



Mecanismos autofágicos no convencionales  
implicados en la regulación del tráfico endocítico  
y la señalización celular

Tesis doctoral

**INMACULADA SERRAMITO GÓMEZ**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y CELULAR DEL CÁNCER  
CSIC-UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
Salamanca, noviembre 2019





Dr. Felipe Xosé Pimentel Muiños, Científico Titular del Consejo de Investigaciones Científicas y miembro del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer (IBMCC), centro mixto CSIC-Universidad de Salamanca,

#### CERTIFICA

Que la presente Tesis Doctoral titulada “Mecanismos autofágicos no convencionales implicados en la regulación del tráfico endocítico y la señalización celular” presentada por Dña. Inmaculada Serramito Gómez, ha sido realizada bajo su dirección en el IBMCC, y reúne, a su juicio, la originalidad y los contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctora por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca a 13 de noviembre de 2019.

Fdo.: Dr. Felipe X. Pimentel Muiños

La financiación para la realización de este trabajo de tesis doctoral procede de proyectos concedidos por el Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2014-53320-R y SAF2017-88390-R), Broad Medical Foundation (IBD-0369), Junta de Castilla y León (FIC016U14, SA042P17), Asociación Española Contra el Cáncer (Ideas Semilla AECC 2018) y Fundación Solórzano (FS18/2014). La doctoranda Dña. Inmaculada Serramito Gómez ha recibido financiación de la Fundación de Investigación del Cáncer de la Universidad de Salamanca (FICUS), mediante la convocatoria de la Fundación Dr. Moraza para la Retención del Talento en Investigación en Cáncer en la Universidad de Salamanca (REF: BEC-MORAZA-14, 2014-2018). A la doctoranda se le concedió un contrato de extensión de tesis doctoral de un año de duración (diciembre 2018-diciembre 2019), en el marco de la Convocatoria de Ayudas destinadas a Financiar Planes Estratégicos y Programas Estratégicos de Investigación, ejecutados por las estructuras de investigación de excelencia, en el marco de la Estrategia Regional de Investigación e Innovación, para una especialización inteligente (RIS3) de Castilla y León 2014-2020 que está cofinanciada por la Consejería de Educación de la Junta de Castilla y León y el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Código CLC-2017-01) (REF: 18-26-XBUTS).







Finaliza una etapa. Una etapa en la que he crecido científica, pero, sobre todo, personalmente. Por eso quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos los que habéis hecho posible esta tesis doctoral. Este trabajo es vuestro. Si he madurado emocionalmente ha sido gracias a vuestros ánimos y valiosos consejos. Cierro este capítulo reconociendo que he aprendido, junto a todos vosotros, grandes lecciones de vida.

Gracias a mi director de tesis, Felipe, por haberme enseñado a hacer ciencia con rigor y transparencia, y por ofrecerme la oportunidad de formar parte de un proyecto que ha sido, en definitiva, un grato desafío para mí.

Gracias a mis compañeros del laboratorio, que me han hecho pasar tan buenos ratos a su lado. Especialmente a Raquel, que ha sido uno de los mayores pilares de mi vida desde que llegó a ella. No existen palabras suficientes para agradecerte tu apoyo, cariño y comprensión. Eres una de esas increíbles personas que vienen al mundo en extrañas ocasiones, con la que yo he tenido la inmensa suerte de coincidir. Gracias a Álvaro, por hacerme desconectar siempre y, al mismo tiempo, por haber conectado tan bien conmigo. A Rachid, que siempre guarda una pregunta imprevista en el tintero. A JL, que ha sido un gran compañero de pasillo y un gran consejero. A Elena, a quién deseo muchísima suerte en esta etapa que acaba de empezar. A Claudia y a Ángela, por su buena disposición y por inundar siempre el laboratorio de buen humor. Y a todos los chicos y chicas de prácticas, grado y máster, por todas las anécdotas que me habéis dejado, pero, sobre todo, por todo lo que me habéis enseñado.

Gracias a mis antiguos compañeros del L18. A Emilio, que me enseñó todo lo que sé de ciencia. Pero no sólo los protocolos y las técnicas, sino también a lidiar con la frustración del día a día y a sacar ánimos para afrontar cada etapa con ilusión. Gracias por transmitirme tu pasión por la ciencia y por no dejarme desfallecer nunca durante mi primera etapa en el laboratorio. Y gracias a Cris, de la que tanto admiro su valentía y con quien tan buenos ratos he pasado.

Gracias a Miguel, por los ánimos y la fuerza que me transmites siempre. Por tu risa contagiosa y, sobre todo, por tu integridad y empatía. Espero que tu pasión por la ciencia no se agote nunca, porque resulta verdaderamente inspiradora para mí.

Gracias a todos mis compañeros de cuarto de cultivos: Andrea, Macarena, Jose, Pedro, Cris, Luis, Sara Ortiz... Con vosotros he compartido confidencias, pero, sobre todo, muchas risas en los momentos en los que más lo necesitaba. Vale que nunca nos haya tocado el cumpleaños de los 1000 euros de Cadena Cien, pero me llevo momentos fantásticos del trabajo diario.

Gracias a todo el personal de servicios del CIC, especialmente a Sonia y Eugenia de almacén, Rosario de Cocina, Carlos de Mantenimiento y Manolo de Secuenciación del departamental. No sabéis cuánto me habéis facilitado las cosas y lo importante que es vuestra tarea para todos nosotros. Y bueno, hay un servicio al que estoy especialmente agradecida, el Servicio de Microscopía Confocal/Gabinete de Psicología del CIC. Ana, Ángel y Sara: no sólo sois unos excelentes profesionales y compañeros, sois una de las principales razones por las que esta tesis

doctoral ha visto la luz. Porque siempre que he necesitado desahogarme, habéis estado ahí. Y porque vuestros ánimos y confianza en mí han sido fundamentales en mi desarrollo emocional.

A las chicas del laboratorio 15, por todas las risas que nos hemos echado en los pasillos y en la cámara oscura. A Nacho, del laboratorio 4, siempre dispuesto a echarme una mano y darme fuerzas. A Avelino y María, por todo el ánimo que me han transmitido durante la realización de la tesis. Y gracias a todos los que habéis pasado con una sonrisa por el CIC, porque seguro que habéis alegrado muchos de mis días aquí.

Gracias a Elena, mi chica de Santander, por estar siempre al otro lado del teléfono. Por ser una de las personas de mayor confianza en mi vida, pese a los muchos meses que pasen entre quedada y quedada. Y porque las dos empezamos una nueva etapa y ¡va a ser genial!

Gracias a Nieves y a Elena por su apoyo incondicional, porque siempre me han hecho sentir como en casa, arropada y comprendida. A Juan, que me tiene que perdonar por no estar al día del último avance tecnológico que nos va a hacer millonarios, por todo lo que me ha hecho reír y porque es un amigo con el que se puede contar.

Gracias a mi gente de Galicia. A todos mis amigos de la banda: Martín, Alejandro, María, Daniel, Pedro, Moisés, Roi, Antía, Sara, Fran, María... por hacerme sentir siempre en casa pese a la distancia que nos separa desde hace más de 11 años. Especialmente, gracias a Raquel, por su apoyo incondicional. Por estar a mi lado durante las grandes y pequeñas decisiones de mi vida, durante los momentos buenos y los no tan buenos. Contigo he aprendido el valor de la amistad sincera, sin prejuicios ni cuestionamientos.

Pero, sobre todo, gracias a mis padres, que a lo largo de mi vida han sido mi mayor apoyo y un ejemplo a seguir. Porque me han inculcado que no importa de dónde vengas, puesto que con esfuerzo y sacrificio uno puede llegar a sitios que parecían inalcanzables, siendo fiel a tus principios y valores. Y, además del apoyo incondicional de mis padres, he tenido la suerte de contar con el amor y comprensión de mi madrina y mi tía. Ellas estarán orgullosas de mí, pero yo lo estoy más de ellas. Y mi hermano Manuel, mi polo opuesto, que me hace ver la vida desde una perspectiva más favorable. Al resto de mi familia, que siempre habéis confiado en mí, gracias.

Y, por último, al que no quería aparecer en estos agradecimientos, a Jesús. Pues apareces. Gracias por habérmelo puesto tan fácil durante estos cinco años de tesis. Por ajustar tu vida a mis pocos momentos libres y por mantenerte incondicionalmente a mi lado. Y el resto ya lo sabes.

Gracias a todos, porque vuestro es este trabajo. Me considero una persona afortunada de poder compartir mi vida con vosotros, porque como dijo alguien más sabio que yo “Hay almas a las que uno tiene ganas de asomarse, como a una ventana llena de sol”.

Y sí, lo dijo Lorca, quién si no.

“La vida no es fácil, para ninguno de nosotros. Pero... ¡qué importa! Hay que perseverar y, sobre todo, tener confianza en uno mismo. Hay que sentirse dotado para realizar alguna cosa y que esa cosa hay que alcanzarla, cueste lo que cueste.”

---

Marie Curie



*A mis padres.*

*A Jesús.*





<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN A LA AUTOFAGIA</b> .....	<b>3</b>
1.1. DEFINICIÓN .....	3
1.2. MODALIDADES DE AUTOFAGIA .....	4
<b>2. LA MAQUINARIA AUTOFÁGICA EN EUCARIOTAS SUPERIORES</b> .....	<b>5</b>
2.1. INDUCCIÓN: mTORC1 COMO NODO FUNDAMENTAL EN AUFAGIA CANÓNICA .....	6
2.2. GENERACIÓN DEL AUTOFAGOSOMA .....	7
2.2.1. Iniciación .....	7
2.2.2. Nucleación. Formación del fagóforo .....	8
2.2.3. Elongación del fagóforo .....	9
2.2.4. Maduración del autofagosoma y fusión con el lisosoma .....	10
<b>3. LOS FENÓMENOS DE AUTOFAGIA NO CANÓNICA</b> .....	<b>13</b>
<b>4. SELECTIVIDAD DEL PROCESO DE AUTOFAGIA</b> .....	<b>15</b>
4.1. FAGOCITOSIS ASOCIADA A LC3 (LAP) .....	16
4.2. XENOFAGIA .....	16
4.3. AGREFAGIA .....	17
4.4. MITOFAGIA .....	17
4.5. PEXOFAGIA .....	18
4.6. OTROS SUBTIPOS DE AUTOFAGIA SELECTIVA .....	18
<b>5. IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS DE LA AUTOFAGIA</b> .....	<b>19</b>
5.1. TUMOROGÉNESIS .....	19
5.2. NEURODEGENERACIÓN .....	20
5.3. DESARROLLO .....	21
5.4. INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA .....	21
5.5. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (IBD) .....	22
<b>6. ETIOLOGÍA MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (IBD)</b> .....	<b>24</b>
6.1. ATG16L1 .....	24
6.1.1. Estructura de ATG16L1 .....	24
6.1.2. El dominio WDD de ATG16L1. Estructura .....	25
6.1.3. El dominio WDD de ATG16L1. Función .....	25
6.1.4. El polimorfismo ATG16L1-A300 y enfermedad de Crohn .....	27
6.2. RECEPTORES TIPO NOD Y ENFERMEDAD DE CROHN .....	29
6.3. INTERLEUCINA 10 (IL-10) .....	30
6.3.1. Estructura y función de IL-10 .....	30
6.3.2. Implicaciones fisiopatológicas de IL-10 .....	33
6.3.3. IL-10 y macrófagos .....	34
6.4. INTERLEUCINA 31 (IL-31) .....	34

# ÍNDICE

<b>7. PROTEÍNA INDUCIDA POR TNF-<math>\alpha</math> (TNAFIP3/A20)</b> .....	<b>36</b>
7.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE A20 .....	36
7.2. IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS DE A20 .....	38
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>41</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>45</b>
<b>1. CULTIVO CELULAR</b> .....	<b>47</b>
1.1. LÍNEAS CELULARES .....	47
1.2. CONDICIONES DE CULTIVO CELULAR.....	48
1.3. MANTENIMIENTO DE CÉLULAS.....	48
1.4. ALMACENAMIENTO Y DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES .....	49
1.5. SIEMBRA DE CÉLULAS EN PLACA.....	50
<b>2. MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN</b> .....	<b>50</b>
2.1. MÉTODO BASADO EN LÍPIDOS (JETPEI).....	50
2.2. MÉTODO DE PRECIPITACIÓN CON FOSFATO CÁLCICO .....	51
<b>3. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES</b> .....	<b>52</b>
3.1. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES VÍA RETROVIRAL.....	52
3.2. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES VÍA LENTIVIRAL.....	53
<b>4. PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR</b> .....	<b>53</b>
4.1. AMPLIFICACIÓN DEL DNA MEDIANTE PCR .....	53
4.1.1. Diseño de oligonucleótidos (primers o cebadores).....	54
4.1.2. Condiciones de PCR.....	54
4.1.3. Análisis y procesamiento del producto de PCR.....	55
4.2. ANILLAMIENTO Y FOSFORILACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA CLONACIÓN DE FRAGMENTOS CORTOS DE DNA.....	56
4.3. DIGESTIÓN MEDIADA POR ENZIMAS DE RESTRICCIÓN .....	56
4.4. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA.....	57
4.5. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES.....	58
4.6. CULTIVO LÍQUIDO Y GENERACIÓN DE DNA PLASMÍDICO A GRAN ESCALA.....	59
4.6.1. Pre-cultivo líquido y minipreparación diagnóstica .....	59
4.6.2. Digestión diagnóstica.....	59
4.6.3. Secuenciación .....	60
4.6.4. Cultivo de DNA plasmídico a gran escala: midi y maxipreparaciones.....	60
4.7. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA.....	60
4.8. PANEL DE PLÁSMIDOS UTILIZADOS.....	62
4.8.1. Etiquetas peptídicas.....	62
4.8.2. Etiquetas proteicas.....	62
4.8.3. Sistema de expresión pEAK 12/8 o p12/8 .....	62
4.8.4. Sistema de expresión pCDNA3 .....	65

4.8.5. Sistema de expresión retroviral p12-MMP.....	66
4.8.6. Sistema de expresión retroviral SB0001.4.....	69
4.8.7. Sistema de expresión lentiviral CRISPR-Cas9.....	69
<b>5. LISIS CELULAR.....</b>	<b>70</b>
5.1. LISIS EN BUFFER NP40.....	70
5.2. LISIS EN BUFFER SB2x.....	71
5.3. FRACCIONAMIENTO CELULAR.....	72
5.4. MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN EXTRACTOS CELULARES.....	72
<b>6. WESTERN BLOT.....</b>	<b>72</b>
6.1. ELECTROFORESIS SDS-PAGE.....	72
6.2. TRANSFERENCIA HÚMEDA.....	73
6.3. BLOQUEO E INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS PRIMARIOS.....	74
6.4. INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS SECUNDARIOS Y REVELADO.....	74
<b>7. CO-INMUNOPRECIPITACIONES (COIPs).....</b>	<b>75</b>
7.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS.....	75
7.2. PRE-LAVADO Y CO-INMUNOPRECIPITACIÓN.....	76
<b>8. INMUNOFLUORESCENCIAS.....</b>	<b>77</b>
8.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA INMUNOFLUORESCENCIA.....	77
8.2. INMUNOFLUORESCENCIA.....	77
8.3. VISUALIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL.....	79
<b>9. ENSAYOS CON MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MÉDULA ÓSEA (BMDMs).....</b>	<b>80</b>
9.1. EXTRACCIÓN DE MÉDULA ÓSEA EN RATONES.....	80
9.2. CULTIVO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE LA MÉDULA ÓSEA (BMDMs).....	80
<b>10. CITOMETRÍA DE FLUJO.....</b>	<b>81</b>
<b>11. ENSAYOS DE PCR CUANTITATIVA (qPCR) EN BMDMs Y THP1.....</b>	<b>83</b>
<b>12. ENSAYOS ELISA EN BMDMs Y THP1.....</b>	<b>85</b>
<b>13. MEDICIÓN DE LUCIFERASA.....</b>	<b>86</b>
<b>14. ENSAYOS DE TRATAMIENTO CONTINUO Y DE PULSO Y CAZA.....</b>	<b>86</b>
<b>15. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....</b>	<b>87</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>89</b>
<b>CAPÍTULO 1. LA INTERACCIÓN ENTRE A20 Y EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 PARTICIPA EN EL CONTROL DE LA HOMEOSTASIS INTESTINAL.....</b>	<b>91</b>
<b>1. A20 Y ATG16L1 INTERACCIONAN A TRAVÉS DE SUS DOMINIOS OTU Y WDD, RESPECTIVAMENTE.....</b>	<b>92</b>
1.1. LOS ENSAYOS DE PROTEÓMICA IDENTIFICAN A20 COMO CANDIDATO POTENCIAL DE UNIÓN AL DOMINIO WDD.....	92
1.2. A20 INTERACCIONA CON ATG16L1 A TRAVÉS DEL DOMINIO WDD.....	93
1.3. ATG16L1 INTERACCIONA CON A20 A TRAVÉS DE SU REGIÓN N-terminal (Nt: 1-263).....	94

# ÍNDICE

1.4. A20 INTERACCIONA CON ATG16L1 A TRAVÉS DEL DOMINIO OTU LOCALIZADO EN LA REGIÓN N-TERMINAL (92-263).....	94
1.5. LA PRESENCIA DEL ALELO DE RIESGO A300 EN ATG16L1 NO ALTERA LA INTERACCIÓN CON A20 .....	97
1.6. LOS DIFERENTES MOTIVOS PRESENTES EN LA REGIÓN N-TERMINAL DE A20 PARTICIPAN COOPERATIVAMENTE EN EL RECONOCIMIENTO DEL DOMINIO WDD DE ATG16L1 .....	98
1.7. A20 Y ATG16L1 INTERACCIONAN EN RESPUESTA A ESTÍMULOS ISIOLÓGICOS).....	100
<b>2. LA AUSENCIA DE A20 ALTERA EL FLUJO AUTOFÁGICO NORMAL .....</b>	<b>101</b>
<b>3. ATG16L1 REGULA LA EXPRESIÓN DE A20 .....</b>	<b>104</b>
3.1. EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 REGULA LA EXPRESIÓN DE A20 .....	104
3.2. EL DOMINIO WDD INHIBE LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA NF- $\kappa$ B EN CÉLULAS DEFICIENTES EN A20 .....	108
3.3. EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 MODULA LA EXPRESIÓN DE A20 ENDÓGENO .....	109
3.4. EL DOMINIO WDD REPRIME, DE FORMA A20-INDEPENDIENTE, LA INDUCCIÓN DE LA RUTA NF- $\kappa$ B EN RESPUESTA A TNF- $\alpha$ .....	110
<b>CAPÍTULO 2. DESCRIPCIÓN Y VERIFICACIÓN DEL MOTIVO PROTEICO PRESENTE EN MOLÉCULAS QUE INTERACCIONAN CON EL DOMINIO WDD DE ATG16L1.....</b>	<b>113</b>
<b>1. LAS MOLÉCULAS CANDIDATAS A REGULACIÓN POR ATG16L1, IL-10RB E IL-31R, INTERACCIONAN <i>IN VITRO</i> CON EL DOMINIO WDD .....</b>	<b>114</b>
1.1. LOS ENSAYOS DE MICROARRAYS PERMITEN REFINAR EL MOTIVO INICIAL DEGENERADO .....	114
1.2. LOS ENSAYOS DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN CONFIRMAN LA CAPACIDAD DE INTERACCIÓN DE DIVERSAS MOLÉCULAS CANDIDATAS CON EL DOMINIO WDD .....	116
1.3. EL DOMINIO WDD CO-COINMUNOPRECIPITA CON RECEPTORES PRO Y ANTIINFLAMATORIOS EN ENSAYOS DE SOBREENPRESIÓN.....	117
1.3.1. El receptor IL-10RB interacciona con ATG16L1 a través del dominio WDD.....	119
1.3.2. El receptor IL-10RB interacciona con el dominio WDD a través del motivo previamente descrito .....	122
1.4. EL RECEPTOR IL-31R GLICOSILADO INTERACCIONA CON EL DOMINIO WDD .....	123
<b>2. IL-10RB E IL-31R INDUCEN LC3-II EN ENSAYOS DE SOBREENPRESIÓN.....</b>	<b>125</b>
2.1. LA SOBREENPRESIÓN DE IL-10RB E IL-31R EN CÉLULAS HeLa ESTIMULA LA LIPIDACIÓN DE LC3 .....	125
2.2. LA VERSIÓN 5M DE IL-10RB ALTERA LA INDUCCIÓN DE LC3-II MEDIADA POR EL RECEPTOR.....	125
<b>3. LA INTERACCIÓN ENTRE IL-10RB/IL-31R Y EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 REPERCUTE FUNCIONALMENTE SOBRE LOS RECEPTORES .....</b>	<b>130</b>
<b>CAPÍTULO 3. LA INTERACCIÓN ENTRE IL-10RB Y EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 MODULA LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR IL-10 EN MEFs .....</b>	<b>133</b>
<b>1. GENERACIÓN Y VALIDACIÓN DE MEFs RESPONDEDORES A IL-10.....</b>	<b>134</b>
1.1. GENERACIÓN DE LAS LÍNEAS ESTABLES DE MEFs ATG16L1 FL Y Nt .....	134

1.2. LAS ESTIRPES DE MEFs RESPONDEDORES A IL-10, ATG16L1-FL Y ATG16L1-NT, SON COMPARABLES EN NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS RELEVANTES .....	135
1.3. LAS ESTIRPES ATG16L1-FL Y ATG16L1-NT RECUPERAN AUTOFAGIA BASAL E INDUCIDA POR RAPAMICINA DE FORMA COMPARABLE.....	138
1.4. LA CITOQUINA IL-10 HUMANA NO ESTIMULA LOS RECEPTORES IL-10RA E IL-10RB ENDÓGENOS EN MEFs .....	139
<b>2. LA SEÑALIZACIÓN VÍA IL-10 ES MODULADA POR EL DOMINIO WDD .....</b>	<b>140</b>
2.1. EL DOMINIO WDD MODULA LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR IL-10 EN ENSAYOS DE LUCIFERASA .....	140
2.2. EL DOMINIO WDD PARTICIPA EN LA ACTIVACIÓN DE STAT3 EN RESPUESTA A IL-10 .....	142
<b>3. IL-10RB Y ATG16L1 INTERACCIONAN EN RESPUESTA A IL-10.....</b>	<b>145</b>
<b>4. EL DOMINIO WDD REGULA EL TRÁFICO INTRACELULAR DEL RECEPTOR IL-10RB .....</b>	<b>148</b>
4.1. LA AUSENCIA DEL DOMINIO WDD RALENTIZA LA ENDOCITOSIS DEL RECEPTOR IL-10RB Y ALTERA LA COLOCALIZACIÓN CON EL MARCADOR DE ENDOSOMAS TEMPRANOS EEA1 .....	148
4.2. LA AUSENCIA DEL DOMINIO WDD REDUCE EL MARCAJE DE LAS VESÍCULAS DE RECEPTOR IL-10RB CON LC3.....	152
<b>CAPÍTULO 4. EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 PARTICIPA EN LA REGULACIÓN DE LA SEÑAL ANTIINFLAMATORIA EN CÉLULAS THP1.....</b>	<b>157</b>
<b>1. CÉLULAS MONOCÍTICAS THP1 DEFICIENTES EN EL DOMINIO WDD RECAPITULAN LOS DEFECTOS EN ACTIVACIÓN DE STAT3 DESCRITOS EN MEFs .....</b>	<b>158</b>
1.1. GENERACIÓN DE CÉLULAS THP1 ATG16L1-FL Y ATG16L1-NT.....	158
1.2. LAS ESTIRPES DE THP1, ATG16L1-FL Y ATG16L1-NT, RECUPERAN AUTOFAGIA BASAL DE FORMA COMPARABLE TRAS EL TRATAMIENTO CON INHIBIDORES LISOSOMALES .....	159
1.3. LAS ESTIRPES DE THP1, ATG16L1-FL Y ATG16L1-NT, EXPRESAN IDÉNTICA CANTIDAD DE RECEPTORES IL-10RA E IL-10RB.....	159
<b>2. EL DOMINIO WDD PARTICIPA EN LA ACTIVACIÓN DE STAT3 EN RESPUESTA A IL-10 EN CÉLULAS THP1.....</b>	<b>162</b>
<b>3. EL DOMINIO WDD MODULA LA RESPUESTA ANTIINFLAMATORIA MEDIADA POR IL-10 .....</b>	<b>163</b>
<b>CAPÍTULO 5. EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 MODULA LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL ANTIINFLAMATORIA EN MACRÓFAGOS .....</b>	<b>167</b>
<b>1. EL DOMINIO WDD CONTROLA LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES REGULADOS POR LA VÍA STAT3, COMO BCL3, EN MACRÓFAGOS DERIVADOS DE LA MÉDULA ÓSEA DE RATÓN (BMDMs).....</b>	<b>168</b>
1.1. OBTENCIÓN DE BMDMs Y VERIFICACIÓN DE SU IDENTIDAD.....	168
1.2. LA AUSENCIA DEL DOMINIO WDD REPERCUTE FUNCIONALMENTE SOBRE LA INDUCCIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES STAT3-DEPENDIENTES .....	170
<b>2. LA AUSENCIA DEL DOMINIO WDD ALTERA LA ACTIVACIÓN DE STAT3 EN BMDMs.....</b>	<b>172</b>

# ÍNDICE

<b>3. LA AUSENCIA DEL DOMINIO WDD ALTERA LA SEÑALIZACIÓN ANTIINFLAMATORIA MEDIADA POR IL-10.....</b>	<b>173</b>
<b>CAPÍTULO 6. EL POLIMORFISMO DE RIESGO PARA ENFERMEDAD DE CROHN A300 NO IMPACTA EN LA RESPUESTA ANTIINFLAMATORIA MEDIADA POR IL-10.....</b>	<b>177</b>
<b>1. GENERACIÓN DE LAS ESTIRPES DE MEFS T300 Y A300 PARA SU ANÁLISIS COMPARATIVO .....</b>	<b>178</b>
1.1. GENERACIÓN DE MEFS ATG16L1-A300 RESPONDEDORES A IL-10 .....	178
1.2. LAS ESTIRPES DE MEFs RESPONDEDORES A IL-10, ATG16L1-T Y ATG16L1-A, PRESENTAN NIVELES COMPARABLES DE ATG16L1 Y DE LOS RECEPTORES IL-10RA E IL-10RB .....	179
1.3. LAS ESTIRPES MEFs ATG16L1-T y ATG16L1-A RECUPERAN AUTOFAGIA BASAL E INDUCIDA POR RAPAMICINA DE FORMA COMPARABLE.....	181
<b>2. LA PRESENCIA DEL POLIMORFISMO DE RIESGO A300 EN ATG16L1 NO ALTERA SU CAPACIDAD DE INTERACCIÓN CON EL RECEPTOR IL-10RB.....</b>	<b>182</b>
2.1. EL POLIMORFISMO A300 NO MODIFICA LA INTERACCIÓN IL-10RB-ATG16L1 EN ENSAYOS DE SOBREEXPRESIÓN.....	182
2.2. EL POLIMORFISMO A300 NO ALTERA LA CAPACIDAD DE INTERACCIÓN DE ATG16L1 CON EL RECEPTOR IL-10RB EN REPUESTA A IL-10 .....	185
<b>3. EL POLIMORFISMO DE RIESGO A300 NO MODULA LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR EN RESPUESTA A IL-10.....</b>	<b>186</b>
<b>4. EL POLIMORFISMO DE RIESGO A300 NO MODIFICA LA ACTIVACIÓN DE STAT3 EN THP1 .....</b>	<b>187</b>
4.1. GENERACIÓN DE THP1 ATG16L1-T300 (T) Y ATG16L1-A300 (A).....	187
4.2. EL POLIMORFISMO A300 NO ALTERA LA FOSFORILACIÓN DE STAT3 EN CÉLULAS THP1 .....	188
<b>5. EL POLIMORFISMO DE RIESGO A300 NO ALTERA LA SEÑALIZACIÓN ANTIINFLAMATORIA EN RESPUESTA A IL-10 EN BMDMs .....</b>	<b>189</b>
5.1. EL POLIMORFISMO A300 NO MODULA LA FOSFORILACIÓN DE STAT3 EN BMDMs ..	189
5.2. EL POLIMORFISMO A300 DE ATG16L1 NO MODIFICA LA INDUCCIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES STAT3-DEPENDIENTES.....	190
5.3. EL POLIMORFISMO A300 DE ATG16L1 NO ALTERA LA SEÑALIZACIÓN ANTIINFLAMATORIA EN RESPUESTA A IL-10 .....	192
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>195</b>
<b>CAPÍTULO 1. LA INTERACCIÓN ENTRE A20 Y EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 PARTICIPA EN EL CONTROL DE LA HOMEOSTASIS INTESTINAL .....</b>	<b>197</b>
<b>CAPÍTULO 2. DESCRIPCIÓN Y VERIFICACIÓN DEL MOTIVO PROTEICO PRESENTE EN MOLÉCULAS QUE INTERACCIONAN CON EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 .....</b>	<b>202</b>
<b>CAPÍTULO 3. LA INTERACCIÓN ENTRE IL-10RB Y EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 MODULA LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR IL-10 EN MEFs.....</b>	<b>207</b>

CAPÍTULO 4. EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 PARTICIPA EN LA REGULACIÓN DE LA SEÑAL ANTIINFLAMATORIA EN CÉLULAS THP1 .....	212
CAPÍTULO 5. EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 MODULA LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL ANTIINFLAMATORIA EN MACRÓFAGOS.....	214
CAPÍTULO 6. EL POLIMORFISMO DE RIESGO PARA ENFERMEDAD DE CROHN A300 NO IMPACTA EN LA RESPUESTA ANTIINFLAMATORIA MEDIADA POR IL-10 .....	218
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>223</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>227</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>249</b>
Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR.....	251
Anexo 2. Anticuerpos primarios.....	253
Anexo 3. Anticuerpos secundarios .....	255
Anexo 4. Anticuerpos primarios conjugados con fluorocromos .....	256
Anexo 5. Oligonucleótidos para qPCR.....	257
<b>FIGURAS</b>	
<b>Figura 1.</b> Esquema general de las etapas de la ruta autofágica .....	7
<b>Figura 2.</b> Esquema simplificado de las etapas y complejos implicados en la ruta autofágica canónica... 12	
<b>Figura 3.</b> Esquema de la estructura de ATG16L1 en mamíferos (parte superior) y su homólogo Atg16 en levaduras (parte inferior).....	25
<b>Figura 4.</b> Estructura del receptor de IL-10 y moléculas implicadas señalización por IL-10.....	32
<b>Figura 5.</b> Receptor de IL-31 y moléculas involucradas en la señalización por esta citoquina .....	35
<b>Figura 6.</b> Esquema de la estructura de A20 y sus sitios de unión relevantes .....	38
<b>Figura 7.</b> A20 interacciona con ATG16L1 a través del dominio WDD.....	93
<b>Figura 8.</b> La región N-terminal (1-263) de A20 interacciona con ATG16L1 .....	95
<b>Figura 9.</b> La región N-terminal (1-263) de A20 interacciona con ATG16L1 a través de su dominio WDD .....	96
<b>Figura 10.</b> El dominio OTU (92-263) de A20 constituye la región de interacción con el dominio WDD de ATG16L1.....	96
<b>Figura 11.</b> La presencia del alelo de riesgo A300 no altera la interacción de ATG16L1 con A20.....	98
<b>Figura 12.</b> Los 7 motivos presentes en la región N-terminal de A20 participan cooperativamente en el reconocimiento del dominio WDD de ATG16L1 .....	99
<b>Figura 13.</b> Los polimorfismos de riesgo para IBD A125 y F127C no alteran la interacción entre A20 y ATG16L1 .....	100
<b>Figura 14.</b> A20 endógeno co-inmunoprecipita con ATG16L1 en respuesta a TNF- $\alpha$ .....	101
<b>Figura 15.</b> A20 modula el flujo autofágico basal y en respuesta a TNF- $\alpha$ .....	103
<b>Figura 16.</b> El dominio WDD expresado ectópicamente inhibe la acumulación de LC3-II inducida por TNF- $\alpha$ en MEFs deficientes en A20 .....	104
<b>Figura 17.</b> La inhibición del proteasoma vía lactacistina no ubiquitina ni estabiliza GST-ATG16L1 ...	105

# ÍNDICE

<b>Figura 18.</b> ATG16L1 regula los niveles de A20 a través del dominio WDD.....	107
<b>Figura 19.</b> El tratamiento con inhibidores lisosomales normaliza los niveles de expresión de A20 en MEFs reconstituidos con HA-A20 y diferentes versiones de ATG16L1 .....	108
<b>Figura 20.</b> El dominio WDD de ATG16L1 reprime la señalización por NF- $\kappa$ B en MEFs deficientes en A20 .....	109
<b>Figura 21.</b> ATG16L1 regula la expresión de A20 endógeno a través del dominio WDD.....	111
<b>Figura 22.</b> El motivo refinado descrito permite identificar proteínas que interactúan con ATG16L1 a través del dominio WDD .....	116
<b>Figura 23.</b> El receptor IL-10RB interactúa con ATG16L1 a través del dominio WDD .....	120
<b>Figura 24.</b> El receptor IL-10RB interactúa con el dominio WDD de ATG16L1 a través del motivo previamente identificado (Tabla 1).....	121
<b>Figura 25.</b> La forma glicosilada del receptor IL-31R interactúa con el dominio WDD de ATG16L1 a través de uno de los motivos previamente identificados (Tabla 1).....	124
<b>Figura 26.</b> IL-10RB e IL-31R inducen lipidación de LC3 en ensayos de sobreexpresión.....	125
<b>Figura 27.</b> La versión 5M de IL-10RB altera la capacidad del receptor para inducir la lipidación de LC3 .....	127
<b>Figura 28.</b> La interacción entre el dominio WDD de ATG16L1 e IL-10RB (izquierda) o IL-31R (derecha) repercute sobre la lipidación de LC3 y sobre los niveles de expresión del receptor .....	131
<b>Figura 29.</b> Las estirpes FL y Nt son comparables en niveles de expresión de las moléculas transducidas .....	137
<b>Figura 30.</b> Las estirpes ATG16L1-FL (FL) y ATG16L1-Nt (Nt) recuperan autofagia basal e inducida por rapamicina de forma comparable.....	138
<b>Figura 31.</b> Los MEFs ATG16L1-FL responden a IL-10 exclusivamente en presencia de los receptores humanos IL-10RA e IL-10RB .....	139
<b>Figura 32.</b> El dominio WDD participa en la modulación de la señal intracelular desencadenada por IL-10.....	141
<b>Figura 33.</b> Los experimentos de tratamiento continuo mostraron diferencias en fosforilación de STAT3 entre células FL (F) y Nt (N).....	143
<b>Figura 34.</b> Los experimentos de “pulso y caza” mostraron diferencias en tráfico intracelular de IL-10 y activación de STAT3 entre células FL (F) y Nt (N) .....	144
<b>Figura 35.</b> IL-10RB y ATG16L1 co-inmunoprecipitan en respuesta a IL-10 .....	146
<b>Figura 36.</b> Las células de la estirpe ATG16L1-Nt presentan defectos en la endocitosis temprana del receptor .....	148
<b>Figura 37.</b> El dominio WDD facilita el tráfico a través de la ruta endolisosomal .....	150
<b>Figura 38.</b> El dominio WDD promueve el marcaje de las vesículas de receptor IL-10RB con LC3.....	153
<b>Figura 39.</b> Las estirpes de THP1, ATG16L1-FL Y ATG16L1-Nt, son comparables en niveles de expresión de las moléculas relevantes y recuperación de la autofagia basal .....	161
<b>Figura 40.</b> La ausencia del dominio WDD en células THP1 provoca defectos en la activación de STAT3.....	163
<b>Figura 41.</b> El dominio WDD participa en la inhibición transcripcional de los genes <i>TNF</i> e <i>IL-6</i> , inducida por IL-10 tras el estímulo inflamatorio en forma de LPS.....	164



<b>Figura 42.</b> El dominio WDD participa en la regulación de la secreción de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ .....	165
<b>Figura 43.</b> Los ensayos de Western-blot verificaron la identidad de los ratones FL y Nt (E230), que presentaron idéntica capacidad de diferenciación macrofágica.....	169
<b>Figura 44.</b> La ausencia del dominio WDD inhibe la activación transcripcional de genes STAT3-dependientes.....	171
<b>Figura 45.</b> La carencia del dominio WDD reduce la fosforilación de STAT3 en BMDMs.....	173
<b>Figura 46.</b> La ausencia del dominio WDD altera la respuesta antiinflamatoria mediada por IL-10 en macrófagos.....	175
<b>Figura 47.</b> Los MEFs T y A son comparables en niveles de expresión de ATG16L1 e IL10RA/B.....	181
<b>Figura 48.</b> Los MEFs ATG16L1-T (T) y ATG16L1-A (A) recuperan autofagia basal e inducida por rapamicina de forma comparable.....	183
<b>Figura 49.</b> El receptor IL-10RB interacciona indistintamente con las versiones T300 o A300 de ATG16L1, en condiciones de sobreexpresión.....	184
<b>Figura 50.</b> El receptor IL-10RB interacciona indistintamente con las versiones T300 y A300 de ATG16L1 en respuesta a IL-10.....	185
<b>Figura 51.</b> El polimorfismo de riesgo A300 no modifica la transducción de la señal intracelular en respuesta a IL-10.....	187
<b>Figura 52.</b> La presencia del alelo de riesgo A300 no modifica la fosforilación de STAT3 en células THP1.....	189
<b>Figura 53.</b> Los BMDMs de ratones A300 no presentan defectos en la fosforilación de STAT3.....	191
<b>Figura 54.</b> El polimorfismo A300 de ATG16L1 no altera la tasa de inducción transcripcional de genes STAT3-dependientes, como <i>Bel3</i> .....	192
<b>Figura 55.</b> El polimorfismo A300 de ATG16L1 no altera la señalización antiinflamatoria en respuesta a IL-10.....	193
<b>Figura 56.</b> Esquema del modelo de regulación propuesto para A20-ATG16L1 en el control de la homeostasis intestinal.....	200
<b>Figura 57.</b> Esquema del modelo de regulación propuesto para ATG16L1.....	204
<b>Figura 58.</b> Esquema del modelo propuesto para la señalización intracelular desencadenada tras la interacción IL-10RB-WDD.....	211

## TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Subgrupo de receptores de citoquinas seleccionados sobre la base de su diversidad de actividades pro y antiinflamatorias y mecanismos señalizadores.....	119
<b>Tabla 2.</b> Estirpes de MEFs generadas a partir de células deficientes en <i>Atg16l1</i> .....	135
<b>Tabla 3.</b> Estirpes de MEFs generadas a partir de células deficientes en <i>Atg16l1</i> . Incluye la estirpe transducida con ATG16L1-A300.....	179
<b>Tabla 4.</b> Resumen de los efectos observados en ratones WT, <i>A20</i> <sup>-/-</sup> , <i>Atg16l1</i> <sup>-/-</sup> y <i>A20/Atg16l1</i> <sup>-/-</sup> .....	199



### A

---

**ABIN:** A20-binding inhibitor of NF- $\kappa$ B activation, inhibidor de la activación de NF- $\kappa$ B asociado a A20.

