suggests a potential mechanism whereby GSK3 β may regulate the translocation of FOXO to the nucleus. As it is known that FOXO can be retained by 14-3-3 molecules in the cytosol (26), it is possible that active GSK3 β , associated to FOXO (Fig. 7E), may control the interaction of 14-3-3 to FOXO, and hence the translocation of the latter factor to the nucleus by phosphorylating amino acid sequences in 14-3-3 and/or FOXO molecule that control this association. In this regard, an analysis using the Scansite tool shows that FOXO1 presents consensus phosphorylation sites for GSK3 β . Furthermore, it has been shown that GSK3 β is able to directly phosphorylate FOXO in vitro (67).

The results indicating a proapoptotic role for GSK3 β in DCs may be of interest in the context of neurological disorders, like bipolar disease, where the GSK3 β inhibitor LiCl is used as a therapeutic agent (68). Although there is some degree of controversy on this issue, data in the literature suggest a predisposition in patients treated with LiCl to thyroid autoimmune disorders (69). This observation is compatible with the possibility that the treatments that cause chronic inhibition of GSK3 β may lead to exaggerated extension of the survival and lifespan of DCs, which may eventually result in autoimmunity, at least in the case of the thyroid (69).

GSK3 is emerging as an important regulator of the immune response. In this regard, recently it has been shown that GSK3 β regulates the differentiation and activation of DCs (70–73). In view of its multiple targets (29–31), it is possible that GSK3 may contribute to regulate DC function at multiple levels, including the regulation of survival, as indicated herein. In summary, we show that GSK3 β behaves as a proapoptotic regulator in DCs both in vitro and in vivo. We also show that stimulation of CCR7 results in phosphorylation/inhibition of GSK3 β in DCs. Our results indicate that this inhibition facilitates the complete translocations of pro-survival NF- κ B and proapoptotic FOXO to the nucleus and cytosol, respectively, resulting in a phenotype more resistant to

apoptotic stimuli in the CCR7-stimulated DCs. Since DC lifespan is known to control the immune response, the results suggest that GSK3 β may be an interesting target when considering treatments to modulate the immune response.

Acknowledgments

We acknowledge J. A. Schmid for the p65-GFP construct and T. G. Unterman for the FOXO1-GFP plasmid.

Disclosures

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- Ueno, H., E. Klechevsky, R. Morita, C. Asford, T. Cao, T. Matsui, T. Di Pucchio, J. Connolly, J. W. Fay, V. Pascual, et al. 2007. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.* 219: 118–142.
- Steinman, R. M. 2007. Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat. Med.* 13: 1155–1159.
- Ruedl, C., P. Koebel, and K. Karjalainen. 2001. In vivo-matured Langerhans cells continue to take up and process native proteins unlike in vitro-matured counterparts. *J. Immunol.* 166: 7178–7182.
- Kamath, A. T., S. Henri, F. Battye, D. F. Tough, and K. Shortman. 2002. Developmental kinetics and lifespan of dendritic cells in mouse lymphoid organs. *Blood* 100: 1734–1741.
- Garg, G., A. Oran, J. Wajchman, S. Sasaki, C. M. 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: 907–912.
- Moon, J. J., H. H. Chu, M. Pepper, S. J. McSorley, S. C. Jameson, R. M. Ked, and M. K. Jenkins. 2007. Naive CD4 T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* 27: 203–213.
- Jung, S., D. Unutmaz, P. Wong, G. Sano, K. De los Santos, T. Sparwasser, S. Wu, S. Vuthoori, K. Ko, F. Zavala, et al. 2002. In vivo depletion of CD11c⁺ dendritic cells abrogates priming of CD8⁺ T cells by exogenous cell-associated antigens. *Immunity* 17: 211–220.
- Nopora, A., and T. Brocker. 2002. Bcl-2 controls dendritic cell longevity in vivo. *J. Immunol.* 169: 3006–3014.
- 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: 583–589.
- Hildeman, D., T. Jorgensen, J. Kappler, and P. Marrack. 2007. Apoptosis and the homeostatic control of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 19: 516–521.
- Chen, M., L. Huang, and J. Wang. 2007. Deficiency of Bim in dendritic cells contributes to overactivation of lymphocytes and autoimmunity. *Blood* 109: 4360–4367.
- Randolph, G. J., J. Ochando, and S. Partida-Sánchez. 2008. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 26: 293–316.
- Cyster, J. G. 2000. Leukocyte migration: scent of the T zone. *Curr. Biol.* 10: R30–R33.
- Randolph, G. J. 2001. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin. Immunol.* 13: 267–274.
- Yanagawa, Y., and K. Onoe. 2002. CCL19 induces rapid dendritic extension of murine dendritic cells. *Blood* 100: 1948–1956.
- Yanagawa, Y., and K. Onoe. 2003. CCR7 ligands induce rapid endocytosis in mature dendritic cells with concomitant up-regulation of cdc42 and Rac activities. *Blood* 101: 4923–4929.
- Sanchez-Sanchez, N., L. Riol-Blanco, G. de la Rosa, J. Garcia-Bordas, D. Martín, N. Longo, A. Cuadrado, C. Cabañas, P. Sanchez-Mateos, and J. L. Rodríguez-Fernández. 2004. Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells. *Blood* 104: 619–625.
- Marsland, B. J., P. Battig, M. Bauer, C. Ruedl, U. Lassing, R. R. Beerli, K. Dietmeier, L. Ivanova, T. Pfister, L. Vogt, et al. 2005. CCL19 and CCL21 induce a potent proinflammatory differentiation program in licensed dendritic cells. *Immunity* 22: 493–505.
- Riol-Blanco, L., N. Sánchez-Sánchez, A. Torres, A. Tejedor, S. Narumiya, A. Corbí, P. Sánchez-Mateos, and J. Rodríguez-Fernández. 2005. The chemokine receptor CCR7 stimulates two signaling pathways that independently modulate chemotaxis and migratory speed of dendritic cells. *J. Immunol.* 174: 4070–4080.
- Sanchez-Sanchez, N., L. Riol-Blanco, and J. L. Rodríguez-Fernández. 2006. The multiples personalities of the chemokine receptor CCR7 in dendritic cells. *J. Immunol.* 176: 5153–5159.
- Scandella, E., Y. Men, D. F. Legler, S. Gillessen, L. Prikler, B. Ludewig, and M. Groettrup. 2004. CCL19/CCL21-triggered signal transduction and migration of dendritic cells requires prostaglandin E2. *Blood* 103: 1595–1601.
- Barkett, M., and T. D. Gilmore. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF- κ B transcription factors. *Oncogene* 18: 6910–6924.
- Chen, G., and D. V. Goeddel. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296: 1634–1635.
- Riol-Blanco, L., C. Delgado-Martín, N. Sánchez-Sánchez, L. M. Alonso-C., M. D. Gutiérrez-López, G. Martínez del Hoyo, J. Navarro, F. Sanchez-Madrid, C. Cabañas, P. Sánchez-Mateos, and J. L. Rodríguez-Fernández. 2009. Immunological synapse formation inhibits, via NF κ B and FOXO1, the apoptosis of dendritic cells. *Nat. Immunol.* 10: 753–760.
- Burgering, B. M. T., and G. J. P. L. Kops. 2002. Cell cycle and death control: long lived Forkheads. *Trends Biochem. Sci.* 27: 352–360.
- Birkenkamp, K. U., and P. J. Coffey. 2003. FOXO transcription factors as regulators of immune homeostasis: molecules to die for? *J. Immunol.* 171: 1623–1629.
- Downward, J. 2004. PI3-kinase, Akt and cell survival. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15: 177–182.
- Manning, B. D., and L. C. Cantley. 2007. Akt/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129: 1261–1274.
- Cohen, P., and S. Frame. 2001. The renaissance of GSK3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2: 769–776.
- Doble, B. W., and J. R. Woodgett. 2003. GSK3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J. Cell Sci.* 116: 391–426.
- Joep, R. S., and G. V. W. Johnson. 2004. The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3 (GSK3). *Trends Biochem. Sci.* 29: 95–106.
- Beurel, E., and R. S. Joep. 2006. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog. Neurobiol.* 79: 179–189.
- Maggirwar, S. B., N. Tong, S. Ramírez, H. A. Gelbard, and S. Dewhurst. 1999. HIV-1 Tat-mediated activation of glycogen synthase kinase-3 β contributes to Tat-mediated neurotoxicity. *J. Neurochem.* 73: 578–586.
- Hetman, M., J. E. Cavanaugh, D. Kimelman, and Z. Xia. 2000. Role of glycogen synthase kinase-3 β in neuronal apoptosis induced by trophic withdrawal. *J. Neurosci.* 20: 2567–2574.
- Eom, T.-Y., K. A. Roth, and R. S. Joep. 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: 22856–22864.
- Hoeflich, K. P., J. Luo, E. A. Rubie, M.-S. Tsao, O. Jin, and J. R. Woodgett. 2000. Requirement for glycogen synthase kinase-3 β in cell survival and NF κ B activation. *Nature* 406: 86–90.
- Song, L., T. Zhou, and R. S. Joep. 2004. Lithium facilitates apoptotic signaling induced by activation of the Fas death domain-containing receptor. *BMC Neurosci.* 5: 1–7.
- Ougolkov, A. V., M. E. Fernandez-Zapico, D. N. Savoy, R. A. Urrutia, and D. D. Billedeau. 2005. Glycogen synthase kinase-3 β participates in nuclear factor κ B-mediated gene transcription and cell survival in pancreatic cells. *J. Clin. Invest.* 115: 2076–2081.
- Smalley, K. S., R. Contractor, N. K. Haass, A. N. Kulp, G. E. Atilla-Gokcumen, D. S. Williams, H. Bregman, K. T. Flaherty, M. S. Soengas, E. Meggers, and N. Herlyn. 2007. An organometallic protein kinase inhibitor pharmacologically activates p53 and induces apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Res.* 67: 209–217.
- Relloso, M., A. Puig-Kroger, O. Muñiz Pello, J. L. Rodríguez-Fernández, G. de la Rosa, N. Longo, J. Navarro, M. A. Muñoz-Fernández, P. Sánchez-Mateos, and A. L. Corbí. 2002. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF- α , and anti-inflammatory agents. *J. Immunol.* 168: 2634–2643.
- Rodríguez-Fernández, J. L., M. Gómez, A. Luque, N. Hogg, F. Sánchez-Madrid, and C. Cabañas. 1999. The interaction of activated integrin lymphocyte function-associated antigen 1 with ligand intercellular adhesion molecule 1 induces activation and redistribution of focal adhesion kinase and proline-rich tyrosine kinase 2 in T lymphocytes. *Mol. Biol. Cell* 10: 1891–1907.
- Schreiber, E., P. Matthias, M. M. Muller, and W. Schaffner. 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with “mini-extracts”, prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17: 6419.
- Riol-Blanco, L., T. Iglesias, N. Sánchez-Sánchez, G. De la Rosa, L. Sánchez-Ruiloba, N. Cabrera-Poch, A. Torres, I. Longo, J. García-Bordas, N. Longo, et al. 2004. The neuronal protein Kidins220 localizes in a raft compartment at the leading edge of motile immature dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 34: 108–118.
- Schmid, J. A., A. Birbach, R. Hofer-Warbinek, B. Pengg M, U., P. G. Furtmuller, B. R. Binder, and R. de Martin. 2000. Dynamics of NF κ B and I κ B α studied with green fluorescent protein (GFP) fusion proteins: investigation of GFP-p65 binding to DNA by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.* 275: 17035–17042.
- Zhang, X., L. Gan, H. Pan, S. Guo, X. He, S. T. Olson, A. Mesecar, S. Adam, and T. G. Unterman. 2002. Phosphorylation of serine 256 suppresses transactivation by FKHR (FOXO1) by multiple mechanisms: direct and indirect effects on nuclear/cytoplasmic shuttling and DNA binding. *J. Biol. Chem.* 277: 45276–45284.
- 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: 154–159.
- Davies, S. P., H. Reddy, M. Caivano, and P. Cohen. 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* 351: 95–105.
- Bhat, R., Y. Hue, S. Berg, S. Hellberg, M. Ormö, Y. Nilsson, A. C. Radesäter, E. Jerning, P. O. Markgren, T. Borgegård, et al. 2003. Structural insights and biological effects of glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418. *J. Biol. Chem.* 278: 45937–45945.
- Meijer, L., A. L. Skaltsounis, P. Magiatis, P. Polychronopoulos, M. Knockaert, M. Leost, X. P. Ryan, C. A. Vonica, A. Brivanlou, R. Dajani, et al. 2003. GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. *Chem. Biol.* 10: 1255–1266.
- 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: 785–789.
- McManus, E. J., K. Sakamoto, L. J. Armit, L. Ronaldson, N. Shpro, R. Marquez, and D. R. Alessi. 2005. Role that phosphorylation of GSK3 plays in insulin and Wnt signalling defined by knockin analysis. *EMBO J.* 24: 1571–1583.