**AKT/PKB:** protein kinase B, proteína quinasa B

**AMBRA1:** activating molecule in Beclin1-regulated autophagy, molécula activadora en la autofagia regulada por Beclin1

**AMP:** adenosine monophosphate, adenosín monofosfato

**AMPK:** AMP-activated protein kinase, proteína quinasa activada por AMP

**ALFY:** autophagy-linked FYVE protein, proteína FYVE ligada a autofagia

**APS:** ammonium persulfate, persulfato amónico

**ASK1:** apoptosis signal-regulating kinase 1, quinasa 1 regulada por señalización apoptótica

**ATCC:** American Type Culture Collection

**ATGX:** autophagy-related gene X, gen relacionado con autofagia X

### B

---

**Bcl-2:** B-cell lymphoma 2, linfoma 2 de células B

**BCL3:** B-cell lymphoma 3-encoded protein, proteína codificada por células B de linfoma 3

**BCL-xL:** B-cell lymphoma-extra large, proteína de linfoma de células B extra-grande

**BECN1:** Beclin-1

**BFA1:** bafilomycin A<sub>1</sub>, bafilomicina A<sub>1</sub>

**BMDM:** bone marrow derived macrophages, macrófagos derivados de médula ósea

**BNIP3:** Bcl-2 interacting protein 3, proteína 3 de interacción con Bcl-2

**BSA:** bovine serum albumin, seroalbúmina bovina

### C

---

**C57BL/6J:** C57 black 6

**CALCOCO2/NDP52:** calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2/nuclear dot protein 52, proteína 2 de unión a calcio que contiene un dominio coiled-coil/proteína de puntos nucleares 52

**Cas9:** CRISPR associated protein 9, proteína 9 asociada a CRISPR

**CD:** Crohn's disease, enfermedad de Crohn

**CD11b:** cluster of differentiation 11b, clúster de diferenciación 11b

## ABREVIATURAS

**CD63:** cluster of differentiation 63, clúster de diferenciación 63

**CIP:** calf-intestinal alkaline phosphatase, fosfatasa intestinal alcalina de ternero

**CLRs:** C-type lectin receptor, receptor lectina tipo C

**CMA:** chaperone-mediated autophagy, autofagia mediada por chaperonas

**CMV:** cytomegalovirus, citomegalovirus

**coIP:** co-immunoprecipitation, co-inmunoprecipitación

**crmA:** cytokine response modifier A, modificador A de respuesta a citoquinas

## D

---

**DAPI:** 4',6-diamidino-2-phenylindole; 4',6-diamidino-2 fenilindol

**DDB1:** DNA damage-binding protein 1, proteína de unión a DNA dañado 1

**DDIT4:** DNA damage-inducible transcript 4, transcripto inducido por daño al DNA 4

**DEDD2:** DNA-binding death effector domain containing 2, proteína que contiene un dominio efector de muerte de unión al DNA

**DFCP1:** double FYVE-containing protein 1, proteína 1 que contiene un doble dominio FYVE

**DMEM:** Dulbecco's modified Eagle's médium, medio de Eagle modificado por Dulbecco

**DMSO:** dimethyl sulfoxide, dimetilsulfóxido

**DNA/cDNA:** deoxyribonucleic acid/complementary DNA, ácido desoxirribonucleico/DNA complementario

**dNTP:** deoxynucleotide triphosphates, desoxirribonucleótido trifosfato

**DSS:** dextran sulfate sodium, dextrano sulfato sódico

**DTT:** dithiothreitol, ditiotreitól

## E

---

**EDTA:** ethylenediaminetetraacetic acid, ácido etilendiaminotetraacético

**EEA1:** early endosome antigen 1, antígeno 1 de endosomas tempranos

**EF1 $\alpha$ :** human elongation factor-1  $\alpha$ , factor 1  $\alpha$  de elongación humano

**E-GFP:** enhanced green fluorescent protein, proteína verde fluorescente mejorada

**EGFR:** epidermal growth factor receptor, receptor del factor de crecimiento epidérmico

**ELISA:** enzyme-linked immunosorbent assay, ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**ERK:** extracellular signal-regulated kinase, quinasa regulada por señales extracelulares

## ABREVIATURAS

**ETV3:** ETS (E-twenty six) translocation variant 3, variante de translocación 3 de la proteína de la familia ETS (E-veintiséis)

### F

---

**FADD:** Fas-associated protein with death domain, proteína asociada a Fas con dominio de muerte

**FBS:** fetal bovine serum, suero bovino fetal

**FI:** fold-induction, ratio de inducción

**FIP200:** FAK family kinase-interacting protein 200 kDa, proteína de 200 kDa de interacción con la familia de las FAK quinasas

**FoxO3:** forkhead box protein O3, proteína O3 *forkhead box*

### G

---

**GABARAP:** gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein, proteína asociada al receptor del ácido gamma-aminobutírico

**GCN2:** general control nonderepressible 2, proteína quinasa regulada por limitación de nutrientes 2

**GFP:** green fluorescent protein, proteína verde fluorescente

**GRB2:** growth factor receptor-bound protein 2, proteína de unión a factores de crecimiento 2

**GSH:** glutathione, glutatión

**GST:** glutathione S transferase, glutatión S-transferasa

**GWAS:** genome-wide association study, estudio de asociación del genoma completo

### H

---

**H3:** histone H3, histona H3

**HA1:** Influenza virus hemagglutinin 1, hemagglutinina 1 de Influenzavirus

**HCT116:** human colon cancer cell 116, células de carcinoma de colon humano 116

**HDAC1:** histone deacetylase 1, histona deacetilasa 1

**HEBS:** HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) - buffered saline, tampón HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico) salino

**HEK-293T:** human embryonic kidney 293 cells transformed with large T antigen (SV40, simian virus 40), células 293 embrionarias de riñón humano transformadas con el antígeno T del virus SV40 (virus 40 del simio)

## ABREVIATURAS

**HeLa:** Henrietta Lacks cells, células de Henrietta Lacks

**HOPS:** Homotypic fusion and protein sorting, proteína de fusión homotípica y clasificación de proteínas

**HRP:** horseradish peroxidase, peroxidasa de rábano

### I

---

**IBD:** inflammatory bowel disease, enfermedad inflamatoria intestinal

**IF:** immunofluorescence, inmunofluorescencia

**IFN- $\gamma$ :** interferon gamma, interferón gamma

**IKK:** I $\kappa$ B kinase, quinasa I $\kappa$ B

**IKK $\gamma$ :** inhibitor of NF- $\kappa$ B kinase gamma, proteína inhibidora de la quinasa gamma de NF- $\kappa$ B

**IL-X:** interleukin-X, interleuquina-X

**IL-XR:** interleukin-X receptor, receptor de interleuquina-X

**IMM:** inner mitochondrial membrane, membrana mitocondrial interna

**In<sup>2</sup>:** inches<sup>2</sup>, pulgadas<sup>2</sup>

**IP:** immunoprecipitation, inmunoprecipitación

**IP3:** inositol-1,4,5-triphosphate, inositol-1,4,5-trifosfato

**IRES:** internal ribosome entry site, sitio interno de entrada al ribosoma

**IRF7:** interferon regulatory factor 7, factor 7 de regulación del interferón

**IRGM1:** immunity-related GTPase family M protein 1, proteína GTPasa 1 de la familia M relacionada con inmunidad

### J

---

**JAK2:** Janus kinase 2, Janus quinasa 2

**JNK1:** c-Jun N-terminal kinase 1, quinasa c-Jun N-terminal

### K

---

**Kb:** kilobase, kilobase

### L

---

**LAMP1:** lysosomal-associated membrane protein 1, proteína 1 asociada a la membrana lisosomal

## ABREVIATURAS

**LAMP2A:** lysosomal associated membrane protein 2, proteína 2A asociada a la membrana lisosomal

**LB:** Luria Bertani

**LC3:** microtubule-associated protein light chain 3, proteína de cadena ligera 3 asociada a microtúbulos

**LGALS3:** galectin 3, galectina 3

**LIF:** leukemia inhibitory factor, factor inhibidor de leucemia

**LPS:** lipopolysaccharide, lipopolisacárido

**LTR:** long terminal repeat, repeticiones terminales largas

### M

---

**MALT-1:** mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein 1, proteína de translocación 1 de linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa

**MAPK:** mitogen-activated protein kinase, proteína quinasa activada por mitógenos

**MCH-II:** major histocompatibility complex II, complejo mayor de hitocompatibilidad de clase II

**M-CSF:** macrophage colony-stimulating factor, factor estimulante de colonias de macrófagos

**MDP:** muramyl dipeptide, muramil dipéptido

**MEF:** mouse embryonic fibroblasts, fibroblastos embrionarios de ratón

**MMP-3:** metalloproteinase-3, metaloproteínasa-3

**MNV CR6:** murine norovirus strain CR6, norovirus murino cepa CR6

**mTORC1/2:** mammalian target of rapamycin complex 1/2, diana de rapamicina en mamíferos complejo 1/2

### N

---

**NBR1:** next to BRCA1 gene 1 protein, proteína 1 junto al gen BRCA1

**NLR:** Nod-like receptor, receptor de tipo Nod

**NLRP3:** NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3, proteína 3 que contiene los dominios NACHT, LRR y PYD

**NOD2:** nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2, proteína 2 que contiene el dominio de oligomerización por unión de nucleótidos

**NSF:** N-ethylmaleimide-sensitive factor, factor sensible a la N-etilmaleimida

## ABREVIATURAS

### O

---

**OMM:** outer mitochondrial membrane, membrana mitocondrial externa

**OPTN:** optineurin, optineurina

**ORF:** open reading frame, marco abierto de lectura

**OSMR:** oncostatin M receptor, receptor M de oncostatina

**OTU:** ovarian tumor, tumor de ovario

### P

---

**PARK:** parkin, parkina

**PAS:** phagophore assembly site, sitio de ensamblaje del fagóforo

**PBS:** phosphate buffered saline, tampón fosfato salino

**PCD:** programmed cell death, muerte celular programada

**PCR:** polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa

**PE:** phosphatidylethanolamine, fosfatidiletanolamina

**PEX:** peroxin, peroxina

***Pfu* polymerase:** *Pyrococcus furiosus* polymerase, polimerasa de *Pyrococcus furiosus*

**PI3K:** phosphatidylinositol 3-kinase, fosfoinositol-3-quinasa o fosfatidilinositol 3-quinasa

**PI3P:** phosphatidylinositol 3-phosphate, fosfatidilinositol-3-fosfato

**PINK:** PTEN-induced kinase 1, quinasa inducida por PTEN 1

**PLEKHM1:** Pleckstrin homology domain-containing family M member 1, proteína que contiene un dominio de homología Pleckstrin de la familia M miembro 1

**PMA:** phorbol 12-myristate 13-acetate, forbol-12-miristato-13-acetato

**PRR:** pattern recognition receptors, receptores de reconocimiento de patrones

**PVDF:** polyvinylidene fluoride, polifluoruro de vinilideno

### Q

---

**qPCR:** quantitative PCR, PCR cuantitativa

### R

---

**RABX:** Ras-associated binding protein X, proteína de unión X asociada a Ras

**RAS:** rat sarcoma protein, proteína de sarcoma de rata

**RETREG:** reticulophagy regulator 1, regulador de reticulofagia 1



## ABREVIATURAS

- RILP:** Rab-interacting lysosomal protein, proteína lisosomal de interacción con Rab
- RIP2/RIPK2:** receptor-interacting-serine/threonine-protein kinase 2, serina-treonina quinasa 2 de interacción con receptores
- RLR:** retinoic acid-inducible gene-I-like receptors, receptores similares al gen I inducible por ácido retinoico
- RNA/mRNA:** ribonucleic acid/messenger RNA, ácido ribonucleico/RNA mensajero
- ROS:** reactive oxygen species, especies reactivas de oxígeno
- RSB:** reducing sample buffer, buffer reductor para muestra
- RUBCN:** run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein, proteína de interacción con el dominio ejecutor de Beclin-1 con dominios ricos en cisteína

### S

---

- SB:** sample buffer, buffer para muestra
- SDS-PAGE:** sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.
- SHC-transforming protein:** Src homology 2 domain containing transforming protein, proteína transformante 2 que contiene un dominio de homología Src
- SNAP:** soluble NSF attachment protein, proteína de unión a NSF soluble
- SNARE:** soluble NSF attachment protein receptor, receptor de proteínas de unión de NSF soluble
- SNP:** single nucleotide polymorphism, polimorfismo de un solo nucleótido
- SOCS3:** suppressor of cytokine signaling 3, supresor 3 de la señalización por citoquinas
- SPF:** specific pathogen free, zona libre de patógenos específicos
- SQSTM1/p62:** sequestosome 1 or ubiquitin-binding protein p62, proteína de unión a ubiquitina p62
- STAT1/3/5:** signal transducer and activator of transcription 1/3/5, transductor de la señal y activador de la transcripción 1/3/5
- STXX:** syntaxine X, sintaxina X

### T

---

- T3JAM:** TRAF3-interacting JNK-activating modulator, modulador activado por JNK que interacciona con TRAF3

## ABREVIATURAS

**TAK2:** TGF-beta-activated kinase 1 and MAP3K7-binding protein 2, quinasa 1 activada por TGF-beta y proteína 2 de unión a MAP3K7

**TAK1:** mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7, proteína quinasa quinasa quinasa 7 activada por mitógeno

**TAE:** tris acetate-EDTA buffer, buffer tris acetato-EDTA

**TBS:** tris-buffered saline, solución salina tamponada con tris

**TE:** buffer tris-EDTA, tampón tris-EDTA

**TEMED:** N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina

**TGF- $\beta$ :** transforming growth factor beta, factor de crecimiento transformante beta

**THP1:** Tohoku Hospital Pediatrics-1, (línea celular procedente del) Hospital Pediátrico Tohoku 1

**TLRX:** Toll-like receptor X, receptor de tipo Toll X

**TMB:** 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, 3,3',5,5'-tetrametilbencidina

**TMEMX:** transmembrane protein X, proteína transmembrana X

**TNFAIP3:** TNF alpha induced protein 3, proteína 3 inducida por TNF- $\alpha$

**TNFR:** tumour necrosis factor receptor 1, receptor 1 del factor de necrosis tumoral

**TNF- $\alpha$ :** tumor necrosis factor  $\alpha$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**TOLLIP:** Toll interacting protein, proteína de interacción con Toll

**TRAF2:** TNF receptor-associated factor 2, factor 2 asociado al receptor de TNF

**TRAIL:** tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral

**TRIM20:** Tripartite motif 20, motivo tripartito 20

**TrKA:** tyrosine kinase receptor A, receptor A de tirosina quinasa

**TSC1/TSC2:** tuberous sclerosis complex 1/2, complejos 1/2 de esclerosis tuberosa

**TYK2:** tyrosine kinase 2, tirosina quinasa 2

## U

---

**U:** units, unidades

**UC:** ulcerative colitis, colitis ulcerosa

**ULK1/2:** Unc-51 like autophagy activating kinase 1/2, quinasa 1/2 activadora de la autofagia similar a unc-51

**UPS:** ubiquitin/proteasome system, sistema ubiquitina/proteasoma

## ABREVIATURAS

**UVRAG:** UV radiation resistance-associated gene protein, proteína asociada a la resistencia a radiación ultravioleta

### V

---

**VAMPX:** vesicle-associated membrane protein, proteína de membrana asociada a vesículas

**VPSX:** vacuolar protein sorting-associated protein X, proteína X asociada a la clasificación de proteínas vacuolares

### WB

---

**WB:** Western-blot

**WIPI:** WD-repeat protein interacting with phosphoinositides, proteína con repeticiones WD que interacciona con fosfoinositol



## RESUMEN

La autofagia es una ruta de degradación celular que actúa como un mecanismo de control de calidad del citoplasma, eliminando agregados proteicos, orgánulos dañados y microorganismos invasores. Aunque la degradación aleatoria de citoplasma es una respuesta común a estrés nutricional, en los últimos años se han descrito modalidades selectivas de autofagia, responsables de la eliminación específica de componentes potencialmente dañinos. Consecuentemente, alteraciones en esta ruta están implicadas en la patogénesis de distintos desórdenes. Recientemente se ha descrito que el incremento de la susceptibilidad a enfermedad de Crohn está asociado, entre otros factores, al polimorfismo A300 en el efector autofágico ATG16L1. La molécula ATG16L1 no sólo es un efector esencial de la ruta autofágica, sino que también se encuentra implicada en funciones autofágicas no convencionales, esto es, no ligadas a esta vía degradativa. Entre las funciones no convencionales de ATG16L1 destacan el control inflamatorio, el tráfico de vesículas secretoras en determinados tipos celulares o la eliminación de microorganismos invasores.

Resultados previos del laboratorio han demostrado que ATG16L1 interacciona con la proteína transmembrana TMEM59, desencadenando un fenómeno autofágico atípico cuyo estudio ha contribuido a dilucidar algunas de las funciones no convencionales en las que se encuentra implicado ATG16L1. En el caso de TMEM59, la activación de ATG16L1 conduce al marcaje con LC3 de endosomas de membrana sencilla en los que se localiza la propia molécula, siendo dirigidos más eficazmente al compartimento lisosómico. TMEM59 interacciona con el dominio WDD de ATG16L1, a través de un motivo aminoacídico que está presente en diversidad de moléculas de distinta entidad biológica. Esta interacción se altera en presencia del alelo de riesgo A300, ralentizándose el tráfico intracelular de TMEM59 y reduciéndose la respuesta xenofágica frente a *Staphylococcus aureus*. Entre las moléculas que interaccionan con ATG16L1 destaca, asimismo, A20/TNFAIP3, que modula la respuesta antiinflamatoria regulando la vía NF- $\kappa$ B. La interacción entre ATG16L1 y A20 había sido descrita previamente en el laboratorio.

Adicionalmente, ensayos preliminares de microarrays peptídicos habían contribuido a identificar un elevado número de proteínas transmembrana que presentan diferentes versiones del motivo de unión al dominio WDD de ATG16L1 en sus regiones

## RESUMEN

intracelulares. Entre el conjunto de moléculas identificado, destacan una colección de receptores de citoquinas pro y antiinflamatorias. Los ensayos moleculares y funcionales efectuados en esta tesis doctoral han permitido evaluar el impacto que el dominio WDD de ATG16L1 ejerce sobre las actividades biológicas de las moléculas más relevantes constituyentes del denominado “interactoma” de ATG16L1.

# INTRODUCCIÓN





## 1. INTRODUCCIÓN A LA AUTOFAGIA

### 1.1. DEFINICIÓN

La autofagia es una vía catabólica de degradación y reciclaje que actúa como mecanismo de control de calidad del citoplasma, mediando la eliminación de proteínas mal plegadas, orgánulos dañados o microorganismos<sup>1</sup>. La primera descripción de la vía en células animales la realizó Christian de Duve en 1963<sup>2</sup>. De Duve acuñó el término autofagia para designar el fenómeno de “auto-ingesta” observado en lisosomas, combinando los vocablos griegos *auto-* y *-phagos*.

La autofagia es un fenómeno altamente conservado: la maquinaria molecular responsable del mismo está presente en el genoma de todos los organismos eucariotas secuenciados hasta el momento, y ausente en todos los procariotas. Se postula, por tanto, que el origen de esta vía está ligado a procesos claves en la aparición y evolución de la vida eucariota<sup>3</sup>. Mientras que en eucariotas inferiores la finalidad fundamental de la ruta es la respuesta a diferentes formas de estrés (ayuno, hipoxia, aumento de temperatura, acumulación de orgánulos dañados...) mediante el reciclaje de componentes citoplasmáticos, en eucariotas superiores participa en desarrollo y juega un papel más complejo en el mantenimiento de la homeostasis celular, mediante la modulación de diferentes respuestas celulares<sup>4</sup>.

Aunque inicialmente se consideraba un fenómeno íntegramente no selectivo, en la actualidad se han descrito diversas formas de autofagia específicas de cargo. Los procesos específicos son responsables, por ejemplo, de la eliminación de orgánulos dañados o superfluos, tales como mitocondrias (mitofagia), peroxisomas (pexofagia), lisosomas (lisofagia) o agregados proteicos (agrefagia)<sup>5</sup>. Dichos cargos poseen señales específicas (por ejemplo, marcas de ubiquitinación), que son reconocidas por los receptores autofágicos<sup>6</sup>. Mientras que la vía autofágica canónica involucra complejos moleculares bien definidos, las señales de degradación y moléculas que actúan en autofagia selectiva son específicas para cada proceso en particular.

La contribución de esta vía a la fisiopatología de numerosas entidades clínicas ha suscitado interrogantes en cuanto a su implicación en protección o muerte celular. Se

# INTRODUCCIÓN

postula que la activación inicial de autofagia ante un daño celular protegería a la célula del estrés causado por carencias nutricionales y metabólicas, orgánulos disfuncionales, macromoléculas alteradas o incluso microorganismos invasores. Sin embargo, si el daño intracelular alcanza un determinado umbral, la autofagia actuaría eliminando la célula dañada y preservando la integridad tisular<sup>7</sup>. De hecho, aunque no exento de cierta controversia, se ha descrito la existencia de una muerte celular autofágica<sup>8</sup>. Se trata de un fenómeno de tipo no apoptótico, morfológicamente diferenciado de ésta. Contrariamente a la apoptosis, la degradación del retículo endoplasmático, el aparato de Golgi y los polirribosomas ocurre previamente a la degradación del núcleo, y el citoesqueleto se preserva en el tiempo<sup>9</sup>. Sin embargo, en la actualidad, continúan existiendo dudas sobre si la autofagia puede actuar como un mecanismo de muerte celular o simplemente modula la muerte celular apoptótica<sup>10,11</sup>.

El paradigma actual aboga por reconciliar las funciones opuestas de la autofagia en condiciones patológicas, condicionando su papel en protección o muerte celular al estadio de la enfermedad, microambiente celular y aproximaciones terapéuticas testadas.

## 1.2. MODALIDADES DE AUTOFAGIA

Los procesos autofágicos son susceptibles de ser clasificados en función de la señal o señales inductoras, aspectos temporales de la inducción, características del cargo y mecanismos de captura y liberación al lisosoma del material autofagocitado<sup>12</sup>.

La clasificación más ampliamente utilizada define tres tipos de autofagia en función de la vía de liberación del material citoplasmático al lumen del lisosoma<sup>13</sup>. En la macroautofagia, vesículas de doble membrana (autofagosomas) se fusionan con los lisosomas para la degradación del contenido citoplasmático<sup>14</sup>. En la microautofagia, la propia membrana lisosomal secuestra específica o inespecíficamente componentes citoplasmáticos<sup>15</sup>. Finalmente, la autofagia mediada por chaperonas (CMA), característica de eucariotas superiores, procesa proteínas con secuencias señalizadoras específicas, dirigiéndolas al compartimento lisosomal<sup>16</sup>. En esta modalidad de autofagia, la chaperona HSC70 reconoce el pentapéptido *KFERQ* presente en aproximadamente el 30% de las proteínas citoplasmáticas, y las dirige a degradación<sup>17</sup>. HSC70 participa asimismo en la autofagia selectiva asistida por chaperonas, una modalidad de macroautofagia en la que

la propia HSC70 interacciona con los residuos hidrofóbicos expuestos en proteínas mal plegadas o agregadas<sup>18</sup>.

En los procesos de macroautofagia y microautofagia, la fusión de la membrana interna autofagosomal o de la membrana intraluminal (respectivamente) con el lisosoma permite la degradación final de los sustratos. Sin embargo, en la autofagia mediada por chaperonas, las proteínas sustrato son translocadas directamente a través de poros de la membrana lisosomal, en un proceso coordinado por la proteína asociada a la membrana lisosomal LAMP2A<sup>19</sup>.

La continua descripción de nuevos subtipos de autofagia refleja el dinamismo de esta área de conocimiento, si bien este estudio se circunscribe exclusivamente a la macroautofagia (denominada simplemente autofagia en esta tesis doctoral).

## **2. LA MAQUINARIA AUTOFÁGICA EN EUCARIOTAS SUPERIORES**

Desde la primera descripción de autofagia realizada por De Duve en el año 1963, numerosos estudios bioquímicos, fisiológicos y ultraestructurales finalizaron sin haber identificado las moléculas involucradas en este proceso. Fue en el año 1993 cuando Yoshinori Ohsumi caracterizó 15 mutantes en levaduras (mutantes *apg*) deficientes en autofagia<sup>20</sup>. Esto supuso un significativo avance en el conocimiento de la ruta puesto que, progresivamente, se fueron describiendo más genes involucrados en la misma<sup>21,22</sup>. Finalmente, la compleja nomenclatura que había surgido se unificó bajo el término genérico de ATGs (genes relacionados con autofagia)<sup>23</sup>. De los 42 ATGs identificados hasta el momento, 16 de ellos constituyen el designado como “núcleo” de ATGs involucrados en la denominada ruta canónica<sup>24</sup>. Los restantes ATGs participan en modalidades específicas de autofagia selectiva.

La formación del autofagosoma en la ruta canónica implica una serie secuencial de eventos en los que la maquinaria molecular actúa de forma jerárquica. La etapa de captura del material citoplasmático es la más compleja: requiere un intermediario de doble membrana, el fagóforo, y cambios en la tipología del cargo que permitan su degradación en el lisosoma. La conversión de fagóforo a autofagosoma es un proceso dinámico que

# INTRODUCCIÓN

involucra numerosos complejos proteicos y la movilización de una cantidad sustancial de reservas de membrana<sup>12</sup>.

## 2.1. INDUCCIÓN: mTORC1 COMO NODO FUNDAMENTAL EN AUTOFAGIA CANÓNICA

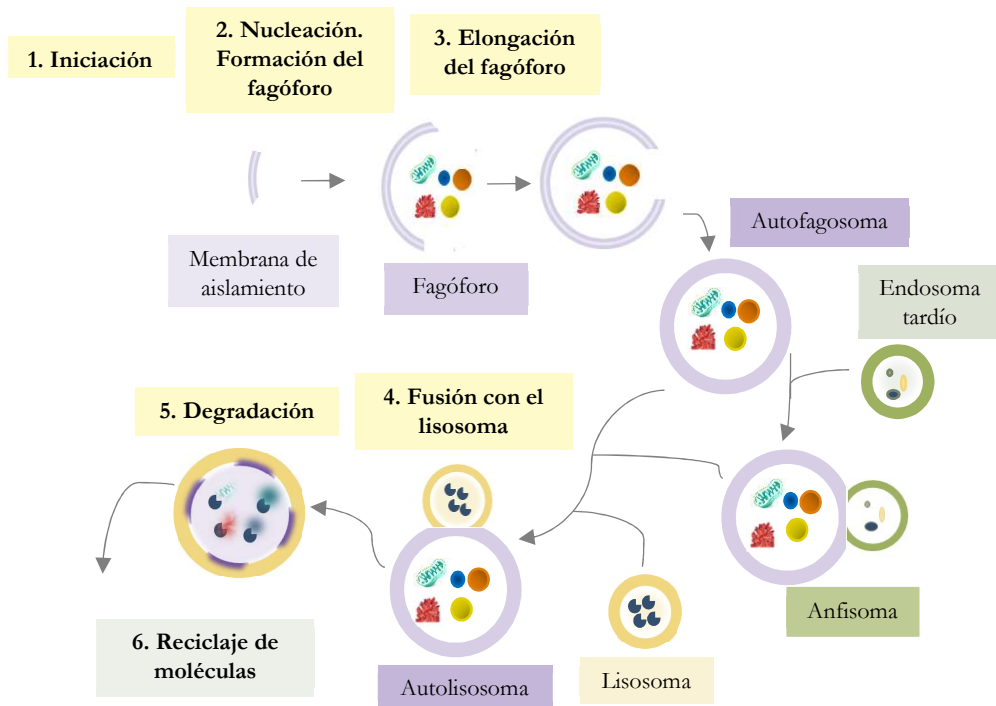
El desencadenante de la ruta autofágica es un estímulo extracelular, generalmente en forma de disponibilidad de nutrientes, glucosa, presencia de factores de crecimiento o estado energético. Se postula que el complejo TSC1/TSC2 transduce gran parte de las señales que convergen en la quinasa mTOR<sup>25</sup>. El heterodímero TSC1/TSC2 integra señales de diversas rutas celulares e inhibe a la GTPasa Rheb, localizada en el sistema de endomembranas. Rheb-GDP no puede activar a mTOR, eliminando el efecto inhibitorio de éste sobre la ruta autofágica<sup>25</sup>.

La subunidad mTOR forma parte de dos complejos diferentes, mTORC1 y mTORC2. mTORC1 es un potente inhibidor de autofagia en eucariotas, y se encuentra constitutivamente activo en ausencia de estímulos. Como ya se ha mencionado anteriormente, la inhibición de mTORC1 desencadena la activación de la vía. Aunque el complejo relevante en autofagia es mTORC1, se ha descrito que el complejo mTORC2 controla la actividad del factor transcripcional FoxO3, responsable de activar la transcripción de genes implicados en autofagia en células musculares<sup>26</sup>.

Aunque mTORC1 es el principal nodo regulador de autofagia e integra gran parte de los estímulos intra y extracelulares, la activación de la ruta no siempre requiere el concurso de este complejo. Sarkar et al. definieron, en 2005, que la inducción de autofagia mediada por litio inhibe la enzima inositol monofosfatasa de forma mTOR-independiente. La inhibición de esta enzima eleva el nivel de PI3P, esencial en el reclutamiento de ATG16L1 a los autofagosomas<sup>27</sup> (véase apartados 2.2.2 y 2.2.3: *Nucleación y Elongación del fagóforo en Introducción*). Otro ejemplo es el de la quinasa AMPK, que detecta elevados niveles de AMP generados en un contexto de privación de nutrientes o disfunción mitocondrial, e induce autofagia activando directamente al complejo ULK<sup>28</sup> o indirectamente a VPS34 vía fosforilación de BECN1<sup>29</sup> (véase apartado 2.2.2. *Nucleación. Formación del fagóforo en Introducción*).