52. Pozarowski, P., X. Huang, D. H. Halicka, B. Lee, G. Johnson, and Z. Darzynkiewicz. 2003. Interactions of fluorochrome-labeled caspases inhibitors with apoptotic cells: a caution in data interpretation. *Cytometry A* 55: 50–60.
53. Lovborg, H., P. Nygren, and R. Larsson. 2004. Multiparametric evaluation of apoptosis: effects of standard cytotoxic agents and cyanoguanidine CHS 828. *Mol. Cancer Ther.* 3: 521–526.
54. Neptune, E. R., and H. R. Bourne. 1997. Receptors induce chemotaxis by releasing the $\beta\gamma$ subunit of G_i , not by activating G_q or G_s . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14489–14494.
55. Chen, M., L. Huang, Z. Shabier, and J. Wang. 2007. Regulation of the lifespan in dendritic cell subsets. *Mol. Immunol.* 44: 2558–2565.
56. 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: 1160–1164.
57. Gilley, J., P. J. Coffey, and J. Ham. 2003. FOXO transcription factors directly activate bim gene expression and promote apoptosis in sympathetic neurons. *J. Cell Biol.* 162: 613–622.
58. Stahl, M., P. F. Dijkers, G. J. Kops, S. M. Lens, P. J. Coffey, B. M. Burgering, and R. H. Medema. 2002. The forkhead transcription factor FoxO regulates transcription of $p27^{Kip1}$ and Bim in response to IL-2. *J. Immunol.* 168: 5024–5031.
59. Song, J., S. Salek-Ardakani, P. R. Rogers, M. Cheng, L. Van Parijs, and M. Croft. 2004. The costimulation-regulated duration of PKB activation controls T cell longevity. *Nat. Immunol.* 5: 150–158.
60. Liu, Z., and J. F. Habener. 2009. Stromal cell-derived factor-1 promotes survival of pancreatic beta cells by the stabilization of β -catenin and activation of transcription factor 7-like 2 (TCF7L2). *Diabetologia* 52: 1589–1598.
61. Kriehuber, E., W. Bauer, A.-S. Charbonnier, D. Winter, S. Amatschek, D. Tamandl, N. Schweifer, G. Stingl, and D. Maurer. 2005. The balance between NF κ B and JNK/AP-1 activity controls dendritic cell life and death. *Blood* 106: 175–183.
62. Mattila, J., J. Kallijarvi, and O. Puig. 2008. RNAi screening for kinases and phosphatases identifies FoxO regulators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 14873–14878.
63. Watcharasi, P., G. N. Bijur, L. Songq, J. Xhu, X. Chen, and R. S. Jope. 2003. Glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) binds to and promotes the actions of p53. *J. Biol. Chem.* 278: 48872–48879.
64. Maurer, U., C. Charvet, A. S. Waqman, 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: 749–760.
65. Lin, C. F., C.-L. Chen, C.-W. Chiang, M.-S. Jan, W.-C. Huang, and Y.-S. Lin. 2007. GSK-3 β acts downstream of PP2A and PI3-kinase-Akt pathway, and upstream of caspase-2 in ceramide-induced mitochondrial apoptosis. *J. Cell Sci.* 120: 2935–2943.
66. Sanchez, J. F., L. F. Sniderhan, A. L. Williamson, S. Fan, S. Chakraborty-Sett, and S. B. Maggirwar. 2003. Glycogen synthase kinase-3- β -mediated apoptosis of primary cortical astrocytes involves inhibition of nuclear factor κ B signaling. *Mol. Cell. Biol.* 23: 4649–4662.
67. Rena, G., Y. L. Woods, E. 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: 2263–2271.
68. Jope, R. S., and J. N. Bijur. 2002. Mood stabilizers, glycogen synthase kinase-3 β and cell survival. *Mol. Psychiatry* 7: S35–S45.
69. Prummel, M. F., T. Strieder, and W. M. Wiersinga. 2004. The environment and autoimmune thyroid diseases. *Eur. J. Endocrinol.* 150: 605–618.
70. 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: 777–784.
71. Ono, T., Y. Yanagawa, K. Iwabuchi, K. Nonomura, and K. Ono. 2007. Glycogen synthase kinase 3 activity during development of bone marrow-derived dendritic cells (DCs) essential for the DC function to induce T helper 2 polarization. *Immunology* 122: 189–198.
72. Rodionova, E., M. Conzelmann, E. Marakovskiy, M. Hess, M. Kirsch, T. Giese, A. D. Ho, M. Zoller, and T. Luft. 2007. GSK-3 mediates differentiation and activation of proinflammatory dendritic cells. *Blood* 109: 1584–1592.
73. Ohtani, M., S. Nagai, S. Kondo, S. Mizuno, K. Nakamura, M. Tanabe, T. Takeuchi, S. Matsuda, and S. Koyasu. 2008. mTOR and GSK3 differentially regulate LPS-induced IL-12 production in dendritic cells. *Blood* 112: 635–643.

Polysialylated neuropilin-2 enhances human dendritic cell migration through the basic C-terminal region of CCL21

Angela Rey-Gallardo², Cristina Escribano²,
Cristina Delgado-Martín², José L Rodríguez-Fernández²,
Rita Gerardy-Schahn³, Urs Rutishauser⁴, Angel L Corbi²,
and Miguel A Vega^{1,2}

²Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain, ³Medizinische Hochschule Hannover, Abteilung Zelluläre Chemie, OE 4330, Zentrum Biochemie, Hannover, Germany, and ⁴Department of Cell Biology, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA

Received on February 9, 2010; revised on April 12, 2010; accepted on May 17, 2010

Dendritic cell (DC) migration to secondary lymphoid organs is a critical step to properly exert its role in immunity and predominantly depends on the interaction of the chemokine receptor CCR7 with its ligands CCL21 and CCL19. Polysialic acid (PSA) has been recently reported to control CCL21-directed migration of mature DCs. Here, we first demonstrate that PSA present on human mature monocyte-derived dendritic cells did not enhance chemotactic responses to CCL19. We have also explored the molecular mechanisms underlying the selective enhancing effect of PSA on CCL21-driven chemotaxis of DCs. In this regard, we found out that prevention of DC polysialylation decreased CCL21 activation of JNK and Akt signaling pathways, both associated with CCR7-mediated chemotaxis. We also report that the enhanced PSA-mediated effect on DC migration towards CCL21 relied on the highly basic C-terminal region of this chemokine and depended on the PSA acceptor molecule neuropilin-2 (NRP2) and on the polysialyltransferase ST8SiaIV. Altogether, our data indicate that the CCR7/CCL21/NRP2/ST8SiaIV functional axis constitutes an important guidance clue for DC targeting to lymphoid organs.

Keywords: CCL21/chemotaxis/dendritic cells/neuropilin-2/polysialic acid/ST8SiaIV

Introduction

Dendritic cells (DCs) are bone marrow-derived cells absolutely required for the proper generation of adaptive immunity and tolerance. Upon antigen recognition, immature DCs localized in

the peripheral tissue acquire the ability to act as antigen presenting cells and home to T-cell zones of lymphoid organs where they stimulate antigen-specific naïve T cells (Steinman and Banchereau 2007). Acquisition of the DC immuno-competent phenotype is achieved by a finely regulated genetic program that modulates the expression of many genes required to accomplish DC immune functions effectively. Among them, induction of expression of the chemotactic receptor CCR7 provides DCs the major guidance clue to traffic towards lymphoid organs (Forster et al. 1999). Chemokines CCL21 and CCL19 induce CCR7-mediated G protein activation, which indeed triggers the multiple signaling modules required for the mobilization of DCs to lymphoid tissues (Randolph et al. 2008). Besides CCR7, other accessory cell surface proteins, such as CD38, and the PGE2 receptors EP2 and EP4 are also known to influence DC migration to secondary lymphoid organs (Randolph et al. 2005).

Polysialic acid 2,8-linked *N*-acetylneuraminic acid (PSA) is a large linear homopolymer post-translationally added to a small number of proteins (Muhlenhoff et al. 1998). On the major carrier protein NCAM, PSA plays a critical role in the development of the vertebrate nervous system (Rutishauser 2008), where it controls neuronal and oligodendrocyte migration and alters cell–cell and cell–extracellular matrix interactions. PSA also regulates migration of T-cell progenitors from the bone marrow to the thymus (Drake et al. 2009). Two polysialyltransferases (ST8SiaII and IV) are known to be responsible for the polysialylation of NCAM and other acceptor molecules (Angata and Fukuda 2003). The expression of the polysialyltransferase ST8SiaIV is induced in mature DCs, where it is likely involved in synthesizing PSA on O-linked glycans of the 130-kDa membrane glycoprotein neuropilin-2 (NRP2), whose expression is also upregulated during DC maturation (Curreli et al. 2007). Polysialylation in DCs has been demonstrated to contribute to T-cell allostimulation (Curreli et al. 2007). More recently, it has been reported that PSA controls CCL21-directed migration of mature DCs (Bax et al. 2009), although its role in CCL19-driven chemotaxis has not been explored yet. NRP2, through binding to its structurally unrelated ligands, semaphorins B, C and F, and some members of the VEGF family, has been implicated in cell motility, including neuronal growth cone collapse and endothelial and tumor cell migration (Geretti et al. 2008; Pellet-Many et al. 2008). The expression of PSA and NRP2 in mature DCs and their involvement in cell migration prompted us to investigate their roles in CCR7-mediated DC chemotaxis.

In this work, we show that PSA has no enhancing effect on human DC migration towards CCL19. We also report that pre-

¹To whom correspondence should be addressed: Tel: 34-91-8373112 (ext. 4386); Fax: 34-91-5627518; e-mail: mavega@cib.csic.es

vention of DC polysialylation decreases CCL21-triggered activation of the CCR7-chemotaxis-associated JNK and Akt signaling pathways. Moreover, our results indicate that the PSA enhancing effect on CCL21-driven chemotaxis of DCs depends on the highly basic C-terminal region of the chemokine and is mediated by the PSA acceptor glycoprotein NRP2.

Results

PSA selectively enhances mature DC chemotaxis towards CCL21 but not towards CCL19

PSA was recently shown to enhance migration in response to CCL21 of lipopolysaccharide (LPS)-induced mature DCs (Bax et al. 2009). We wondered if this effect was also shared by CCL19, the other CCR7 ligand. For this purpose, LPS-matured human DCs were treated with the EndoN enzyme to remove surface PSA, and their ability to migrate towards CCL21 or CCL19 was compared with that displayed by untreated DCs. EndoN treatment resulted in complete PSA removal, as assayed by western blotting (Figure 1A, upper panel, compare lines 1 and 2) and flow cytometry (Figure 1A, lower panel). PSA content recovery was measured at distinct times after EndoN treatment to assure that no significant PSA re-expression occurs during the chemotaxis assays. In this regard, less than 20% of PSA content was recovered 8 h after DC-EndoN treatment, a time that exceeded the 2-h period of time required to complete the chemotaxis experiments (Figure 1A, upper panel). Chemotaxis assays in response to each chemokine revealed that EndoN-treated DCs showed significant reduced migration towards CCL21 (average percentage of migration of EndoN-treated DCs with respect to untreated DCs was 52%, $P = 0.000045$, $N = 19$), but not towards CCL19 (average percentage of migration of EndoN-treated DCs with respect to untreated DCs was 92%, $P = 0.37$, $N = 15$) (Figure 1B). Interestingly, reduction of migration towards CCL21 after PSA removal was even stronger when suboptimal doses of CCL21 were used (average percentage of migration of EndoN-treated DCs with respect to untreated DCs was 27%, $P = 0.009$, $N = 4$) (Figure 1C). Addition of CCL21 to both the upper and the lower chambers of the migration transwells revealed no differences in the number of DCs that migrated to the lower chambers when EndoN-treated and non-treated DCs were compared, which indicated that the effects of PSA were exerted on CCL21-dependent chemotaxis and not on migratory speed (unpublished data). Moreover, EndoN treatment of DCs did not modify CCR7 expression levels as determined by western blotting (Figure 1D) and flow cytometry (Figure 1E). The absence of differences in the CCR7 molecular size between EndoN-treated and untreated DCs (Figure 1D) strongly suggests that CCR7 is not polysialylated. The above data indicate that cell surface PSA does not affect migration of mature DCs towards CCL19, implying that PSA selectively contributes to CCL21-directed DC migration.

Removal of PSA in DCs decreases CCL21-induced CCR7-mediated signaling

CCL21 triggers CCR7-mediated G protein activation that results in the activation of multiple signaling pathways (Randolph et al. 2008). Of them, JNK activation has been

associated with DC migration in response to chemokines (Iijima et al. 2005; Riol-Blanco et al. 2005) and Akt activation with promotion of DC migration (Del Prete et al. 2004) and survival (Sanchez-Sanchez et al. 2004). To examine the signaling pathways underlying the PSA-mediated enhancement of CCL21-directed chemotaxis, CCL21-induced JNK and Akt phosphorylation levels were compared between EndoN-treated and untreated mature DCs. While more pronounced transient JNK and Akt phosphorylations were observed in untreated DCs than in EndoN-treated DCs upon stimulation with CCL21 (Figure 2A), no differences were observed upon stimulation with CCL19 (Figure 2B). These results indicate that PSA enhances CCL21-driven signaling likely through CCR7 and are consistent with the increased migration towards CCL21 observed in PSA-bearing DCs with respect to DCs devoid of PSA.