## 2.2. GENERACIÓN DEL AUTOFAGOSOMA

Una vez inducida la ruta autofágica, el material citoplasmático es capturado por una estructura de doble membrana, denominada autofagosoma. Los autofagosomas pueden fusionarse con endosomas tardíos (formando anfisomas) o con lisosomas (dando lugar a autolisosomas). La autofagia puede dividirse en varias etapas, esquematizadas en la **Figura 1**: iniciación, nucleación, elongación, maduración, fusión y degradación.



**Figura 1.** Esquema general de las etapas de la ruta autofágica. Una vez iniciada la ruta, la autofagia puede dividirse en varias etapas: nucleación, elongación del fagóforo, maduración del autofagosoma, fusión del autofagosoma o anfisoma con el lisosoma, degradación y reciclaje de componentes.

### 2.2.1. Iniciación

En el primer estadio de formación del autofagosoma, los cargos citosólicos se capturan en un compartimento no degradativo con estructura de membrana sencilla, denominada fagóforo<sup>30</sup>.

El primer complejo implicado en la formación del fagóforo está constituido por ULK1/2 (funcionalmente redundantes), ATG13, FIP200 y ATG101<sup>31</sup>. ATG101 se une

## INTRODUCCIÓN

directamente a ATG13 y es esencial en autofagia en células de mamífero, pero, al contrario que los otros tres miembros del complejo, carece de homólogo en levaduras<sup>32</sup>.

En ausencia de señales inductoras, mTORC1 se encuentra unido a ULK1/2-ATG13-FIP200, fosforilando ULK1/2 y ATG13 y, por tanto, inactivando la ruta. Una vez inducido, mTORC1 se disocia del complejo modificando el patrón de fosforilación de ULK1/2 y ATG13 y activando las etapas subsecuentes de la ruta<sup>31</sup>.

### 2.2.2. Nucleación. Formación del fagóforo

El siguiente complejo reclutado para la nucleación del fagóforo está constituido por ATG14-VPS34-p150-BECN1<sup>33</sup>. Este complejo, que incluye la fosfatidilinositol-3-quinasa de clase III (PI3KC3) VPS34, genera fosfatidil-inositol-3P (PtdIns3P o PI3P), esencial para la autofagia en mamíferos y levaduras<sup>34</sup>. Se ha propuesto que el complejo ATG14-VPS34-p150-BECN1 es atraído al fagóforo vía ATG13, que forma parte del complejo de iniciación ULK<sup>35</sup>.

La regulación del complejo por ATG14-VPS34-p150-BECN1 ocurre a través de proteínas que interaccionan con BECN1, como el regulador positivo AMBRA1, que se une directamente a BECN1<sup>36</sup>. Una vez inducida la ruta, ULK1/2 activado fosforila AMBRA1 y BECN1, estimulando así la actividad fosfatidilinositol-3-quinasa de VPS34<sup>37</sup>. Las proteínas WIPI1 y WIPI2 se unen al fosfatidilinositol-3-fosfato (PI3P) generado<sup>38,39</sup>, siendo reclutadas de esta forma al sitio de nucleación del fagóforo. Asimismo, la proteína DFCP1 es atraída a la región de nucleación vía interacción con PI3P<sup>40</sup>. Las proteínas WIPI y DFCP1 participan en el reclutamiento del sistema ATG12-5-16 durante la elongación del fagóforo (véase apartado 2.2.3. *Elongación del fagóforo en Introducción*). Adicionalmente, ATG2 actúa en coordinación con las proteínas WIPI favoreciendo la elongación del fagóforo<sup>41</sup>.

En células de mamífero, la etapa de nucleación se asocia al retículo endoplasmático, concretamente a un subdominio rico en PI3P, conocido como omegasoma (equivalente al complejo de ensamblaje del fagóforo o PAS en levaduras)<sup>42</sup>. El fagóforo se elonga desde el omegasoma, dando lugar a una estructura en forma de copa, e iniciando la captura del material citosólico<sup>43</sup>. Un elevado número de moléculas involucradas en la

iniciación del autofagosoma se localizan en el omegasoma. Es el caso de ULK1/2<sup>35</sup>, VPS34<sup>44</sup>, y efectores como ATG9<sup>45</sup> y las proteínas WIPI<sup>38</sup>.

La elongación del fagóforo es un proceso que implica la movilización de una gran cantidad de reservas de membrana, de procedencia diversa<sup>46</sup>. Aunque tradicionalmente se ha considerado al retículo endoplasmático el principal orgánulo de origen de la membrana autofagosomal<sup>47</sup>, en los últimos años se han identificado fuentes alternativas, entre las que destacan la mitocondria<sup>48</sup> y sus membranas asociadas<sup>44</sup>, la membrana plasmática<sup>49</sup>, los endosomas<sup>50</sup> y el aparato de Golgi<sup>51</sup>.

### 2.2.3. Elongación del fagóforo

La elongación del fagóforo es un proceso que involucra dos sistemas de conjugación similares a ubiquitina. El primer complejo está constituido por ATG5, ATG12 y ATG16L1. ATG12 se conjuga covalentemente con ATG5 gracias a la enzima de activación ATG7 (E1) y a la enzima de conjugación ATG10 (E2)<sup>52,53</sup>. Esta etapa difiere de la ubiquitinación en su irreversibilidad e independencia de enzimas ligasas (E3)<sup>54</sup>. Una vez generado el dímero ATG5-ATG12, ATG16L1 se une de forma no covalente a ATG5 y oligomeriza con más moléculas de ATG16L1, generando un complejo multimérico<sup>55</sup>. El complejo ATG5-ATG12-ATG16L1 se asocia a la membrana del fagóforo atraída por WIPIs y DFCP1, disociándose una vez formado el autofagosoma<sup>56</sup>.

El segundo complejo de conjugación similar a ubiquitina, implicado en la elongación del fagóforo, es el sistema LC3 (Atg8 en levaduras). Esta ruta se inicia con el procesamiento de LC3 por la cisteín proteasa ATG4, exponiendo un residuo de glicina en el extremo C-terminal de LC3<sup>57</sup>. A continuación, la enzima activadora ATG7 (E1) transfiere LC3 procesado a la enzima de conjugación ATG3 (E2)<sup>58</sup>. Finalmente, el residuo de glicina del extremo C-terminal se conjuga covalentemente con fosfatidiletanolamina (PE). En esta etapa, la actividad ligasa es proporcionada por el complejo ATG5-ATG12 (E3)<sup>59</sup>, mientras que ATG16L1 define el sitio en el que se lipida LC3<sup>60</sup>. LC3-II (LC3 conjugado con PE) es la forma asociada a membrana y generada tras la activación de la ruta autofágica, mientras que LC3-I se encuentra soluble en el citosol. La proteasa ATG4 puede, asimismo, mediar la liberación de la forma LC3-II de la

## INTRODUCCIÓN

membrana para su reciclaje en el citosol, una vez el autofagosoma finaliza su ciclo biológico<sup>57</sup>.

En células de mamífero se han identificado 4 isoformas de ATG4<sup>61</sup> y varias isoformas de LC3, éstas últimas divididas en dos subfamilias: LC3 y GABARAP<sup>62</sup>. Se postula que la subfamilia LC3 actúa antes que la subfamilia GABARAP en la etapa de elongación del fagóforo<sup>62</sup>.

La lipidación de LC3 y su localización en la célula se utilizan ampliamente como sistema reportero para medir el proceso autofágico, puesto que su magnitud correlaciona de forma aproximada con el número de autofagosomas presentes en la célula en un momento concreto y se encuentra unido a la membrana del autofagosoma durante todo el proceso<sup>63,64</sup>. En Western-blot, LC3-I y LC3-II presentan una movilidad electroforética ligeramente diferente. En inmunofluorescencia, la forma LC3-I se encuentra soluble y difusa en el citoplasma, mientras que LC3-II adquiere una disposición punteada.

La proteína transmembrana ATG9 favorece la expansión de las membranas autofágicas iniciales, transportando lípidos desde el Golgi hasta el retículo endoplasmático<sup>45</sup>. ATG9 es susceptible de regulación por el complejo ULK1/2 y VPS34<sup>65</sup>. En ausencia de autofagia, ATG9 se localiza en la red trans-Golgi y endosomas tardíos. En presencia de señales inductoras de la ruta, ATG9 colocaliza con marcadores autofágicos<sup>65</sup>.

### **2.2.4. Maduración del autofagosoma y fusión con el lisosoma**

Durante esta etapa, el fagóforo madura y se cierra para formar un autofagosoma completo. El autofagosoma se fusiona, eventualmente, con un lisosoma, convirtiéndose en un autolisosoma. El movimiento de los autofagosomas hacia los lisosomas es dependiente de microtúbulos<sup>66</sup>. Previo a su fusión con el lisosoma, el autofagosoma cerrado puede fusionarse con un endosoma temprano o tardío, generando una entidad de naturaleza mixta, el anfisoma<sup>67</sup>.

La fusión del autofagosoma (o anfisoma) con el lisosoma está regulada por diversas proteínas. El evento de fusión requiere tres familias de proteínas: GTPasas Rab, complejos de ligación de membranas y SNAREs. Las proteínas Rab se localizan en



## INTRODUCCIÓN

membranas específicas y reclutan a los complejos de ligación, que actúan como andamiajes, manteniendo próximos a los compartimentos susceptibles de fusión. Estos complejos colaboran con las proteínas SNARE en la fusión propiamente dicha, que se produce entre bicapas lipídicas enfrentadas<sup>68</sup>.

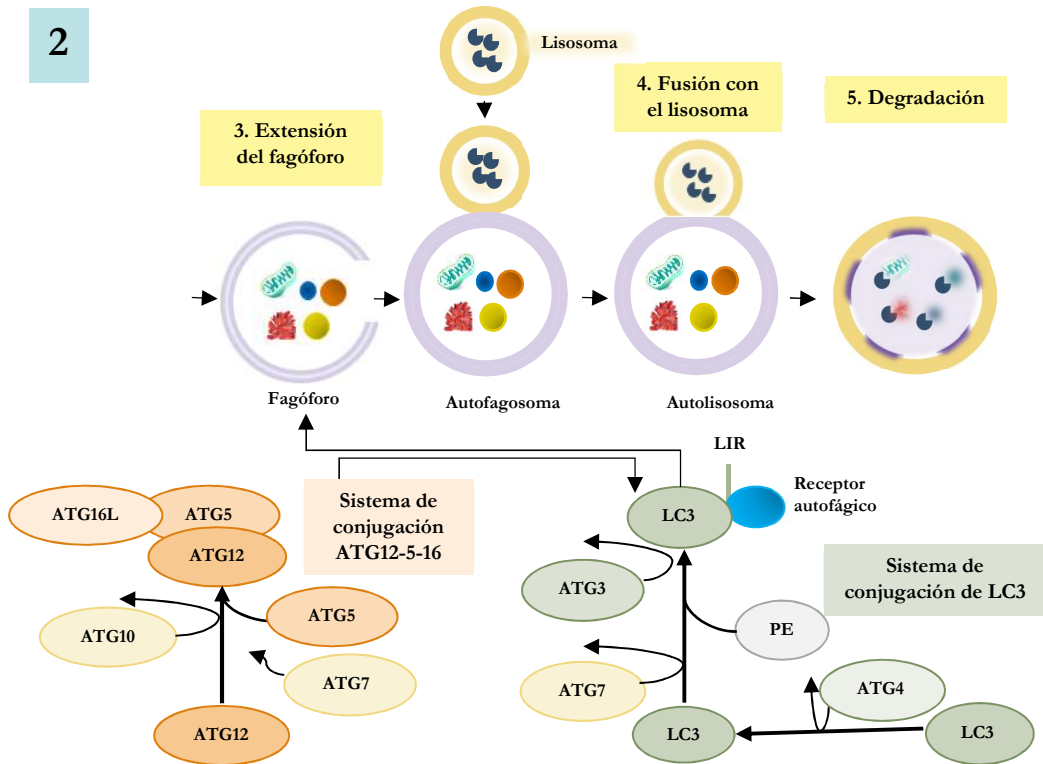
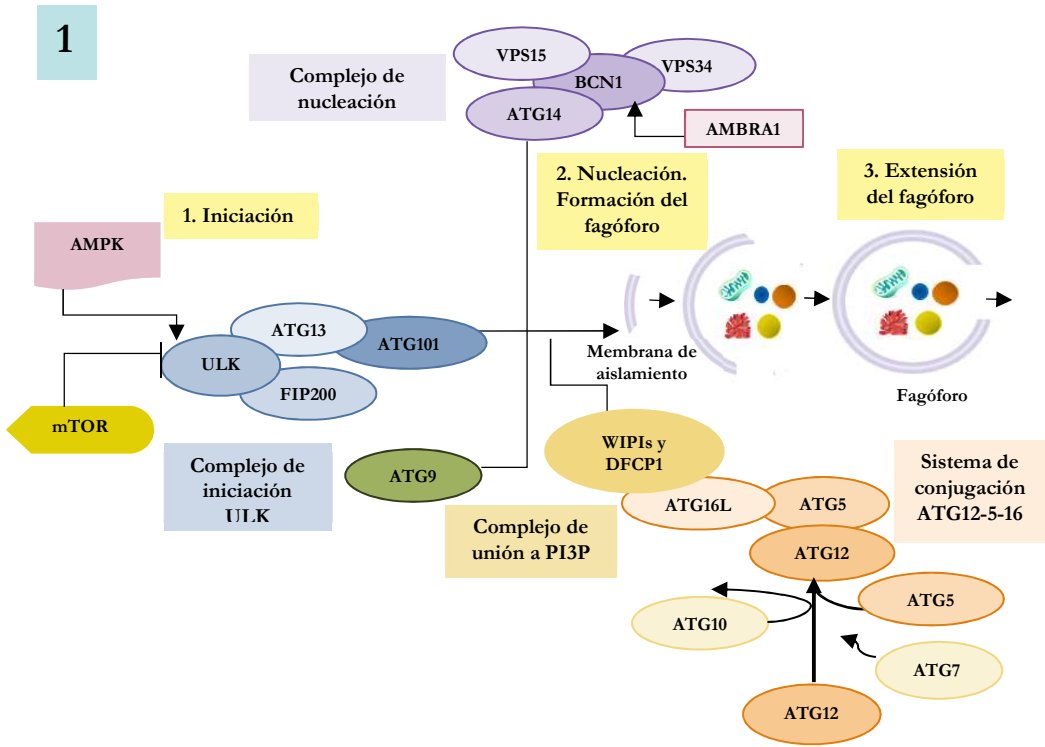
Entre las GTPasas involucradas en la fusión destaca RAB7, que promueve la fusión con el lisosoma favoreciendo el transporte mediado por microtúbulos. RAB7 es susceptible a regulación por UVRAG y RUBCN. UVRAG interacciona con VPS16, una subunidad del complejo de andamiaje HOPS, estimulando la actividad GTPasa de RAB7 y, por tanto, la fusión autofagosoma-lisosoma<sup>69</sup>. Por el contrario, RUBCN interacciona con UVRAG y lo regula negativamente, interfiriendo en la actividad de UVRAG y del complejo HOPS e impidiendo, de este modo, la maduración del autofagosoma<sup>70</sup>. Otras GTPasas implicadas en este evento son RAB33b<sup>71</sup> y RAB27<sup>2</sup>.

Adicionalmente, el proceso de fusión autofagosoma-lisosoma requiere la mediación de proteínas de la familia SNARE<sup>73</sup>, moléculas transmembrana con capacidad para ensamblarse en complejos de alta afinidad formados entre membranas opuestas<sup>74</sup>. Tras el estímulo autofágico, syntaxina 17 (STX17) se moviliza desde el citoplasma a la cercanía de los autofagosomas, y media la fusión interaccionando con miembros de la familia SNARE como SNAP29 y VAMP8, localizados en la membrana del lisosoma<sup>75</sup>.

Los complejos de ensamblaje de membranas proporcionan especificidad y facilitan la unión y fusión, generando entrecruzamientos entre membranas y estimulando la formación del complejo SNARE. Entre estos elementos de ensamblaje destaca el complejo HOPS, constituido por VPS33A, VPS16, VPS11, VPS18, VPS39 y VPS41<sup>76</sup>. Las subunidades del complejo HOPS son reclutadas a autofagosomas positivos para STX17, vía unión a los efectores de RAB7 PLEKHM1 y RILP<sup>77</sup>.

Tras la fusión autofagosoma-lisosoma, la degradación de la membrana lisosomal interna permite el procesamiento de los cargos por enzimas hidrolasas y su subsecuente reciclaje, redirigiéndose a rutas metabólicas esenciales. En la **Figura 2** se esquematiza la ruta autofágica, incluyendo las etapas de inicio a degradación final de los cargos, señalando las moléculas de mayor relevancia involucradas en el proceso.

# INTRODUCCIÓN



**Figura 2. Esquema simplificado de las etapas y complejos implicados en la ruta autofágica canónica.** La iniciación de la ruta, mediada por inhibición de mTOR o activación de AMPK, desencadena una sucesión de etapas que se inician con la formación del fagóforo y finalizan con la degradación del cargo. Las proteínas implicadas se organizan en complejos y actúan jerárquicamente. Durante las etapas de iniciación, nucleación y extensión actúan cuatro complejos clave: complejo de iniciación ULK, complejo de nucleación PI3KC3 y los sistemas de conjugación ATG12-5-16 y LC3. El fagóforo evoluciona a autofagosoma y, tras la fusión con el lisosoma, se convierte en un autolisosoma. En este último compartimento se efectúa la degradación de los cargos mediante enzimas hidrolasas.

### 3. LOS FENÓMENOS DE AUTOFAGIA NO CANÓNICA

Aunque no existe una definición única de autofagia canónica, se considera que los procesos que se engloban dentro de este subgrupo deben caracterizarse por su capacidad para direccionar material citosólico (de origen exógeno o endógeno, pero accesible a las proteínas citosólicas involucradas) a los lisosomas. Por tanto, la finalidad de la autofagia canónica es siempre degradativa<sup>78</sup>. Además, los fenómenos convencionales deben implicar la intervención jerárquica de las proteínas ATG (véase apartado 2. *La maquinaria autofágica en eucariotas superiores en Introducción*)<sup>16</sup>. Sin embargo, en los procesos no canónicos, se recluta un subgrupo de proteínas ATG a una membrana preexistente, cuya finalidad no es siempre degradativa<sup>16,78</sup>. En cualquier caso, la tendencia y recomendación actual es evitar el empleo del término “no canónico”, sustituyéndolo por autofagia BECN1/ULK-independiente, ATG7/ATG5/LC3-independiente o expresiones similares, en función del mecanismo alternativo que aplique en cada caso<sup>78</sup>.

El hecho de que la formación de autofagosomas funcionales no requiera el concurso de alguna de las etapas detalladas anteriormente, es un paradigma completamente establecido. Según lo descrito en el apartado 2.2.1. *Iniciación en Introducción*, existen diversas rutas de autofagia no canónica que sortean el circuito de iniciación TSC1/TSC2-mTORC1-ULK1/<sup>27-29</sup>.

Adicionalmente, se han descrito varias rutas autofágicas independientes de BECN1, esto es, autónomas en lo que refiere al mecanismo canónico de formación del autofagosoma. Es el caso de la autofagia inducida por la neurotoxina 1-metil-4-fenilpiridina (MPP+) o la autofagia mediada por resveratrol, asociadas a muerte neuronal y tumorigénesis, respectivamente<sup>79,80</sup>. Otros compuestos pro-apoptóticos como

## INTRODUCCIÓN

estaurosporina, MK801 y etopósido, inducen autofagia independiente de BECN1 en neuronas primarias de la capa cortical<sup>81</sup>. Asimismo, también se ha descrito la existencia de rutas independientes de BECN1 involucradas en fenómenos de diferenciación<sup>82</sup> o infección bacteriana<sup>83</sup>.

Las rutas independientes de BECN1 no excluyen, necesariamente, la vía PI3KC3-WIPI1-ATG5-LC3. Es el caso del resveratrol, con capacidad para inducir lipidación de LC3 dependiente de WIPI1, pero independiente de BECN1<sup>80</sup>.

En lo referido a etapas más tardías, se ha descrito que el tratamiento prolongado con etopósido de células carentes de ATG5, permite la generación de autofagosomas y anfisomas sin formación de LC3-II<sup>84</sup>. En este particular fenómeno autofágico, la iniciación es promovida por los complejos ULK1 y PI3KC3. Sin embargo, la elongación de la membrana autofagosomal no requiere ATG9 ni los sistemas de conjugación ATG5, ATG7 y LC3. Es la GTPasa RAB9, implicada en el tráfico vesicular desde la red trans-Golgi, la responsable de la elongación de los autofagosomas generados que, eventualmente, pueden fusionarse con los lisosomas para la degradación de sus cargos. Se ha descrito que esta ruta, en paralelo con la vía convencional dependiente de ATG5-ATG7, participa en la eliminación de las mitocondrias durante la maduración de los eritrocitos *in vivo*<sup>85</sup>.

Asimismo, Mizushima y colaboradores han descrito la formación de estructuras similares a autofagosomas en células carentes del sistema de conjugación ATG3<sup>86</sup>. Adicionalmente, Mizushima et al. postulan que, aunque el sistema de conjugación ATG3-5-7 no participa en la fusión de las estructuras similares a autofagosomas con los lisosomas, sí interviene en la degradación eficiente de la membrana lisosomal interna (IAM)<sup>86</sup>.

Adicionalmente, numerosos patógenos penetran en la célula a través de la ruta fagocítica y finalmente son englobados en autofagosomas, favoreciendo su replicación. Este fenómeno se desencadena, por ejemplo, tras la infección de macrófagos por *Toxoplasma gondii*<sup>87</sup>, y su finalidad es no degradativa. La maquinaria autofágica se recluta a los fagosomas de membrana sencilla que emanan de la membrana plasmática, participando en su maduración<sup>88</sup>. Se postula que este proceso es ATG-dependiente, pero

no vinculado a mTORC1 ni ULK1/2, y no restringido exclusivamente al procesamiento de patógenos vía fagocitosis, sino involucrado también en procesos como la entosis (entrada de células vivas en el citoplasma de otra célula) o la macropinocitosis (captación dirigida de material del espacio extracelular mediante invaginación de la membrana plasmática)<sup>89</sup>.

### 4. SELECTIVIDAD DEL PROCESO DE AUTOFAGIA

Aunque tradicionalmente se consideraba la autofagia un proceso inespecífico, desencadenado en ausencia de nutrientes esenciales, el paradigma actual establece la existencia de diversas formas de autofagia selectivas, que actúan como una respuesta adaptativa al estrés celular en general: genotoxicidad, disfuncionalidad de orgánulos o presencia de patógenos invasores. En contraposición a la autofagia no selectiva, esta modalidad favorece la eliminación de componentes específicos, obsoletos o potencialmente nocivos<sup>90</sup>. Opera incluso en condiciones basales, eliminando, por ejemplo, orgánulos superfluos o dañados<sup>91</sup>. Esta característica de selectividad pone de manifiesto las implicaciones fisiológicas y patológicas de este proceso en células animales<sup>92</sup>.

Las diferentes modalidades de autofagia selectiva se caracterizan por la existencia de un nodo que vincula el cargo específico con la maquinaria autofágica. Dicha interacción es mediada por un conjunto de moléculas que reciben el nombre de proteínas adaptadoras, entre las que destacan: NBR1<sup>93</sup>, SQSTM1/p62<sup>94</sup>, CALCOCO2/NDP52<sup>95</sup> y OPTN/OPTINEURIN<sup>96</sup>. De esta forma, cargos como agregados proteicos insolubles o patógenos citosólicos, pueden ser fuertemente ubiquitinados y reconocidos así por las moléculas adaptadoras. Estas moléculas presentan la capacidad de unir simultáneamente ubiquitina y LC3, dirigiendo los cargos a degradación. La interacción entre LC3 y las moléculas adaptadoras está mediada por firma molecular WXXL, denominada dominio de interacción con LC3 (LIR)<sup>97</sup>.

La interacción con la maquinaria autofágica convencional puede originarse, incluso, en etapas más tempranas de la ruta, de forma previa al marcaje con LC3. Esto es, los

# INTRODUCCIÓN

complejos BECN1-PI3KC3-ATG14 o ATG12-ATG5-ATG16L1 pueden actuar como nodos de interacción para determinados estímulos inductores<sup>92</sup>.

Los fenómenos de autofagia selectiva se pueden clasificar atendiendo al cargo diana, a su finalidad (degradativa o no), al nodo de interacción con la maquinaria autofágica canónica o al tipo de vesículas que se generan, entre otros aspectos. En los subsiguientes apartados se discuten los ejemplos más ampliamente descritos y representativos de autofagia selectiva.

## 4.1. FAGOCITOSIS ASOCIADA A LC3 (LAP)

Existen diversidad de fenómenos durante los cuales un cargo específico es capturado en autofagosomas convencionales de doble membrana y dirigido a degradación lisosomal. No obstante, en la actualidad se postula que el simple marcaje de una vesícula preexistente con LC3 es suficiente para dirigir ésta a degradación. Es el caso de la fagocitosis asociada a LC3 (LAP). Durante este proceso, la estimulación de receptores de tipo Toll (TLRs) media la formación de fagosomas, que son marcados posteriormente con LC3 con fines degradativos. Se ha descrito que este tipo de fagocitosis emplea parte de la maquinaria de la ruta canónica (al menos, el complejo de nucleación PI3K3C), pero se desconoce cómo se reclutan los sistemas de conjugación de LC3 al fagosoma<sup>98</sup>. Este fenómeno participa, entre otros eventos celulares, en la eliminación de células muertas<sup>99</sup> o en la presentación de antígenos mediada el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) en células dendríticas<sup>100</sup>.

## 4.2. XENOFAGIA

La xenofagia es un tipo de autofagia selectiva que procesa microorganismos invasores. Por ejemplo, los receptores inmunes NOD1 y NOD2 reclutan y unen ATG16L1 en la región de entrada de *Shigella*, favoreciendo su degradación lisosomal<sup>101</sup>. Adicionalmente, trabajo previo de nuestro laboratorio ha permitido determinar que la molécula transmembrana TMEM59 promueve el marcaje de su propio compartimento de membrana sencilla con LC3. Este fenómeno se encuentra implicado, al menos parcialmente, en la respuesta autofágica frente a *Staphylococcus aureus*<sup>102</sup>. En ambos casos, ATG16L1 actúa como un nodo para la autofagia selectiva de microorganismos invasores.

En otras ocasiones, la finalidad del marcaje de la membrana del autofagosoma con LC3 no es degradativa. *Yersinia pestis* prolifera en el interior de vesículas multimembrana marcadas con LC3<sup>103</sup> y los poliovirus emplean autofagosomas como sitios de replicación<sup>104</sup>. En ambos casos, la inhibición de la ruta autofágica implica una reducción en la ratio de replicación bacteriana o viral, respectivamente.

### 4.3. AGREFAGIA

La agrefagia involucra la degradación de proteínas constituidas por tractos aberrantes de poliglutamina o polialanina<sup>105</sup>, esto es, agregados de proteína  $\beta$ -amiloide<sup>106</sup>, huntingtina<sup>107</sup> o  $\alpha$ -sinucleína<sup>108</sup>, entre otras. Estos sustratos no son susceptibles de ser eliminados por la vía ubiquitina/proteasoma (UPS), debido a su longitud o a la naturaleza de las cadenas de ubiquitina. En este contexto surge la agrefagia, como una alternativa dinámica al estrés celular.

La degradación es mediada por proteínas adaptadoras como TOLLIP (homólogo de Cue5 en levaduras), p62/SQSTM1, NBR1 y OPTN<sup>109</sup>. Estas moléculas receptoras reconocen proteínas agregadas que han sido ubiquitinadas y actúan como nexo con LC3. Otro efector interesante en este contexto es la proteína ALFY<sup>110</sup>. La proteína ALFY no puede unir directamente sustratos ubiquitinados, pero interacciona con ATG5, p62/SQSTM1 y miembros de la subfamilia GABARAP y PI3P, actuando como una molécula de ensamblaje durante la degradación de agregados mediada por p62<sup>110</sup>.

### 4.4. MITOFAGIA

La mitofagia es el subtipo de autofagia selectiva más ampliamente descrito. Funciona en coordinación con el sistema ubiquitina/proteasoma (UPS), como mecanismo de control de calidad del citoplasma y mantenimiento de la homeostasis celular, dirimiendo la cantidad y calidad de mitocondrias en la célula. Participa en eventos de diferenciación celular<sup>111</sup>, hipoxia<sup>112</sup> y desarrollo<sup>113</sup>. Existen dos sistemas responsables de la mayor parte de los fenómenos mitofágicos: por una parte, la Ser/Thr quinasa PINK1 y la E3-ubiquitín-ligasa PARK2<sup>114</sup> y por otra, la proteína receptora BNIP3L (NIX)<sup>111</sup>.

## INTRODUCCIÓN

- **Sistema PARK2-PINK1:** la pérdida de integridad de la membrana mitocondrial provoca su despolarización, que es captada por el sensor PINK1. Bajo estas circunstancias, PINK1, que en condiciones fisiológicas se translocaría a la membrana mitocondrial interna (IMM), permanece en la membrana mitocondrial externa (OMM) y se activa por autofosforilación. Una vez activado, fosforila PARK2 y residuos de ubiquitina de proteínas situadas en la membrana mitocondrial externa. Los procesos de fosforilación activan a más complejos PINK1-PARK2, desencadenándose un bucle de activación que permite a la mitocondria poliubiquitinada ser reconocida por p62 y OPTN<sup>114</sup>.
- **BNIP3L (NIX):** se trata de una molécula adaptadora, implicada en mitofagia inducida por hipoxia<sup>112</sup> y en diferenciación reticular<sup>111</sup>. BNIP3L se localiza en la membrana mitocondrial externa (OMM) y presenta un dominio de interacción con LC3 o LIR.

Cabe mencionar que otras moléculas como la cardiolipina (lípidos), también se encuentran implicadas en mitofagia vía interacción con LC3<sup>115</sup>. Ello contradice la afirmación genérica que considera proteínas a todas las moléculas adaptadoras.

### 4.5. PEXOFAGIA

La pexofagia es la eliminación de peroxisomas mediada por p62/SQSTM1 y NBR1. Se desconoce cuál es el estímulo que desencadena la ruta en células animales. Se ha postulado que dicha activación puede deberse a la acumulación en membrana de la proteína peroxisomal PEX5<sup>116</sup>, o a la activación de PEX14, que puede interaccionar directamente con LC3 en ausencia de nutrientes esenciales<sup>117</sup>.

### 4.6. OTROS SUBTIPOS DE AUTOFAGIA SELECTIVA

Otros subtipos de autofagia selectiva menos caracterizados son la reticulofagia, la nucleofagia y la lisofagia. La reticulofagia se desencadena como causa del inadecuado funcionamiento del retículo endoplasmático, que ocasiona la acumulación de proteínas mal plegadas y estrés reticular. La proteína RETREG actúa como molécula adaptadora, interaccionando con LC3<sup>118</sup>.



La nucleofagia implica la degradación selectiva de cromatina o lámina nuclear, siendo un proceso escasamente estudiado en eucariotas complejos<sup>119</sup>.

Finalmente, la lisofagia favorece la eliminación de lisosomas dañados, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis celular. Galectina-3 (LGALS3) interacciona con glicoproteínas expuestas en la membrana lisosomal dañada y colocaliza con LC3. Se postula que, como en mitofagia o pexofagia, el mecanismo es dependiente de la vía ubiquitina-p62/SQSTM-LC3<sup>120</sup>.

## 5. IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS DE LA AUTOFAGIA

### 5.1. TUMOROGÉNESIS

Los roles de la autofagia en cáncer son altamente dependientes del contexto celular. Paradójicamente, puede presentar un comportamiento dual, actuando como una vía citoprotectora<sup>121,122</sup> o, por el contrario, permitiendo a la masa tumoral evadir el estrés genotóxico y los procesos inflamatorios preventivos desencadenados por el sistema inmune<sup>123</sup>. En este último caso, la autofagia aportaría plasticidad metabólica a las células cancerígenas, permitiendo su supervivencia en un microambiente subóptimo. Esto es, la autofagia contribuiría a sostener el crecimiento de la masa tumoral en un contexto de hipoxia, inflamación, presencia de señales antiproliferativas, inestabilidad genética o apoptosis<sup>124</sup>.

La contribución de la autofagia al incremento de la susceptibilidad a la tumorigénesis se encuentra ampliamente descrita en ciertos contextos celulares. Es el caso, por ejemplo, de las alteraciones en BECN1 o ATG4, que contribuyen al desarrollo del proceso tumoral<sup>125,126</sup>. No obstante, en otros modelos, la contribución de la autofagia es dependiente del *status* de genes adicionales: en el adenocarcinoma ductal pancreático previene la formación de neoplasias intraepiteliales en presencia de p53, pero contribuye al crecimiento tumoral en ausencia del mismo<sup>127</sup>.

Además, la autofagia puede actuar sobre el microambiente tumoral, regulando, por ejemplo, la secreción de factores que, como IL-6, favorecen la invasión oncogénica<sup>128</sup> o modulando la biogénesis y secreción de los exosomas<sup>129</sup>.

## INTRODUCCIÓN

En resumen, la diversidad funcional de este fenómeno lo convierte en un nodo clave en la regulación del crecimiento tumoral, la alteración del microambiente, la diseminación de células tumorales y la modulación de la respuesta inmune.

### 5.2. NEURODEGENERACIÓN

La formación de agregados proteicos a nivel del sistema nervioso central conduce a la aparición de un fenotipo de muerte neuronal característico de diversas enfermedades neurodegenerativas, como Parkinson, Alzheimer o enfermedad de Huntington. En células normales, la degradación de estos agregados proteicos es mediada por el sistema ubiquitina/proteasoma. Sin embargo, este mecanismo es altamente susceptible a diversos tipos de estrés celular y su eficiencia decrece proporcionalmente a la edad del individuo<sup>130</sup>. En este contexto, la autofagia cobra especial relevancia en el mantenimiento de la homeostasis celular. De hecho, animales deficientes en diversos genes de la ruta autofágica, como ATG5 o ATG7, fallecen, en su mayoría, a raíz de la patología neurodegenerativa que desarrollan<sup>131,132</sup>.

La autofagia previene la neurodegeneración eliminando agregados proteicos y mitocondrias dañadas. La molécula adaptadora p62 presenta especial relevancia en la eliminación de agregados proteicos. Inicialmente, p62 transporta los agregados a una región de la célula denominada agresoma, con el objetivo de minimizar la citotoxicidad de los mismos. A continuación, actúa como nodo de conexión para la captura del agresoma por el fagóforo<sup>94,133</sup>.

La mitofagia también desempeña un rol esencial en la prevención de la neurodegeneración, mediante la eliminación de mitocondrias no funcionales que elevan los niveles de ROS en la célula. El incremento de ROS repercute negativamente en el genoma y en el proteoma. Se ha descrito que mutaciones en el sistema PINK1-PARK2 (véase apartado 4.4. *Mitofagia en Introducción*) se encuentran involucradas en la aparición de una forma temprana de enfermedad de Parkinson<sup>134</sup>.

Contrariamente a la diversidad de efectos (en ocasiones, diametralmente opuestos) que la activación de la autofagia presenta en procesos tumorigénicos, su potencial preventivo en enfermedad neurodegenerativa se encuentra ampliamente establecido. Se

postula, por tanto, que la activación de la ruta podría constituir una estrategia alternativa en la prevención de esta clase de patologías.

### 5.3. DESARROLLO

La autofagia participa en los cambios fenotípicos drásticos que las células sufren durante el desarrollo. Por ejemplo, la disrupción de BECN1 provoca un fenotipo de letalidad embrionaria a día E7.5 de gestación. Dicho fenotipo se atribuye a defectos en el desarrollo del endodermo visceral, que constituye el sistema fundamental de intercambio de nutrientes y detoxificación en el embrión<sup>135</sup>.

Recientemente, se ha descrito que la autofagia se encuentra implicada en la degradación del receptor Notch1, siendo éste un proceso fundamental en la diferenciación celular. Este receptor se degrada en vesículas positivas para ATG16L1, precursoras de autofagosomas. Mutaciones hipomórficas en ATG16L1, que alteran el normal procesamiento de Notch1, provocan la retención del desarrollo neural en estadios tempranos<sup>136</sup>.

Adicionalmente, la ruta autofágica participa en el desarrollo, diferenciación y protección de células de la retina, así como en la supervivencia de fotorreceptores<sup>137</sup>.

### 5.4. INMUNIDAD INNATA Y ADAPTATIVA

La autofagia participa en variedad de funciones inmunes, como la eliminación de bacterias intracelulares, la secreción de citoquinas inflamatorias, el control de la inflamación o la presentación antigénica. De hecho, animales deficientes en diferentes genes de la ruta son altamente susceptibles a infecciones o al desarrollo de enfermedades autoinmunes, como lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, psoriasis, diabetes o esclerosis múltiple<sup>130</sup>. A nivel tumoral, la autofagia modula el reclutamiento e interacción de elementos de la respuesta inmune innata y adaptativa<sup>138</sup>.

Entre los microorganismos susceptibles de ser eliminados vía autofagia, destacan las familias de *Mycobacteria*, *Listeria*, *Salmonella*, *Legionella*, *Shigella* o *Streptococcus*<sup>139</sup>. La elevada complejidad del marcaje de estos patógenos con ubiquitina define una firma molecular que no solo atrae a la maquinaria autofágica, sino que en ocasiones estimula localmente

## INTRODUCCIÓN

la señalización por NF- $\kappa$ B, maximizando la respuesta antimicrobiana<sup>140</sup>. Tal es la relevancia de este sistema de eliminación de patógenos que, como se señalaba en el apartado 4.2. *Xenofagia* en *Introducción*, algunos microorganismos invasores han desarrollado sistemas que les permiten evadir la respuesta autofágica e, incluso, manipularla a su favor, pudiendo replicarse más eficientemente una vez capturados en los autofagosomas<sup>103,104</sup>.

Aunque el hecho de que la autofagia sea un mecanismo universal de defensa contra patógenos no se halla completamente establecido, sí participa en la compleja respuesta celular contra microorganismos invasores.

### 5.5. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (IBD)

En la última década ha cobrado especial relevancia el estudio del proceso autofágico en el contexto de la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD, del inglés “*Inflammatory Bowel Disease*”). Se postula que esta clase de patologías se caracterizan por la presencia de una reacción inflamatoria alterada pero continua, en respuesta a microorganismos de la flora intestinal en un huésped genéticamente susceptible<sup>141</sup>. Esto es, la existencia de un factor genético aislado no desencadena la enfermedad, sino que se requiere la concurrencia de factores ambientales. Dentro del grupo de enfermedades inflamatorias intestinales destacan la colitis ulcerosa (UC, del inglés “*Ulcerative Colitis*”) y la enfermedad de Crohn (CD, del inglés “*Crohn's disease*”).

La enfermedad de Crohn es una patología compleja, que implica la inflamación de cualquier parte del colon o intestino delgado, afectando mayormente a la región del íleon. Etiológicamente, el epitelio intestinal, que en individuos sanos constituye una barrera a la infiltración bacteriana y subsecuente inflamación, pierde su integridad. La disfuncionalidad de las células epiteliales intestinales, como las células de Paneth y las células caliciformes, contribuye al fenotipo. Su incapacidad para participar en la respuesta inmune mediante la secreción de péptidos antibacterianos y mucus favorece la adhesión bacteriana y la infiltración<sup>141</sup>.

La sintomatología de la enfermedad de Crohn incluye dolor abdominal, diarrea, sangrado rectal y pérdida de peso, que conducen a un debilitamiento general del paciente.

## INTRODUCCIÓN

El tratamiento farmacológico se basa en corticoesteroides e inmunosupresión, requiriendo, en ocasiones, cirugía ablativa<sup>142</sup>. La inespecificidad de los tratamientos disponibles en la actualidad se debe, en parte, al desconocimiento de las causas moleculares de la enfermedad. Sin embargo, en la última década, un gran número de estudios de asociación del genoma completo (GWAS) ha permitido la identificación de alteraciones implicadas en el inicio y desarrollo de esta patología<sup>143-148</sup>. Varios de los polimorfismos descritos afectan a moléculas clave en inmunidad innata y autofagia, como NOD2, IRGM, ATG16L1 o IL23R, así como a numerosas rutas cruciales en el mantenimiento de funcionalidad de la barrera intestinal (por ejemplo A20/TNFAIP3, que participa en el control de la inflamación y la muerte celular), la restitución epitelial, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), la regulación de la inmunidad adaptativa o el estrés reticular<sup>141</sup>.

Los estudios GWAS también han descrito asociaciones entre enfermedad de Crohn y alteraciones en componentes de la ruta de señalización mediada por la citoquina antiinflamatoria interleucina 10 (IL-10), como IL-10RA, IL-10RB, STAT3, TYK2, JAK2 o la propia IL-10<sup>146</sup>. De hecho, las alteraciones en la ruta de señalización inducida por IL-10 se hallan asociadas a una forma especialmente grave y temprana de enfermedad de Crohn<sup>146</sup>.

Aunque el estudio de la asociación entre autofagia y enfermedad inflamatoria intestinal constituye un área de trabajo extensa, que ha generado nuevos y relevantes conocimientos científicos, también se ha descrito que la autofagia participa en la respuesta del sistema respiratorio a infecciones y estrés<sup>149</sup>. En este caso, la autofagia muestra un comportamiento dual. En condiciones basales, es fundamental para la inhibición de la inflamación espontánea en el tracto respiratorio y para la respuesta de los leucocitos pulmonares a la infección. No obstante, si la inducción de la ruta autofágica persevera en el tiempo o resulta ineficiente, puede resultar perjudicial para las células epiteliales pulmonares, causando daño pulmonar<sup>149</sup>.

# INTRODUCCIÓN

## 6. ETIOLOGÍA MOLECULAR DE LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (IBD)

Considerando la relevancia de determinadas moléculas implicadas en autofagia o en señalización pro y antiinflamatoria en el origen y desarrollo de la enfermedad inflamatoria intestinal (fundamentalmente, en enfermedad de Crohn), en los subsiguientes apartados se describirán las implicaciones de aquellas que resultan más relevantes en el contexto de este estudio. Se trata de las moléculas relacionadas con autofagia ATG16L1 y NOD1/2, las implicadas en la vía de señalización de interleucina 10 (IL-10) e interleucina 31 (IL-31) y la molécula antiinflamatoria A20/TNFAIP3.

### 6.1. ATG16L1

#### 6.1.1. Estructura de ATG16L1

ATG16L1 se puede dividir arbitrariamente en cuatro regiones:

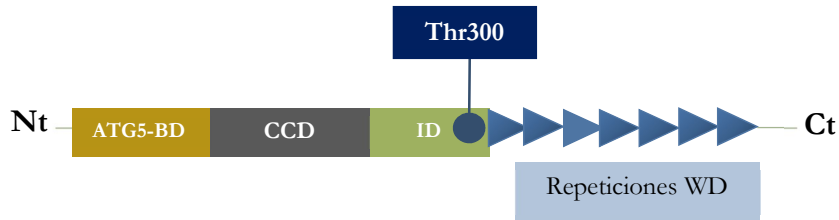
- Dominio de unión a ATG5 (*ATG5-Binding Domain* o ATG5-BD)<sup>56</sup>: aminoácidos 1-77.
- Región de dimerización con estructura coiled-coil (CCD), responsable de la oligomerización de moléculas de ATG16L1: aminoácidos 78-230.
- Región intermedia (ID), de interacción con moléculas como FIP200<sup>150,151</sup>: aminoácidos 231-319.
- Dominio WD40 (o WDD), constituido por 7 repeticiones de tipo WD40: aminoácidos 320-607<sup>56</sup>.

Generalmente, se considera que las regiones ATG5-BD, CCD e ID constituyen el dominio Nt de la molécula, mientras que el WDD equivaldría al dominio Ct de ATG16L1. En la **Figura 3** se adjunta un esquema de la estructura de ATG16L1 en mamíferos y de su homólogo Atg16 en levaduras.

ATG16L1 consta de 20 exones, si bien se han descrito diversas isoformas o variantes de procesamiento alternativo de esta molécula. La isoforma  $\alpha$  carece de los exones 8 y 9, mientras que la isoforma  $\beta$  carece únicamente del exón 9. La isoforma  $\gamma$  presenta todos los exones<sup>56</sup>. ATG16L1- $\alpha$  y ATG16L1- $\beta$  forman un característico doblete en Western-

blot, debido a su semejante peso molecular. Su abundancia relativa varía en función del tejido en particular. Por ejemplo, ATG16L1- $\gamma$  es la isoforma más abundante en el cerebro, mientras que en riñón e hígado se expresan ATG16L1- $\alpha$  y ATG16L1- $\beta$ , siendo ATG16L1- $\alpha$  la isoforma más abundante en ambos órganos<sup>56</sup>.

## ESTRUCTURA DE ATG16L1 EN MAMÍFEROS



## ESTRUCTURA DE Atg16 EN LEVADURAS



**Figura 3.** Esquema de la estructura de ATG16L1 en mamíferos (parte superior) y su homólogo Atg16 en levaduras (parte inferior). La región Nt, que incluye los dominios de unión a ATG5 (ATG5-BD), de dimerización o coiled-coil, (CCD) y la región intermedia (ID), es común a mamíferos y levaduras. La región Ct o dominio WDD se encuentra exclusivamente en eucariotas superiores.

### 6.1.2. El dominio WDD de ATG16L1. Estructura

El dominio WDD contiene repeticiones de aproximadamente 40 aminoácidos, constituidas por el dipéptido GH (glicina-histidina) en la región N-terminal y el dipéptido WD (triptófano-ácido aspártico) en la región C-terminal. Entre ambas regiones se dispone una secuencia central conservada<sup>152</sup>. Las proteínas con dominios WDD pueden incorporar de 4 a 16 unidades repetidas del dominio (por ejemplo, ATG16L1 consta de 7 repeticiones WD), dispuestas en estructura de hélice beta. A nivel conformacional, el dominio WDD se pliega sobre sí mismo en disposición cónica<sup>152</sup>.

### 6.1.3. El dominio WDD de ATG16L1. Función

Las proteínas con dominios WDD son exclusivas de organismos eucariotas y están implicadas en diversidad de funciones, como señalización celular, transcripción, regulación del ciclo celular, apoptosis y autofagia<sup>153</sup>.

## INTRODUCCIÓN

El dominio WDD no está presente en la molécula Atg16 de levaduras (**Figura 3**), siendo prescindible para las funciones básicas de la autofagia en organismos unicelulares. Tampoco es imprescindible para el mantenimiento de la autofagia canónica (basal o inducida por estrés nutricional), siendo la región N-terminal suficiente para sustentarla<sup>150,151,154–156</sup>. Efectivamente, el dominio N-terminal es el que define la región en la que LC3 lipidado se inserta en los autofagosomas<sup>60</sup>. De hecho, la mayor parte de los efectores autofágicos que interactúan con ATG16L1 (ATG5<sup>56</sup>, FIP200<sup>150,151</sup>, WIPI2<sup>157</sup> o Rab33<sup>158</sup>) lo hacen a través de la región N-terminal.

Aunque el dominio WDD es prescindible para la autofagia canónica, se ha relacionado con control inflamatorio, tráfico de vesículas secretoras en células de Paneth y xenofagia<sup>102,156,159,160</sup>. Un ejemplo de ello es su participación en xenofagia frente a *Staphylococcus aureus*. Durante este proceso, vesículas de membrana sencilla que engloban al patógeno se marcan directamente con LC3, siendo dirigidas más eficazmente al compartimento lisosomal (véase apartado 4.2 *Xenofagia en Introducción*)<sup>102,156</sup>. Trabajo previo de nuestro laboratorio ha permitido dilucidar que esta actividad está mediada por la proteína transmembrana TMEM59, que activa esta modalidad de autofagia no convencional interactuando con la región WDD de ATG16L1, a través de un motivo aminoacídico concreto<sup>102,156</sup>. El motivo de unión al dominio WDD está funcionalmente conservado en otras proteínas, sugiriendo que moléculas adicionales podrían reclutar ATG16L1 mediante un mecanismo análogo.

Por otra parte, se ha descrito que ATG16L1 puede interactuar con cargos poliubiquitinados con independencia de la ruta ubiquitina-adaptador-LC3. De hecho, el dominio WDD presenta la capacidad de interactuar con ubiquitina bien directamente, bien a través de FIP200<sup>161</sup>.

Asimismo, la ausencia del dominio WDD imposibilita la modalidad de fagocitosis asociada a LC3 (o LAP, véase apartado 4.1. *Fagocitosis asociada a LC3 (LAP)* en *Introducción*)<sup>162,163</sup>, implicada en control inflamatorio y autoinmunidad. De hecho, el dominio WDD es esencial en el reclutamiento del propio ATG16L1 y la lipidación de LC3 en procesos no-canónicos<sup>162</sup>. La inhibición de la autofagia no canónica en ratones



## INTRODUCCIÓN

deficientes en el dominio WDD (E230) inhibe la presentación antigénica mediada por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) en células dendríticas<sup>162</sup>.

El dominio WDD también puede interactuar con la proteína de unión a DNA dañado (DDB1) constituyente del complejo Cullin-E3-ubiquitin-ligasa<sup>164</sup>, la proteína transmembrana TMEM166/EVA1A asociada a la membrana autofagosomal<sup>165</sup>, TRIM20, implicada en la degradación vía autofagia de componentes clave de los sistemas de respuesta inflamatoria e IFN-1<sup>166</sup>, T3JAM, que modula la señalización por JNKs controlando el crecimiento celular<sup>102,156</sup> y DEDD2, mediador de apoptosis<sup>102,156</sup>.

Los datos anteriormente descritos sustentan la noción de que el dominio WDD podría haber sido añadido durante la evolución como un sitio de ensamblaje para efectores que contienen un motivo de unión y que, hipotéticamente, activarían ATG16L1 para su participación en actividades autofágicas atípicas, como el control inflamatorio y la eliminación de patógenos. En cualquier caso, el dominio WDD no desempeña sus funciones aisladamente, siendo imprescindible el concurso del dominio efector N-terminal.

### 6.1.4. El polimorfismo ATG16L1-A300 y enfermedad de Crohn

El polimorfismo A300 en ATG16L1 (rs2241880), localizado adyacentemente al dominio WDD (**Figura 3**), confiere susceptibilidad a enfermedad de Crohn<sup>147,148</sup>. Se trata de un cambio de codón no sinónimo (A→G), en el que la treonina (T) en posición 300, se sustituye por alanina (A). Dada su proximidad con la región WDD, la presencia de este polimorfismo podría alterar actividades no convencionales mediadas por este dominio. Por ejemplo, sistemas celulares reconstituidos con la versión A300 de ATG16L1 son incapaces de mediar xenofagia en respuesta a *Salmonella typhimurium*. Este patógeno es utilizado como microorganismo modelo para la inducción de autofagia, no tratándose de un agente causal de enfermedad de Crohn<sup>159</sup>.

Sin embargo, otros autores señalan que células con la variante alélica A300 son más eficientes en la eliminación de *Salmonella typhimurium* respecto a sus homólogas WT<sup>160</sup>, argumentando que el efecto del alelo de riesgo es dependiente del patógeno, duración de la infección y tipo celular. Pese a la existencia de datos aparentemente contradictorios,

## INTRODUCCIÓN

parece indiscutible la contribución de ATG16L1 al control de la proliferación de microorganismos invasores. Este control podría estar mediado por el dominio WDD y alterado en presencia del alelo de riesgo.

Asimismo, se ha descrito que los aminoácidos 296-299 de ATG16L1 constituyen un sitio de corte por caspasa 3. El estrés metabólico o reticular, la activación de receptores de muerte o la infección de ciertos patógenos intracelulares incrementan la degradación de ATG16L1 mediada por caspasa 3 en presencia del alelo de riesgo A300<sup>167</sup>, ligando así el estrés celular y los estímulos apoptóticos con una autofagia defectiva. El incremento de la degradación de ATG16L1 en condiciones de estrés redundante en una reducción generalizada de la autofagia. De hecho, ratones con la variante A316 (equivalente a A300 humano) presentan defectos en la eliminación del patógeno *Yersinia enterocolitica*<sup>167</sup>, así como una exacerbada respuesta inflamatoria (incrementándose la producción de factores como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6)<sup>168</sup>.

Adicionalmente, se ha reportado que pacientes homocigotos para el alelo de riesgo A300 presentan alteraciones a nivel de las células de Paneth. Las células de Paneth son un tipo especializado de células epiteliales localizadas en la base de las criptas del íleon, relevantes en el mantenimiento de la inmunidad mucosal. En las células de Paneth de estos pacientes se observó un aberrante empaquetamiento y exocitosis de gránulos antimicrobianos. Simultáneamente, los perfiles transcriptómicos se encontraban alterados, con un incremento del metabolismo lipídico y de citoquinas proinflamatorias<sup>169</sup>. Dichos defectos se identificaron también en ratones hipomórficos para ATG16L1<sup>169</sup> (los ratones deficientes en ATG16L1 no son viables) y en ratones portadores del alelo de riesgo A300 infectados con un norovirus murino persistente (MNV CR6)<sup>170</sup>. Estos estudios reflejan la complejidad de patologías inflamatorias como la enfermedad de Crohn, y refuerzan la hipótesis de que el origen etiológico de la misma es la combinación de determinados factores ambientales (como la exposición a patógenos) en un huésped genéticamente susceptible. La modificación de la capacidad de unión del dominio WDD en presencia del alelo de riesgo podría alterar actividades no convencionales mediadas por este dominio, con relevancia en enfermedad inflamatoria intestinal.

## INTRODUCCIÓN

Nuestro laboratorio también ha descrito que la autofagia inducida por TMEM59 (véase apartado 4.2. *Xenofagia en Introducción*) se altera en presencia del alelo de riesgo, que interrumpe el tráfico intracelular normal de TMEM59 y, consecuentemente, su capacidad para mediar autofagia frente a *Staphylococcus aureus*. Adicionalmente, otras proteínas que presentan el motivo de unión al dominio WDD, como DEDD2 o T3JAM (véase apartado 6.1.3. *El dominio WDD de ATG16L1. Función en Introducción*) sufren alteraciones en su capacidad de interacción con ATG16L1 en presencia del alelo de riesgo<sup>156</sup>. Este efecto podría ser generalizado y contribuir a la disfuncionalidad de proteínas que, como DEDD2 o T3JAM, interaccionan con ATG16L1 a través de su dominio WDD.

### 6.2. RECEPTORES TIPO NOD Y ENFERMEDAD DE CROHN

Los receptores NOD1 y NOD2 detectan bacterias intracelulares gracias a su capacidad para reconocer el muramil dipéptido (MDP) producto del peptidoglucano, modulando así la respuesta innata y adaptativa. NOD1 y NOD2 inducen autofagia vía reclutamiento de ATG16L1 a la región de entrada de la bacteria en la membrana plasmática, controlando, de esta forma, la replicación bacteriana y la presentación antigénica<sup>101</sup>. El polimorfismo L1007fsinsC en NOD2, asociado a enfermedad de Crohn, altera funcionalmente a esta molécula. Así, ATG16L1 no se recluta eficientemente a la región de entrada de la bacteria y ello redundaría en una reducida respuesta autofágica. Por tanto, los polimorfismos en NOD2 y ATG16L1 afectan a la xenofagia mediada por este receptor bacteriano, contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad de Crohn<sup>101</sup>.

Adicionalmente, la activación de NOD2 mediada por MDP induce autofagia en células dendríticas (DCs). Esta activación involucra al propio NOD2, a su mediador de señalización RIP2 y a diversas proteínas autofágicas: PI3KC3, ATG4, ATG7 y ATG16L1<sup>171</sup>. La estimulación de NOD2 activa, asimismo, al complejo mayor de histocompatibilidad de clase II DM (HLA-DM), que en este contexto colocaliza con LC3, generando respuestas antígeno-específicas en linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Estas respuestas se encuentran alteradas en individuos que presentan alguno de los alelos de riesgo para enfermedad de Crohn, bien en NOD2 (1007fsinsC, R702W, G908R) o en ATG16L1 (A300)<sup>171</sup>.

## INTRODUCCIÓN

También se ha descrito que ATG16L1 controla la producción de citoquinas proinflamatorias mediada por NOD2. NOD2 estimula a su mediador RIP2 y éste se poliubiquitina activando IKK, entre otros componentes de señalización inflamatoria. Esto desencadena la activación de cascadas de señalización inflamatorias dependientes de NF- $\kappa$ B y MAPK<sup>172,173</sup>. ATG16L1 interfiere en el proceso de poliubiquitinación de RIP2, restringiendo su incorporación en los complejos de señalización proinflamatoria. En presencia del alelo de riesgo A300 se exagera la respuesta inflamatoria desencadenada por NOD2, al carecer del mecanismo inhibitorio mediado por ATG16L1 WT<sup>174</sup>.

### 6.3. INTERLEUCINA 10 (IL-10)

#### 6.3.1. Estructura y función de IL-10

Como se mencionaba anteriormente, mutaciones en genes que codifican las dos subunidades del receptor de IL-10 (IL-10RA e IL-10RB), la propia IL-10 u otros componentes de esta ruta señalizadora, predisponen a una forma severa y extremadamente temprana de enfermedad de Crohn<sup>146</sup>. Esta variante prematura de enfermedad de Crohn se manifiesta durante los primeros meses de vida y cursa con enterocolitis, proctitis, abscesos en la zona perianal, foliculitis cutánea y fístulas entéricas, consecuencia de una exacerbada respuesta inmune inflamatoria a nivel intestinal<sup>146</sup>. Estas observaciones recientes correlacionan con descripciones de enterocolitis espontánea desarrollada por ratones deficientes en IL-10 o en su receptor, realizadas en la década de 1990<sup>175,176</sup>.

IL-10 es una citoquina antiinflamatoria secretada por una amplia variedad de leucocitos y células no hematopoyéticas, que ejerce efectos pleiotrópicos sobre linfocitos T, linfocitos B, células mieloides y, mayormente, macrófagos. Los macrófagos son la diana primaria de su efecto inhibitorio<sup>177</sup>. La secreción de esta citoquina es inducida por activación de PRRs (del inglés “*Pattern Recognition Receptors*”) como TLR2 y NOD2 o citoquinas como IL-21 o IL-27<sup>177</sup>, entre otros factores. IL-10 actúa limitando la secreción de moléculas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6, IL-1, IL-8, quimiocinas y prostaglandinas. TNF- $\alpha$  desempeña un papel fundamental en la patogénesis de la enfermedad de Crohn. Es secretado por monocitos, macrófagos y linfocitos T

## INTRODUCCIÓN

crónicamente activados y sostiene el mantenimiento de una respuesta de tipo Th1 o proinflamatoria<sup>178</sup>.

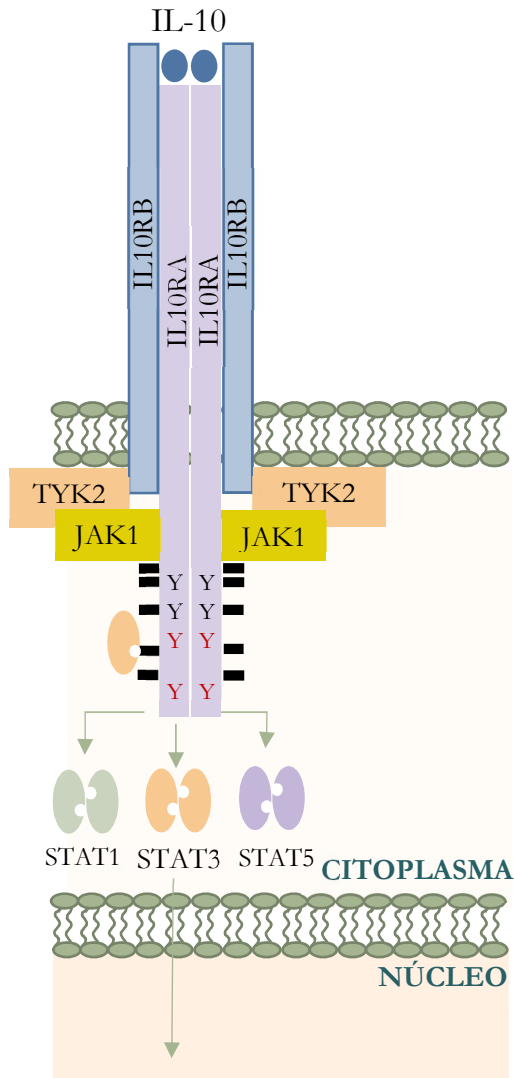
El receptor de IL-10 está constituido por dos moléculas A (IL-10RA) y dos subunidades B (IL-10RB) (**Figura 4**)<sup>179</sup>. Las subunidades A son específicas para la señalización por IL-10, mientras que las subunidades B participan en la señalización por otras citoquinas, como IL-22, IL-26, IL-28A, IL-28B, e IL-29<sup>180</sup>. Inicialmente, IL-10 interacciona con las subunidades A, generándose un cambio conformacional que permite su ensamblaje con las subunidades de señalización B en un complejo heterotetramérico. El ensamblaje de este complejo activa a las quinasas JAK1 y Tyk2, que fosforilan a las subunidades A, reclutando STAT3. En paralelo se produce la activación de los factores transcripcionales STAT1 y STAT5, si bien la mayor parte de los efectos biológicos de IL-10 son mediados por STAT3. Una vez reclutado, STAT3 es fosforilado por JAK1 y Tyk2, homodimeriza y se transloca al núcleo, donde induce genes STAT3-dependientes (SOCS3, BCL3, ETV3, entre otros), implicados en el control de la secreción de citoquinas proinflamatorias como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ <sup>177</sup>. En la **Figura 4** se indican las moléculas involucradas en la señalización por IL-10.

Se postula que el efecto antiinflamatorio (inhibición de la secreción de INF- $\gamma$  e IL-6) mediado el supresor de la señalización por citoquinas (SOCS3), involucra la modulación de las rutas NF- $\kappa$ B y MAPK. Asimismo, otros genes diana de STAT3, como BCL3 o ETV3, inhiben la secreción de moléculas proinflamatorias ejerciendo sus efectos reguladores sobre la ruta NF- $\kappa$ B<sup>181,182</sup>. BCL3 interfiere en la capacidad de NF- $\kappa$ B para interactuar con el DNA y recluta a la histona deacetilasa HDAC1 (que condensa la estructura del DNA e impide el acceso de la maquinaria transcripcional), inhibiendo así la producción de TNF- $\alpha$ <sup>181,182</sup>. ETV3 es un correpresor transcripcional que inhibe la actividad mediada por NF- $\kappa$ B<sup>181,182</sup>.

Paradójicamente, la citoquina proinflamatoria IL-6 y la citoquina antiinflamatoria IL-10 activan STAT3, generando respuestas celulares diametralmente opuestas. Sin embargo, mientras que la estimulación por IL-6 resulta en una activación transitoria de STAT3, la estimulación por IL-10 provoca una activación de STAT3 sostenida<sup>183</sup>. SOCS3, activado en respuesta a STAT3, es el regulador clave de la acción divergente de

# INTRODUCCIÓN

ambas moléculas. Este modulador inhibe la activación de STAT3 en respuesta a IL-6, pero no a IL-10, esto es, bloquea selectivamente la señalización por IL-6. De hecho, se ha descrito que en ausencia de SOCS3, IL-6 se comporta como una citoquina antiinflamatoria en macrófagos<sup>184</sup>.



**Figura 4. Estructura del receptor de IL-10 y moléculas implicadas en señalización por IL-10.** El receptor está constituido por dos subunidades A y dos subunidades B. Señaliza a través de un bucle de fosforilaciones que involucran a JAK1 y TYK2, convergiendo finalmente en la fosforilación de STAT3, que se dirige al núcleo y activa genes de respuesta a IL-10.

## 6.3.2. Implicaciones fisiopatológicas de IL-10

Puesto que la subunidad IL-10RB es parte constituyente de receptores para diferentes citoquinas, una deficiente transducción de la señal mediada por este receptor afectaría a diversas vías de señalización, pudiendo existir efectos aditivos o sinérgicos<sup>146</sup>. IL-22 e IL-26 actúan primariamente sobre diversos tipos epiteliales, protegiendo a las células de la invasión de patógenos extracelulares. También participan en el mantenimiento de la integridad tisular y la homeostasis de las barreras epiteliales durante episodios de infección y respuesta inflamatoria. De hecho, ambas citoquinas modulan la respuesta inmune a nivel de la piel, sugiriendo la posibilidad de que la foliculitis crónica en pacientes con disfunciones en IL-10RB pueda originarse a raíz de una señalización irregular mediada por IL-22 o IL-26<sup>146</sup>.

En ausencia de la respuesta antiinflamatoria mediada por IL-10, las bacterias de la flora intestinal pueden desencadenar una respuesta inmune fulminante, que conduce a un fenotipo de inflamación exacerbada y, consecuentemente, a daño tisular. Permitiría, incluso, la migración de bacterias intestinales, ocasionando linfadenopatías intestinales crónicas o abscesos en órganos relacionados<sup>146</sup>. Por tanto, IL-10 y la ruta de señalización asociada desempeñan un papel fundamental en la regulación homeostática de la mucosa intestinal y en la prevención de la enfermedad inflamatoria intestinal.

De forma interesante, los ensayos clínicos realizados hasta la fecha no muestran evidencias de mejoría clínica en pacientes tratados con IL-10. La suplementación con la citoquina, que ha mostrado potencial clínico en modelos animales, no ha resultado eficaz en el tratamiento de la enfermedad humana<sup>185</sup>. Varios factores podrían explicar las limitaciones de esta estrategia terapéutica: diferencias interindividuales y severidad de la enfermedad, biodisponibilidad limitada de IL-10 a nivel intestinal, incapacidad de la citoquina para tratar la enfermedad una vez establecida o para inhibir a todos los mediadores inflamatorios involucrados<sup>185</sup>. Sin embargo, la terapia anti-TNF- $\alpha$  (infliximab, adalimumab o certolizumab pegola) ha resultado más eficiente y está siendo ampliamente empleada; no obstante, el 40% de los pacientes de IBD no responde o se convierte en refractario al tratamiento<sup>186</sup>.

# INTRODUCCIÓN

## 6.3.3. IL-10 y macrófagos

La carencia de una ruta de señalización antiinflamatoria eficiente mediada por IL-10 afecta al metabolismo de los macrófagos. Entre otras alteraciones descritas, se acumulan un gran número de mitocondrias disfuncionales (y consiguientemente, de ROS), consecuencia, en parte, de una mitofagia disfuncional<sup>187</sup>.

IL-10 controla el metabolismo de los macrófagos vía inhibición de mTORC1<sup>187</sup>. En modelos animales y muestras de pacientes deficientes en IL-10 se observa una acumulación de macrófagos dañados y de mediadores inflamatorios, puesto que IL-10 no ejerce su efecto inhibitorio sobre mTORC1 a través del efector DDIT4. En condiciones normales, IL-10 promueve la mitofagia de mitocondrias dañadas (con un bajo potencial de membrana y un elevado nivel de ROS). La carencia de una ruta funcional de señalización mediada por IL-10 que active mitofagia (vía inhibición de mTORC1) provoca que los macrófagos acumulen mitocondrias disfuncionales, con la consecuente activación del inflamasoma NLRP3 (complejo proteico multimérico responsable de la iniciación de una forma de muerte celular inflamatoria) y la subsecuente producción de IL-1 $\beta$ <sup>187</sup>. En este contexto inflamatorio, mTORC1 se postula como diana terapéutica en el tratamiento de IBD y otras enfermedades relacionadas.

## 6.4. INTERLEUCINA 31 (IL-31)

La interleucina 31 (IL-31) es un miembro de la familia de citoquinas proinflamatorias IL-6. Señaliza a través de un receptor heterodimérico constituido por OSMR e IL-31RA (**Figura 5**). Este complejo estimula las rutas de señalización JAK-STAT, RAS/ERK y PI3K/AKT<sup>188</sup>. IL-31RA interacciona exclusivamente con IL-31, mientras que OSMR participa en la señalización por otros ligandos.