PSA enhancement of CCL21-driven chemotaxis relies on the highly basic C-terminal amino acid region of the chemokine

As shown before and unlike the case of CCL21, no PSA-enhancement effect on CCL19-directed chemotaxis was observed (Figure 1B). A striking structural difference between CCL21 and CCL19 is the presence of a highly basic C-terminal 32-amino-acid-long region in CCL21, which is absent in CCL19 (Figure 3A). This region has been suggested to interact with glycosaminoglycans to mediate the sequestration of CCL21 in endothelial cells to facilitate the formation and maintenance of the CCL21 gradient (Hirose et al. 2002). In this regard, highly negatively charged PSA present on polysialylated proteins in DCs is likely to interact with the basic C-terminal region of CCL21. Such an interaction would resemble the interaction of CCL21 with negatively charged glycosaminoglycans (Hirose et al. 2002) and sulfated chains coupled to PSGL-1 on T cells (Veerman et al. 2007). Furthermore, the cationic neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor, nerve growth factor, neurotrophin-3 and neurotrophin-4 have been demonstrated to directly interact with PSA (Kanato et al. 2008). Interestingly, PSA coupled to biotinylated polyacrylamide has been recently shown to interact with CCL21 in vitro (Bax et al. 2009). The above reasoning prompted us to test whether the basic C-terminal region of CCL21 contributes to the PSA effect on CCL21-directed chemotaxis. To that end, a CCL21 mutant lacking the last 32 C-terminal amino acid residues (designated as St CCL21-stop) was generated and expressed in the supernatants of transfected COS-7 cells. As a control, a CCL21 full-length form was also produced in COS7 cells (referred to as St CCL21 wt). Both proteins displayed the expected molecular sizes as determined by western blotting on supernatants of transfected COS7 cells using a CCL21 specific antibody (Figure 3B). Recombinant CCL21, St CCL21 wt and St CCL21-stop were then compared in their chemotaxis-inducing ability on untreated and EndoN-treated mature DCs. As shown in Figure 3C, untreated DCs migrated better than EndoN-treated DCs to both recombinant CCL21 and St CCL21 wt. However, no differences in migration between untreated and EndoN-treated DCs towards St CCL21-stop were evidenced (Figure 3C). Thus, like for CCL19, St CCL21-stop-driven DC chemotaxis is not sensitive to PSA removal. Taken together, these observations indicate that the C-terminal region of CCL21 contributes to the in-

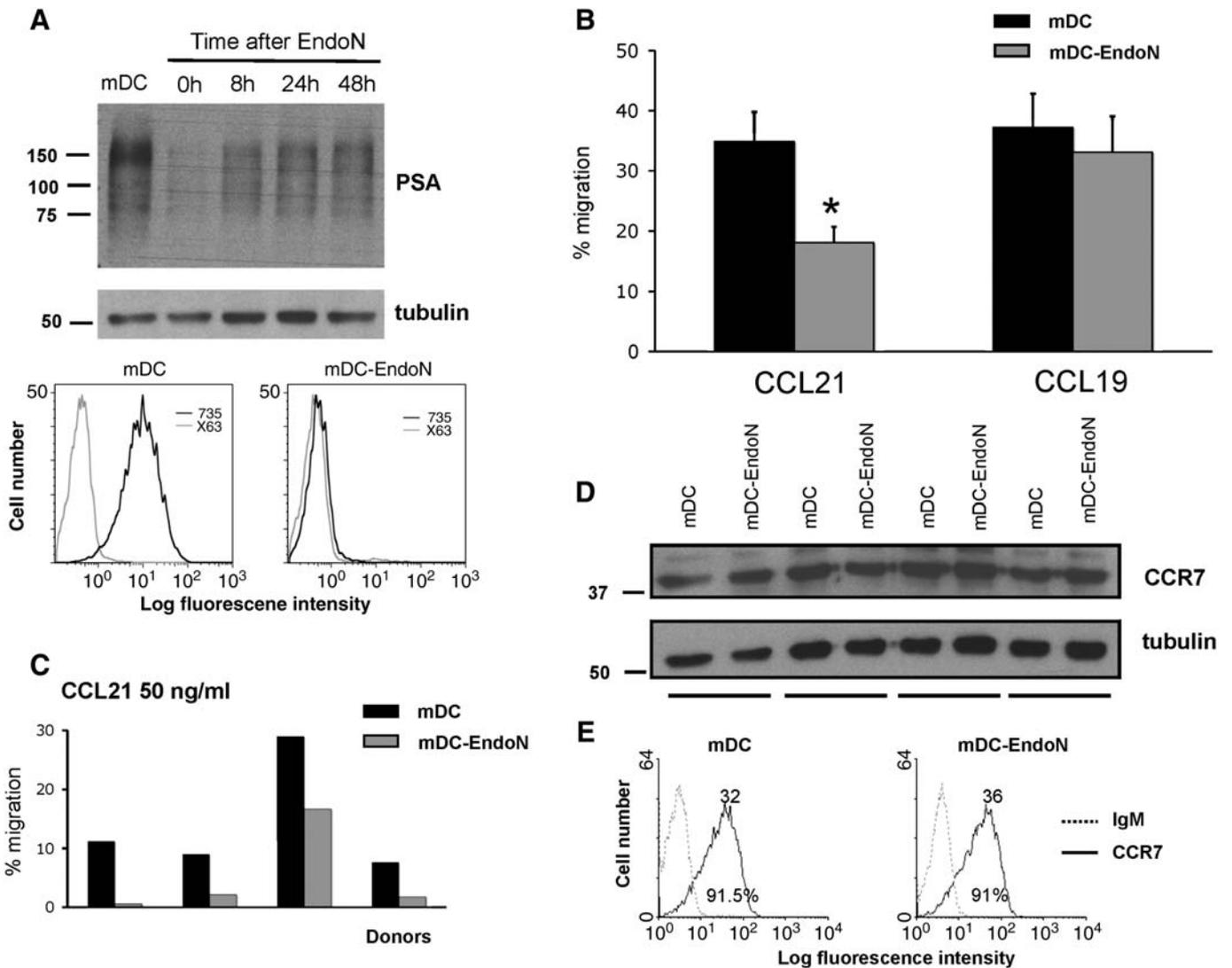


Fig. 1. PSA on DCs enhances their chemotaxis to CCL21 but not to CCL19. (A) *Upper panel.* Removal of PSA from mature DCs by EndoN treatment. Time course of PSA content recovery after EndoN treatment of DCs. Mature DCs (line 1) were treated with EndoN (line 2) as indicated in experimental procedures and cultured in complete medium for the times indicated (lines 3 to 5). Cell lysates were obtained and probed by western blotting with the antibody 735. Blots were stripped and probed for tubulin levels as a control for protein loading. The time course experiment shown is representative of two independent experiments. *Lower panel.* Cell surface expression of PSA on untreated (left panel) and EndoN-treated (right panel) DCs was determined by flow cytometry using the antibody 735 (continuous line). P3X63 antibody was used as a negative control (gray line). A representative experiment is shown. (B) Average percentage of migration to 200 ng/mL of CCL21 and of CCL19 of untreated (black bars) and EndoN-treated mature DCs (gray bars) generated from 19 independent donors for CCL21 and from 15 donors for CCL19. Mean values and SEM are represented. **P* less than 0.05 (Student's paired *t*-test). (C) Percentage of migration to 50 ng/mL of CCL21 of untreated (black bars) and EndoN-treated mature DCs (gray bars) generated from four independent donors. (D) Expression of CCR7 in mature DCs untreated or treated with EndoN from four independent donors (each denoted by the horizontal line shown below), as determined by western blotting. Blot was stripped and probed for tubulin levels as a control for protein loading. (E) Representative experiment for the determination of cell surface CCR7 expression measured by flow cytometry on mature DCs untreated or treated with EndoN. The percentage of positive cells (lower number) and the mean fluorescence intensity (upper number) are shown.

creased migration observed in PSA-bearing DCs towards this chemokine and provides a suitable molecular explanation of why PSA does not affect migration of DCs towards CCL19.

Polysialylated NRP2 regulates CCL21-driven migration of DCs

Polysialylation of NRP2 in DCs and its role in endothelial and tumor cell migration (Geretti et al. 2008; Pellet-Many et al. 2008) induced us to investigate its contribution to CCL21-

and CCL19-driven DC migration by using siRNA technology to knock down its polysialylation (by ST8SiaIV siRNA) and expression (by NRP2 siRNA). Effective downregulation of ST8SIAIV expression in DCs after siRNA nucleofection was evidenced in all experiments performed by an almost complete abrogation of cellular PSA content (Figure 4A, left panel) and by the shift of the smear corresponding to the NRP2 into a sharper and smaller size band, a feature consistent with the removal of the NRP2-attached PSA chains (Figure 4A, right panel). Downregulation of ST8SiaIV expression resulted in a

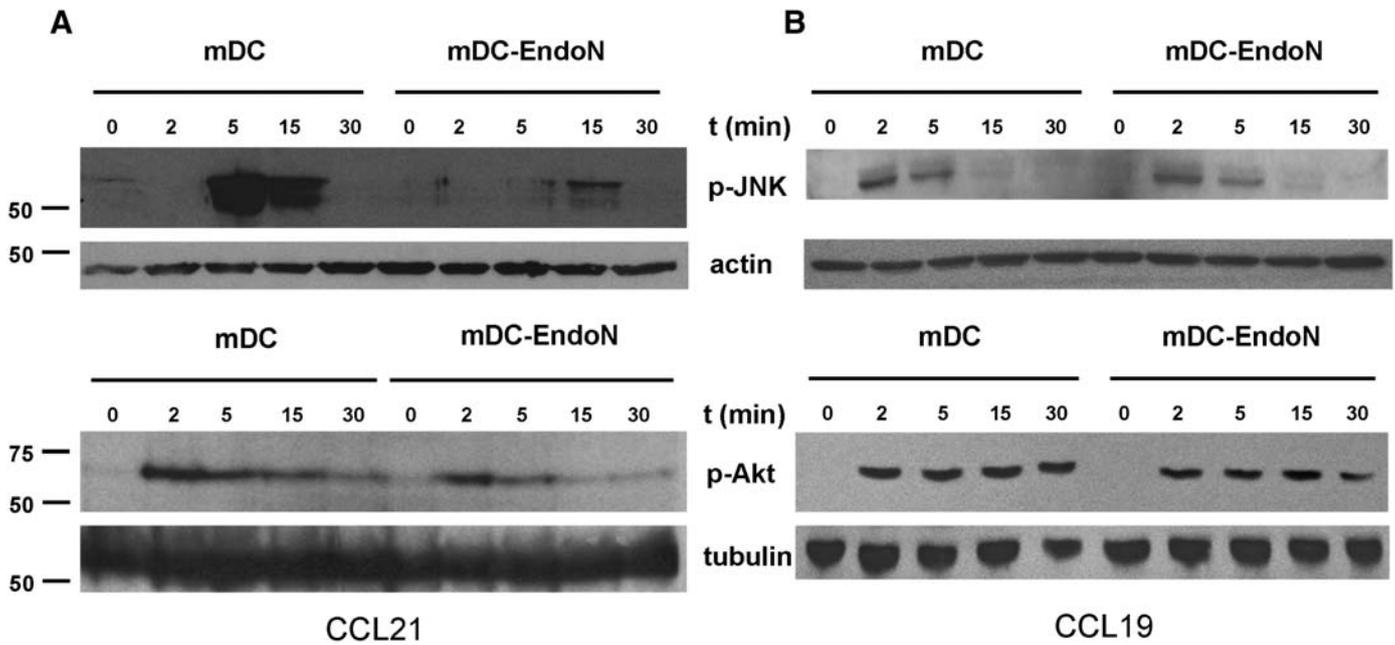


Fig. 2. JNK and Akt signaling after CCL21 stimulation is reduced in EndoN-treated DCs. Mature DCs were treated with CCL21 (200 ng/mL) (panel A) or CCL19 (200 ng/mL) (panel B) for the indicated times. Levels of active forms of JNK and Akt in cell lysates were determined by western blotting. Blots were stripped and probed for actin or tubulin levels as controls for protein loading. Data shown are representative of three independent experiments.

A

CCL21	1	MAQSLALSLLILVLAFGIPRTQGSDDGGAQDCCLKYSQRKIPAKVVRSYRK	50
		. . : : : . : . . . : : . . . :	
CCL19	1	MALLLALSLLVLTWS-PAPTLSGTN-DAEDCCLSVTQKPIPGYIVRNFHY	48
CCL21	51	QEPSLGCSIPAILFLPRKRSQAELCADPKELWVQQLMQHLDKTPSPQKPA	100
	 : : : : . : : : . . : 	
CCL19	49	LLIKDGCRVPAVVFVTLRGRQ--LCAPPDQPWVERIIQRLQRTSAKMRR	96
CCL21	101	QGCRKDRGASKTGKKGKSGKCKRTERSQTPKGP	134
		. .	
CCL19	97	SS-----	98

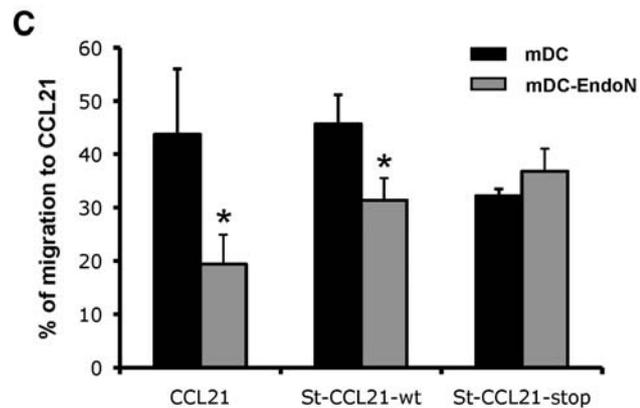


Fig. 3. The basic C-terminal region of CCL21 contributes to the PSA-enhanced chemotaxis. (A) Alignment of sequences for human CCL21 and CCL19. Basic residues within the C-terminal region of CCL21 are represented in bold. (B) Characterization of st CCL21 wt and st CCL21-stop forms. Supernatants of COS7 cells transfected with vectors pcDNA3.1 (mock), pVAX-CCL21 (St CCL21 wt) and pVAX-CCL21-stop (St CCL21-stop) and recombinant CCL21 (20 ng) were subjected to SDS-PAGE and western blotting and detected with an antibody against human CCL21. (C) Average percentage of migration towards recombinant CCL21, St CCL21 wt and St CCL21-stop of untreated (black bars) and EndoN-treated mature DCs (gray bars). Recombinant CCL21 was used at 200 ng/mL, and St CCL21wt and St CCL21-stop forms were used at doses estimated to be within a range between 100 and 200 ng/mL. Data were derived from three independent donors. Mean values and SEM are represented. **P* less than 0.05 (Student's paired *t*-test).

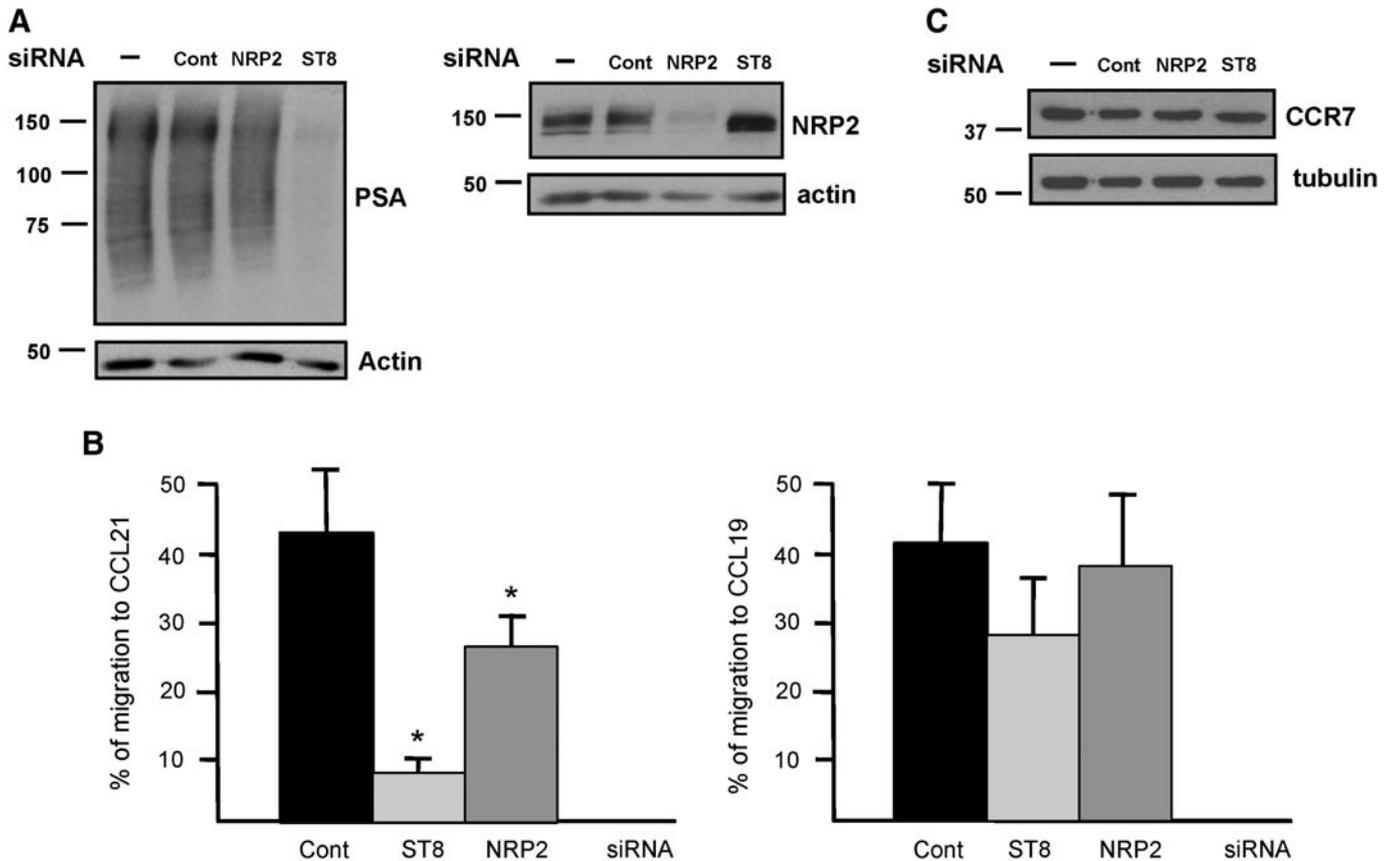


Fig. 4. Downregulation of the polysialyltransferase ST8SiaIV and NRP2 in mature DCs selectively and negatively affect their chemotaxis towards CCL21. (A) Western blotting was used to determine the expression levels of PSA (with the antibody 735) (left panel) and NRP2 (right panel) on untreated mature DCs and mature DCs nucleofected with siRNAs for GAPDH (referred to as Cont), ST8SiaIV and NRP2. Blots were stripped and probed for actin levels as a control for protein loading. Band observed in left panel around 150 kDa corresponds to NRP2. A representative experiment out of three is shown. (B) Average percentage of migration to 200 ng/mL of CCL21 (left panel) and CCL19 (right panel) of mature DCs, obtained from three independent donors, nucleofected with the indicated siRNAs. Mean values and SEM are represented. For statistical analysis, data for migration of DCs nucleofected with ST8SiaIV and NRP2 siRNAs were independently compared with those obtained for DCs nucleofected with GAPDH siRNA (referred to as Cont). **P* less than 0.05 (Student's paired *t*-test). (C) CCR7 expression in untreated mature DCs and mature DCs nucleofected with GAPDH, NRP2 and ST8SiaIV siRNAs was determined by western blotting. Blots were stripped and probed for tubulin levels as a control for protein loading. The experiment shown is representative of three independent experiments.

drastic drop of migration towards CCL21 but, in agreement with our former results, not towards CCL19 (Figure 4B). These results corroborate our previous conclusions by a different experimental approach and demonstrate that the enzyme ST8SiaIV mediates the incorporation of the PSA moieties implicated in CCL21-directed DC migration.

Since ST8SiaIV knockdown dramatically reduced the polysialylation extent of NRP2, we next investigated the influence of NRP2 expression on DC migration towards CCL21 and CCL19. Nucleofection of NRP2 siRNA in DCs resulted in reduction of NRP2 expression levels of 15%, 34% and 80% in three independent experiments with respect to those found in DCs nucleofected with GAPDH siRNA (Figure 4A) and led to a significant hampered migration of DCs towards CCL21 but not towards CCL19 (Figure 4A and B). The greater knock-down efficiency of ST8SiaIV siRNA with respect to NRP2 siRNA might explain why the effects in migration were more drastic in DCs nucleofected with the former siRNA. Since neither ST8SiaIV nor NRP2 siRNAs modified CCR7 expression levels (Figure 4C), the above results indicate that

polysialylated NRP2 specifically controls CCL21-directed chemotaxis of DCs.

Discussion

This report provides evidence that PSA removal from mature DCs either by EndoN treatment or by knocking down the polysialyltransferase ST8SIAIV impairs their ability to migrate towards CCL21 but not towards CCL19. Our results, besides reinforcing the data reported by Bax et al. (2009): (1) show that prevention of DC polysialylation impaired CCL21 activation of CCR7-migration-associated JNK and Akt signaling pathways, (2) highlight the critical role of the highly basic C-terminal region of the CCL21 chemokine for the PSA-enhancement effect on DC chemotaxis towards CCL21 and (3) demonstrate the contribution of the PSA acceptor molecule NRP2 to mature DC migration towards CCL21.

Since our experiments used LPS-induced mature DCs, a Toll-like receptor (TLR)-4-dependent maturation model, it should be investigated whether the enhanced PSA-mediated

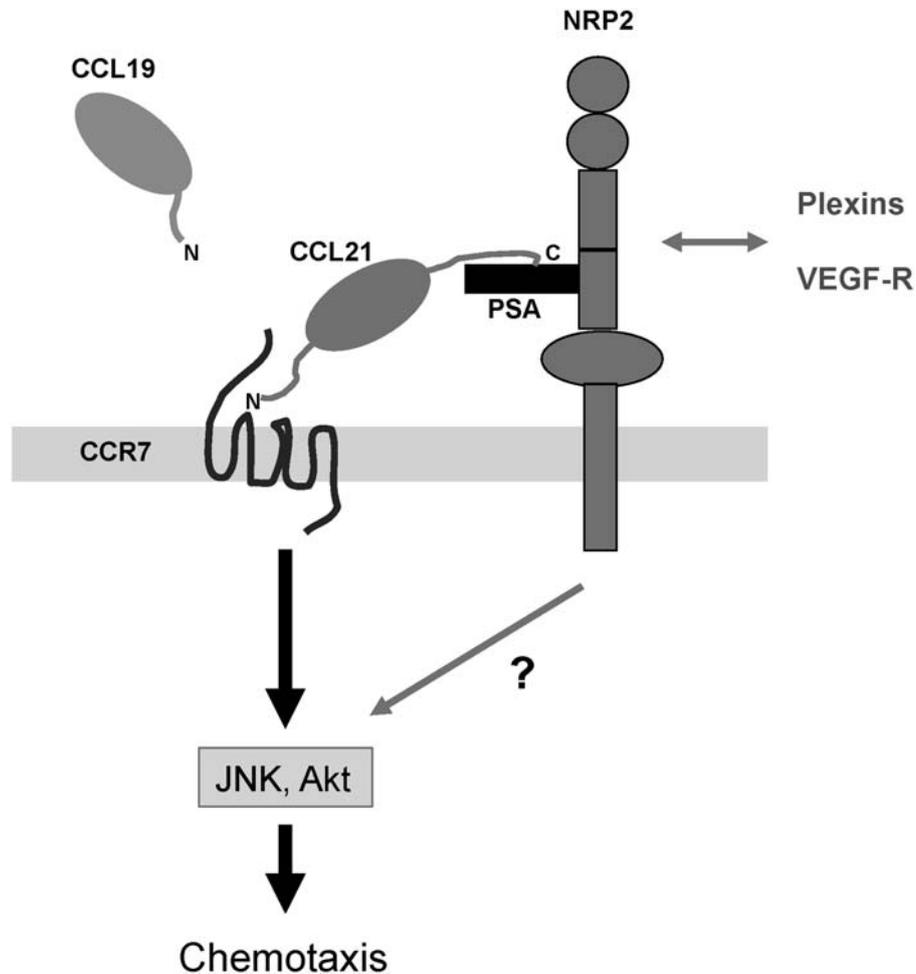


Fig. 5. Working structural model of the CCR7/PSA-NRP2/CCL21 functional axis. See the text for explanations. PSA on the NRP2 structure was arbitrarily positioned, since the region within the NRP2 structure where PSA is attached is so far unknown.

effect on DC migration towards CCL21 operates upon DC maturation triggered through activation of other TLR.

Interestingly, selective enhancement of CCL21-mediated chemotaxis might provide clues about the differential effects of CCL21/CCL19 on CCR7 recycling/degradation, desensitization and signaling (Kohout et al. 2004; Otero et al. 2006).

Plasma membrane glycoprotein NRP2 has been identified as a PSA acceptor in mature DCs (Curreli et al. 2007). Our experiments show that downregulating NRP2 expression (by NRP2 siRNA) or impairing its polysialylation (either by EndoN treatment or by ST8SiaIV siRNA) led to a significant reduction of DC migration towards CCL21. Altogether, these results point out that the PSA present on the structural context of NRP2 contributes to DC chemotaxis towards CCL21. Nevertheless, although western blotting analysis of lysates from mature DCs identified NRP2 as the most abundant polysialylated protein (Curreli et al. 2007 and our data), the contribution of other so far uncharacterized polysialylated acceptor proteins cannot be ruled out.

Besides mature DCs, NRP2 is preferentially expressed on lymphatic endothelial cells and some tumors, where it acts as a co-receptor for semaphorins 3B, C and F and some member of the VEGF family through their interactions with the signal-

transducing receptors Plexins and VEGFR, respectively. Those interactions license NRP2 to contribute to neurogenesis, lymphangiogenesis and tumor progression via its key roles in axon guidance and endothelial and tumor migration and survival (Favier et al. 2006; Geretti et al. 2008; Pellet-Many et al. 2008). Our finding is consistent with the role of NRP2 in migration and adds novel perspectives of interest with regard to its post-translational modification by PSA and its functional cooperation with a chemokine receptor.

Finally, we have demonstrated that PSA-enhanced chemotaxis to CCL21 relies on its highly basic C-terminal region. This finding provides a structural framework that helps to explain why the PSA-enhancing effects on CCL21-directed DC chemotaxis were not seen for CCL19 (Figure 5). The binding of CCL21 to PSA (Bax et al. 2009) and of its C-terminal basic region to glycosaminoglycans (Hirose et al. 2002), in combination with our experimental data, make it reasonable to propose that the C-terminal basic region of CCL21 binds NRP2-coupled PSA. This interaction would presumably leave the N-terminal portion of the chemokine available (the region of chemokines known to be required for receptor binding (Allen et al. 2007)), to interact with CCR7. According to this model, PSA-NRP2 would trap CCL21, increasing the local concentra-

tion of the chemokine and/or enabling a proper CCL21-CCR7 docking. In any case, the formation of the ternary functional CCR7/PSA-NRP2/CCL21 complex could result in a lowering of the activation threshold of CCR7 and therefore in an increase of CCR7-mediated JNK and Akt signaling pathways. The higher effect on PSA-enhanced migration observed at lower doses of CCL21 supports the model proposed, which is reminiscent of the one proposed for the simultaneous binding of VEGF to neuropilins and VEGF receptors, and the enhancing effect of neuropilins on cell migration (Favier et al. 2006; Staton et al. 2007). In addition, binding of PSA-NRP2 to CCL21 might favor dimerization of the chemokine, protect it from proteolysis and/or enhance CCR7-independent signaling through NRP2-mediated signaling by itself or through its co-receptors, Plexins and/or VEGF receptors. Clearly, further investigation is required to unravel all of the above issues. The absence of a basic C-terminal region in CCL19 and in the St CCL21-stop mutant would preclude its interaction with PSA-NRP2 and therefore its integration in the CCR7/NRP2/ST8SiaIV axis.

A direct association of CCR7 expression with lymph node metastasis in cancer patients has been found in a large variety of solid tumors (Zlotnik 2006). On the other hand, NRP2 has been implicated in mediating proliferation, survival and migration of tumor cells (Bielenberg et al. 2006; Gray et al. 2008), and PSA has been demonstrated to facilitate tumor invasion (Suzuki et al. 2005). The functional cooperation reported here between CCR7, NRP2 and ST8SiaIV prompts further investigation of the relevance of this axis in tumors cell types that preferentially metastasize to secondary lymphoid organs.

Materials and methods

Reagents

CCL21 and CCL19 chemokines were obtained from Prepro-Tech. Antibodies against human CCL21, NRP2 and CCR7-phycoerythrin (for flow cytometry) were from R&D Systems. Anti-CCR7 for western blotting was obtained from AbCam. For PSA detection, the monoclonal antibody 735 was used (Frosch et al. 1985). The anti-phospho-JNK(Thr183/Tyr185) and anti-phospho-Akt(Ser473) antibodies were purchased from Cell Signaling. Antibodies against actin and tubulin were from Sigma.

Generation of monocyte-derived dendritic cells

Monocyte-derived dendritic cells were generated from peripheral blood mononuclear cells of healthy donors as described (Puig-Kroger et al. 2006). For maturation, immature DCs were treated with 100 ng/mL of LPS (*Escherichia coli* 0111:B4, InvivoGen) for 48 h. Acquisition of the DC mature phenotype was checked by flow cytometry using antibodies against CD83, CD86, CD209 and PSA.