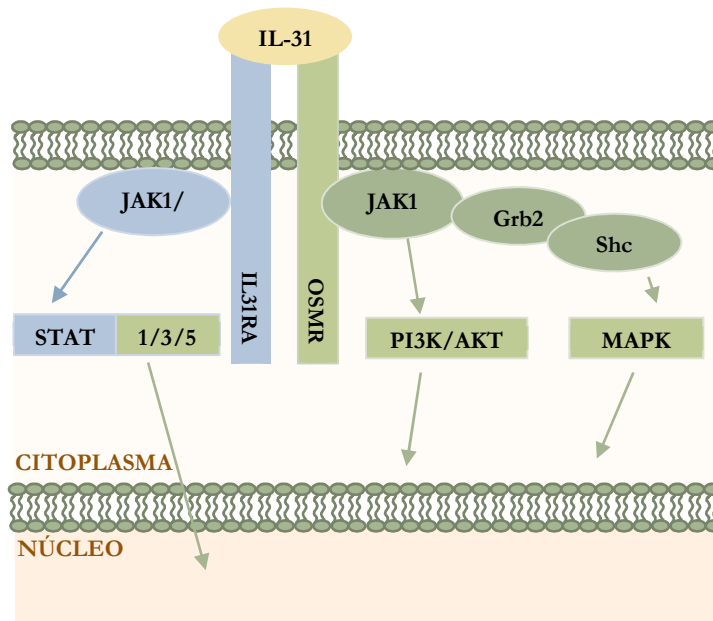
La principal fuente de IL-31 son los linfocitos T; no obstante, otros tipos celulares como mastocitos, monocitos, macrófagos, células dendríticas, queratinocitos de la epidermis o fibroblastos de la dermis pueden secretarla en respuesta a gran variedad de estímulos<sup>188</sup>. Se postula que desempeña funciones relevantes en inmunidad innata y adaptativa, mayormente en tejidos en estrecho contacto con el ambiente, como la piel, los pulmones o el intestino. De hecho, una elevada expresión de IL-31 se asocia con el



## INTRODUCCIÓN

desarrollo de diversas patologías que afectan a la piel (entre ellas, la dermatitis atópica), así como alergia y enfermedad inflamatoria intestinal<sup>188</sup>.

La expresión de la subunidad IL-31RA es inducida por factores como IFN- $\gamma$  o TGF- $\beta$ . Inicialmente, IL-31 se une a IL-31RA, generándose un cambio conformacional en la propia citoquina que le permite interactuar con OSMR. Esto es, una vez ensamblado el complejo receptor, la IL-31 producida en respuesta a alérgenos, histaminas,  $\beta$ -defensinas u otras citoquinas, puede interactuar con ambas subunidades del receptor. IL-31RA activado recluta a las quinasas JAK1/2 y subsecuentemente fosforila STAT1/3/5<sup>188</sup>. El receptor IL-31R presenta 3 residuos de tirosina (Y) en la región intracelular (Y652, Y683, Y721), esenciales en la transducción de la señal: Y721 recluta STAT3 al receptor activado, mientras que Y652 permite la activación de STAT5. Los tres residuos contribuyen a la activación de STAT1<sup>188</sup>. Por otra parte, la subunidad OSMR participa en la activación de PI3K y diversas rutas de MAPK (ERK, p38, JNK)<sup>188,189</sup>.



**Figura 5. Receptor de IL-31 y moléculas involucradas en la señalización por esta citoquina.** El receptor está constituido por una subunidad IL-31RA y una subunidad OSMR. Una vez activado, IL-31RA media la señalización vía STAT1/3/5 a través de JAK1/2. OSMR activa cascadas de PI3K, AKT y MAPK a través de JAK1/2, Grb2 y Shc.

De forma interesante, diversos estudios han mostrado la existencia de diferentes variantes de procesamiento de IL-31RA, esto es, diversas isoformas de esta subunidad.

## INTRODUCCIÓN

La mayor parte de ellas difieren ligeramente en la región N-terminal o citosólica, pero se ha visto que al menos dos están constituidas exclusivamente por la región extracelular<sup>190</sup>. Estas dos isoformas son solubles y actúan como antagonistas de la señalización por IL-31, ejerciendo un efecto dominante negativo con un elevado potencial inhibitorio<sup>190</sup>. Aunque se desconoce la extensión de la expresión de estas dos isoformas, es irrefutable que su presencia añade complejidad al mecanismo de señalización mediado por IL-31.

Pese a que la participación de la citoquina IL-31 y su receptor en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal no se encuentra tan afianzada como en el caso de la ruta IL-10, diferentes publicaciones sugieren la existencia de una contribución de esta vía al desarrollo de este subconjunto de enfermedades<sup>189,191</sup>. Primeramente, se postula que IL-31 puede ejercer sus efectos sobre diferentes tipos celulares intestinales. Por ejemplo, la expresión de IL-31 inhibe la proliferación de células HCT116 e incrementa la migración celular<sup>189</sup>. Asimismo, los fibroblastos colónicos subepiteliales humanos (SEMFs) responden a la estimulación por IL-31 secretando citoquinas proinflamatorias, quimiocinas y metaloproteinasas de la matriz, que contribuyen a la destrucción tisular<sup>191</sup>. Estos fibroblastos se localizan directamente bajo la membrana de la mucosa intestinal y están implicados en cicatrización e inflamación. La citoquina IL-17A se secreta prominentemente en respuesta a IL-31. IL-17A es un reconocido mediador involucrado en enfermedad inflamatoria intestinal mediante la secreción de IL-6, IL-8 y MMP-3. Se postula que la acción combinada de IL-31 e IL-17A ejerce efectos sinérgicos en la señalización inflamatoria, de forma que ambas citoquinas cooperarían en la patología de la enfermedad inflamatoria intestinal<sup>191</sup>. Los niveles de IL-31, IL-31RA y OSMR se han detectado incrementados en la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa en recidiva, pero no en biopsias de tejido no inflamado correspondientes a los mismos pacientes<sup>189</sup>.

## 7. PROTEÍNA INDUCIDA POR TNF- $\alpha$ (TNFAIP3/A20)

### 7.1. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE A20

A20 (también denominada proteína inducida por TNF- $\alpha$ , TNFAIP3) es una enzima modificadora de ubiquitina que regula las cascadas de señalización inflamatoria y de muerte celular programada (PCD), inducidas por TNF- $\alpha$ . Se expresa pleiotrópicamente

## INTRODUCCIÓN

en respuesta a TNF- $\alpha$  y modula la duración y la intensidad de la señalización mediada por diversas moléculas implicadas en ambas rutas, interaccionando, entre otros, con TRAF2, IKK $\gamma$  y/o ABIN (inhibidor de la activación de NF- $\kappa$ B asociado a A20)<sup>192</sup>. La actividad de A20 genera un bucle de retroalimentación negativa: una vez inducido por señales dependientes de activación de la ruta NF- $\kappa$ B, restringe la duración y la intensidad de la señalización mediada por diversas moléculas implicadas en la vía NF- $\kappa$ B<sup>193</sup>. Esta actividad inhibitoria se modula en función de las modificaciones postraduccionales a las que A20 es susceptible (fosforilación, procesamiento proteolítico, glicosilación o ubiquitinación), y que permiten sostener o detener dicha función inhibitoria.

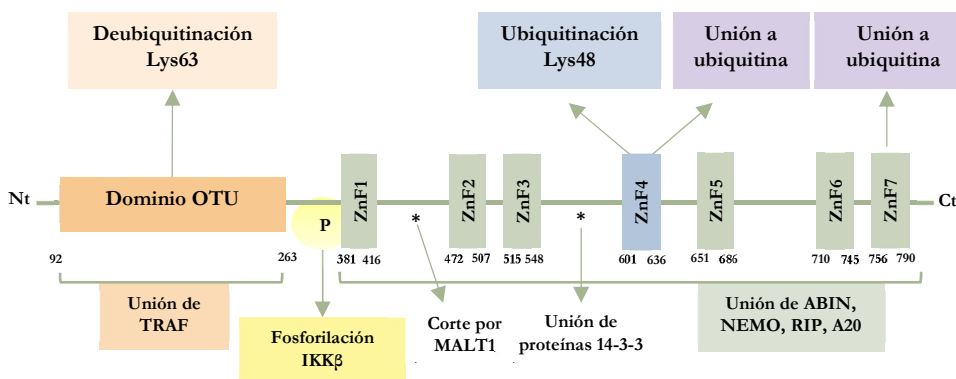
El epitelio intestinal activa la señalización por NF- $\kappa$ B en respuesta a la estimulación de PRRs (TLRs, NLRs, RLRs o CLRs) o diversos receptores de citoquinas como TNFR1 o IL-1R. Además, el propio epitelio promueve la generación de señales de supervivencia, esto es, regula respuestas inmunes dinámicas<sup>194</sup>. Asimismo, contribuye a la protección celular minimizando la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  en células epiteliales<sup>195</sup>.

A20 presenta actividad deubiquitinasa (DUB), aunque también colabora con las enzimas de activación (E1) y conjugación (E2) en la construcción de cadenas de ubiquitina, esto es, muestra actividad ubiquitín-ligasa (E3)<sup>193</sup>. La actividad deubiquitinasa está mediada por un motivo situado en el extremo N-terminal (en el dominio OTU (del inglés "*Ovarian Tumor domain*"), que contiene un residuo catalítico de cisteína (C103). El dedo de zinc 4 (ZnF4) del extremo C-terminal confiere capacidad de unión a ubiquitina (actividad ubiquitín-ligasa)<sup>193</sup>. En la **Figura 6** se muestra un esquema de la estructura de A20.

Durante la señalización vía TNF, la conjugación de cadenas de ubiquitina al residuo K63 de RIP1/RIPK1, conduce al reclutamiento de moléculas señalizadoras como TAB2, TAK1 e IKK $\gamma$  (NEMO), que forman un complejo con RIP1/RIPK1. De esta forma, se fosforila el inhibidor de NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$  y se activa la señalización por NF- $\kappa$ B. En un contexto de inflamación exacerbada, la actividad deubiquitinasa de A20 probablemente restrinja la inducción de la señalización NF- $\kappa$ B inducida por TNF- $\alpha$  eliminando las cadenas de ubiquitina unidas al residuo K63 de RIP1/RIPK1<sup>193</sup> (interfiriendo, consecuentemente, en la asociación entre RIP/RIPK1 y NEMO) y adicionando cadenas

# INTRODUCCIÓN

de ubiquitina al residuo K48 mediante su actividad E3-ligasa. Las cadenas de ubiquitina incorporadas al residuo K48 marcan a RIP1/RIPK1 para su degradación en el proteasoma<sup>196</sup>.



**Figura 6.** Esquema de la estructura de A20 y sus sitios de unión relevantes. A20 está constituida por un dominio OTU en el extremo N-terminal, que contiene el residuo catalítico C103 responsable de su actividad deubiquitinasa. En el extremo C-terminal presenta 7 dominios de dedos de zinc (ZnF). El dominio 4 es el responsable de la actividad ubiquitín-ligasa. Adicionalmente, se señalan las regiones de unión a TRAF, ABIN, NEMO, dimerización, unión de proteínas 14-3-3, corte por paracaspasa MALT1 y fosforilación de IKK $\beta$ .

Sin embargo, el mecanismo mediante el cual A20 regula la muerte celular no se ha determinado con claridad. Se postula que es dependiente de RIP1/RIPK1 y requiere la asociación de A20 con el complejo Ripoptosoma, potenciando su capacidad para activar caspasa 8. Este mecanismo no requeriría la actividad deubiquitinasa de A20 ni el dominio ZnF4, pero involucraría la dimerización de A20, así como la participación del dominio ZnF7<sup>197</sup>. Sin embargo, estudios previos han señalado la capacidad de A20 para inhibir la señal apoptótica (detectada a través de TRAIL) deubiquitinando e inhibiendo a la caspasa 8<sup>198</sup>. Otros autores abogan por un mecanismo de supresión de la quinasa JNK mediante el marcaje de la quinasa reguladora de la señal apoptótica ASK1 para su degradación proteasomal<sup>199</sup>.

## 7.2. IMPLICACIONES FISIOPATOLÓGICAS DE A20

La activación de la señalización vía NF- $\kappa$ B en condiciones fisiológicas (por bacterias comensales) constituye un mecanismo de protección que participa en el mantenimiento de la barrera intestinal, mediante la inducción de proteínas antiapoptóticas, péptidos

## INTRODUCCIÓN

antimicrobianos y mucinas<sup>194,195</sup>. Por tanto, es fundamental para el mantenimiento de la homeostasis intestinal.

No obstante, en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (y, asimismo, en ciertas enfermedades malignas) se ha detectado una excesiva y aberrante estimulación de la vía NF- $\kappa$ B, asociada a alteraciones en A20<sup>200</sup>. La disfunción en A20 provoca la generación de una elevada cantidad de mediadores inflamatorios y cronifica el evento inflamatorio<sup>201</sup>. Así, los ratones deficientes en A20 desarrollan espontáneamente un fenotipo inflamatorio exacerbado (ocasionado por un incremento de la susceptibilidad a TNF- $\alpha$ ) acompañado de daño tisular multiorgánico. Estos animales fallecen de forma prematura debido a la elevada extensión del daño tisular y a la carencia de respuestas antiapoptóticas mediadas por A20<sup>192</sup>. La prematura muerte de los ratones deficientes en A20 pone de manifiesto la relevancia de los modelos condicionales específicos de tejido. Por ejemplo, la delección de A20 en células epiteliales intestinales genera un modelo animal susceptible a colitis experimental (mediada por el detergente DSS) y a toxicidad por TNF- $\alpha$ , debido al incremento de la apoptosis intestinal. A20 actúa protegiendo a las células frente al fenómeno apoptótico que se produce en una situación de daño celular agudo, así como participando en la reparación tisular. Por tanto, este modelo condicional ha permitido establecer la relevancia de A20 como elemento clave en el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal en un contexto de estrés inflamatorio<sup>201</sup>.

Numerosos estudios genéticos han permitido relacionar SNPs en A20 con susceptibilidad a diversas enfermedades humanas, entre las que destacan: lupus eritematoso sistémico, artritis reumatoide, psoriasis, diabetes de tipo 1, enfermedad celiaca, enfermedad coronaria en diabetes de tipo 2 y esclerosis múltiple<sup>193</sup>. Asimismo, entre los genes asociados a enfermedad inflamatoria intestinal identificados mediante GWAS se encuentra A20<sup>202</sup>. Muchos de los SNPs con relevancia clínica descritos están localizados flanqueando la región codificante o en regiones intrónicas, probablemente interfiriendo con elementos reguladores y alterando la expresión de A20<sup>196</sup>.

No obstante, dos de los SNPs más ampliamente caracterizados, A125V (rs5029941) y F127C (rs2230926) se localizan en las proximidades del residuo catalítico C103 del dominio OTU. Ambos cambios se traducen en la aparición de codones no sinónimos en

## INTRODUCCIÓN

la proteína A20. El SNP F127C se asocia con numerosas enfermedades autoinmunes, puesto que altera funcionalmente a A20 en su respuesta a la estimulación por TNF- $\alpha$ . Aunque su efecto biológico continúa sin esclarecerse, su localización apunta a una alteración en la actividad K63-deubiquitinasa<sup>196</sup>. Sin embargo, sí se ha confirmado que el SNP A125V reduce la actividad deubiquitinasa y, consecuentemente, altera la degradación y deubiquitinación de TRAF2 mediada por A20. Este efecto contribuye al mantenimiento de la activación de la ruta NF- $\kappa$ B. Paradójicamente, el SNP A125V, al que en lupus eritematoso sistémico se le asocia un rol protector, está vinculado con un mayor riesgo de enfermedad inflamatoria intestinal<sup>196</sup>.

# OBJETIVOS





## OBJETIVOS

1. Dilucidar el mecanismo de control establecido entre el efector autofágico ATG16L1 y la molécula antiinflamatoria A20.
2. Establecer un sistema de cribado que permita identificar moléculas cuya interacción con ATG16L1 a través del dominio WDD presente repercusiones funcionales.
3. Evaluar el efecto del dominio WDD sobre la funcionalidad de ciertas moléculas que interaccionan con ATG16L1 a través de este dominio, en diversos sistemas celulares.
4. Definir el impacto funcional de la ausencia del dominio WDD en macrófagos procedentes de médula ósea de ratones knock-out para este dominio.
5. Evaluar el potencial efecto que el polimorfismo A300 en ATG16L1 ejerce sobre la funcionalidad de las moléculas seleccionadas.



# MATERIALES Y MÉTODOS



## 1. CULTIVO CELULAR

### 1.1. LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares HEK-293T (variante de células embrionarias de riñón humano HEK-293 transformadas con el antígeno T del virus SV40), HeLa (células de adenocarcinoma de cérvix humano) y THP1 (células monocíticas derivadas de leucemia mielocítica aguda), procedían de la ATCC (American Type Culture Collection).

La línea HEK-293T-AU:BCL-xL-CrmA-p35, derivada de células HEK-293 y utilizada para la producción de retrovirus y lentivirus, fue generada en el laboratorio por la Dra. Martina Klee<sup>203</sup>. Es la línea celular empleada en la producción de retrovirus y lentivirus con capacidad para transducir temporal o establemente otras líneas celulares.

La estirpe de células de carcinoma colorrectal humano HCT116 deficientes en ATG16L1 procedía del laboratorio del Dr. David Boone (Universidad de Chicago, Illinois, USA)<sup>160</sup>. Los fibroblastos embrionarios murinos (MEFs) de ratones WT y deficientes en ATG16L1 provenían del laboratorio del Dr. Ramnik J. Xavier (Universidad de Harvard, Boston, Massachusetts, USA)<sup>168</sup>.

Los macrófagos de cultivo primario (BMDMs) se obtuvieron a partir de médula ósea de ratones WT, deficientes en el dominio WDD de ATG16L1 (E230) y knock-in A300 para ATG16L1. Los ratones deficientes en el dominio WDD procedían del laboratorio del Dr. Thomas Wileman (Norwich Medical School, UEA, Norwich, Reino Unido)<sup>162,163</sup>, mientras que los ratones knock-in A300 se generaron en el laboratorio del Dr. Ramnik J. Xavier (Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA)<sup>168</sup>. Ambas estirpes fueron cruzadas posteriormente en el Animalario OMG del Centro de Investigación del Cáncer.

El proceso de extracción implicó el sacrificio del animal en cámara de CO<sub>2</sub>, la disección en condiciones asépticas de fémur y tibia y la posterior extracción de líquido y células de la médula ósea mediante la inserción de una aguja en la zona de la epífisis (véase apartado 9. *Ensayos con macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs) en Materiales y Métodos*). El manejo y mantenimiento de los animales de experimentación se llevó a cabo de

## MATERIALES Y MÉTODOS

acuerdo con la legislación europea y española (Directiva 2010/63/UE y Ley 6/2013, respectivamente), relativa a la protección y cuidado de los animales en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. Los animales knock-out (E230) y knock-in (A300) recibidos permanecieron en zona de cuarentena y los embriones resultantes del cruce con C57BL/6J WT se transfirieron a madres gestantes en zona libre de gérmenes específicos (SPF).

### 1.2. CONDICIONES DE CULTIVO CELULAR

Las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada, a temperatura de 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, en medio DMEM (Gibco-Invitrogen) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS, Gibco-Invitrogen) previamente inactivado (56°C durante 30 minutos), 2 mM de L-glutamina (Gibco-Invitrogen) y antibióticos: 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco-Invitrogen).

Los cultivos primarios de células de médula ósea se realizaron en medio DMEM suplementado con 20% de FBS y las proporciones de L-glutamina y antibióticos descritas anteriormente. Adicionalmente, se incorporó al medio el factor estimulante de colonias de macrófagos humano (M-CSF, Biolegend) en concentración de 20 ng/ml, con el objetivo de inducir la activación de macrófagos a partir de sus precursores hematopoyéticos en los cultivos de médula ósea.

Los diversos ensayos que involucraron el tratamiento de células con citoquinas pro o antiinflamatorias se realizaron en medio con bajo contenido en suero (de 0.5% a 1% de FBS inactivado), con el objetivo de minimizar la contribución de elementos que podrían estar presentes en la mezcla compleja del suero.

### 1.3. MANTENIMIENTO DE CÉLULAS

Las líneas celulares adherentes se transfirieron a nuevas placas en intervalos de 2-3 días, utilizando una solución de 0.25% tripsina-EDTA (Gibco-Invitrogen). El proceso implicó la aspiración del medio de cultivo, eliminación de FBS remanente mediante lavado con 5 ml de PBS1x Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (8.5 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 137 mM NaCl en agua MilliQ, generado por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de

## MATERIALES Y MÉTODOS

Investigación del Cáncer) e incubación con la solución de 0.25% tripsina-EDTA durante 1-3 minutos a 37°C. A continuación, se neutralizó el efecto de la solución de tripsina-EDTA añadiendo 5 ml de medio DMEM completo, y se disgregaron los posibles agregados celulares mediante pipeteo repetido sobre la placa de cultivo. Esta solución se transfirió a un tubo cónico de 15 ml y se centrifugó durante 5 minutos a 500xg. Finalmente, las células se diluyeron en DMEM completo en nuevas placas de 10 cm (55 cm<sup>2</sup>). La dilución varió ampliamente en función de la línea celular e incluso del estado particular del cultivo en un momento determinado. Como norma general, las células derivadas de HEK-293 se diluyeron 1:5, los MEFs 1:10 y las células HeLa 1:4.

En el caso de las líneas celulares en suspensión (THP1), el pase involucró únicamente la transferencia de un tercio del volumen de cultivo a nuevas placas de 10 cm con medio fresco. La finalidad de este pase fue diluir el cultivo preservando los factores presentes en el medio que facilitan el crecimiento de este tipo celular.

### **1.4. ALMACENAMIENTO Y DESCONGELACIÓN DE LÍNEAS CELULARES**

Las líneas celulares se almacenaron durante periodos prolongados de tiempo a temperatura de -180°C, en los tanques de nitrógeno líquido dispuestos para tal fin en las instalaciones de Crioconservación del Centro de Investigación del Cáncer. El medio de congelación (FBS en el caso de MEFs y DMEM para las restantes estirpes celulares) incorporó 10% DMSO (v/v, Sigma-Aldrich) como agente crioprotector. La dilución en medio de congelación involucró un proceso progresivo de aclimatación a bajas temperaturas: unos minutos a 4°C, aproximadamente una semana a -70°C y, finalmente, almacenamiento indefinido a -180°C. Todas las líneas celulares de trabajo se congelaron en un periodo de 3 pases desde su propia descongelación.

Al comportarse el DMSO como un tóxico celular a temperatura ambiente, el proceso de descongelación requirió rapidez y neutralización progresiva del medio de congelación. Los criotubos se descongelaron en un baño a 37°C y se añadieron 10 ml de medio DMEM completo gota a gota. A continuación, se centrifugó durante 5 minutos a 500xg y se dividió todo el volumen celular en una o dos placas de 10 cm (en función del tipo

## MATERIALES Y MÉTODOS

celular y, por tanto, características de crecimiento), completando hasta 10 ml con medio de cultivo fresco.

### 1.5. SIEMBRA DE CÉLULAS EN PLACA

El conteo de células para su posterior sembrado se realizó utilizando cámaras de Neubauer. La distinción entre células vivas y muertas se efectuó empleando el colorante vital azul de tripán (Sigma-Aldrich), que únicamente permea la membrana de las células muertas. Se realizaron alícuotas del cultivo o cultivos susceptibles de conteo y se diluyeron 1:1 con azul de tripán. Finalmente, el cálculo del número de células por unidad de volumen consideró el factor de corrección de la propia cámara de Neubauer ( $10^4$ ), el número de cuadrantes contados y la dilución en azul de tripán. Los formatos de placa más ampliamente utilizados fueron: multipocillo p6 (9,5 cm<sup>2</sup>), multipocillo p12 (3,8 cm<sup>2</sup>), multipocillo p24 (1,9 cm<sup>2</sup>) y placas de 60 mm (21 cm<sup>2</sup>). El número de células sembradas se determinó en función de la estirpe celular, requisitos del experimento a realizar y formato de placa empleado.

## 2. MÉTODOS DE TRANSFECCIÓN

### 2.1. MÉTODO BASADO EN LÍPIDOS (JETPEI)

En ensayos de sobreexpresión, la transfección de las células se efectuó mayoritariamente utilizando el reactivo jetPEI (Polyplus). Este reactivo forma liposomas que engloban el DNA, pudiendo penetrar en la célula y, eventualmente, alcanzar el núcleo durante la división celular. Las células se sembraron 24 horas antes de la transfección, a una concentración que permitiese alcanzar una densidad del 50-70% en el momento de la transfección. Considerando que el proceso de transfección implica cierta toxicidad, el medio de cultivo se sustituyó por medio fresco entre 1 y 4 horas antes de la transfección, favoreciendo el crecimiento activo de las células.

Se realizó la siguiente mezcla de transfección (para placas de 24 pocillos): 1 µg total de DNA en 50 µl de NaCl 150 mM (generado mediante dilución de NaCl 5M en agua libre de endotoxinas; ambos reactivos de Sigma-Aldrich). En un tubo diferente se preparó un volumen igual de NaCl 150 mM con 2 µl de reactivo jetPEI. El contenido de este



## MATERIALES Y MÉTODOS

último tubo se añadió a la mezcla de DNA plasmídico en NaCl, incubándose 40 minutos. Tras el periodo de incubación, la solución se incorporó gota a gota sobre las células de cada pocillo en particular. Una vez transcurridas 12-24 horas, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco, con el objetivo de reducir la toxicidad de la transfección. Los ratios de DNA/jetPEI no se modificaron en función del formato de placa; no obstante, se ajustaron los volúmenes totales al tamaño de la placa/pocillos empleados: 5 µg DNA/10 µl PEI/250 µl NaCl 150mM en placas de 6 pocillos; 10 µg DNA/20 µl PEI/500 µl NaCl 150mM en placas de 60 mm y 20 µg DNA/40 µl PEI/1000 µl NaCl 150mM en placas de 100 mm.

Los métodos basados en lípidos proporcionaron transfecciones reproducibles y comparables entre diferentes condiciones, si bien su capacidad para introducir DNA en las células resultó más limitada que la de los métodos basados en fosfato cálcico. La transfección con jetPEI fue la más ampliamente empleada en ensayos de sobreexpresión.

### **2.2. MÉTODO DE PRECIPITACIÓN CON FOSFATO CÁLCICO**

El sembrado de las células y el cambio de medio de cultivo pre-transfección se realizó de forma equivalente a lo descrito para la transfección con lípidos. En este caso, la mezcla de transfección (en placas de 24 pocillos) incorporó 22.5 µl de agua MilliQ, 2.5 µl de CaCl<sub>2</sub> (cloruro cálcico 2.5 M para cultivo celular, Sigma-Aldrich) y 1 µg total de mezcla de DNA. A esta solución se le añadieron 50 µl de tampón HEBS2x pH 7.1 (280 mM NaCl, 1.5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 11 mM glucosa y 50 mM HEPES) y se mezcló vigorosamente mediante pipeteo repetido. Tras 10-15 segundos, se añadió gota a gota sobre las células, formándose un precipitado DNA-fosfato cálcico. Los volúmenes totales se ajustaron según la relación de superficie existente entre los diferentes formatos de placa (de igual forma a lo descrito para la transfección con lípidos). El medio de cultivo se sustituyó por medio fresco entre 12 y 24 horas después de la transfección.

Los métodos de precipitación con fosfato cálcico permiten alcanzar ratios elevadas de sobreexpresión, si bien la formación del precipitado entre diferentes condiciones suele ser más heterogénea.

# MATERIALES Y MÉTODOS

## 3. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES

### 3.1. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES VÍA RETROVIRAL

Los vectores retrovirales constituyen uno de los vehículos más ampliamente utilizados para integrar de forma estable transgenes en el genoma de las células hospedadoras. La producción de líneas celulares estables implica la transfección de las células productoras con los vectores retrovirales de interés y, posteriormente, la infección de las células diana con el sobrenadante retroviral generado.

La línea HEK-293T-AU:BCL-xL-CrmA-p35, derivada de células HEK-293 y utilizada para la generación de retrovirus y lentivirus (véase apartado 1.1. *Líneas celulares en Materiales y Métodos*), expresa de forma estable los inhibidores apoptóticos BCL-xL, CrmA y p35, siendo menos susceptible a la toxicidad causada por el propio virus.

Esta línea celular productora (HEK-293T-AU:BCL-xL-CrmA-p35) fue transfectada con el vector retroviral p12-MMP. El vector p12-MMP procede del plásmido pMMP modificado mediante inserción en p12, y expresa los transgenes desde la propia LTR del virus (véase apartado 4.8.5 *Sistema de expresión retroviral p12-MMP en Materiales y Métodos*). En paralelo con el vector, que porta el transgén de interés, se co-transfectaron los plásmidos pMD-MLV.OGP y pMD-VSV-G (véase apartado 4.8.5 *Sistema de expresión retroviral p12-MMP en Materiales y Métodos*).

Las transfecciones se realizaron en células productoras en crecimiento activo, en torno al 50-70% de confluencia, en placas de 6 pocillos. Aproximadamente 24 horas tras la transfección se eliminó el sobrenadante retroviral de las mismas y se añadió DMEM fresco. Tras 24 horas, el sobrenadante se filtró (acetato de celulosa 0.45  $\mu\text{m}$ ) y se diluyó 1:1 en DMEM fresco (pudiendo incrementarse la dilución en función de la cantidad de expresión del transgén que se pretenda conseguir). La mezcla de sobrenadante viral y DMEM fresco se suplementó con polibreno (8  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , Sigma-Aldrich), un polímero catiónico que favorece la entrada de los viriones en las células diana.

El sobrenadante diluido y suplementado con polibreno se empleó en la infección de las líneas celulares de interés (sembradas en placas de 6 pocillos, aproximadamente al 30-40% de confluencia). La infección se llevó a cabo en una centrifuga Eppendorf, a 32°C y

## MATERIALES Y MÉTODOS

700xg, durante una hora. Una vez finalizada, las células se retornaron al incubador. En los casos en los que se requirió la selección de células transducidas, se suplementó el medio con el antibiótico puromicina (1 µg/ml, Sigma-Aldrich) o higromicina B (200 µg/ml, Sigma-Aldrich), en función del gen de resistencia integrado en el vector. La eficiencia de la técnica eliminó la necesidad de selección en numerosas ocasiones, puesto que un elevado porcentaje de las células se transducían eficazmente procediendo según el protocolo anteriormente descrito.

### 3.2. GENERACIÓN DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES VÍA LENTIVIRAL

El proceso de generación de líneas celulares vía lentiviral fue prácticamente análogo al descrito anteriormente, con las siguientes modificaciones:

- Las actividades *gag* y *pol* fueron aportadas por los plásmidos pCMV-VSV-g y psPAX, co-transfectados con el vector lentiviral. El vector lentiviral lentiCRISPR-v2 permitió la generación de líneas celulares deficientes en diversas proteínas o dominios de proteínas humanas y murinas. Este plásmido porta la secuencia diana para el corte por Cas9 y la propia Cas9 (véase apartado 4.8.7. *Sistema de expresión lentiviral CRISPR-Cas9 en Materiales y Métodos*).
- El proceso de filtrado del sobrenadante lentiviral fue precedido de un paso de centrifugación a 700xg durante 10 minutos. Este sobrenadante se diluyó en DMEM fresco al objeto de generar una mezcla de infección constituida por un 80% de sobrenadante viral y un 20% de DMEM fresco. Igualmente, se incorporó polibreno 8 µg/ml a la mezcla de infección y se centrifugaron las células diana en las mismas condiciones descritas para la infección retroviral.

## 4. PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

### 4.1. AMPLIFICACIÓN DEL DNA MEDIANTE PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) permitió amplificar fragmentos de DNA a partir de un plásmido preexistente o de genotecas complejas de cDNA. En primer lugar, se linearizó el DNA molde digiriendo con una enzima de restricción cuya

## MATERIALES Y MÉTODOS

diana estaba ausente en la banda de PCR de interés. SpeI (presente en el promotor de los vectores pEAK y p12-MMP; New England Biolabs (NEB)) fue la enzima más ampliamente utilizada. Las digestiones se realizaron a 37°C durante toda la noche, mezclando 5 µg de DNA molde con 1 µl del buffer correspondiente (1x) y 9 U de enzima. La inactivación de la actividad enzimática se realizó a 70°C durante 20 minutos. Este DNA linearizado actuó como DNA molde en la reacción de PCR.

### 4.1.1. Diseño de oligonucleótidos (primers o cebadores)

Los oligonucleótidos se diseñaron introduciendo sitios de restricción en ambos extremos 5', con el objetivo de disponer de secuencias diana que permitiesen la digestión del producto de PCR y su subsiguiente clonación en el vector de interés. La región de hibridación incluyó 25 nucleótidos, de los cuales, al menos el 50% fueron G o C (guanina o citosina). Dado que las enzimas de restricción reducen su eficacia de digestión en las regiones próximas a los extremos de DNA, se incluyeron regiones adicionales en el extremo 5' de cada oligonucleótido (gggcc) al objeto de facilitar el corte por las correspondientes endonucleasas.

Adicionalmente, se añadió un sitio consenso de parada de la traducción (taaa) en el extremo 3'. No se requirió la introducción de un sitio de iniciación de la síntesis proteica, puesto que los plásmidos utilizados presentaban la misma secuencia Kozak de inicio de la traducción (5' gccaccatg 3').

Los oligonucleótidos empleados figuran en el *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*. Se recibieron en forma liofilizada (producidos por Thermo Fischer Scientific o Sigma-Aldrich) y se hidrataron a 1 µg/µl en TE 1X (Tris-EDTA solución 1x, pH 8.0; generado por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer). Una vez reconstituidos, los oligonucleótidos se almacenaron a -20°C para su conservación durante periodos prolongados de tiempo.

### 4.1.2. Condiciones de PCR

Cada reacción de PCR se realizó por duplicado: en ausencia y presencia de un 10% de DMSO (Sigma-Aldrich). El DMSO altera el apareamiento de las bases y favorece la reacción en regiones en las que se forman estructuras secundarias complejas. La mezcla

## MATERIALES Y MÉTODOS

de reacción generada en agua MilliQ (hasta un total de 50  $\mu$ l) incluyó los siguientes reactivos: *Pfu* buffer 1x (Promega), 0.5  $\mu$ g de DNA molde linearizado, 20-40 pmol de cada oligonucleótido (forward y reverse), 10 nmol de cóctel de dNTPs (Thermo Fischer Scientific) y 1.5 U de polimerasa *Pfu* (Promega). La reacción de amplificación se llevó a cabo en un termociclador iCycler (BioRad), en las condiciones que se detallan a continuación:

1. Un ciclo de desnaturalización: 4 minutos a 96°C.
2. Número variable de ciclos de amplificación:
  - 1 minuto a 95°C (desnaturalización).
  - 1 minuto a 56°C (anillamiento).
  - 2 minutos a 72°C (extensión).
3. Un ciclo de extensión final: 10 minutos a 72°C.
4. Un ciclo de mantenimiento: tiempo infinito a 4°C.

El número de ciclos de amplificación se determinó en función del origen del DNA molde. En el caso de plásmidos, se fijó en 12-14 ciclos, mientras que para genotecas de cDNA se ajustó a 30 ciclos. La temperatura de anillamiento también fue susceptible de modificaciones en función de la  $T_m$  (temperatura de fusión) de cada oligonucleótido en particular, así como del requerimiento de eliminar bandas inespecíficas o incrementar el rendimiento de la banda de interés en la reacción.