EndoN treatment of DCs

EndoN was purified as described (Hallenbeck et al. 1987). Mature DCs at 2×10^6 cells/mL were incubated for 1 h at 37°C with either 5 U of EndoN at 1 U/mL (referred to as mDC-EndoN) or an equal volume of phosphate-buffered saline/glycerol in RPMI 1640, with occasional shaking. Afterwards, cells were washed with complete medium.

PSA removal after EndoN treatment was tested in all DCs preparations by western blotting and occasionally by flow cytometry using the monoclonal antibody 735.

Western blotting

Western blots were essentially performed as described (Puig-Kroger et al. 2006). Briefly, 10 µg of each lysate were subjected to sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) under reducing conditions and transferred onto an Immobilon polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). ImageJ software was used for gel quantification analysis.

Site-directed mutagenesis of CCL21 and expression of CCL21 plasmids in COS7 cells

Site-directed mutagenesis was performed on the pVAX-CCL21 construct (kindly provided by Dr. Y. Zhao, Medical Research Center, Shandong Provincial Hospital, Shandong University, Jinan (Li et al. 2006)) using the QuikChange System (Stratagene). For the introduction of a stop codon in amino Cys 103 of human CCL21, the oligonucleotides GAAACCAGCC-CAGGGCTGAAGGAAGGACAGGGGGG, sense, and CCCCCTGTCTTCCTTCAGCCCTGGGCTGGTTTC, antisense, were used. This mutation gave rise to a CCL21 protein 31 amino acids shorter than the full-length form. The mutations of the resulting plasmid, designated as pVAX-CCL21-stop, were confirmed by DNA sequencing.

Vectors pcDNA3.1, pVAX-CCL21 and pVAX-CCL21-stop were transfected in COS7 cells by using Lipofectamine 2000 as recommended by the manufacturer. Supernatants were collected 48 h after transfection. Concentrations for each CCL21 form present in the supernatants were roughly estimated by western blotting by comparison with known amounts of recombinant CCL21.

Chemotaxis assays

Chemotaxis in response to chemokines CCL21 and CCL19 was determined by measuring the number of cells migrating through a polycarbonate filter (5-µm pore size) in 24-well transwell chambers (Costar Europe). The upper chamber included 1×10^5 DCs diluted in 100 µL of RPMI 1640 medium and 0.1% bovine serum albumin, and the lower chamber contained 600 µL of the same medium with or without chemokines (at 200 ng/mL, unless otherwise indicated). DCs that migrated to the bottom chamber (after 2 h at 37°C) and inputs were counted by flow cytometry using CellQuest software (BD Biosciences). Percentage of migration was expressed relative to the number of input cells after subtracting the number of cells migrated in the absence of chemokines from the values obtained in the presence of chemokine in the lower chamber. COS7 cell supernatants containing CCL21-wt and CCL21-stop forms were used at doses estimated to be within a range between 100 and 200 ng/mL.

Nucleofection in DCs of siRNAs

Immature DCs ($2-4 \times 10^6$) were transfected with 600 nmol of each siRNA (Ambion) using the Amaxa human dendritic cell nucleofector kit following the manufacturer's instructions. Sense siRNAs used were: GAPDH: (ref 4390850, Ambion); ST8SiaAIV:CCUCCUACCUGAAGUUUCAAtt; NRP2: AGAUUGUCCUCAACUUCAAtt. One hour later, DCs were

matured by the addition of 100 ng/mL of LPS. Experiments were carried out 36 h later. Downregulation of protein expression levels for NRP2 was assayed by western blotting using an anti-NRP2 antibody. ST8SiaIV downregulation was indirectly determined by detection of PSA levels by western blotting using the 735 antibody.

Signaling assays

Signaling experiments were basically as described (Riol-Blanco et al. 2005). DCs were stimulated with CCL21 at 200 ng/mL for the indicated times. JNK and Akt activation was assayed with anti-phospho-JNK(Thr183/Tyr185) and anti-phospho-Akt (Ser473) antibodies, respectively.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the paired Student's *t*-test. A value of *P* equal to or less than 0.05 was considered significant.

Acknowledgments

We thank Prof. Joaquín Teixidó and Prof. Angeles García Pardo (CIB, Madrid, Spain) for critical reading of the manuscript. This work was supported by a research grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS-PI0708879 to MAV).

Abbreviations

DC, dendritic cell; LPS, lipopolysaccharide; NRP2, neuropilin-2; PSA, polysialic acid; SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; TLR, Toll-like receptor.

References

Allen SJ, Crown SE, Handel TM. 2007. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol.* 25:787–820.

Angata K, Fukuda M. 2003. Polysialyltransferases: major players in polysialic acid synthesis on the neural cell adhesion molecule. *Biochimie.* 85:195–206.

Bax M, van Vliet SJ, Litjens M, Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y. 2009. Interaction of polysialic acid with CCL21 regulates the migratory capacity of human dendritic cells. *PLoS ONE.* 4:e6987.

Bielenberg DR, Pettaway CA, Takashima S, Klagsbrun M. 2006. Neuropilins in neoplasms: expression, regulation, and function. *Exp Cell Res.* 312:584–593.

Curreli S, Arany Z, Gerardy-Schahn R, Mann D, Stamatou NM. 2007. Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. *J Biol Chem.* 282:30346–30356.

Del Prete A, Vermi W, Dander E, Otero K, Barberis L, Luini W, Bernasconi S, Sironi M, Santoro A, Garlanda C, et al. 2004. Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice. *EMBO J.* 23:3505–3515.

Drake PM, Stock CM, Nathan JK, Gip P, Golden KP, Weinhold B, Gerardy-Schahn R, Bertozzi CR. 2009. Polysialic acid governs T-cell development by regulating progenitor access to the thymus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 106:11995–12000.

Favier B, Alam A, Barron P, Bonnin J, Laboudie P, Fons P, Mandron M, Herauld JP, Neufeld G, Savi P, et al. 2006. Neuropilin-2 interacts with VEGFR-2 and VEGFR-3 and promotes human endothelial cell survival and migration. *Blood.* 108:1243–1250.

Forster R, Schubel A, Breitfeld D, Kremmer E, Renner-Muller I, Wolf E, Lipp M. 1999. CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell.* 99:23–33.

Frosch M, Gorgen I, Boulnois GJ, Timmis KN, Bitter-Suermann D. 1985. NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of *Escherichia coli* K1 and group B meningococci. *Proc Natl Acad Sci USA.* 82:1194–1198.

Geretti E, Shimizu A, Klagsbrun M. 2008. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis.* 11:31–39.

Gray MJ, Van Buren G, Dallas NA, Xia L, Wang X, Yang AD, Somcio RJ, Lin YG, Lim S, Fan F, et al. 2008. Therapeutic targeting of neuropilin-2 on colorectal carcinoma cells implanted in the murine liver. *J Natl Cancer Inst.* 100:109–120.

Hallenbeck PC, Vimr ER, Yu F, Bassler B, Troy FA. 1987. Purification and properties of a bacteriophage-induced endo-*N*-acetylneuraminidase specific for poly-alpha-2, 8-sialosyl carbohydrate units. *J Biol Chem.* 262:3553–3561.

Hirose J, Kawashima H, Swope Willis M, Springer TA, Hasegawa H, Yoshie O, Miyasaka M. 2002. Chondroitin sulfate B exerts its inhibitory effect on secondary lymphoid tissue chemokine (SLC) by binding to the C-terminus of SLC. *Biochim Biophys Acta.* 1571:219–224.

Iijima N, Yanagawa Y, Clingan JM, Onoe K. 2005. CCR7-mediated c-Jun N-terminal kinase activation regulates cell migration in mature dendritic cells. *Int Immunol.* 17:1201–1212.

Kanato Y, Kitajima K, Sato C. 2008. Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization. *Glycobiology.* 18:1044–1053.

Kohout TA, Nicholas SL, Perry SJ, Reinhart G, Junger S, Struthers RS. 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.* 279:23214–23222.

Li H, Qi L, Yu-lian J, Jie Z, Lai-cheng W, Chun-yan M, Bin C, Xue Z, Yue-ran Z. 2006. Construction of eukaryotic expression vector for human CCL21 and characterization of its chemotactic activity. *Chin J Cancer Res.* 18:246–250.

Muhlenhoff M, Eckhardt M, Gerardy-Schahn R. 1998. Polysialic acid: three-dimensional structure, biosynthesis and function. *Curr Opin Struct Biol.* 8:558–564.

Otero C, Groettrup M, Legler DF. 2006. Opposite fate of endocytosed CCR7 and its ligands: recycling versus degradation. *J Immunol.* 177:2314–2323.

Pellet-Many C, Frankel P, Jia H, Zachary I. 2008. Neuropilins: structure, function and role in disease. *Biochem J.* 411:211–226.

Puig-Kroger A, Dominguez-Soto A, Martinez-Munoz L, Serrano-Gomez D, Lopez-Bravo M, Sierra-Filardi E, Fernandez-Ruiz E, Ruiz-Velasco N, Ardavin C, Groner Y, et al. 2006. RUNX3 negatively regulates CD36 expression in myeloid cell lines. *J Immunol.* 177:2107–2114.

Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sanchez S. 2008. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol.* 26:293–316.

Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Angeli V. 2005. Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances. *Springer Semin Immunopathol.* 26:273–287.

Riol-Blanco L, Sanchez-Sanchez N, Torres A, Tejedor A, Narumiya S, Corbi AL, Sanchez-Mateos P, Rodriguez-Fernandez JL. 2005. The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed. *J Immunol.* 174:4070–4080.

Rutishauser U. 2008. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system. *Nat Rev Neurosci.* 9:26–35.

Sanchez-Sanchez N, Riol-Blanco L, de la Rosa G, Puig-Kroger A, Garcia-Bordas J, Martin D, Longo N, Cuadrado A, Cabanas C, Corbi AL, et al. 2004. Chemokine receptor CCR7 induces intracellular signaling that inhibits apoptosis of mature dendritic cells. *Blood.* 104:619–625.

Staton CA, Kumar I, Reed MW, Brown NJ. 2007. Neuropilins in physiological and pathological angiogenesis. *J Pathol.* 212:237–248.

Steinman RM, Banchereau J. 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature.* 449:419–426.

Suzuki M, Nakayama J, Suzuki A, Angata K, Chen S, Sakai K, Hagihara K, Yamaguchi Y, Fukuda M. 2005. Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells. *Glycobiology.* 15:887–894.

Veerman KM, Williams MJ, Uchimura K, Singer MS, Merzaban JS, Naus S, Carlow DA, Owen P, Rivera-Nieves J, Rosen SD, et al. 2007. Interaction of the selectin ligand PSGL-1 with chemokines CCL21 and CCL19 facilitates efficient homing of T cells to secondary lymphoid organs. *Nat Immunol.* 8:532–539.

Zlotnik A. 2006. Chemokines and cancer. *Int J Cancer.* 119:2026–2029.

Polysialic acid is required for neuropilin-2a/b-mediated control of CCL21-driven chemotaxis of mature dendritic cells and for their migration in vivo

Angela Rey-Gallardo², Cristina Delgado-Martín²,
Rita Gerardy-Schahn³, José L. Rodríguez-Fernández²,
and Miguel A. Vega^{1,2}

²Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones,
Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid, Spain and

³Medizinische Hochschule Hannover, Institute für Zelluläre Chemie,
Hannover, Germany

Received on October 12, 2010; revised on December 1, 2010; accepted on
December 22, 2010

Migration of mature dendritic cells (mDCs) to secondary lymphoid organs is required for the development of immunity. Recently, we reported that polysialic acid (PSA) and the transmembrane glycoprotein neuropilin-2 (NRP2) control mDC chemotaxis to CCL21 and that this process is dependent on the C-terminal basic region of the chemokine. Herein, we provide further insight into the molecular components controlling PSA regulated chemotaxis in mDCs. In the present study, we demonstrate that human mDCs express the NRP2 isoforms NRP2a and NRP2b, that both of them are susceptible to polysialylation and that polysialylation is required to specifically enhance chemotaxis toward CCL21 in mDCs. The results presented suggest that PSA attached to NRP2 isoforms acts as a binding module for the CCL21 chemokine, thereby facilitating its presentation to the chemokine receptor CCR7. To investigate the relevance of polysialylation on mDC migration, a xenograft mouse model was used and the migration of human DCs to mouse lymph nodes analyzed. Here, we demonstrate that the depletion of PSA from mDCs results in a drastic reduction in the migration of the cells to draining popliteal lymph nodes. With this finding, we provide first evidence that PSA is a crucial factor for in vivo migration of mDCs to lymph nodes.

Keywords: dendritic cells / migration / neuropilin-2 / polysialic acid / ST8SiaIV

Introduction

Pathogen sensing by tissue dendritic cells (DCs) triggers a complex regulated genetic program that induces their maturation (Steinman and Banchereau 2007). Mature DCs (mDCs) acquire the capabilities to process and present the captured antigens and migrate to lymph nodes, where they activate antigen-specific T lymphocytes, thereby initiating the adaptive immune response against the infection (Alvarez et al. 2008). The migration of mDCs to lymph nodes is controlled by the CCR7-dependent activation of multiple G-protein-dependent signaling pathways, induced by the interaction between the CCR7 receptor and its chemokine ligands CCL21 and CCL19 (Randolph et al. 2008). Besides CCR7, accessory molecules, such as the ADP-ribosyl cyclase CD38 and the PGE2 receptors EP2 and EP4, affect mDC migration to secondary lymphoid organs, likely by regulating CCR7-associated signaling cascades (Randolph, Sanchez-Schmitz et al. 2005).

In independent studies, we and others have recently demonstrated that the presence of polysialic acid (PSA) 2,8-linked *N*-acetylneuraminic acid enhances the chemotaxis of monocyte-derived human mDCs toward CCL21 (Bax et al. 2009; Rey-Gallardo et al. 2010). Moreover, we found that chemotaxis toward CCL19 was not influenced by PSA (Rey-Gallardo et al. 2010). Consequently, the depletion of PSA from mDCs decreased CCL21- but not CCL19-mediated activation of the JNK and Akt signaling pathways, both of them associated with CCR7-dependent migration (Rey-Gallardo et al. 2010). Importantly, the enhancing effect of PSA on CCL21-driven chemotaxis was shown to depend on the highly basic C-terminal region present in CCL21 (Rey-Gallardo et al. 2010).

The cell surface expressed glycoprotein neuropilin-2 (NRP2) acts as a receptor for some members of the VEGF family and for a number of class 3 semaphorins (Pellet-Many et al. 2008). Thereby, NRP2 associates with VEGF receptors upon VEGF binding and enhances VEGF receptor activity and signaling (Geretti et al. 2008). Similarly, NRP2 acts as co-receptors for plexins and transmembrane receptors that activate signal transduction pathways upon SEMA3F binding (Shimizu et al. 2008). The interactions of NRP2 expressed in endothelial cells and some tumors with VEGF/SEMA3 are thought to be responsible of the assigned NRP2 roles in angiogenesis, cell migration and tumor progression (Bielenberg et al. 2006; Geretti et al. 2008; Pellet-Many et al. 2008).

¹To whom correspondence should be addressed: Tel: +34-91-8373112; Fax: +34-91-5627518; e-mail: mavega@cib.csic.es

NRP2 expression is induced during DC maturation, and it is known to carry PSA attached to *O*-linked glycans (Curreli et al. 2007). We have previously demonstrated that the siRNA-mediated knocking down of NRP2 in DCs, selectively decreases their chemotaxis toward CCL21 and thus identified NRP2 as a regulator of mDC migration (Rey-Gallardo et al. 2010).

To gain a deeper understanding of the molecular mechanisms that underlie the PSA enhancement of CCL21-driven mDC migration, we first investigated the overall expression of NRP2 and its isoforms in mDCs. Our data indicate that most mDCs expressing PSA also expressed NRP2 and that NRP2 appears in mDCs as two isoforms (NRP2a and NRP2b). We also demonstrate that both forms are the targets of polysialylation in mDCs and that their polysialylation is required for CCL21-stimulated mDC migration. Finally, in a xenograft mouse model, the migration of extra corporally human DCs to draining popliteal lymph nodes was visualized after subcutaneous injection into mouse footpads. This *in vivo* model clearly demonstrated that PSA on mDCs is essential for the efficient migration of these cells to secondary lymphoid organs.

Results

Human mDCs express the NRP2 isoforms, NRP2a and NRP2b, and both are the targets of the polysialyltransferase ST8SiaIV

To investigate the overall expression of polysialylated NRP2 on mDCs, we carried out flow cytometry analysis of mDCs stained with both anti-NRP2 and anti-PSA antibodies. As shown in Figure 1A, most of the PSA + DC population is also positive for NRP2 expression. This observation, which is consistent with previously published western blot analysis on PSA expression in mDCs (Curreli et al. 2007; Rey-Gallardo et al. 2010), strongly suggests that NRP2 is the most abundant polysialylated protein present on mDCs. Interestingly, the existence of a minor PSA + NRP2 – DC population indicates that besides NRP2, other polysialylated proteins must be present on mDCs.

The *NRP2* gene encodes several mRNA isoforms (Rossignol et al. 2000). Among these, there are two major transmembrane isoforms, designated as NRP2a and NRP2b, differing only in their transmembrane and cytoplasmic domains. To identify the NRP2 isoforms present in mDCs, we set up a RT-PCR assay to analyze their relative expression levels in human LPS-induced DCs (Figure 1B). We used as amplification controls for NRP2 in mDCs, cDNAs derived from RNA isolated from the tumor cell lines A375 and HEK293, which showed by flow cytometry analysis comparable cell surface expression levels of NRP2 to mDCs (Supplementary data, Figure S1). Expression of NRP2a and NRP2b isoforms in mDCs generated from several independent donors revealed that both isoforms were consistently detected in mDCs (Figure 1B). However, the NRP2a/NRP2b expression ratio was not equivalent for all donors, suggesting a donor-dependency the regulation of the relative expression of both isoforms. In the absence of specific antibodies to distinguish the NRP2a/NRP2b isoforms, the small difference in size between both isoforms (NRP2a: 931 amino acids;

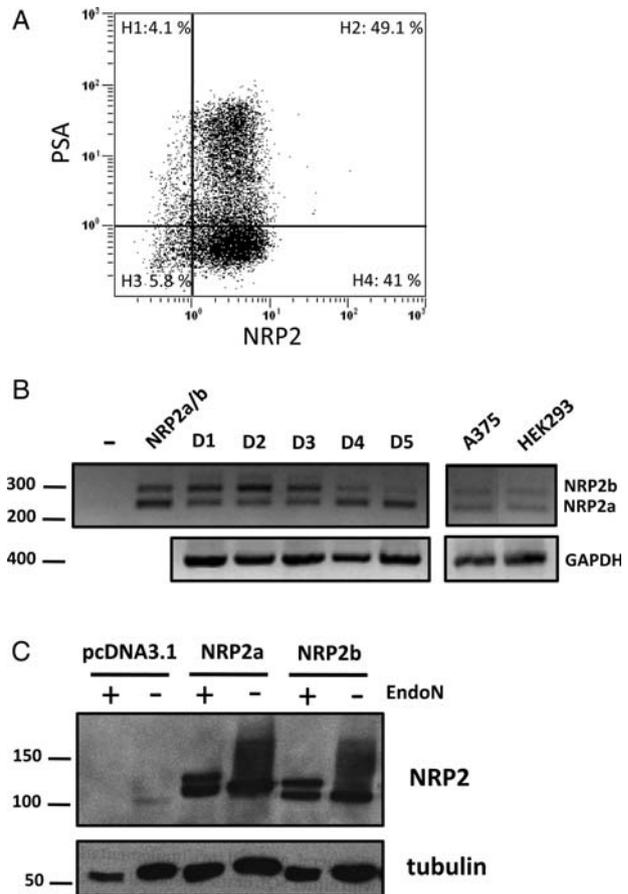


Fig. 1. Human mDCs express mRNA corresponding to the NRP2a and NRP2b isoforms, and both proteins are the targets of the polysialyltransferase ST8SiaIV. (A) Surface expression and density of PSA and NRP2 on mDCs. DCs were matured for 48 h with 100 ng/mL of LPS and were stained with antibodies to PSA and NRP2, and surface expression and staining intensity were analyzed by flow cytometry. Selected gates are indicated as H1–H4. The percentage of cells in each gate is also indicated. A representative dot plot out of three is shown. (B) Human mDCs expressed mRNA from the NRP2a and NRP2b isoforms. Detection by RT-PCR of the NRP2a and NRP2b isoforms in DCs matured with LPS for 48 h and derived from five independent donors (indicated as D1–D5). cDNAs generated from A375 and HEK293 tumor cell lines were also amplified. A mixture of 20 pg of each pcDNA3.1-hygro-NRP2a and pcDNA3.1-hygro-NRP2b was used as both positive control and a control for the relative expression of both isoforms (indicated as NRP2a/b). A dash in the first lane denotes the negative control with water. GAPDH amplification of the samples analyzed for NRP2 is shown below. (C) NRP2a and NRP2b are targets of the polysialyltransferase ST8SiaIV. COS7 cells were co-transfected with pcDNA1-ST8SiaIV and either pcDNA-3.1-hygro (used as control), or pcDNA3.1-hygro-NRP2a, or of pcDNA3.1-hygro-NRP2b. Twenty-four hours after transfection, half of the transfected cells were treated with EndoN and the other half were left untreated, and NRP2 was detected in cell lysates by western blot. Blots were stripped and probed for tubulin levels as a control for protein loading.

NRP2b: 906 amino acids) precludes their identification at the protein level by western blot (data not shown). These results demonstrate that human mDCs express the mRNA corresponding to both the NRP2a and NRP2b isoforms. The involvement of NRP2 and PSA in the regulation of

CCL21-directed chemotaxis (Rey-Gallardo et al. 2010), and the fact that NRP2 can be found polysialylated in mDCs (Curreli et al. 2007; Rey-Gallardo et al. 2010), strongly suggest that regulation of mDC chemotaxis toward CCL21 requires polysialylated NRP2. To explore this assumption, we first investigated whether both NRP2 isoforms are targets of the ST8SiaIV, the only polysialyltransferase expressed in mDCs (Curreli et al. 2007). For this purpose, COS7 cells were co-transfected with expression vectors encoding for the ST8SiaIV and for either NRP2a or NRP2b. Twenty-four hours after transfection, one half of the cells were treated with EndoN and the second half were left untreated, and NRP2 protein expression was analyzed in cell lysates by western blotting. As shown in Figure 1C, treatment of both the NRP2a and NRP2b transfected cells with EndoN caused the disappearance of the smear band displayed with the NRP2 antibody and revealed a smaller in size discrete band. This change in mobility is a feature consistent with the removal of PSA from the carrier protein by EndoN. Identical results were obtained when human K562 cells were used (Supplementary data, Figure S2). Taken together, these results indicate that both NRP2a and NRP2b are targets of the polysialyltransferase ST8SiaIV.

NRP2a and NRP2b must be polysialylated to regulate CCL21-driven chemotaxis in mDCs

We next investigated whether both NRP2 isoforms are also polysialylated in mDCs and whether the control of mDC migration toward the CCL21 and CCL19 chemokines requires their polysialylation. Therefore, immature DCs were nucleofected with expression vectors encoding for NRP2a and NRP2b, respectively, or with an empty control vector. The cells were matured in the presence of LPS for 18 h, and then used for in vitro chemotaxis assays. An 18 h maturation time was chosen to limit as much as possible the up-regulation and polysialylation of endogenous NRP2, but allowing the detection of the recombinant nucleofected NRP2. In this respect, and as evidenced through investigation of the kinetics of expression of NRP2 along DC maturation, although NRP2 protein expression started to appear 12 h after the addition of the maturation stimulus, polysialylation was only observed later on (Figure 2A). By flow cytometry using anti-NRP2 and anti-PSA antibodies, mDCs transfected with either NRP2a or NRP2b were found to express higher NRP2 and PSA levels than mDCs transfected with a control plasmid (Figure 2B). Treatment with EndoN fully removed the PSA without altering the expression of NRP2 (Figure 2B). Identical results were obtained in the western blot analysis shown in Figure 2C. Cells transfected with NRP2 isoforms show stronger NRP2 signals before and after EndoN treatment of samples, and a wider NRP2 band smear (indicative of PSA content and observed in the EndoN-untreated samples) with respect to cells nucleofected with the control vector. In summary, these results strongly indicate that, as expected on the basis of the experiments carried out in COS7 cells, both NRP2a and NRP2b are polysialylated in mDCs.

Finally, to determine whether the polysialylation of NRP2a and NRP2b influences mDC chemotaxis, mDCs overexpressing the NRP2 isoforms were used in chemotaxis

experiments. Overexpression of each of the two NRP2 isoforms resulted in an enhancement of the CCL21-driven chemotaxis. In contrast, no influence in the response to CCL19 was observed (Figure 2D). Interestingly, the removal of PSA by EndoN treatment of DC nucleofected with either the control vector or the NRP2a/NRP2b vectors reduced to the similar basal levels their chemotaxis toward CCL21, without affecting the chemotaxis toward CCL19 (Figure 2D). In conclusion, these results indicate that both NRP2a and NRP2b enhance the CCL21-directed migration of mDCs with a comparable efficiency and that the reinforcing effect requires the presence of PSA on the NRP2 polypeptide chain.

PSA controls DC migration in vivo

To investigate the in vivo relevance of the above-described PSA-mediated enhancement of CCL21-driven chemotaxis, we assayed the migration of human mDCs to lymph nodes in a xenograft mouse model. Thereby, we made use of an experimental setup earlier shown by Helfer et al. (2010) and by Briley-Saebo et al. (2010) to preserve the migratory potential of human mDCs in vivo.

mDCs generated from independent donors to be used for the in vivo adoptive transfer experiment were treated with EndoN or left untreated (Figure 3A) and tested for their ability to migrate in vitro toward mouse CCL21 and CCL19. As previously observed for human chemokines, the removal of PSA from mDCs by EndoN treatment reduced their in vitro chemotaxis toward murine CCL21, but not toward mouse CCL19 (Figure 3B). Simultaneously to the in vitro chemotaxis experiments, untreated or EndoN-treated CFSE-labeled human mDCs were also injected into distinct footpads of C57BL/6 mice. By flow cytometry, their presence in popliteal lymph nodes was analyzed 18 h after injection. This time is long enough to allow DCs to reach the draining lymph nodes, as previously reported (Briley-Saebo et al. 2010; Helfer et al. 2010) and is short enough to limit endogenous re-expression of PSA in the EndoN-treated DCs, as shown before (Rey-Gallardo et al. 2010) and for the development of an adaptive immune response against the human DCs graft.

Quantification of the number of CFSE-labeled DCs present in lymph nodes revealed in average six times more grafted cells if mDCs expressed PSA (Figure 3C and D). This finding, which perfectly correlates with the contribution of PSA to mDC migration as denoted in the in vitro chemotaxis experiments discussed above (Figure 2D and 3D), strongly indicates that PSA controls in vivo mDC migration to lymph nodes.