### 4.1.3. Análisis y procesamiento del producto de PCR

Una vez finalizada la reacción, se analizó una alícuota de la misma en un gel de agarosa, al objeto de visualizar el aspecto y abundancia de la banda de PCR de interés (gel diagnóstico). Con esta finalidad, se separaron 10  $\mu$ l de producto de PCR y se mezclaron con 1.5  $\mu$ l de buffer de carga OrangeG (Sigma-Aldrich). La agarosa se preparó al 1-2% (m/v, Pronadisa) en TAE 1x (tampón tris acetato-EDTA: 40 mM Tris, 1 mM EDTA en agua MilliQ, generado como solución TAE 50x por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer). La solución de agarosa en TAE 1x se suplementó con 50  $\mu$ g/ml de bromuro de etidio (Sigma-Aldrich). El buffer TAE 1x suplementado con bromuro de etidio se utilizó asimismo como tampón de electroforesis.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las muestras se corrieron en paralelo con un marcador de peso molecular (GeneRuler 1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) y las bandas se visualizaron en un transiluminador GelDoc2000 (BioRad). En el caso de bandas de similar aspecto y abundancia, se seleccionaron las preparaciones carentes de DMSO para su subsiguiente procesamiento.

El volumen remanente de las reacciones seleccionadas se purificó empleando el kit QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), según las instrucciones del fabricante. La elución se efectuó en 30  $\mu$ l de buffer TE1x. La ligación del fragmento de DNA en un nuevo vector implicó la digestión de 13.5  $\mu$ l del producto de PCR purificado en 1.5  $\mu$ l del buffer relevante, adicionando 4 U de las enzimas de interés.

### **4.2. ANILLAMIENTO Y FOSFORILACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS PARA CLONACIÓN DE FRAGMENTOS CORTOS DE DNA**

La generación de fragmentos cortos de DNA se efectuó a partir de oligonucleótidos que portaban la secuencia de interés, los cuales se anillaron y fosforilaron sin requerimiento de DNA molde. En primer lugar, se mezclaron 3  $\mu$ g de cada oligonucleótido (forward y reverse) con buffer CutSmart 1x (New England Biolabs), completándose con 39  $\mu$ l de agua MilliQ. A continuación, se sometió esta mezcla a un ciclo de temperaturas variables: 2 minutos a 100°C, descenso gradual a 70°C y, una vez alcanzada esta temperatura, incubación de 10 minutos a 70°C. Una vez anillados, los oligonucleótidos se fosforilaron en una reacción catalizada por la T4-polinucleótido quinasa (NEB). La reacción de fosforilación incorporó buffer CutSmart 1x (NEB), DTT 10 mM (Thermo Fisher Scientific), BSA 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l (NEB), 2.5  $\mu$ l de oligos fosforilados, ATP 1 mM (NEB) y 12.5 U de T4-polinucleótido quinasa. La reacción se incubó durante 90 minutos a 37°C y, finalmente, se inactivó la quinasa a 70°C durante 40 minutos. Los oligonucleótidos fosforilados se utilizaron directamente en la reacción de ligación.

### **4.3. DIGESTIÓN MEDIADA POR ENZIMAS DE RESTRICCIÓN**

Las bandas de PCR purificadas o los plásmidos preexistentes (esto es, los elementos origen del fragmento de DNA de interés) se sometieron a digestión vía endonucleasas de restricción. La mezcla de digestión incorporó el buffer de restricción correspondiente a concentración 1x, una cantidad de DNA variable en función de la procedencia y tamaño

## MATERIALES Y MÉTODOS

del fragmento de interés y 3 U de las enzimas relevantes, completando hasta 10  $\mu$ l con TE 1x. En el caso de pequeños fragmentos de DNA, difícilmente visualizables, se efectuó la digestión de la mayor cantidad de DNA posible. Las digestiones se realizaron a 37°C durante toda la noche.

### 4.4. LIGACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA

En primer lugar, se trataron los vectores previamente digeridos con 6 U de fosfatasa CIP (NEB) durante 30 minutos, a 37°C. El objetivo de este tratamiento fue evitar la religación de los vectores una vez digeridos, eliminando el grupo fosfato del extremo 5'.

Los fragmentos de DNA previamente digeridos por restricción (vector e insertos) se corrieron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Nusieve® GTG® Agarosa, Lonza), con un porcentaje mínimo del 1.2% (ajustable según el peso molecular del fragmento de DNA de interés). Se añadieron 1.5  $\mu$ l de buffer de carga Orange-G a cada muestra y se corrieron en paralelo con 5  $\mu$ l de marcador de peso molecular. Las digestiones se cargaron en pocillos alternos para evitar contaminaciones cruzadas. Las bandas se visualizaron en un transiluminador y los fragmentos de interés se cortaron con un punzón, empleándose directamente en el proceso de ligación.

El vector e inserto/s se mezclaron en una reacción catalizada por 120 U de enzima T4-DNA ligasa (NEB). Inicialmente, se preparó una mezcla de ligación que incluía la enzima ligasa, T4 DNA ligasa buffer 1x (NEB) y 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de BSA (NEB), en un volumen final de 10  $\mu$ l en agua MilliQ. Las bandas de agarosa previamente cortadas se fundieron en un bloque térmico (Grant-Boekel) a 65°C y se incorporaron a la mezcla de ligación a 37°C. En ligaciones sencillas o a dos partes (que involucran únicamente un vector y un inserto) se utilizaron 1.5  $\mu$ l de vector y 2.2  $\mu$ l de inserto, mientras que en ligaciones a tres o más partes (un vector y dos o más insertos) se emplearon 1.5  $\mu$ l de vector y 1.5  $\mu$ l de cada uno de los insertos. Cada reacción de ligación se acompañó de una reacción control realizada en paralelo, con el objetivo de evaluar el fondo. En el caso de ligaciones sencillas se empleó como control el vector tratado con CIP, mientras que el vector y el inserto/s de menor tamaño actuaron como control en el caso de las ligaciones a tres o más partes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las ligaciones sencillas se incubaron durante 3-4 horas a temperatura ambiente, mientras que las ligaciones a tres o más partes requirieron incubación durante toda la noche.

Las ligaciones de fragmentos romos de DNA (como los generados por el corte con la enzima de restricción HpaI) implicaron incubaciones de dos a tres horas a temperatura ambiente y, posteriormente, toda la noche a 16°C.

### 4.5. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES

El DNA resultante de la mezcla de ligación, así como cualquier otro DNA plasmídico susceptible de amplificación, se empleó para transformar la cepa DH5- $\alpha$  de *Escherichia coli* (*E. coli*) mediante choque térmico. Las células competentes de *E. coli* fueron generadas por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer. Esta cepa carecía de los sistemas de recombinación del DNA característicos de bacterias, amplificando fielmente un plásmido en particular. Una alícuota de 100  $\mu$ l de bacterias (altamente competentes, esto es, con un mínimo de  $5 \times 10^7$  colonias por  $\mu$ g de plásmido) se mezcló con 4.5  $\mu$ l de reacción de ligación previamente fundida a 65°C. Se incubó la mezcla durante 30 minutos y se procedió entonces con el choque térmico: 47 segundos a 42°C y un mínimo de 2 minutos a 4°C. La mezcla se sembró en placas de LB (Luria Bertani) con agar al 2% (m/v) y 100  $\mu$ g/ml del antibiótico de selección, generalmente ampicilina (las placas fueron generadas por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer).

Durante los 30 minutos de incubación bacterias-DNA fue necesario generar una fina monocapa de LB-Agar 1.5% (m/v) sin antibiótico, sobre la propia placa de LB-Agar al 2%. El objetivo de esta monocapa carente de antibiótico fue el de proporcionar el tiempo necesario a las bacterias para expresar  $\beta$ -lactamasa. Esta enzima rompe el antibiótico y permite crecer únicamente a las células transformadas con el plásmido, esto es, seleccionar las colonias transformadas. Las placas se incubaron a 37°C durante al menos 16 horas. El medio LB contiene: 0.5% extracto de levadura, 1% triptona y 1% NaCl (todos m/v), y fue generado por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer.



### 4.6. CULTIVO LÍQUIDO Y GENERACIÓN DE DNA PLASMÍDICO A GRAN ESCALA

#### 4.6.1. Pre-cultivo líquido y minipreparación diagnóstica

Un número variable de colonias crecidas en placa se inocularon independientemente en 5 ml de medio LB-agar con 50 µg/ml de ampicilina (preparada en agua MilliQ y posteriormente filtrada, Sigma-Aldrich). El número de colonias inoculadas varió en función de las características de la ligación: en el caso de ligaciones sencillas se optó por inocular 4 colonias, incrementándose el número para ligaciones de mayor complejidad. Se mantuvieron en tubos estériles que permitían la aireación del cultivo, a 37°C y agitación (150 rpm). Se crecieron durante 16-20 horas y se procedió entonces a la extracción del DNA plasmídico.

Inicialmente, se centrifugaron 1.5 ml del minicultivo líquido a 16 100xg durante 5 minutos, eliminando el sobrenadante y repitiendo el proceso con 1.5 ml de minicultivo adicionales (minipreparaciones dobles). A continuación, se realizó la extracción de DNA plasmídico empleando el kit QIAprep Spin Miniprep Kit® de Qiagen, según las instrucciones del fabricante (resuspensión, lisis alcalina, neutralización, introducción en columna de membrana de sílica, unión a columna, lavados y elución). La elución se realizó en 30 µl de TE 1x. La medición de la concentración de DNA en la minipreparación se efectuó en el equipo NanoDrop2000® (Thermo-Fisher) disponible en el Servicio de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer.

#### 4.6.2. Digestión diagnóstica

Previo al cultivo de DNA a gran escala (midi o maxipreparaciones) y con el objetivo de evaluar la validez e idoneidad del DNA extraído, se efectuaron digestiones diagnósticas. Se realizaron en las condiciones anteriormente descritas (véase apartado 4.3. *Digestión mediada por enzimas de restricción en Materiales y Métodos*) y permitieron evaluar la existencia de una correcta ligación entre vector e inserto/s, así como la recuperación de los sitios de restricción (si aplica). Se digirieron entre 600 y 1 000 ng del DNA obtenido y se corrieron en paralelo con la misma cantidad de DNA no digerido, con la intención de evaluar la proporción de DNA superenrollado presente en la preparación (idealmente,

## MATERIALES Y MÉTODOS

todo el DNA debería encontrarse en este estado). La topología del DNA superenrollado le confiere una movilidad electroforética mayor, esto es, corre en un peso molecular inferior al del DNA en disposición lineal. La digestión se incubó a 37°C durante 2 horas y se corrió en un gel de agarosa de porcentaje variable, en función del tamaño de las bandas esperado.

### 4.6.3. Secuenciación

Una vez evaluado mediante restricción, se procedió a la completa validación del DNA vía secuenciación. Se mezclaron 200-300 ng de preparación plasmídica con 25 nmoles del oligonucleótido de interés, y se completó con agua MilliQ hasta un volumen total de 8 µl. Esta mezcla fue procesada por el Servicio de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer o por el Servicio General de Secuenciación de la Universidad de Salamanca, utilizando, en ambos casos, el equipo 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem, Hitachi). El análisis de secuencias se efectuó en el software *SnapGene Viewer* (GSL Biotech, disponible en [snapgene.com](http://snapgene.com)). Los alineamientos y búsquedas de secuencias de identidad desconocida se realizaron utilizando las herramientas MAFFT del EBI y blast del NCBI, respectivamente.

### 4.6.4. Cultivo de DNA plasmídico a gran escala: midi y maxipreparaciones

La obtención de grandes cantidades de DNA plasmídico se realizó mediante la inoculación del precultivo líquido (tras su validación) en 100 ml (midipreparaciones) o 400 ml (maxipreparaciones) de LB líquido suplementado con 50 µg/ml de ampicilina. Los cultivos se crecieron a 37°C y 150 rpms de agitación, durante 16-20 horas. La extracción de DNA plasmídico se efectuó empleando los kits Qiagen Plasmid Midi Kit® y Qiagen Plasmid Maxi Kit® (Qiagen) respectivamente, según las instrucciones del fabricante. La preparación de DNA se eluyó en 60 o 360 µl de TE 1x (en midi y maxipreparaciones, respectivamente) y se sometió a los mismos protocolos de validación (restricción y secuenciación) descritos en el caso de las minipreparaciones.

## 4.7. MUTAGÉNESIS DIRIGIDA

La introducción de mutaciones puntuales en un plásmido de interés se realizó mediante mutagénesis dirigida. Al tratarse de una reacción metodológicamente similar a

## MATERIALES Y MÉTODOS

la PCR convencional, se procedió de forma prácticamente análoga. La reacción se realizó por duplicado (-/+DMSO), en agua MilliQ, adicionando *Pfu Turbo* buffer 1x (Agilent), 50 ng de DNA molde, 5 pmoles de cada oligonucleótido (forward y reverse), 10 nmol de cóctel de dNTPs y 2.5 U de *Pfu Turbo* (Agilent). La versión mejorada de la enzima *Pfu*, la enzima *Pfu Turbo*, es altamente procesiva, característica que la dota de capacidad para copiar el plásmido completo. Los oligonucleótidos se diseñaron de forma que la mutación deseada se localizase, aproximadamente, en la parte central del propio cebador, cuya longitud total osciló entre 30 y 35 pares de bases. La mutación se incorporó modificando el menor número posible de bases y sustituyendo cada codón por uno con frecuencia de uso similar en la especie en particular. Asimismo, se ajustó el contenido GC al 40-60%. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados figuran en el *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*.

La mutagénesis se realizó en un termociclador iCycler convencional (BioRad), utilizando el programa que figura a continuación:

1. Un ciclo de desnaturalización: 30 segundos a 95°C.
2. Número variable de ciclos de amplificación:
  - 30 segundos a 95°C (desnaturalización).
  - 1 minuto a 55°C (anillamiento).
  - 6 minutos a 72°C o 90 segundos por kilobase (extensión).
3. Un ciclo de mantenimiento: tiempo infinito a 4°C.

Una vez finalizada la reacción, se analizó una alícuota de la misma en un gel de agarosa al 1%, con el objetivo de verificar la amplificación. El producto de PCR se transformó directamente en bacterias competentes, previa digestión con 20 U de DpnI, a 37°C durante 2 horas. DpnI únicamente digiere su diana en estado metilado, eliminando así el DNA genómico molde remanente en la reacción.

Se prosiguió con la amplificación del plásmido siguiendo las indicaciones que figuran en los apartados 4.5. *Transformación de células competentes* y 4.6.1. *Pre-cultivo líquido y minipreparación diagnóstica* en *Materiales y métodos*. El fragmento de interés se subclonó en un nuevo vector, una vez verificada su identidad mediante secuenciación. Dado que la

## MATERIALES Y MÉTODOS

capacidad de la reacción de secuenciación no excede los 1 000 pares de bases, se podrían haber generado mutaciones adicionales inadvertidas en el vector. Clonando la región mutagenizada validada mediante secuenciación en un vector previamente verificado, se eliminó la posibilidad de que los efectos observados derivasen de alteraciones en la expresión proteica.

### 4.8. PANEL DE PLÁSMIDOS

#### 4.8.1. Etiquetas peptídicas

- **HA1 (YPYDVPDYA):** derivada de la glicoproteína hemaglutinina (HA) del virus influenza humano<sup>204</sup>.
- **AU1 (DTYRYI):** derivada de la proteína mayor de la cápside del papilomavirus-1 bovino (BPV-1)<sup>205</sup>.
- **FLAG (DYKDDDDK):** diseñada artificialmente vía tecnología de DNA recombinante<sup>206</sup>.
- **E-TAG (GAPVPYDPLEPR)**<sup>201</sup>.

#### 4.8.2. Etiquetas proteicas

- **E-GFP (Enhanced Green Fluorescent Protein):** derivada de la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria*<sup>207</sup>. Originalmente proporcionada por el Dr. Tsien (Universidad de California, San Diego, California, USA) y mejorada por Cormack *et al.* en 1996<sup>208</sup>.
- **GST (Glutation S-transferasa):** procedente de *Schistosoma japonicum*. Su fusión con la proteína de interés permite aislar ésta cuando se encuentra en solución, esto es, resulta especialmente útil en ensayos de pull-down o inmunoprecipitaciones<sup>209</sup>.

#### 4.8.3. Sistema de expresión pEAK 12/8 o p12/8

El sistema de expresión peak 12/8 o p12/8 procede del laboratorio del Dr. Brian Seed (Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA). En estos plásmidos, el promotor EF1 $\alpha$  (fuerte y relativamente independiente de tejido) controla la expresión de los insertos clonados en ellos. Presentan genes de resistencia a puomicina (bajo el control del promotor de timidina quinasa) y ampicilina ( $\beta$ -lactamasa), para su selección en eucariotas y bacterias, respectivamente. Adicionalmente, portan el origen de replicación

## MATERIALES Y MÉTODOS

de SV40, por lo que pueden replicar en células que expresan el antígeno T de este virus. p12 (7kb) tiene un tamaño ligeramente superior a p8 (6,1kb), porque uno de sus elementos es de mayor tamaño; sin embargo, ambos plásmidos pueden considerarse esencialmente iguales.

El vector de expresión vacío (no codificante) recibe el nombre de p12-poly o p8-poly (de “*polylinker*”, sitio múltiple de clonación). p12-poly se empleó como control negativo y plásmido de relleno en ensayos de expresión transitoria que involucraron transfección.

**p12-IL-10RB-flag:** se clonó el inserto IL-10RB en el vector p12-flag (HindIII a BspHI). El inserto IL-10RB se había obtenido vía PCR (véase *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*), introduciendo los sitios de restricción HindIII y BspHI en los extremos 5' y 3', respectivamente. En el vector p12-flag, el inserto flag se había generado mediante anillamiento y fosforilación de los correspondientes oligonucleótidos (véase *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*) diseñados para introducir sitios de restricción BspHI y NotI en los extremos 5' y 3' respectivamente, para ser ligado posteriormente BspHI a NotI en un vector p12-poly.

**p12-IL-10RB-HA:** se clonó la etiqueta HA (BspHI a NotI) en el vector p12-IL-10RB-flag (BspHI a NotI). BspHI y NotI digirieron a nivel de la etiqueta flag, al objeto de incorporar HA en su lugar.

**p12-IL-10RB-HA/flag (5M):** se realizó una mutagénesis dirigida sobre p12-IL-10RB-HA/flag véase *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*). En primer lugar, se mutaron los aminoácidos F292 y L295 a alanina. En una segunda ronda, se mutaron F280, F281 y F283 a alanina. A continuación, se clonó la versión 5M (Hind3/BspHI) en un vector fresco p12-IL-10RB-HA/flag (Hind3/BspHI). El plásmido p12-IL-10RB-HA/flag (5M) presentaba las siguientes mutaciones: F280A, F281A, F283A, F292A, L295A.

**p12-IL-10RB-GST:** p12-GST se clonó (BspHI/NotI) en un vector p12-IL-10RB-HA (BspHI/NotI). BspHI/NotI digirieron a nivel de HA, que se elimina y se sustituye por GST.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**p12-IL-10RB-GST (5M):** p12-GST se clonó (BspHI/NotI) en un vector p12-IL-10RB-HA (5M) (BspHI/NotI). Nuevamente, BspHI/NotI cortaron a nivel de HA, que se elimina y se sustituye por GST.

**p12-IL-31RA-HA:** el inserto IL-31RA se obtuvo mediante PCR (véase *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*). A continuación, se ligó este inserto (HindIII/BspHI) en un vector p12-HA (HindIII/BspHI).

**p12-IL-31RA-HA (3M y 4M):** se efectuó una mutagénesis dirigida sobre el vector p12-IL-31RA-HA de los aminoácidos FFL-644-654-657-AA (3M) y LFVF-603-612-615-620-AAAA (véase *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*). A continuación, se subclonaron en un vector fresco p12-IL-31RA-HA (XbaI/BspHI). XbaI digiere la propia IL-31RA, pero los fragmentos generados incluyen los dos motivos mutados (3M y 4M), respectivamente. Estos fragmentos se incorporaron mediante ligación en el vector fresco.

**p8-GFP-LC3A:** el cDNA para LC3A se amplificó desde una genoteca de cDNA de células T humanas mediante PCR, introduciendo un sitio PciI en el extremo 5' de la secuencia codificante y un sitio NotI en el extremo 3'. El producto de PCR se insertó en un vector p8-GFP (PciI/NotI)<sup>102,156</sup>.

**p8-HA-LC3A, p8-AU-LC3A:** el cDNA de LC3A se clonó en un vector p8-HA o p8-AU (PciI/NotI)<sup>102,156</sup>.

**p8-HA-ATG16L1:** el plásmido que codifica la isoforma  $\beta$  de ATG16L1 procedía del laboratorio del Dr. Tamotsu Yoshimori (Osaka University, Japan). El cDNA se amplificó mediante PCR y se clonó PciI/NotI un vector p8-HA (NcoI/NotI). Los sitios PciI y NcoI son compatibles, anulándose tras la ligación<sup>102,156</sup>.

**p12-GST-ATG16L1:** se realizó una ligación a tres partes. GST procedía de un plásmido p8-GST (HindIII/NcoI), ATG16L1 se obtuvo a partir de un plásmido que portaba la versión completa de la molécula (PciI/NotI) y p12-poly se empleó como vector (HindIII/NotI). Los sitios PciI y NcoI son compatibles<sup>102,156</sup>.

**p8-HA-ATG16L1-A300 y p12-GST-ATG16L1-A300:** se generaron vía PCR mutagénica, introduciendo la mutación T300>A300 (ACT>GCT) sobre un molde p8-

## MATERIALES Y MÉTODOS

HA-ATG16L1. Una vez validada por secuenciación, se subclonó la secuencia codificante (PciI/NotI) en un vector p8-HA (PciI/NotI) o p12-GST (PciI/NotI)<sup>156</sup>.

**p8-HA-ATG16L1-Nt (1-319) y p8-HA-ATG16L1-WDD (320-607); p12-GST-ATG16L1-Nt (1-319), p12-GST-ATG16L1-WDD (320-607):** se amplificaron vía PCR los cDNA que codifican para la región N-terminal (Nt; aminoácidos 1 a 320) y para la región C-terminal (WDD; aminoácidos 321-607). Los productos de PCR se subclonaron independientemente (NcoI/NotI) en vectores p12-GST y p8-HA (NcoI/NotI y PciI/NotI, respectivamente). Los sitios PciI y NcoI son compatibles<sup>156</sup>.

**p12-HA-E-A20:** se realizó una ligación a cuatro partes entre pCDNA3-[HA-E]-A20 (HindIII/NotI), pcDNA3-HA-E-[A20] (NotI/XhoI), pcDNA3-poly (XhoI/EcoRI) que aporta un adaptador de 33 pbs y el vector [p12]-poly (HindIII/EcoRI). Entre corchetes se indica la región de cada plásmido digerida y empleada en la posterior ligación.

### 4.8.4. Sistema de expresión pCDNA3

Los plásmidos pcDNA3 constituyen uno de los sistemas de expresión en mamíferos más ampliamente empleados. Su promotor (CMV) permite la expresión de los insertos clonados en ellos de forma constitutiva. Presentan un gen de resistencia a ampicilina, para su selección en bacterias, y resistencia a neomicina como marcador seleccionable en células de mamífero.

**pCDNA3-HA-E-A20:** procedente del laboratorio del Dr. Van Loo (Ghent University, Ghent, Belgium).

**pcDNA3-HA-E-A20 (1-263; 264-790; 357-790):** los 3 fragmentos de A20 (1-263; 264-790; 357-790) se amplificaron vía PCR utilizando como molde el plásmido pcDNA3-HA-E-A20. Los sitios NotI/XhoI introducidos mediante PCR permitieron la clonación de los tres fragmentos en el plásmido pcDNA3-HA-E-A20 (NotI/XhoI). NotI/XhoI digirieron A20 completo, siendo sustituido por cada uno de los fragmentos generados mediante PCR. Los oligonucleótidos empleados figuran en el *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**pcDNA3-HA-E-A20 (1-91; 92-263):** los 2 fragmentos de A20 (1-91; 92-263) se amplificaron vía PCR utilizando como molde el plásmido pcDNA3-HA-E-A20. Los sitios NotI/XhoI introducidos mediante PCR permitieron la clonación de los dos fragmentos en el plásmido pcDNA3-HA-E-[A20] NotI/XhoI. Los oligonucleótidos empleados figuran en el *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*.

**Versiones pCDNA3-HA-E-A20 (1-263) con mutaciones puntuales:** se realizó la mutagénesis sobre el plásmido pcDNA3-HA-E-A20 (1-263) y la región codificante se clonó NotI/XhoI en un vector fresco pcDNA3-HA-E-A20 (NotI/XhoI). Las mutaciones introducidas se adjuntan a continuación:

A125V	F127C	
FL-127-130-AA	FR-138-141-AA	WE-142-144-AA
YR-159-162-AA	WL-168-171-AA	FL-224-227-AA
YV-246-249-AA	FL-257-260-AA	YG-111-114-AA
WE-164-167-AA	YL-188-191-AA	YL-233-236-AA
YY-244-246-AA	YH-252-256-AA	

**pCDNA3-HA-E-A20-7M y pCDNA3-HA-E-A20 (92-263)-7M:** se generaron mediante rondas sucesivas de mutagénesis sobre pCDNA3-HA-E-A20 y pCDNA3-HA-E-A20 (92-263), respectivamente. Los aminoácidos fueron mutagenizados en el orden que se indica a continuación:

1. FL-127-130-AA
2. YL-188-191-AA
3. FL-257-260-AA
4. WL-168-171-AA
5. FL-224-227-AA
6. YV-246-249-AA
7. YL-233-236-AA

### 4.8.5. Sistema de expresión retroviral p12-MMP

Los plásmidos pMD-VSV-G, pMD-MLV-OGP y p12-MMP-poly provenían del laboratorio del Dr. Richard C. Mulligan (Harvard Medical School, USA) y se utilizaron en la producción de partículas retrovirales infecciosas (para transducir, de forma estable



## MATERIALES Y MÉTODOS

o transitoria, líneas celulares humanas o murinas). pMD-VSV-G codifica la proteína estructural *gag* y la retrotranscriptasa *pol*, imprescindibles en el empaquetamiento de los viriones. El vector p12-MMP-poly, procedente de p-MMP, consta de los elementos requeridos para el empaquetamiento del RNA en partículas retrovirales. Los cDNA pertinentes se clonaron entre las regiones LTR del vector, que actúan como secuencias promotoras. La región p12 del vector aporta los elementos de propagación en bacterias y la resistencia a ampicilina, e impide la recombinación promovida por las propias secuencias repetidas LTRs.

El vector p12-MMP puede incorporar, asimismo, una secuencia IRES y un gen de resistencia a antibióticos puromicina o higromicina para la selección de células transducidas. Las secuencias IRES permiten la traducción de ORFs alternativas, esto es, la iniciación de la síntesis proteica en mRNAs que carecen de la modificación Cap en su extremo 5'.

**p12-MMP-HA-ATG16L1-T300-IRES-PURO** y **p12-MMP-HA-ATG16L1-A300-IRES-PURO**: los plásmidos p8-HA-ATG16L1 (T300 y A300) se digirieron PciI/NotI para ser clonados en un vector p12-MMP-poly-IRES-PURO (AgeI/NcoI y AgeI/NotI) mediante una estrategia de ligación a tres partes. Los sitios NcoI y PciI son compatibles. Los plásmidos incluyen sitios internos de entrada de los ribosomas (IRES) y genes de resistencia a puromicina, que permiten la selección de células transducidas en los medios de selección apropiados<sup>156</sup>. El plásmido p12-MMP-poly-IRES-PURO había sido generado previamente en el laboratorio<sup>156</sup>.

**p12-MMP-AU-ATG16L1-1-299-IRES-HYGRO (Nt)** y **p12-MMP-ATG16L1-HA-300-607-IRES-PURO (Ct)**: las regiones N-terminal (1-299) y C-terminal (300-607) de ATG16L1<sup>167</sup> se amplificaron vía PCR. El fragmento N-terminal se clonó (NcoI/NotI) en un vector p12-MMP-AU-[ ]-IRES-hygro (PciI/NotI). NcoI y PciI son compatibles. La región C-terminal se ligó (EcoRI/BspHI) en un vector p12-MMP-[ ]-HA-IRES-PURO (EcoRI/BspHI). Las resistencias a puromicina y higromicina permitieron la selección de células transducidas<sup>156</sup>. Los corchetes indican la región en la que se clonó cada fragmento de DNA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**p12-MMP-STAT3-flag:** el inserto STAT3 fue generado mediante PCR (véase *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*) y posteriormente clonado (HindIII/BspHI) en el vector p12-MMP-flag (HindIII/BspHI).

**p12-MMP-IL-10RB-flag-IRES-GFP:** se clonó el inserto IL-10RB-flag (AgeI/NotI) procedente del plásmido p12-MMP-IL-10RB-flag en un vector p12-MMP-FD.DD-IRES-GFP (AgeI/NotI). El vector p12-MMP-FD.DD-IRES-GFP había sido generado previamente en el laboratorio. El plásmido p12-MMP-IL-10RB-flag se generó vía clonación del producto de PCR IL-10RB (HindIII/BspHI) (véase *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*) en un vector p12-MMP-flag (HindIII/BspHI). La introducción de GFP en una segunda ORF (marco de lectura abierto) mediante el empleo de la secuencia IRES, permitió monitorizar y comparar la expresión de este plásmido en diferentes estirpes celulares.

**p12-MMP-IL-10RA-AU:** se clonó el producto de PCR IL-10RA (HindIII/BspHI) (véase *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*) en un vector p12-MMP-AU (HindIII/BspHI).

**p12-MMP-HA-ATG16L1(T300)-IRES-HYGRO mutagenizado en 81G>C, 87A>G, 91G>A, 94G>C, 100G>A (mut):** se realizó una PCR mutagénica sobre p12-HA-ATG16L1-T300 para introducir las mutaciones 81G>C, 87A>G, 91G>A, 94G>C, 100G>A. A continuación, se efectuó una ligación a cuatro partes entre p12-HA-[ATG16L1-T300-mut] (PciI/KpnI), p12-HA-[ATG16L1] (KpnI/NotI), p12-MMP-HA-LC3A-[IRES]-HYGRO (NotI/BspHI) y el vector [p12-MMP]-HA-LC3A-IRES-HYGRO (PciI/BspHI). Entre corchetes se indica la región de cada plásmido empleada en la ligación a cuatro partes. KpnI corta en el nucleótido 900 de ATG16L1, generándose dos fragmentos de ATG16L1 que fueron clonados en la subsiguiente ligación.

**p12-MMP-HA-ATG16L1(A300)-IRES-HYGRO mutagenizado en 81G>C, 87A>G, 91G>A, 94G>C, 100G>A (mut):** se efectuó una PCR mutagénica sobre p12-MMP-HA-ATG16L1(T300)-IRES-HYGRO mutagenizado en 81G>C, 87A>G, 91G>A, 94G>C, 100G>A (mut), al objeto de generar la versión A300. A continuación, se subclonó en un vector fresco mediante ligación a tres partes: p12-MMP-HA-[ATG16L1(A300)]-IRES-HYGRO (mut) (PciI/NotI) y p12-MMP-HA-ATG16L1(T300)-[IRES]-HYGRO (NotI/BspHI) en un vector p12-MMP]-HA-

## MATERIALES Y MÉTODOS

ATG16L1(T300)-IRES-[HYGRO (PciI/BspHI)]. Entre corchetes se indica la región de cada plásmido empleada en la ligación a cuatro partes. La dificultad de la ligación a cuatro partes efectuada para la generación del plásmido p12-MMP-HA-ATG16L1(T300)-IRES-HYGRO (mut) fue el motivo por el que se eligió la aproximación anteriormente descrita. Esta aproximación implicaba una ligación a tres partes, metodológicamente más sencilla.

Ambos plásmidos mutagenizados en 81G>C, 87A>G, 91G>A, 94G>C, 100G>A, versiones T300 y A300) permitieron recuperar la expresión de ATG16L1 en células previamente silenciadas para esta molécula (vía CRISPR-Cas9, véase apartado 4.8.7. *Sistema de expresión lentiviral CRISPR-Cas9 en Materiales y Métodos*), puesto que las mutaciones generadas interferían en el sitio de corte de Cas9. Todos los cambios introducidos fueron de tipo sinónimo, esto es, la secuencia de aminoácidos permaneció inalterada.

### 4.8.6. Sistema de expresión retroviral SB0001.4

**STAT3x3-LUC:** se anillaron y fosforilaron los oligonucleótidos para el operón de STAT3 (véase tabla *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*) y se ligaron en un vector SB0001.4-STAT3-LUC (HpaI a XhoI), generando así el plásmido SB0001.4-STAT3x2-LUC. La versión STAT3x3-LUC se obtuvo a partir de la anterior, de nuevo anillando y fosforilando los oligos para STAT3 y ligándolos en el vector SB0001.4-STAT3x2-LUC (HpaI a XhoI). El vector inicial SB0001.4-STAT3-LUC se generó vía ligación del operón STAT3 (procedente de un vector reportero comercial (Clontech)) en el vector SB0001.4-luc (HpaI a NcoI). El plásmido SB0001.4 es un vector  $\lambda$ B-luc retroviral<sup>201</sup>. De esta forma, el plásmido STAT3x3-LUC funcionó como reportero retroviral en diversos contextos celulares. La multimerización del mismo favoreció la generación de señales más robustas y, por tanto, más fácilmente medibles.

### 4.8.7. Sistema de expresión lentiviral CRISPR-Cas9

El sistema lentiviral utilizado para transducción celular requirió los plásmidos pCMV-VSV-g y psPAX, ambos procedentes de Addgene. El plásmido pCMV-VSV-g codifica la proteína de la cápside del virus (o proteína estructural *gag*), mientras que el plásmido psPAX aporta proteínas estructurales y actividad retrotranscriptasa. La actividad Cas9 la

## MATERIALES Y MÉTODOS

proporciona el vector lentiCRISPR-v2, que porta, adicionalmente, la secuencia diana y resistencia a puromicina. El vector vacío se denomina lentiCRISPR-v2-control.

**lentiCRISPR-v2-ATG16L1 (humano):** se generó vía anillamiento y fosforilación de los oligonucleótidos para las secuencias diana de ATG16L1 (véase *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*) y ligación en un vector lentiCRISPR-v2 (Bsmbl).

**lentiCRISPR-v2- $\Delta$ WDD (humano):** se generó vía anillamiento y fosforilación de los oligonucleótidos para las secuencias diana de la región WDD de ATG16L1 humano (véase *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*) y ligación en un vector lentiCRISPR-v2 (Bsmbl).