Discussion

In this work, we provide experimental evidences indicating that NRP2 is likely the most abundant polysialylated protein present in mDCs. We have also found out that NRP2 is found in human mDCs as two isoforms, NRP2a and NRP2b, that both NRP2 forms can be polysialylated and that their overexpression in DCs specifically enhances DC migration toward CCL21. Interestingly, the enhancement effect was abolished when mDCs overexpressing NRP2 isoforms were devoid of

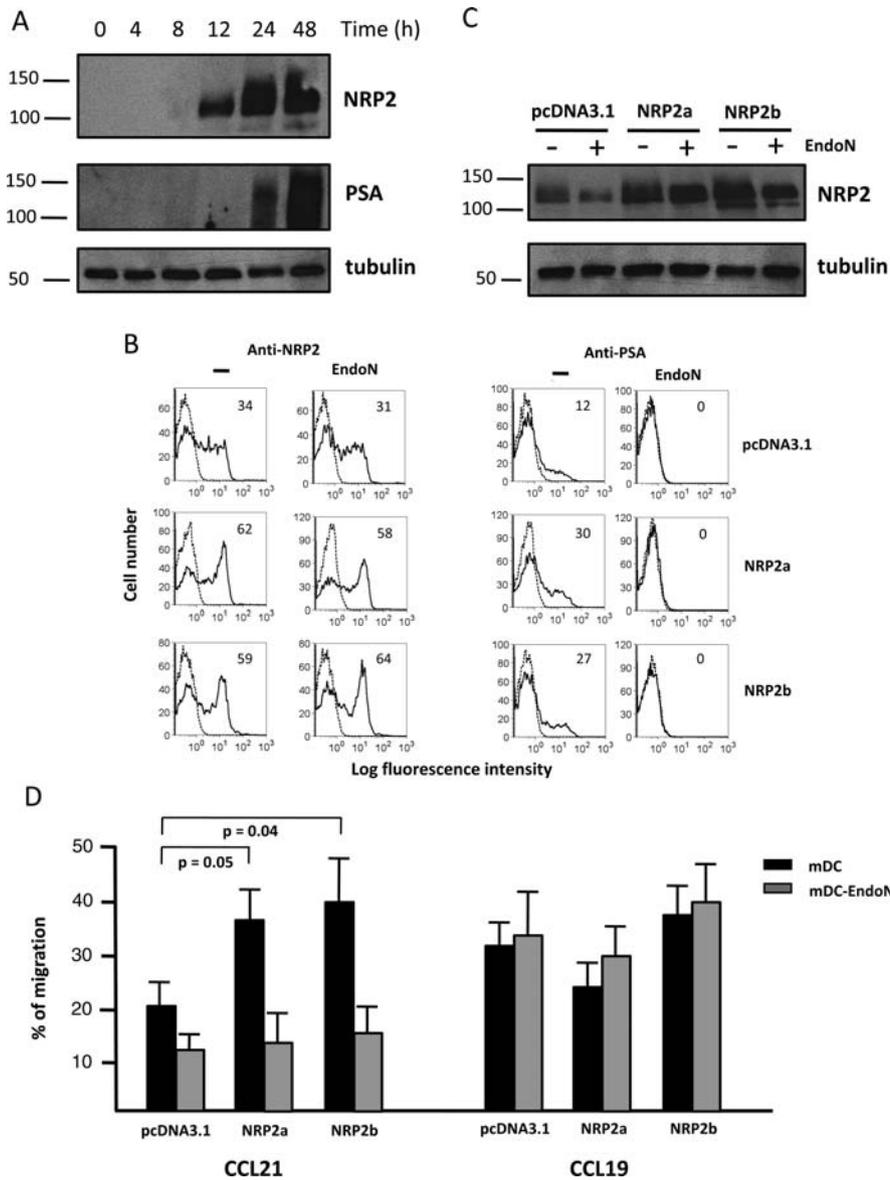


Fig. 2. NRP2a and NRP2b must be polysialylated to regulate CCL21-driven chemotaxis in DCs. (A) Time course of NRP2 and PSA expression during DC maturation. LPS was added to immature DCs, and cell lysates were obtained at the indicated times and analyzed by western blot by using antibodies against NRP2, PSA and tubulin (for control of protein loading). A representative experiment out of two performed is shown. (B) Cell surface expression of NRP2 and PSA on human DCs nucleofected with expression vectors encoding for NRP2a or NRP2b, or a control vector. Eighteen hours after transfection, half of the cells were treated with EndoN and the other half were left untreated and analyzed by flow cytometry by using antibodies against NRP2 or PSA (solid lines) or by control antibodies (dashed lines). Numbers inside graphs indicate the percentage of positive cells. A representative experiment out of three carried out is shown. (C) Overexpression of NRP2a and NRP2b in mDCs. Cell lysates were obtained from the DCs generated and treated as indicated in (B) and analyzed for NRP2 expression by western blot. Blots were stripped and probed for tubulin levels as a control for protein loading. A representative experiment out of three is shown. (D) Overexpression of NRP2a or NRP2b in human mDCs enhances migration in a PSA-dependent manner toward CCL21. Chemotaxis toward CCL21 and CCL19 chemokines was analyzed in DCs generated and treated as indicated in (B). Average percentages of migration toward 200 ng/mL of human CCL21 or CCL19 of untreated (black bars) and EndoN-treated human mDCs (gray bars) nucleofected with the expression vectors indicated in the x-axis are represented. Data were derived from three independent donors. Mean values and SEM are represented. Significant *P*-values are shown for the indicated pairs. No significant differences were found for the migration experiments using CCL19.

PSA after EndoN treatment. These results demonstrate the requirement of NRP2 polysialylation to mediate the enhancing effect on CCL21-directed chemotaxis.

Two major membrane bound NRP2 isoforms have been described, NRP2a and NRP2b, that result from alternative splicing and differ after amino acid 808 (Rossignol et al.

2000). NRP2b has only been described at the amino acid sequence level and, therefore, no data on NRP2b ligands and on the functional properties of this protein are yet available. Since both NRP2 isoforms share most of their extracellular domains, it is reasonable to expect that NRP2b, like NRP2a, binds VEGF and Sema3F (Zachary et al. 2009). On the other

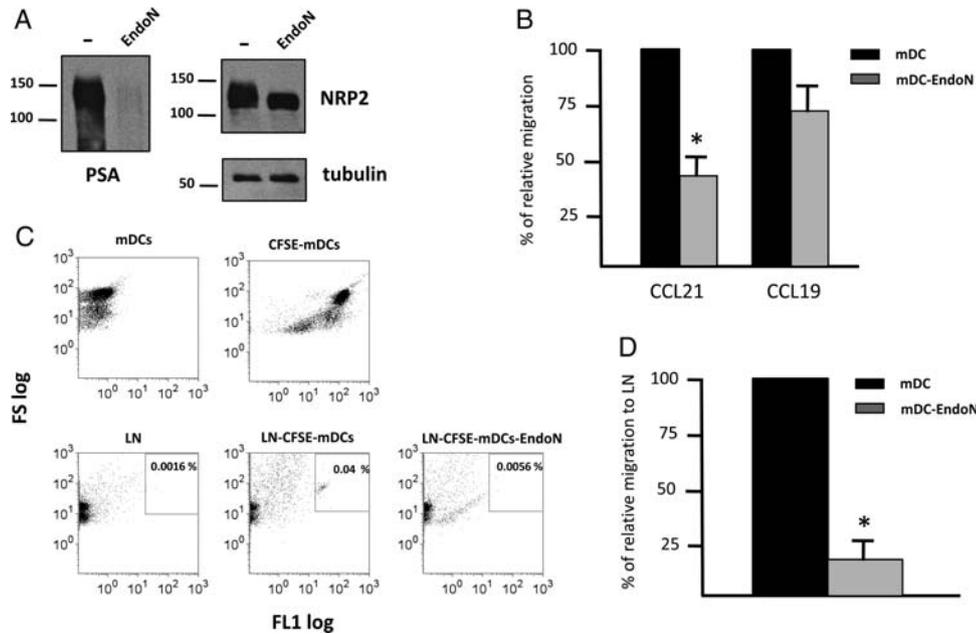


Fig. 3. PSA controls DC migration in vivo. (A) Removal of PSA from mDCs by EndoN treatment. DCs mature with LPS for 18 h were treated with EndoN or left untreated. Cell lysates were obtained and probed by western blotting with the antibodies 735 (anti-PSA), anti-NRP2 and anti-tubulin (for protein-loading control). The experiment shown is representative of three independent experiments. (B) Migration of human mDCs toward mouse chemokines. Average percentages of migration to 200 ng/mL of mouse CCL21 and CCL19 of untreated (black bars) and EndoN-treated human mDCs (gray bars) generated from three independent donors and mature with LPS for 18 h. Mean values and SEM are represented. Asterisk denotes $P < 0.05$. (C) In vivo migration of human DCs to draining popliteal lymph nodes. (Upper panel) FL1–FS dot plots of unlabeled and CFSE-labeled human DCs mature with LPS for 18 h. The dot plot for CFSE-labeled DCs was used to select the collecting gate for the experiments using lymph node cell suspensions and shown in the lower panel. (Lower panel) FL1–FS dot plots of cells in the popliteal lymph node isolated from a noninjected mouse (left panel), from a mouse injected with CFSE-labeled mDCs (middle panel) and from a mouse injected with EndoN-treated CFSE-labeled DCs in the opposite foodpad (right panel). Numbers inside the selected gates indicated the percentage of CFSE-labeled DCs with respect to the total number of cells in the lymph node. A representative experiment out of three using DCs generated from independent donors is shown. (D) Average relative migration to lymph nodes of CFSE-labeled untreated (black bar) and EndoN-treated (gray bar) DCs. Data were derived from three independent donors. SEM are represented. Asterisk denotes $P < 0.05$.

hand, the two proteins are largely different in their transmembrane and cytoplasmic regions (Rossignol et al. 2000), implying different functions upon ligand binding (Zachary et al. 2009). NRP2a for instance has a C-terminal PDZ domain recognition sequence in its cytoplasmic domain which might dictate its interaction with synectin, a protein that binds to G-protein-coupled receptors and modulates signaling. Although beyond the scope of the current study, an important question to answer in the future is whether polysialylated NRP2a/NR2b maintain their capability to interact with VEGF and Sema3 ligands.

However, it is likely that the addition of PSA to NRP2a and NRP2b equips the molecules with new ligand-binding properties. Important in this regard is the demonstration that PSA added to its major carrier NCAM facilitates the interaction with basic neurotrophins, thus serving as a reservoir or a regulator of the concentration of neurotrophins (Kanato et al. 2008). Likewise, the similar behavior of NRP2a and NRP2b on mDC chemotaxis toward CCL21, which appears to be independent of their respective transmembrane/cytoplasmic regions, favors the hypothesis that PSA attached to NRP2 functions as a binding and not as a signaling, module for the CCL21 chemokine, increasing its local concentration and/or facilitating its presentation to the CCR7 receptor. The described interaction in vitro between PSA and CCL21 (Bax

et al. 2009) supports this view. Furthermore, this behavior is reminiscent of that of growth cone collapse mediated by the NRP2-homologous protein NRP1, and its ligand Sema3A, where the deletion of the cytoplasmic domain of NRP1 does not impair the Sema3A-induced growth cone collapse (Nakamura et al. 1998). An open question but certainly not trivial to answer is if NRP2a and NRP2b as well as their polysialylated forms have individual functions. One strategy to approach this complex question may be to study other mDC effector functions that are nonrelated to mDC migration (e.g. DC–T cell interactions could be differentially affected by the two NRP2 isoforms (Curreli et al. 2007).

Our experiments of adoptive transfer of human mDCs into a mouse xenograft model revealed a severe impairment of migration to draining lymph nodes of PSA-lacking human mDCs. The expression of NRP2 in most mDCs carrying PSA suggests that the impaired in vivo migration of DCs devoid of PSA could be largely attributed to polysialylated NRP2. Nevertheless, whether other putative polysialylated proteins could also contribute to either DC migration or other DC effector functions is an interesting issue that warrants further studies.

The attraction of mDCs to the lymph nodes is mostly influenced by CCL21, a chemokine present along all the lymphatic vasculature, whereas CCL19 is mainly expressed in lymph nodes (Randolph, Angeli et al. 2005).

Here, it is important to emphasize that PSA removal from mDCs seems to cause a greater impairment on *in vivo* mDC migration to lymph nodes than on *in vitro* chemotaxis toward CCL21, suggesting that the role of PSA in the control of mDCs migration *in vivo* might have more relevance than that previously argued on the basis of the *in vitro* chemotaxis experiments. This observation is of major relevance as the animal model system reflects the summary effect of the complexity of the *in vivo* system, where besides of chemotaxis, other processes like cell–cell and cell–extracellular matrix interactions are likely to affect cell migration. Important in this context, DC migration to lymph nodes requires also exit from the tissues via the afferent lymphatics and the transmigration across the lymphatic vessel endothelium, a process that is favored by the CCL21-mediated activation of LFA-1 in mDCs (Eich et al. 2010; Johnson and Jackson 2010). It seems allowed to hypothesize that the higher ability of PSA-bearing mDC to interact with CCL21 results in a greater LFA-1 activation, and therefore in an increased lymphatic transmigration of mDCs, finally leading to the elevated numbers of cells observed in the lymph nodes (Figure 3C and D).

The described role of PSA in disrupting cell–cell and cell–extracellular matrix interactions might also contribute to mDC migration in the *in vivo* setup (Yang et al. 1994; Johnson et al. 2005). In this regard, PSA coupled to NCAM has been suggested to modulate NCAM-mediated cell adhesion during development (Weinhold et al. 2005) and invasion of glioma cells in the brain (Suzuki et al. 2005). In addition, PSA has been reported to control migration of T cell progenitors from the bone marrow to the thymus by increasing their capacity to escape from the bone marrow niches (Drake et al. 2009). Therefore, it is tempting to speculate that PSA, besides regulating mDC chemotaxis toward CCL21, can also modulate other chemotaxis-independent processes involved in mDC migration to lymph nodes.

The use of the *in vivo* experimental setup that we report in this current study should constitute a suitable tool to test on how drugs targeted to control the expression and function of any of the components of the CCR7/CCL21/NRP2/ST8SialIV axis might affect human mDC migration. In summary, our data pointing out PSA as a crucial factor for mDC migration offer a new molecular approach to regulate mDC migration and thereby immunity.

Materials and methods

Reagents

Human and mouse CCL21 and CCL19 chemokines were obtained from PreproTech. Antibody against NRP2 was from R&D Systems. This antibody was used at 10 µg/mL for flow cytometry experiments and at 0.1 µg/mL for western blot. For PSA detection, the monoclonal antibody 735 was used (Frosch et al. 1985). Antibody 735 was used at 10 µg/mL for flow cytometry experiments and at 0.5 µg/mL for western blotting analysis. Antibody against tubulin was from Sigma. The following secondary antibodies were used: anti-mouse Igs/HRP (DakoCytomation) for western blotting analysis using antibody 735; goat anti-mouse IgG/FITC for flow cytometry analysis using antibody 735; donkey anti-mouse Cy5

(Jackson Laboratories) for double-staining flow cytometry analysis using antibody 735; donkey anti-goat IgG/HRP (Santa Cruz Biotechnology) for western blotting analysis using the NRP2 antibody; chicken anti-goat Alexa 488 (Invitrogen) for cytometry analysis using the NRP2 antibody. All of them were used at the concentrations recommended by the manufacturer. Plasmids pcDNA1-ST8SialIV and pcDNA3.1-hygro-NRP2a were kindly provided by Drs Minoru Fukuda and Gera Neufeld, respectively. EndoN was purified as described (Hallenbeck et al. 1987) and was generously provided by Dr. Urs Rutishauser.

Generation of monocyte-derived DCs

Monocyte-derived DCs were generated from peripheral blood mononuclear cells of healthy donors as described (Puig-Kroger et al. 2006). For maturation, immature DCs were treated with 100 ng/mL of LPS (*Escherichia coli* 0111: B4, InvivoGen) for the times indicated.

Flow cytometry analysis of mDCs double stained with PSA and NRP2 antibodies

Immature DCs were matured for 48 h with LPS at 100 ng/mL. Cells were collected and double stained for NRP2 and PSA (735 antibody) using as secondary antibodies chicken anti-goat Alexa 488 (Invitrogen) and donkey anti-mouse Cy5 (Jackson Laboratories), respectively. Appropriate isotype control antibodies were used to select plot gates. Stained cells were analyzed with a Beckman-Coulter FC500 cell analyzer.

RT-PCR for NRP2 isoform detection

cDNAs were synthesized using random hexanucleotides from RNA (isolated with RNeasy columns (Qiagen)) obtained from mDCs generated from either independent donors or the A375 and tumor cells lines using the High Fidelity cDNA synthesis Kit (Roche). NR2a and NRP2b were simultaneously amplified. The sense oligonucleotide 5'-GGAGTGATAGGGAAA GGACGTT-3' was used for the amplification of both NRP2a and NRP2b. The antisense oligonucleotides used were 5'-AA AAGAGCTGGCTGTACACCCT-3' for NRP2a and 5'-CAAG AAGACCGATCACTCCATC-3' for NRP2b. Amplification reactions were performed in the presence of 1 M betaine in the PCR cocktail to facilitate the denaturation of GC-rich regions and were performed according to the following thermal cycle: 30 s at 94°C, 30 s at 63°C and 20 s at 72°C for 35 cycles. The amplified fragments were resolved by agarose gel electrophoresis. Expected sizes of the PCR products were of 290 bp for NRP2b and 250 bp for NRP2a. Control PCRs were performed using oligonucleotides 5-GGCTGAGAA CGGGAAGCTTGTC-3 and 5-CGGCCATCACGCCACAG TTTC-3, which together amplify a 417-bp fragment from the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mRNA.

Construction of the expression vector encoding the NRP2b isoform

The entire open reading frame of human NRP2b was amplified by PCR from cDNA generated from human DCs mature with LPS for 48 h, using the following primers: sense: 5'-CGGAAGCTTCACCTTCTCCAAAATGGATATGTTTCT

CTCACC-3' and antisense: 5'-GGCTCTAGACCTCAGCAGTGCGAGCCACGGTC-3'. The amplification reaction was performed in the presence of 1 M betaine in the PCR cocktail to facilitate the denaturation of GC-rich regions. Amplification was performed according to the following thermal cycle: 30 s at 95°C, 30 s at 62°C and 60 s at 72°C for 10 cycles, followed by 30 s at 95°C, 30 s at 62°C and 60 s at 72°C (with 1 s of additional extension per cycle) for 25 cycles. The PCR product was subcloned into the *HindIII/XbaI* sites of pcDNA3.1-hygro vector (Invitrogen). The identity of NRP2b was confirmed by DNA sequencing.

Transfection of COS7 cells

COS7 cells cultured in 10 cm plates at 80% of confluence were co-transfected with 18 µg of pcDNA1-ST8SiaIV and either with 6 µg of pcDNA-3.1-hygro (used as control), with 6 µg of pcDNA3.1-hygro-NRP2a or with 6 µg of pcDNA3.1-hygro-NRP2b, using Lipofectamine 2000 as recommended by the manufacturer. Twenty-four hours later, cells were analyzed by flow cytometry and western blot.

Transfection of K562 cells

2×10^6 K562 cells were co-transfected with 2 µg of pcDNA1-ST8SiaIV and either with 2 µg of pcDNA3.1-hygro (used as control), with 2 µg of pcDNA3.1-hygro-NRP2a or with 2 µg of pcDNA3.1-hygro-NRP2b, using the Solution V nucleofector kit (Lonza), following the manufacturer's instructions.

EndoN treatment of DCs and transfected COS7 and K562 cells

mDCs, COS7 or K562 cells at 2×10^6 cells/mL were incubated for 1 h at 37°C with either 20 U of EndoN at 1 U/µL or an equal volume of PBS/glycerol in RPMI 1640, with occasional shaking. Afterward, cells were washed with complete medium. PSA removal after EndoN treatment was tested by western blotting, and when indicated by flow cytometry using the monoclonal antibody 735.

Nucleofection of NRP2a and NRP2b expression plasmids in DCs

4×10^6 immature DCs were transfected with 5 µg of plasmid (pcDNA3.1-hygro or pcDNA3.1-hygro-NRP2a or pcDNA3.1-hygro-NRP2b) using the Lonza human dendritic cell nucleofector kit, following the manufacturer's instructions. One hour later, DCs were matured by the addition of 100 ng/mL of LPS. In vitro chemotaxis assays were carried out 18 h later. Protein expression levels for NRP2 were assayed by flow cytometry and western blotting using the anti-NRP2 antibody. PSA expression levels were monitored by using antibody 735.

CFSE labeling of DCs

Untreated or EndoN-treated DCs at 1×10^6 cells/mL were incubated in PBS + 0.1% BSA with 1 µM CFSE (Invitrogen) for 30 min at 37°C. Labeling was stopped by the addition of five volumes of complete culture medium at 4°C and incubation for 5 min on ice. After two washes, cells were resuspended in

PBS for flow cytometry analysis or in RPMI 1640 for the in vivo migration assays.

In vivo migration assay

2×10^6 CFSE-labeled mDCs treated or untreated with EndoN were resuspended in 25 µL of RPMI 1640 and injected subcutaneously in distinct footpads of C57BL/6 mice. Eighteen hours later, animals were killed and the draining popliteal lymph nodes were extracted. Single-cell suspensions were prepared by mechanical disaggregation and analyzed by flow cytometry to identify CFSE-labeled cells.

Western blotting

For western blotting analysis, 10 µg each cell lysates were subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and transferred onto an Immobilon polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). Western blots were developed with appropriate HRP-conjugated secondary antibodies and an ECL substrate (Pierce) detection system.

In vitro chemotaxis assays

Chemotaxis experiments of DCs toward human and mouse chemokines CCL21 and CCL19 were performed as described (Rey-Gallardo et al. 2010). All chemokines were used at 200 ng/mL.

Statistical analysis

Statistical analyzes were performed using the paired Student's *t*-test.

Supplementary data

Supplementary data for this article is available online at <http://glycob.oxfordjournals.org/>.

Funding

This work was supported by research grant from Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo (FIS-PI0708879 to M.A.V.), and from Genoma España (MEICA project).

Acknowledgements

We thank Prof. Angel L. Corbí (CIB, Madrid, Spain) for critical reading of the manuscript.

Conflict of interest

None declared.

Abbreviations

DC, dendritic cell; PSA, polysialic acid; NRP2, neuropilin-2; LPS, Lipopolysaccharide; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; PBS, phosphate buffer saline; CFSE, carboxyfluorescein succinimidyl ester; SDS-PAGE,

sodium docecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis; HRP, horseradish peroxidase.

References

- Alvarez D, Vollmann EH, von Andrian UH. 2008. Mechanisms and consequences of dendritic cell migration. *Immunity*. 29:325–342.
- Bax M, van Vliet SJ, Litjens M, Garcia-Vallejo JJ, van Kooyk Y. 2009. Interaction of polysialic acid with CCL21 regulates the migratory capacity of human dendritic cells. *PLoS One*. 4:e6987.
- Bielenberg DR, Pettaway CA, Takashima S, Klagsbrun M. 2006. Neuropilins in neoplasms: Expression, regulation, and function. *Exp Cell Res*. 312:584–593.
- Briley-Saebo KC, Leboeuf M, Dickson S, Mani V, Fayad ZA, Palucka AK, Banchereau J, Merad M. 2010. Longitudinal tracking of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. *Magn Reson Med*. 64:1510–1519.
- Curreli S, Arany Z, Gerardy-Schahn R, Mann D, Stamatou NM. 2007. Polysialylated neuropilin-2 is expressed on the surface of human dendritic cells and modulates dendritic cell-T lymphocyte interactions. *J Biol Chem*. 282:30346–30356.
- Drake PM, Stock CM, Nathan JK, Gip P, Golden KP, Weinhold B, Gerardy-Schahn R, Bertozzi CR. 2009. Polysialic acid governs T-cell development by regulating progenitor access to the thymus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106:11995–12000.
- Eich C, de Vries IJ, Linssen PC, de Boer A, Boezeman JB, Figdor CG, Cambi A. 2010. The lymphoid chemokine CCL21 triggers LFA-1 adhesive properties on human dendritic cells. *Immunol Cell Biol*. 88:1194–1198.
- Frosch M, Gorgen I, Boulnois GJ, Timmis KN, Bitter-Suermann D. 1985. NZB mouse system for production of monoclonal antibodies to weak bacterial antigens: Isolation of an IgG antibody to the polysaccharide capsules of *Escherichia coli* K1 and group B meningococci. *Proc Natl Acad Sci USA*. 82:1194–1198.
- Geretti E, Shimizu A, Klagsbrun M. 2008. Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis. *Angiogenesis*. 11:31–39.
- Hallenbeck PC, Vimr ER, Yu F, Bassler B, Troy FA. 1987. Purification and properties of a bacteriophage-induced endo-N-acetylneuraminidase specific for poly-alpha-2,8-sialosyl carbohydrate units. *J Biol Chem*. 262:3553–3561.
- Helfer BM, Balducci A, Nelson AD, Janjic JM, Gil RR, Kalinski P, de Vries IJ, Ahrens ET, Mailliard RB. 2010. Functional assessment of human dendritic cells labeled for in vivo (19)F magnetic resonance imaging cell tracking. *Cytotherapy*. 12:238–250.
- Johnson CP, Fujimoto I, Rutishauser U, Leckband DE. 2005. Direct evidence that neural cell adhesion molecule (NCAM) polysialylation increases intermembrane repulsion and abrogates adhesion. *J Biol Chem*. 280:137–145.
- Johnson LA, Jackson DG. 2010. Inflammation-induced secretion of CCL21 in lymphatic endothelium is a key regulator of integrin-mediated dendritic cell transmigration. *Int Immunol*. 22:839–849.
- Kanato Y, Kitajima K, Sato C. 2008. Direct binding of polysialic acid to a brain-derived neurotrophic factor depends on the degree of polymerization. *Glycobiology*. 18:1044–1053.
- Nakamura F, Tanaka M, Takahashi T, Kalb RG, Strittmatter SM. 1998. Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse. *Neuron*. 21:1093–1100.
- Pellet-Many C, Frankel P, Jia H, Zachary I. 2008. Neuropilins: Structure, function and role in disease. *Biochem J*. 411:211–226.
- Puig-Kroger A, Dominguez-Soto A, Martinez-Munoz L, Serrano-Gomez D, Lopez-Bravo M, Sierra-Filardi E, Fernandez-Ruiz E, Ruiz-Velasco N, Ardavin C, Groner Y, et al. 2006. RUNX3 negatively regulates CD36 expression in myeloid cell lines. *J Immunol*. 177:2107–2114.
- Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA. 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol*. 5:617–628.
- Randolph GJ, Ochando J, Partida-Sanchez S. 2008. Migration of dendritic cell subsets and their precursors. *Annu Rev Immunol*. 26:293–316.
- Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Angeli V. 2005. Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: Recent advances. *Springer Semin Immunopathol*. 26:273–287.
- Rey-Gallardo A, Escibano C, Delgado-Martin C, Rodriguez-Fernandez JL, Gerardy-Schahn R, Rutishauser U, Corbi AL, Vega MA. 2010. Polysialylated neuropilin-2 enhances human dendritic cell migration through the basic C-terminal region of CCL21. *Glycobiology*. 20:1139–1146.
- Rossignol M, Gagnon ML, Klagsbrun M. 2000. Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: Identification and distribution of splice variants and soluble isoforms. *Genomics*. 70:211–222.
- Shimizu A, Mammoto A, Italiano JE, Jr., Pravda E, Dudley AC, Ingber DE, Klagsbrun M. 2008. ABL2/ARG tyrosine kinase mediates SEMA3F-induced RhoA inactivation and cytoskeleton collapse in human glioma cells. *J Biol Chem*. 283:27230–27238.
- Steinman RM, Banchereau J. 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature*. 449:419–426.
- Suzuki M, Nakayama J, Suzuki A, Angata K, Chen S, Sakai K, Hagihara K, Yamaguchi Y, Fukuda M. 2005. Polysialic acid facilitates tumor invasion by glioma cells. *Glycobiology*. 15:887–894.
- Weinhold B, Seidenfaden R, Rockle I, Muhlenhoff M, Schertzinger F, Conzelmann S, Marth JD, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H. 2005. Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule. *J Biol Chem*. 280:42971–42977.
- Yang P, Major D, Rutishauser U. 1994. Role of charge and hydration in effects of polysialic acid on molecular interactions on and between cell membranes. *J Biol Chem*. 269:23039–23044.
- Zachary IC, Frankel P, Evans IM, Pellet-Many C. 2009. The role of neuropilins in cell signalling. *Biochem Soc Trans*. 37:1171–1178.