### 5. LISIS CELULAR

El método de lisis celular se seleccionó en función del objetivo global de cada ensayo. La lisis se efectuó en buffer NP40 (Igepal, Sigma-Aldrich) o en SB2x (*Sample Buffer 2x*). El buffer NP40 no rompe membranas celulares (únicamente extrae proteínas citosólicas) ni altera las interacciones proteína-proteína, por lo que resultó útil en fraccionamiento núcleo/citoplasma y ensayos de co-inmunoprecipitación. El buffer SB2x permite la extracción de proteínas transmembrana y nucleares, siendo la opción elegida para la lisis del núcleo celular y, en general, para todos aquellos ensayos en los que no resultaba imprescindible el mantenimiento de interacciones proteicas. La composición de cada uno de los buffers y el proceso de lisis efectuado en cada caso se detalla en los siguientes apartados.

#### 5.1. LISIS EN BUFFER NP40

El procedimiento de lisis se realizó en frío (requisito que aplica a todos los reactivos empleados), efectuando todas las etapas en el menor tiempo posible, con el objetivo de evitar la degradación proteica. Las células adherentes se recogieron mediante pipeteo repetido (HEK-293T) o se despegaron con ayuda de un raspador celular (HCT116, HeLa, MEFs, macrófagos), según sus propiedades de adherencia. Los cultivos en suspensión (THP1) se recogieron, asimismo, mediante pipeteo repetido. Las placas se lavaron con PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>. Se centrifugó a 500xg durante 5 minutos, a 4°C de temperatura. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular en 1 ml

## MATERIALES Y MÉTODOS

de PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>. Nuevamente, se centrifugó a 500xg durante 5 minutos y 4°C de temperatura. Se succionó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado celular en buffer de lisis NP40 (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA y 1% de NP40 (v/v) en agua MilliQ). El buffer de lisis se suplementó con inhibidores de proteasas: fluoruro de fenilmetilsulfonilo PMSF (10 µg/ml, Roche) y cóctel de inhibidores de proteasas PIC (1%, v/v, Sigma-Aldrich). En los ensayos destinados a la evaluación fosforilación proteica se adicionaron inhibidores de fosfatasas: β-glicerofosfato (25 mM, Sigma-Aldrich), fluoruro de sodio NaF (5 mM, Sigma-Aldrich) y 1mM de ortovanadato de sodio Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (New England Biolabs). Se efectuó el proceso de lisis durante 30 minutos, a 4°C y sometiendo los extractos a vórtex suave cada 5-7 minutos. Una vez finalizada la lisis, se centrifugó a 4°C y 16 100xg durante 10 minutos. El sobrenadante se transfirió a nuevos tubos.

En los ensayos destinados a la evaluación del marcador autofágico LC3, se separó una alícuota del sobrenadante a un nuevo tubo (con la finalidad de ser empleada en la medición de la concentración de proteína) y el extracto restante se mezcló 1:1 con RSB2x. Se hirvió la mezcla a 100°C durante 10 minutos (eliminando cualquier actividad hidrolasa (lipasa y proteasa) del extracto) y se centrifugó a temperatura ambiente, 16 100xg durante 5-10 minutos. El RSB2x es una solución acuosa constituida por 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% de SDS (m/v), 10% de β-mercaptoetanol (v/v, Sigma-Aldrich), 0.2% de azul de bromofenol (Sigma-Aldrich) y 20% de glicerol (v/v). Todos los reactivos no comerciales fueron generados por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer. Los extractos proteicos se almacenaron a -80°C.

### 5.2. LISIS EN BUFFER SB2X

Se procedió análogamente a lo descrito en el anterior apartado, pero los precipitados celulares se resuspendieron en buffer SB2x (100 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% de SDS (v/v) y 20% de glicerol (v/v) en agua MilliQ) suplementado con fluoruro de fenilmetilsulfonilo PMSF (10 µg/ml) y cóctel de inhibidores de proteasas PIC (1%, v/v). Tras un vórtex vigoroso, los extractos se hirvieron durante 15 minutos y se centrifugaron a temperatura ambiente y 16 100xg durante 5 minutos. Todos los reactivos no comerciales fueron

## MATERIALES Y MÉTODOS

generados por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer.

### 5.3. FRACCIONAMIENTO CELULAR

El fraccionamiento celular aquí descrito refiere únicamente a la separación de proteínas citosólicas y nucleares. El procedimiento se inició con una lisis convencional en buffer NP40. Tras la centrifugación a 16 100xg durante 10 minutos, los sobrenadantes (fracción citosólica) fueron transferidos a nuevos tubos, mientras que el precipitado remanente (fracción nuclear) se lisó en buffer SB2x.

### 5.4. MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA EN EXTRACTOS CELULARES

La concentración proteica se evaluó utilizando el kit DC Protein Assay (BioRad), que permite la determinación de la concentración total de proteínas basándose en el método de Lowry<sup>210</sup>. Esta técnica bioquímica mide, vía colorimetría, la reacción de los residuos aromáticos de las proteínas con una solución alcalina de tartrato de cobre y el reactivo de Folin. El producto resultante de la reducción presenta color azulado, y su intensidad correlaciona con la cantidad de proteína presente en la muestra. La detección de la absorbancia para cada punto problema se realizó en un espectrofotómetro Ultra Evolution (Tecan) ligado al software *XFluor*, a 690 nm. La concentración total de proteína se extrapoló a partir de la curva patrón realizada con BSA (Pierce), válida en el intervalo de concentraciones de 0 a 1.8 µg/µl. Puesto que las concentraciones proteicas en los extractos excedían, en la mayor parte de las mediciones, el umbral superior de la curva patrón, se realizaron diluciones 1:6 en agua MilliQ. Asimismo, se efectuaron replicados de cada punto problema con el objetivo de discriminar errores experimentales en la medición.

## 6. WESTERN BLOT

### 6.1. ELECTROFORESIS SDS-PAGE

La electroforesis se efectuó en geles de poliacrilamida con SDS (electroforesis SDS-PAGE)<sup>211</sup>. Los geles se generaron empleando una mezcla comercial de 30% acrilamida-

## MATERIALES Y MÉTODOS

bisacrilamida (37.5:1 (2.7% de agente entrecruzador, BioRad) y soluciones Tris, generadas en el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer (Lower-Tris: 0.375 mM de Tris-HCl pH 8.8 y 3.5 mM SDS en agua MilliQ y Upper-Tris: 0.125 mM de Tris-HCl pH 6.8 y 3.5 mM de SDS en agua MilliQ). Las mezclas se polimerizaron utilizando APS al 0.1% (m/v, Sigma-Aldrich) y TEMED al 0.1% (v/v, Sigma-Aldrich). Mientras que el porcentaje de poliacrilamida en el gel de resolución se seleccionó en función del peso molecular de cada proteína/s objeto de estudio, oscilando entre el 7 y el 14%, el gel empaquetador se mantuvo en un porcentaje constante del 5% de poliacrilamida.

La cantidad de muestra cargada en cada gel fue ampliamente variable, dependiente de cada experimento en particular y de la calidad de los anticuerpos empleados *a posteriori* en la detección de la proteína/s de interés. Los extractos proteicos se mezclaron 1:1 con RSB2x y se hirvieron para su completa desnaturalización. Tras la centrifugación (temperatura ambiente y 16 100xg durante 5 minutos) los extractos se corrieron en el sistema Mini-PROTEAN II (BioRad), en paralelo con un marcador de peso molecular de proteínas (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, BioRad). La electroforesis se efectuó a voltaje constante (150V), en buffer 25 mM Tris, 200 mM glicina y 0.05% SDS (m/v) en agua MilliQ, generado en forma de solución stock 10x por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer.

### 6.2. TRANSFERENCIA HÚMEDA

Las proteínas separadas durante la electroforesis se transfirieron a una membrana de PVDF (Immobilon, Millipore) utilizando el sistema Mini-Trans blot® (BioRad). La membrana de PVDF fue activada en metanol (5 minutos) y a continuación lavada en agua MilliQ (5 minutos) y buffer de transferencia (5 minutos), previo a su montaje en el equipo de electroforesis. Los geles se lavaron en buffer de transferencia frío durante 15 minutos, con el objetivo de eliminar el SDS remanente que pudiese causar interferencias durante la transferencia. El buffer de transferencia (25 mM Tris, 192 mM glicina y 20% metanol (v/v) en agua MilliQ) fue generado como una solución stock 10x por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La transferencia se efectuó a voltaje constante (100 V) durante dos horas. La temperatura (4°C) y la agitación favorecieron la disipación del calor generado.

### 6.3. BLOQUEO E INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS PRIMARIOS

El bloqueo se realizó a temperatura ambiente, en una solución 10% de leche en polvo (m/v, Nestlé) diluida en buffer de lavado TBS-t (TBS: 5 mM Tris-HCl pH 8.8, 50 mM NaCl, 2.5 mM KCl en agua MilliQ (preparado como solución stock 20x por el Servicio de Lavado y Esterilización del Centro de Investigación del Cáncer) y Tween20 0.05% (v/v, Sigma-Aldrich)). Transcurrida la hora de bloqueo, se lavaron las membranas con TBS-t, 3 veces durante 30 minutos, y se transfirieron a una nueva cubeta para su incubación con el anticuerpo primario relevante. Todos los lavados se efectuaron en TBS-t frío. Los anticuerpos primarios se prepararon en solución 2% BSA (Sigma-Aldrich) y 0.1% de azida sódica  $\text{NaN}_3$  (m/v, Sigma-Aldrich), en TBS-t. La etapa de bloqueo, así como las incubaciones con los anticuerpos primario y secundario (y los correspondientes lavados intermedios), se efectuaron en agitación constante (100 rpms).

En el *Anexo 2. Anticuerpos primarios* figuran los anticuerpos primarios empleados, la dilución efectuada en su variedad de aplicaciones y las casas comerciales proveedoras. La incubación con los correspondientes anticuerpos primarios se efectuó durante toda la noche a 4°C o durante una hora a temperatura ambiente, en función de la calidad del anticuerpo y de la señal esperada.

### 6.4. INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS SECUNDARIOS Y REVELADO

Transcurrido el tiempo de incubación con el anticuerpo primario, se procedió al lavado de las membranas en TBS-t frío, 3 veces durante 30 minutos. Los anticuerpos secundarios (véase *Anexo 3. Anticuerpos secundarios*) se prepararon en una solución de leche al 5% en TBS-t. Las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, y a continuación se lavaron con TBS-t frío, 3 veces durante 30 minutos.

Dado que los anticuerpos secundarios empleados se encontraban conjugados con la peroxidasa HRP, se procedió al revelado de las membranas vía quimioluminiscencia, utilizando los reactivos ECL (GE Healthcare) o ECL-Clarity (BioRad) en función de la



## MATERIALES Y MÉTODOS

señal esperada. La visualización se efectuó en una reveladora automática AGFA 1890 Classics E.O.S., utilizando películas SuperRX (Fuji Medical X-Ray Film, Fujifilm). Las películas se escanearon a 600 dpi y se seleccionaron las bandas relevantes que se incluyeron en las figuras correspondientes. Los Western-blot mostrados son representativos de al menos tres repeticiones.

Las membranas se incubaron con diferentes anticuerpos primarios, esto es, un único Western blot proporcionó múltiples resultados. En los casos en los que existieron incompatibilidades de especie, peso molecular o excesiva señal de un anticuerpo previo, la incubación con un nuevo anticuerpo requirió la eliminación de la señal anterior. Con esta finalidad, las membranas se incubaron en una solución de guanidina-HCl 7M (Sigma-Aldrich) generada en agua MilliQ. Tras un periodo de 20 minutos, se procedió a efectuar una serie de lavados de 10 minutos, empleando TBS-t frío. Los lavados se prolongaron durante 40 minutos totales, tras los cuales las membranas se bloquearon durante una hora en leche al 10%. A partir de este momento se prosiguió con el procedimiento habitual de lavados e incubaciones con los correspondientes anticuerpos primarios y secundarios.

## 7. CO-INMUNOPRECIPITACIONES (COIPs)

### 7.1. PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS PROTEICOS

Se sembraron células HEK-293T ( $1.5 \times 10^6$ ), HCT116 ( $1.2 \times 10^6$ ) o MEFs ( $1 \times 10^6$ ) en placas de 60 mm. Transcurridas 24 horas, se transfectaron con PEI o se trataron con el estímulo relevante. Una vez finalizado el tiempo de incubación correspondiente, se recogieron en PBS1x Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> frío y se lisaron en NP40 buffer 1% (v/v) suplementado con inhibidores de proteasas (véase apartado 5.1. *Lisis en buffer NP40 en Materiales y Métodos*). Transcurridos los 30 minutos de lisis, los extractos proteicos se centrifugaron durante 10 minutos, a 16 100xg y 4°C. El sobrenadante se diluyó hasta una concentración final del 0.2% (v/v) de NP40 buffer, con buffer de lisis carente de detergente. Previo a la dilución, se había retirado una alícuota de extracto proteico no diluido con la finalidad de ser analizada *a posteriori* mediante Western blot (denominada lisado total o TL en las imágenes que se muestran en los apartados de *Resultados*).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.2. PRE-LAVADO Y CO-INMUNOPRECIPITACIÓN

El lisado diluido se incubó durante 1 hora en presencia de una matriz de proteína G-sefarosa (GE Healthcare), previamente bloqueada en BSA 2%. Esta etapa de pre-lavado favoreció la eliminación de inespecificidades en la co-inmunoprecipitación, mediante la adsorción no específica de proteínas irrelevantes a la matriz de proteína G.

A continuación, los extractos diluidos se incubaron en presencia de una matriz de GSH-sefarosa (GE Healthcare), previamente bloqueada en BSA 2%. Esta incubación, cuya duración osciló entre 1 y 3 horas, permitió recuperar las proteínas etiquetadas con GST, que mostraban una gran afinidad por dicha matriz.

Ambas matrices (proteína G y GSH) se bloquearon en una solución de BSA al 2% (m/v) preparada en buffer de co-inmunoprecipitación (coIP). El buffer de coIP se generó de forma análoga al buffer de lisis, reduciendo la concentración de detergente incorporada del 1% al 0.2%. El bloqueo de las matrices se realizó durante toda la noche. La etapa de bloqueo y las incubaciones con proteína G y GSH se efectuaron a 4°C de temperatura y 20 rpms de rotación.

Tras la incubación con GSH-sefarosa, se lavó la matriz con buffer de coIP frío. Se efectuaron entre 2 y 5 lavados, de 10 segundos a 1 minuto de duración. La elección del número de lavados y duración de estos se efectuó baremando la robustez de la interacción proteica de interés y la presencia de inespecificidades. Finalmente, se eliminó el buffer de lavado y se añadieron 25 µl de RSB2x. Las muestras se hirvieron durante 10 minutos, liberándose así las interacciones proteína-proteína. Finalmente, se realizó una centrifugación a 16 100xg durante 5 minutos y el sobrenadante se corrió en un gel de poliacrilamida para su posterior análisis mediante Western blot.

Adicionalmente, las interacciones proteicas de interés pudieron recuperarse empleando anticuerpos afines a alguna de las proteínas implicadas en la unión, como alternativa al etiquetado con GST. En esta aproximación se procedió de forma análoga respecto a lo anteriormente descrito; no obstante, tras el paso de pre-lavado, los lisados diluidos se incubaron en presencia de un anticuerpo afín a una de las proteínas involucradas en la unión. Tras 2-3 horas, los lisados incubados con el anticuerpo

## MATERIALES Y MÉTODOS

correspondiente se sometieron a una incubación de una hora con matriz de proteína G-sefarosa. La elevada afinidad de la proteína G por la región constante y variable de los anticuerpos permitió recuperar la interacción proteica. Finalmente, se prosiguió con la etapa de lavados y desnaturalización, según las pautas previamente descritas. Los anticuerpos empleados y su dilución figuran en el *Anexo 2. Anticuerpos primarios*.

### 8. INMUNOFLUORESCENCIAS

#### 8.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA INMUNOFLUORESCENCIA

El procedimiento de inmunofluorescencia implicó el sembrado de las células sobre cubreobjetos para su posterior manipulación. Inicialmente, se distribuyeron los cubreobjetos de diámetro 10 mm (Thermo-Scientific) en placas de 24 pocillos, depositándose sobre cada uno de ellos 50  $\mu$ l de poli-L-lisina 0.01% (Sigma-Aldrich). Este poliaminoácido de carga positiva facilita la interacción con la membrana plasmática (cargada negativamente), favoreciendo así la adhesión celular al cubreobjetos. El tratamiento se extendió durante 30 minutos, tras los cuales se eliminó el exceso de poli-L-lisina lavando con agua MilliQ y PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> frío. A continuación, se sembraron las células según el protocolo habitual.

#### 8.2. INMUNOFLUORESCENCIA

Una vez finalizado el ensayo en particular, las células se lavaron dos veces con PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> frío y se fijaron en 4% de paraformaldehído (m/v, Sigma-Aldrich) en PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>. La fijación se prolongó durante 15 minutos. El paraformaldehído es un agente fijador que preserva las estructuras celulares. En ensayos que requirieron una tinción posterior con LC3 (Nanotools), el paraformaldehído se sustituyó por metanol a -20°C (Sigma-Aldrich). El periodo de fijación se redujo a 5 minutos, al tratarse de un procedimiento más agresivo, que fácilmente desestructura las células. En cualquier caso, una vez transcurrido el tiempo de fijación, se lavaron las células dos veces con PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> frío.

Tras la etapa de fijación, se permeabilizaron las células con NP40 0.5% (v/v, Sigma-Aldrich) en PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>. Esta solución incorporó glicina 1% (m/v, USB Affimetrix),

## MATERIALES Y MÉTODOS

que favorece el bloqueo grupos aldehído libres, altamente reactivos. La incubación con esta solución fue omitida para células fijadas previamente con metanol, ya permeabilizadas por la deshidratación inducida por el propio solvente orgánico. En este caso, únicamente se efectuó el bloqueo de los grupos aldehído libres en una solución de glicina 1% en PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>. En cualquiera de los casos, transcurridos 30 minutos de incubación, los cubreobjetos se lavaron dos veces con PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> frío.

En caso de carecer de etiquetas fluorescentes (proteínas sin etiquetar, con etiquetas no fluorescentes o endógenas), se efectuó una tinción con anticuerpos para revelar la señal de interés. En primer lugar, se bloquearon las preparaciones en 3% BSA (m/v, Sigma-Aldrich) y 0.1% de azida sódica (m/v, Sigma-Aldrich) en PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>. Tras 45-60 minutos, los cubreobjetos se lavaron con PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> frío y se incubaron con los anticuerpos primarios relevantes (véase *Anexo 2. Anticuerpos primarios*). Las soluciones de los anticuerpos primarios se prepararon en 2% BSA (m/v) y 0.1% de azida sódica (m/v) en PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>.

Posteriormente, se lavaron los cubreobjetos con PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> frío y se incubaron en presencia de los anticuerpos secundarios correspondientes (véase *Anexo 3. Anticuerpos secundarios*), preparados en solución 2% BSA (m/v) y 0.1% de azida sódica (m/v) en PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>. Los anticuerpos secundarios se encontraban conjugados con los fluorocromos Cy3 (rojo cercano) o Cy5 (rojo lejano), pudiendo combinarse en tinciones dobles según la especie de procedencia del anticuerpo primario. El bloqueo y las tinciones se efectuaron en atmósfera húmeda y oscura. La duración total de cada etapa fue de una hora.

Finalmente, el núcleo celular se tiñó con una solución de DAPI 1 µg/ml (Sigma-Aldrich) en PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>. Tras una incubación de 5 minutos, los cubreobjetos se lavaron tres veces con PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> y se fijaron sobre los portaobjetos (LineaLab), utilizando 4 µl de la resina PROLONG GOLD (Invitrogen). Se secaron en atmósfera oscura y se sellaron con laca de uñas convencional.

### 8.3. VISUALIZACIÓN MEDIANTE MICROSCOPIA CONFOCAL

Las muestras se analizaron en un microscopio confocal SP5 de Leica (Servicio de Microscopía del Centro de Investigación del Cáncer), empleando los láseres de excitación 405 (azul), 488 (verde), 561 (rojo) y/o 633 (rojo lejano). Los umbrales de las ventanas de adquisición electrónicas, que determinan el rango de captura de cada espectro de emisión, se establecieron en valores suficientemente distantes para descartar la existencia de superposiciones. Las imágenes se visualizaron mediante el objetivo 63x y, tras su captura, se analizaron mediante los softwares *LAS X Core (Offline version*, Leica Microsystems), e *ImageJ 1.52a* (Rasband W., National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA)<sup>212</sup>. Ambos programas son de acceso libre y se encuentran disponibles en línea.

Los contajes de vesículas totales en la célula se efectuaron de forma automática, mediante *ImageJ*. En primer lugar, se disociaron las señales para seleccionar exclusivamente el canal de interés. A continuación, se aplicó una máscara para extraer los píxeles positivos del fondo, y se emplearon las herramientas “*erode*” y “*watershed*” para eliminar fondo y separar adecuadamente las vesículas, respectivamente. Finalmente, se efectuó el contaje estableciendo como umbral mínimo de diámetro (0.0005 in<sup>2</sup>) y circularidad en valores por defecto (0-1). El tratamiento estadístico de los datos se efectuó según lo descrito en el apartado 15. *Tratamiento estadístico de los datos en Materiales y Métodos*.

Los contajes de colocalizaciones se efectuaron en el Servicio de Microscopía del Centro de Investigación del Cáncer, empleando la versión completa del software *LAS X* (Leica Microsystems), de distribución limitada. Se eliminó el ruido de fondo para cada una de las señales a analizar y se cuantificó el porcentaje de colocalización de cada célula en particular. El porcentaje de colocalización se define como el cociente entre el número de píxeles que colocalizan/número de píxeles totales, expresado como porcentaje. El análisis estadístico se efectuó según lo descrito en el apartado 15. *Tratamiento estadístico de datos en Materiales y Métodos*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### **9. ENSAYOS CON MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MÉDULA ÓSEA (BMDMs)**

#### **9.1. EXTRACCIÓN DE MÉDULA ÓSEA EN RATONES**

En primer lugar, se trataron las superficies y el animal con etanol 70%, al objeto de preservar el ambiente en condiciones asépticas. Los animales se sacrificaron en el Servicio de Experimentación Animal del Centro de Investigación del Cáncer, en cámara de gas de CO<sub>2</sub>, de acuerdo con las directrices legales europeas y españolas (Directiva 2010/63/UE y Ley 6/2013, respectivamente).

Una vez tratado con etanol, se retiró la capa de piel de las extremidades traseras para exponer el músculo y, a continuación, se separó el tejido muscular de los huesos (fémur y tibia), dislocando y seccionando a nivel de la intersección con la pelvis. Los huesos se depositaron en un tubo cónico con 15-20 ml de medio DMEM completo frío. Subsiguientemente, se eliminó la capa muscular remanente, y se dislocaron fémur y tibia a nivel de la rótula. Tras seccionar las epífisis, se introdujo una jeringa de 23G-27G en la región inicial de la diáfisis y se arrastró el líquido y células medulares haciendo pasar 10 ml de medio DMEM completo frío. Se procedió análogamente con los restantes huesos (tibias y fémures) extraídos. El medio DMEM empleado en el cultivo de macrófagos se suplementó con 1% de glutamina, 1% de cóctel de antibióticos y 20% de FBS (véase apartado 1.2. *Condiciones de cultivo celular en Materiales y Métodos*).

Finalmente, esta suspensión heterogénea de células de la médula ósea se centrifugó a temperatura ambiente, 5 minutos y 500xg. Tras eliminar el sobrenadante, el precipitado celular heterogéneo se resuspendió en 25 ml de medio DMEM completo y suplementado con 20 ng/ml del factor humano recombinante M-CSF (BioLegend). El factor M-CSF favorece la diferenciación macrofágica.

#### **9.2. CULTIVO DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE LA MÉDULA ÓSEA (BMDMs)**

Transcurridos tres días, una gran cantidad de células procedentes de la médula ósea se había adherido a la placa de cultivo. En este punto, se reemplazó el medio de cultivo

## MATERIALES Y MÉTODOS

por DMEM fresco, suplementado con 20 ng/ml de M-CSF. La finalidad del cambio de medio fue eliminar las células no adheridas, esto es, sin capacidad de diferenciación macrofágica, así como hematíes y restos de tejido. Dado la elevada sensibilidad de los cultivos primarios a la inhibición de la proliferación por contacto y en función del estado del cultivo celular particular, se efectuó un cambio de medio adicional previo al empleo de estas células en la realización de ensayos de PCR cuantitativa, ELISA o Western blot. Así, los cultivos permanecieron en condiciones óptimas para su posterior procesamiento.

Aproximadamente seis días después de la extracción, se analizó la presencia de marcadores macrofágicos en la superficie de las células adherentes (CD11b y F4/80). Una vez corroborada su identidad, se efectuaron ensayos de diversa índole, entre los que se incluyen PCR cuantitativa o ELISA. Considerando sus propiedades adherentes, la siembra de los macrófagos requirió la utilización de un raspador celular, al objeto de disgregar las células y generar una solución celular homogénea. Las células se sembraron en placas multipocillo p6 (ensayos de fosforilación de STAT3 y qPCR) o p12 (ensayos de ELISA), en ausencia de M-CSF, entre 12 y 16 horas antes de su estimulación (periodo de “*resting*” o reposo).

### 10. CITOMETRÍA DE FLUJO

El análisis de marcadores en superficie implicó el marcaje de las poblaciones celulares de interés con anticuerpos específicos conjugados con fluorocromos, detectados por los equipos de citometría de flujo.

Las distintas poblaciones celulares (en cultivo de mantenimiento o sembradas previamente en placas de 24 pocillos) se recogieron para su posterior tinción. En el caso células de crecimiento adherente, como MEFS o THP1 activadas por PMA, se optó por efectuar una incubación en presencia del reactivo Accutase Solution (Sigma-Aldrich) como método de disgregación. Se descartó la tripsinización dada su capacidad para eliminar proteínas de membrana. En resumen, tras la aspiración del medio de cultivo y el lavado con PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>, se adicionó un volumen variable de Accutase Solution (100 µl por pocillo para placas p24). El periodo de incubación se prolongó hasta la completa disgregación del cultivo celular, neutralizándose entonces con medio de cultivo y

## MATERIALES Y MÉTODOS

transfiriéndose a un tubo de citometría. Otras estirpes celulares, como macrófagos diferenciados, se individualizaron mediante raspado y pipeteo repetido.

A continuación, las células se centrifugaron a 800xg durante 10 minutos, a temperatura de 4°C. Finalizada la centrifugación, se eliminó el medio de cultivo y el precipitado celular se resuspendió en DMEM completo con 0.1% de azida sódica y agente bloqueante: 50 µg/ml de  $\gamma$ -globulina humana (Sigma-Aldrich), o suero de rata o ratón 1:100 (comercial (Sigma-Aldrich) u obtenido en el laboratorio, respectivamente). Esta etapa de bloqueo se extendió durante 30 minutos, tras los cuales se añadió el anticuerpo primario correspondiente (véase *Anexo 4. Anticuerpos primarios conjugados con fluorocromos*) preparado en DMEM completo con 0.1% de azida sódica. Se realizó una incubación de 30 minutos adicionales y la subsiguiente neutralización, mediante la adición de DMEM completo con 0.1% de azida sódica. Se centrifugaron los tubos a 800xg durante 5 minutos, a temperatura de 4°C.

Tras eliminar el medio, se resuspendió el precipitado en un volumen inferior de DMEM completo con 0.1% de azida sódica, homogeneizando las muestras previamente a su procesamiento en el citómetro. El volumen de medio necesario para la resuspensión celular final se seleccionó en función de la densidad celular y del flujo deseado en el citómetro. La conjugación de los anticuerpos primarios con fluorocromos soslaya el requerimiento de tinciones adicionales.

Las muestras se analizaron en un citómetro Accuri C6 (BD BioSciences), ajustando el flujo de adquisición a modalidad rápida y fijando el número total de eventos adquiridos en 20 000. Para el procesamiento de los datos adquiridos se recurrió al software *BD Accuri™ C6* (BD BioSciences), de distribución limitada. En cada muestra se evaluó la proporción de células vivas, el porcentaje de eventos positivos para una tinción en particular, la media de fluorescencia total y la media de fluorescencia de los eventos positivos. El tratamiento estadístico de los datos se efectuó según lo descrito en el apartado 15. *Tratamiento estadístico de datos en Materiales y Métodos*.



### 11. ENSAYOS DE PCR CUANTITATIVA (qPCR) EN BMDMs Y THP1

Los BMDMs se sembraron en medio DMEM completo (no suplementado con M-CSF), en placas de 6 pocillos. Tras un periodo de reposo de 12-16 horas, se reemplazó el medio de cultivo por DMEM completo con 1% de suero (sin M-CSF). Tras 5 horas en bajo porcentaje de suero, se trataron con la dosis relevante de LPS (Invivogen), IL-10 murina (R&D Systems) o ambos, simultánea o desfasadamente añadidos. Los tratamientos se efectuaron, asimismo, en DMEM completo con 1% de suero y carente de M-CSF.

Las células THP1 precisaron un pretratamiento de 48 horas con PMA 125 ng/ml (Sigma-Aldrich) en medio DMEM completo. Una vez activadas por PMA, se reemplazó el medio de cultivo por DMEM completo con 1% de suero (carente de PMA). Tras 5 horas de incubación en bajo porcentaje de suero, fueron sometidas a esquemas de tratamiento análogos a los señalados anteriormente, empleando, en este caso, IL-10 humana (Gibco-Thermo Fisher Scientific). Los diferentes tratamientos se efectuaron en medio DMEM completo con 1% de suero y carente de PMA.

Una vez finalizado el periodo de tratamiento (usualmente 4 a 5 horas), se lisaron en placa para la extracción de RNA total. La extracción y purificación de RNA se efectuó empleando el kit RNeasy® Mini (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración del RNA purificado se evaluó en un NanoDrop2000®.

El kit de qPCR iTaq™ Universal SYBR® Green One-Step (BioRad) incorpora la enzima retrotranscriptasa, de modo que la generación de cDNA y la qPCR *per se* se efectuaron en un único paso. Las reacciones se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos (Thermo Fisher Scientific) se incorporaron a una concentración final de 200 nM, mientras que la cantidad de RNA añadido osciló entre 30 y 40 ng por reacción. Las preparaciones se corrieron en un termociclador iQ™5 Real-Time PCR Detection System (BioRad, disponible en el Servicio de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer) y se analizaron mediante el software *Bio-Rad iQ5™ 2.0 Standard Edition Optical System Software* Versión 2.0 (Bio-Rad), de

## MATERIALES Y MÉTODOS

distribución limitada. En el *Anexo 5. Oligonucleótidos para qPCR* se adjunta el panel de oligonucleótidos testados.

El análisis de los datos de qPCR se llevó a cabo relativizando la expresión de los genes de interés respecto a los genes control (del inglés “*housekeeping genes*”) GAPDH y ACTINA, cuya expresión permanecía invariable con independencia del estímulo recibido por la población celular. Este método se denomina cuantificación relativa o “análisis doble  $\Delta Ct$ ” y se realizó en 4 etapas, descritas a continuación:

1. Se halló la media de los valores Ct (número ciclos requeridos para detectar el transcrito de interés, proporcionado por el equipo de qPCR) del gen control (GAPDH o ACTINA) y el gen testado, en ausencia/presencia de tratamiento. De esta forma se obtuvieron 4 valores:
  - Gen control no tratado (HC).
  - Gen control tratado (HE).
  - Gen testado no tratado (TC).
  - Gen testado tratado (TE).
2. Se calcularon las diferencias entre TE y HE (TE-HE) y TC y HC (TC-HC), generando así los valores  $\Delta Ct$  para las condiciones no tratado ( $\Delta CTC$ ) y tratado ( $\Delta CTE$ ).
3. Se halló la diferencia entre  $\Delta CTE$  y  $\Delta CTC$  ( $\Delta CTE - \Delta CTC$ ), siendo dicha diferencia el valor “doble  $\Delta Ct$  ( $\Delta \Delta Ct$ )”.
4. El valor “doble  $\Delta Ct$  ( $\Delta \Delta Ct$ )” no refleja intuitivamente la abundancia de un transcrito en particular. Por ejemplo, una disminución de 1 en el valor Ct implica una reducción de la abundancia del transcrito a la mitad. Dado que todos los cálculos se encuentran en forma de logaritmo de base 2 (puesto que una cadena molde de DNA genera dos hebras durante la amplificación, esto es, la reacción es exponencial), la ratio de cambio en la expresión de un transcrito en particular se expresó como  $2^{-\Delta \Delta Ct}$ . Este valor fue el utilizado en el análisis de datos de qPCR que figura en los apartados de *Resultados*. El tratamiento estadístico de los datos se efectuó según lo descrito en el apartado 15. *Tratamiento estadístico de datos en Materiales y Métodos*.

### 12. ENSAYOS ELISA EN BMDMs Y THP1

La técnica de inmunoensayo ELISA se utilizó para detectar la presencia de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en el sobrenadante de BMDMs y THP1, respectivamente, tras ser sometidas a un estímulo en particular.

La secreción de TNF- $\alpha$  requirió exclusivamente la adición de LPS<sup>213</sup>. Sin embargo, IL-1 $\beta$  se genera como una forma citosólica inactiva de 31 kDa, que requiere el corte por caspasa-1 para ser secretada en su forma activa de 17 kDa<sup>214</sup>. La liberación de IL-1 $\beta$  implica la activación del inflamasoma (caspasa-1), siendo insuficiente la presencia de LPS para inducirla. Su secreción se estimuló, por tanto, con un tratamiento combinado de LPS y MDP, o con un estímulo único en forma de PMA. Asimismo, se añadió citoquina IL-10 (humana o murina, en función de la procedencia de cada línea celular), al objeto de evaluar la ratio de inhibición inflamatoria en las estirpes comparadas. En cualquier caso, la estimulación se mantuvo durante 24 horas, con la finalidad de generar concentraciones detectables de ambas citoquinas en el sobrenadante.

Los sobrenadantes se testaron para inducción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  utilizando kits comerciales (Thermo Fisher Scientific) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El anticuerpo específico afín a cada una de las citoquinas se inmovilizó en los pocillos e interaccionó con éstas al adicionar la muestra (sobrenadantes del cultivo celular). En este caso, la incubación con los sobrenadantes se realizó durante toda la noche, a 4°C y agitación constante. La adición del anticuerpo de detección permitió la formación del denominado “*sándwich*”, que interaccionó con la solución de avidina-HRP incorporada posteriormente.

La detección se efectuó vía quimioluminiscencia, por reacción de la peroxidasa HRP conjugada a avidina con el sustrato cromogénico TMB, en un equipo Ultra Evolution (Tecan) ligado al software *XFluor*. La lectura se realizó a 450 nm, sustrayendo los valores medidos a 570 nm al objeto de obtener datos de absorbancia absolutos para cada punto. Las concentraciones particulares se extrapolaron a partir de la recta patrón generada mediante diluciones seriadas del estándar proporcionado por el propio kit. La intensidad de cada señal fue directamente proporcional a la concentración de citoquina presente en

## MATERIALES Y MÉTODOS

la muestra. El tratamiento estadístico de los datos se efectuó según lo descrito en el apartado 15. *Tratamiento estadístico de datos en Materiales y Métodos.*

### 13. MEDICIÓN DE LUCIFERASA

La medición de actividad luciferasa se realizó en células que expresaban establemente un plásmido reportero de luciferasa (véase apartado 4.8.6. *Sistema de expresión retroviral SB0001.4.* en *Materiales y Métodos*). Las células se sembraron en placas de 24 pocillos y, 4 horas antes de ser tratadas con el estímulo de interés, se incubaron en medio DMEM con baja proporción de suero (0.5 a 1%). Esta incubación tenía como finalidad reducir la señal inespecífica que podría originarse fruto de posibles estímulos presentes en el suero.

Transcurrido el tiempo de incubación con el estímulo, se lavaron las células con PBS1x Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup> atemperado y se lisaron en placa, añadiendo 100 µl de Luciferase Cell Culture Lysis 1x Reagent (Promega). La placa se sometió a agitación vigorosa (250-300 rpms) durante 20 minutos. Finalmente, se mezclaron 5 µl de lisado total con 25 µl de Luciferase Reagent (Promega). La señal se leyó en un luminómetro Lumat LB 9507 (Berthold Technologies), que proporcionó el número de cuentas luminiscentes emitidas por cada reacción.

La ratio de inducción (FI) se expresó como un cociente entre el número de cuentas para una condición en particular bajo un estímulo determinado, respecto al número de cuentas basal. El tratamiento estadístico de los datos se efectuó según lo descrito en el apartado 15. *Tratamiento estadístico de datos en Materiales y Métodos.*

### 14. ENSAYOS DE TRATAMIENTO CONTINUO Y DE “PULSO Y CAZA”

La estimulación de los cultivos celulares (destinados a evaluación mediante Western blot) por medio de IL-10, se efectuó siguiendo dos esquemas de tratamiento alternativos. El tratamiento continuo implicó el mantenimiento del estímulo en el tiempo, hasta el momento de la lisis celular. La modalidad “pulso y caza” supuso una incubación de 30 minutos en presencia de la citoquina, a temperatura de 4°C. A continuación, los cultivos se lavaron dos veces con medio DMEM atemperado y se incubaron a 37°C durante los

## MATERIALES Y MÉTODOS

intervalos de tratamiento previstos (en ausencia de estimulación). La presencia puntual del estímulo permitió examinar un proceso celular que, como en el caso de las cascadas de señalización descritas, ocurre a través del tiempo. Sin embargo, la estimulación continua presenta también un valioso carácter acumulativo en determinados contextos.

### **15. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS**

El análisis estadístico de los datos experimentales obtenidos se efectuó mediante el programa de análisis Microsoft Excel versión 1902 y el software GraphPad Prism versión 7.04 para Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA) (ambos disponibles en línea y de distribución limitada).

Los gráficos de columnas y de dispersión representan la media y la desviación estándar asociada a cada grupo experimental. En algunos casos se ha optado por representar los puntos individuales que conforman cada condición experimental, con el objetivo de evidenciar la dispersión asociada a cada condición.

En las representaciones en forma de box-plot, la línea central señala la mediana. La caja se extiende desde el percentil 25 al 75. Los bigotes señalan los valores extremos, desde el mínimo hasta el máximo.

El contraste de hipótesis entre dos grupos experimentales se efectuó mediante la prueba t de Student de dos colas (se analizaron las desviaciones en las dos direcciones). Esta prueba, aplicada a muestras independientes, asume una distribución normal de los datos y establece diferencias entre las medias de ambos grupos. El nivel de significación se fijó en el 5% ( $p=0.05$ ).



# RESULTADOS





---

## CAPÍTULO 1

La interacción entre A20 y el dominio WDD de ATG16L1  
participa en el control de la homeostasis intestinal

### **1. A20 Y ATG16L1 INTERACCIONAN A TRAVÉS DE SUS DOMINIOS OTU Y WDD, RESPECTIVAMENTE**

#### **1.1. LOS ENSAYOS DE PROTEÓMICA IDENTIFICAN A20 COMO CANDIDATO POTENCIAL DE UNIÓN AL DOMINIO WDD**

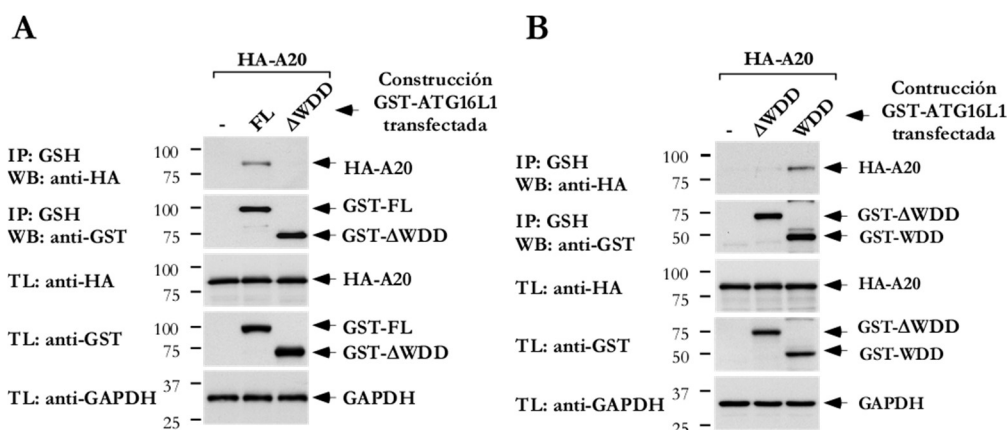
La caracterización de proteínas con capacidad de interacción con el dominio WDD de ATG16L1 se había realizado previamente en el laboratorio, mediante técnicas de proteómica (ensayos efectuados por el Dr. Emilio Boada Romero). Para ello, el dominio WDD fusionado con GST se expresó en células JAR (coriocarcinoma humano) y THP1 (monocíticas humanas). Adicionalmente, éstas últimas fueron tratadas con la combinación PMA/LPS, al objeto de favorecer la estimulación de mediadores inflamatorios, potenciales moléculas de unión al dominio WDD.

El dominio WDD anotado en las bases de datos abarca la región comprendida entre las posiciones 320-607. Sin embargo, la quimera GST-WDD (320-607) presentó una limitada expresión en los ensayos preliminares. Se postuló que la reducida expresión de esta quimera se originaba como consecuencia de la interrupción de una hélice  $\beta$  que posiblemente forme parte del dominio WDD y aporte estabilidad al mismo<sup>215</sup>. La presencia de la posición 320 interrumpiría dicha hélice. Considerando esta apreciación, se recurrió a la quimera GST-WDD (231-607), la cual mostró adecuados niveles de expresión y resultó apropiada para la realización de ensayos de proteómica.

Las proteínas que co-precipitaron con la quimera GST-WDD se identificaron mediante espectrometría de masas. El escaso solapamiento entre las tres condiciones analizadas (JAR, THP1 y THP1 tratadas con PMA/LPS), reveló la existencia de un interactoma altamente dependiente del tipo celular y estadio del desarrollo, consecuente con la diversidad funcional atribuida al dominio WDD. De entre las 1044 proteínas identificadas, resultó de especial interés un subgrupo de moléculas implicadas en inmunidad innata y señalización inflamatoria. Destacan los receptores intracelulares NALP2 y NALP4 de la familia NLRP (mediadores de inmunidad innata), el sensor viral MDA5 y la proteína antiinflamatoria A20/TNFAIP3, objeto de estudio de este trabajo de tesis<sup>201</sup>.

## 1.2. A20 INTERACCIONA CON ATG16L1 A TRAVÉS DEL DOMINIO WDD

Puesto que los datos de proteómica apuntaban a la existencia de una interacción entre A20 y ATG16L1 mediada por el dominio WDD, se realizaron una serie de ensayos de co-inmunoprecipitación destinados a confirmar esta hipótesis. Las co-inmunoprecipitaciones se efectuaron en condiciones de sobreexpresión, en células HEK-293T, y permitieron corroborar, en primer lugar, la existencia de una unión específica entre A20 y la versión completa de ATG16L1 o FL (del inglés “*full length*”) (**Figura 7A**). Adicionalmente, proporcionaron una sólida evidencia de la capacidad de A20 para interactuar con el dominio WDD de ATG16L1, pero no con el dominio efector N-terminal o  $\Delta$ WDD (**Figura 7B**).



**Figura 7. A20 interactúa con ATG16L1 a través del dominio WDD. (A) A20 interactúa con la versión completa o FL de ATG16L1, pero no con el dominio N-terminal o  $\Delta$ WDD y (B) A20 interactúa con el dominio WDD, pero no con la región  $\Delta$ WDD.** Células HEK-293T se co-transfectaron con las quimeras GST indicadas (FL, versión completa de ATG16L1; WDD, residuos 320-607;  $\Delta$ WDD, residuos 1-319) o el control GST (-) y la versión completa de A20. Transcurridas 36 horas, se lisaron y se sometieron a co-inmunoprecipitación empleando bolas de agarosa fusionadas con GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Finalmente se procesaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados.

Atendiendo a estos datos, se hipotetizó que el dominio WDD podría participar en la regulación de la señalización inflamatoria, actuando como módulo de anclaje de moléculas que, como A20, se encuentran involucradas en este fenómeno.

## RESULTADOS. CAPÍTULO 1

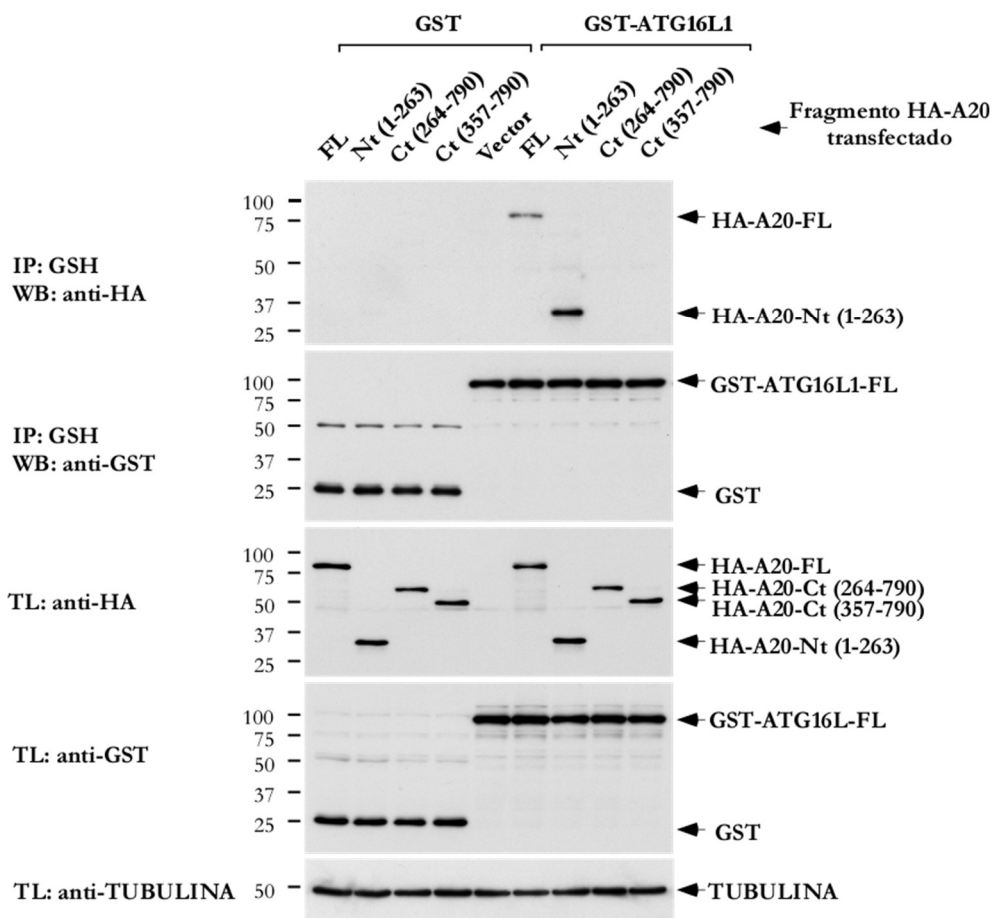
### 1.3. ATG16L1 INTERACCIONA CON A20 A TRAVÉS DE SU REGIÓN N-TERMINAL (Nt: 1-263)

Con el objetivo de identificar la región de A20 implicada en la unión a ATG16L1, se efectuaron una serie de deleciones en la molécula completa de A20: Nt (1-263), Ct (264-790) y Ct (357-790). Se generaron dos versiones Ct de la molécula puesto que, en la región comprendida entre los aminoácidos 264-357, existía un posible motivo de unión al dominio WDD<sup>102</sup>. Además, según la información cristalográfica disponible, la similitud no se limitaba a la secuencia aminoacídica, sino que también presentaba semejanzas estructurales con el motivo descrito previamente en nuestro laboratorio<sup>102</sup>. Sin embargo, los ensayos de co-inmunoprecipitación en células HEK-293T descartaron esta hipótesis y revelaron que la región Nt (1-263) de A20 es necesaria y suficiente para la interacción con ATG16L1 (**Figura 8**).

Adicionalmente, se sobreexpresó la región Nt (1-263) de A20 en células HEK-293T y HCT116. Ambas estirpes se co-transfectaron con el dominio WDD o la región Nt ( $\Delta$ WDD), sometiéndose posteriormente a co-inmunoprecipitación. Los datos de Western-blot revelaron que la región Nt (1-263) de A20 interacciona exclusivamente con ATG16L1 a través del dominio WDD, tanto en células HEK-293T como HCT116 (**Figuras 9A y 9B**, respectivamente).

### 1.4. A20 INTERACCIONA CON ATG16L1 A TRAVÉS DEL DOMINIO OTU LOCALIZADO EN LA REGIÓN N-TERMINAL (92-263)

A20 presenta un dominio OTU en su región N-terminal (véase apartado 7.1. *Estructura y función de A20 en Introducción*), que contiene el residuo catalítico de cisteína C103 responsable de la actividad deubiquitinasa. Puesto que ATG16L1 interacciona con A20 a través de su región N-terminal (1-263), se realizaron nuevamente una serie de deleciones en esta región, con el objetivo de confirmar o descartar la implicación del dominio OTU en la interacción con ATG16L1. De esta forma, se generaron dos versiones de la región N-terminal, abarcando los aminoácidos 1-91 y 92-263.



**Figura 8.** La región N-terminal (1-263) de A20 interacciona con ATG16L1. Células HEK-293T se co-transfectaron con A20 completo (FL) o sus tres versiones delecionadas (Nt (1-263), Ct (264-790) y Ct (357-790)) y la químera GST-ATG16L1 o GST control. Transcurridas 36 horas se lisaron y se sometieron a co-inmunoprecipitación empleando bolas de agarosa fusionadas con GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Finalmente se procesaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados.

A continuación, las versiones Nt 1-91 y 92-263 se sometieron, en paralelo con la versión Nt (1-263), a co-inmunoprecipitación frente a las quimeras GST-ATG16L1-WDD o GST control, en células HEK-293T. La químera Nt (92-263) presentó similar capacidad de unión al dominio WDD respecto a la versión larga Nt (1-263) (**Figura 10**). Estos datos permitieron corroborar que el dominio OTU, responsable de la actividad deubiquitinasa de A20, estaba implicado en la interacción con el dominio WDD de ATG16L1.

# RESULTADOS. CAPÍTULO 1

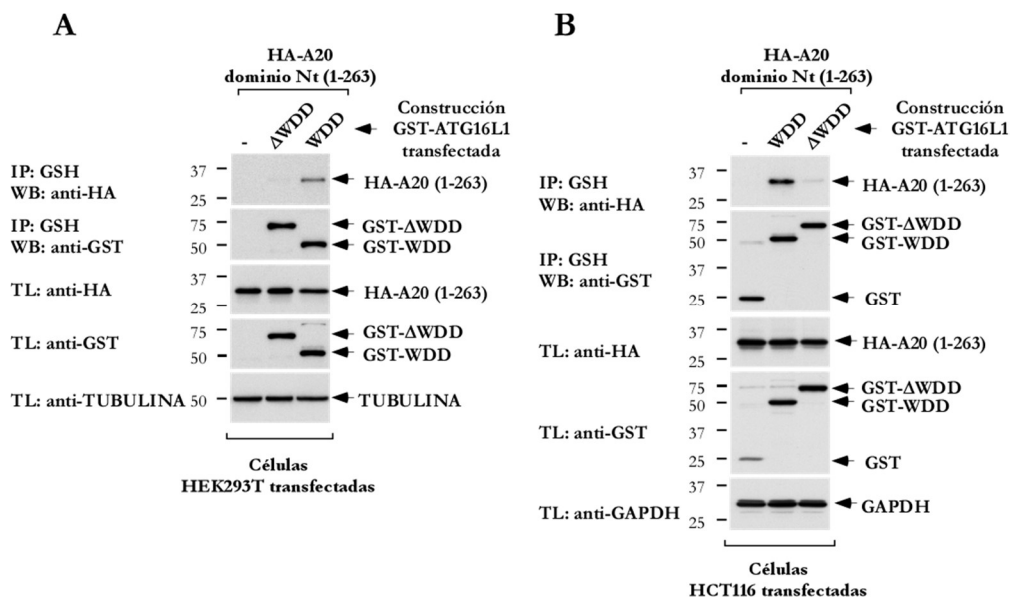


Figura 9. La región N-terminal (1-263) de A20 interacciona con ATG16L1 a través de su dominio WDD. La región N-terminal de A20 (1-263) interacciona con el dominio WDD de ATG16L1, pero no con la región N-terminal  $\Delta$ WDD, en células HEK-293T (A) y HCT116 (B). Células HEK-293T (A) o HCT116 (B) se co-transfectaron con la región N-terminal de A20 (1-263) y las quimeras GST-WDD, GST- $\Delta$ WDD o GST control. Transcurridas 36 horas se lisaron y se sometieron a co-inmunoprecipitación empleando bolas de agarosa fusionadas con GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Finalmente se procesaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados.

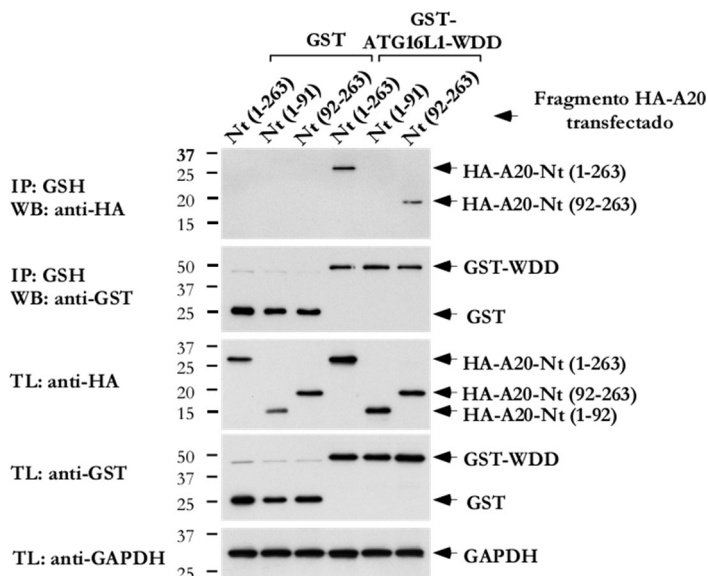


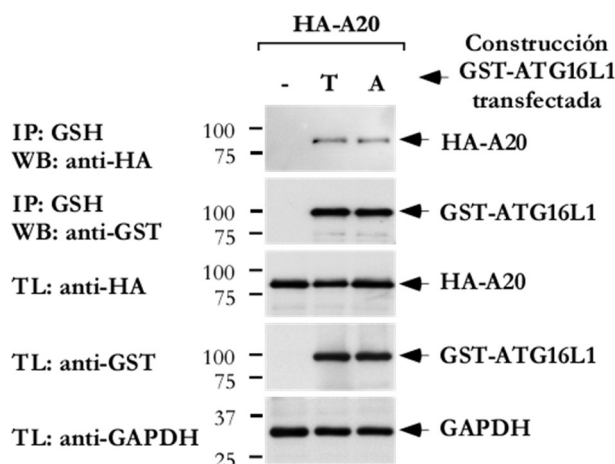
Figura 10. El dominio OTU (92-263) de A20 constituye la región de interacción con el dominio WDD de ATG16L1. Células HEK-293T se co-transfectaron con las quimeras Nt (1-263), Nt (1-91) o Nt

(92-263) de A20 y GST-ATG16L1-WDD o su control GST. Transcurridas 36 horas se lisaron y se sometieron a co-inmunoprecipitación empleando bolas de agarosa fusionadas con GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Finalmente, se procesaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados.

### **1.5. LA PRESENCIA DEL ALELO DE RIESGO A300 EN ATG16L1 NO ALTERA LA INTERACCIÓN CON A20**

Considerando que la presencia del alelo de riesgo para enfermedad de Crohn, ATG16L1-A300, influye en la capacidad de interacción de moléculas como TMEM59, T3JAM o DEDD2 con ATG16L1<sup>156</sup>, se efectuaron ensayos de co-inmunoprecipitación de A20 en presencia de las versiones T300 y A300 de ATG16L1. Estos ensayos estaban dirigidos a determinar si el alelo de riesgo alteraba la unión entre A20 y ATG16L1. Sin embargo, no se observaron efectos diferenciales en la interacción de A20 con cualquiera de las dos versiones de ATG16L1 (**Figura 11**).

Datos previamente publicados por nuestro laboratorio apuntaban a la existencia de diferentes sensibilidades a la presencia de la versión de riesgo A300, en moléculas que interaccionan con ATG16L1 a través del dominio WDD. Si bien T3JAM y DEDD2 son incapaces de unirse a la versión A300 de ATG16L1, otras moléculas como NOD2 o TLR2 interaccionan con igual o incluso mayor afinidad en presencia de la versión A300 de ATG16L1<sup>156</sup>. Dado que el motivo aminoacídico mediante el cual estas proteínas interaccionan con el dominio WDD de ATG16L1 es laxo y admite diversas configuraciones, la alteración introducida por la versión A300 de ATG16L1 afectaría exclusivamente a determinadas versiones del motivo de unión. En el caso particular de A20, su capacidad de interacción con ATG16L1 no se encontraría condicionada por la presencia del alelo de riesgo.



**Figura 11.** La presencia del alelo de riesgo A300 no altera la interacción de ATG16L1 con A20. Células HEK-293T se co-transfectaron con A20 y GST-ATG16L1-T300, GST-ATG16L1-A300 o el control GST. Transcurridas 36 horas se lisaron y se sometieron a co-inmunoprecipitación empleando bolas de agarosa fusionadas con GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Finalmente se procesaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados.

### 1.6. LOS DIFERENTES MOTIVOS PRESENTES EN LA REGIÓN N-TERMINAL DE A20 PARTICIPAN COOPERATIVAMENTE EN EL RECONOCIMIENTO DEL DOMINIO WDD DE ATG16L1

Como se ha mencionado anteriormente, resultados previos publicados por el laboratorio<sup>156</sup> mostraron que la capacidad de interacción del dominio WDD está determinada por el reconocimiento de un motivo aminoacídico [YFW]-X-X-[LVI], inicialmente descrito en la proteína transmembrana TMEM59, y posteriormente identificado en otras moléculas como NOD2, TLR2, DEDD2, T3JAM<sup>156</sup> o A20. El rastreo de la región comprendida entre los aminoácidos 92-263 de A20 proporcionó 7 posibles versiones de esta forma laxa del motivo. Sin embargo, la mutagénesis dirigida de los residuos críticos de cada una de estas 7 versiones a alanina, efectuada sobre la región Nt (1-263), no inhibió su capacidad de unión al dominio WDD de ATG16L1 (**Figura 12A**).



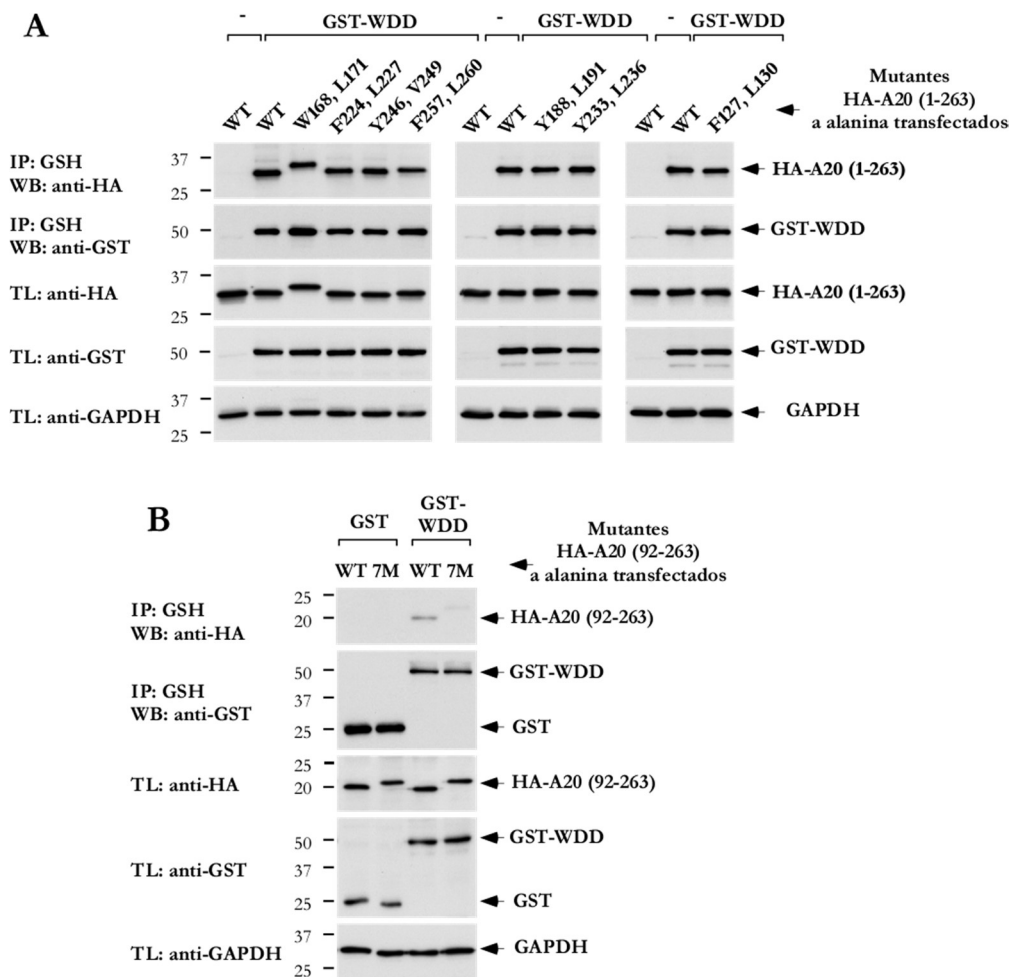
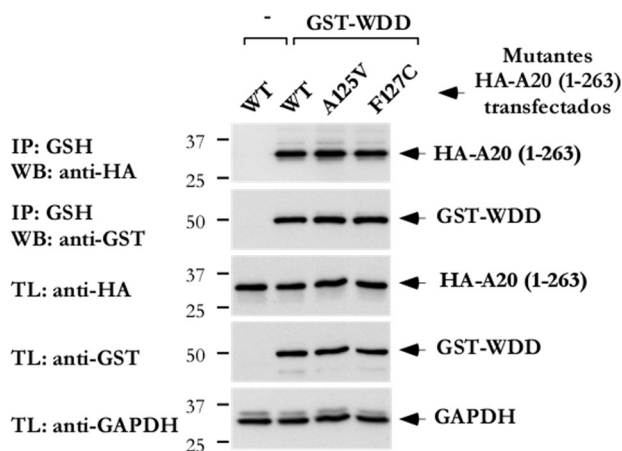


Figura 12. Los 7 motivos presentes en la región N-terminal de A20 participan cooperativamente en el reconocimiento del dominio WDD de ATG16L1. (A) La mutación de cada uno de los motivos identificados en la región N-terminal (1-263) de A20 no altera la capacidad de interacción con el dominio WDD de ATG16L1. Células HEK-293T se co-transfectaron con la región Nt (1-263) mutagenizada a alanina en los residuos críticos de cada uno de los 7 dominios de unión identificados (indicados en la figura), en paralelo con la versión WT, y la quimera GST-ATG16L1-WDD en todos los casos. (B) La mutación simultánea de los 7 motivos identificados en la región OTU de A20 inhibe la unión al dominio WDD de ATG16L1. Células HEK-293T se co-transfectaron con la versión Nt (92-263) mutagenizada simultáneamente en los 7 pares de residuos críticos de los diferentes motivos identificados, en paralelo con la versión WT y la quimera GST-ATG16L1-WDD o su control GST. En (A) y (B), 36 horas después de la transfección, las células se lisaron y los extractos proteicos se sometieron a co-inmunoprecipitación empleando bolas de agarosa fusionadas con GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Finalmente se procesaron mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican.

## RESULTADOS. CAPÍTULO 1

No obstante, la mutagénesis simultánea de las 7 versiones del motivo (versión 7M), realizada sobre la región Nt (92-263), inhibió la capacidad de interacción del dominio OTU con el dominio WDD de ATG16L1 (**Figura 12B**). La combinación de mutaciones de varios residuos críticos del motivo no inhibió (ni completa ni parcialmente) la interacción entre A20 y ATG16L1. Se postula, entonces, que el reconocimiento de la región WDD por el dominio OTU de A20 está mediado por la acción cooperativa de los 7 motivos de unión identificados.



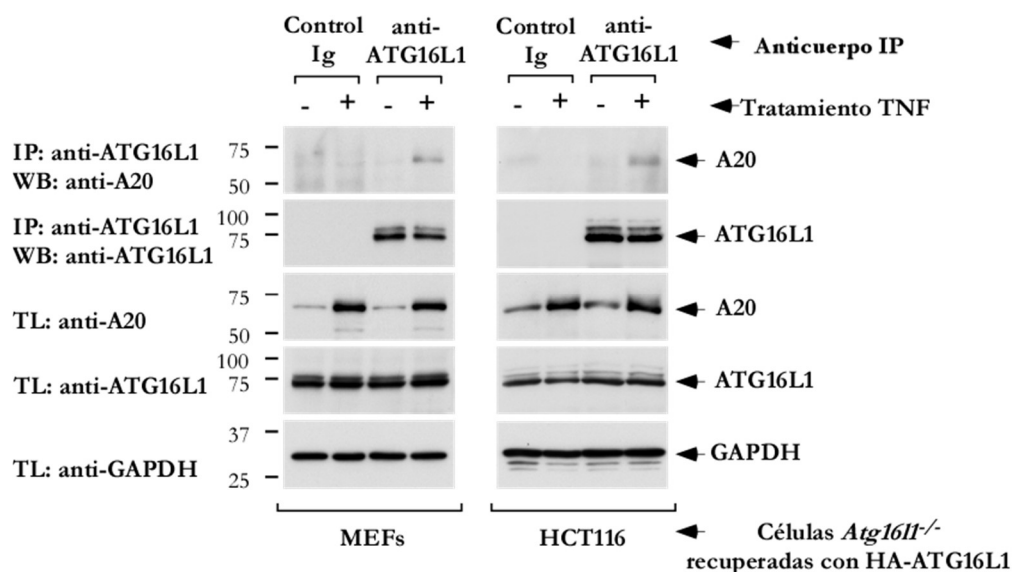
**Figura 13.** Los polimorfismos de riesgo para IBD A125 y F127C no alteran la interacción entre A20 y ATG16L1. Células HEK-293T se co-transfectaron con dos versiones de la región Nt (1-263) mutagenizadas a los SNPs A125V o F127C en paralelo con la versión WT, y la quimera GST-ATG16L1-WDD. Transcurridas 36 horas, se lisaron y se sometieron a co-inmunoprecipitación empleando bolas de agarosa fusionadas con GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Finalmente se procesaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados.

Además, la introducción de los SNPs A125V y F127C (véase apartado 7.2. *Implicaciones fisiopatológicas de A20 en Introducción*) en la región N-terminal de A20 (1-263) no causó, asimismo, alteraciones en la interacción con el dominio WDD de ATG16L1 (**Figura 13**). Ambos polimorfismos habían sido vinculados previamente a enfermedad inflamatoria intestinal y patologías autoinmunes<sup>193</sup>.

### 1.7. A20 Y ATG16L1 INTERACCIONAN EN RESPUESTA A ESTÍMULOS FISIOLÓGICOS

Una vez corroborada la existencia de una unión específica entre A20 y ATG16L1 en condiciones de sobreexpresión, se decidió evaluar si dicha interacción se producía

igualmente en circunstancias fisiológicas. Con esta finalidad, se emplearon modelos celulares de MEFs y HCT116 deficientes en *Atg16l1*. Ambas estirpes habían sido recuperadas con HA-ATG16L1 humano. Como estímulo fisiológico se adicionó TNF- $\alpha$ , que desencadenó la co-inmunoprecipitación entre A20 endógeno y HA-ATG16L1 (Figura 14).



**Figura 14. A20 endógeno co-inmunoprecipita con ATG16L1 en respuesta a TNF- $\alpha$ .** Células MEFs *Atg16l1*<sup>-/-</sup> y HCT116 *ATG16L1*<sup>-/-</sup> reconstituidas con HA-ATG16L1, fueron tratadas con 30 ng/ml de TNF- $\alpha$  durante 2 horas. A continuación, se sometieron a inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-ATG16L1 (de conejo) y se procesaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total).

Esta co-inmunoprecipitación reveló, por tanto, la existencia de una interacción específica entre ambas moléculas en respuesta a un estímulo fisiológico como TNF- $\alpha$  (Figura 14).

## 2. LA AUSENCIA DE A20 ALTERA EL FLUJO AUTOFÁGICO NORMAL

Estudios previos habían señalado que MEFs deficientes en *A20* mostraban una activación prolongada de la vía NF- $\kappa$ B. Por tanto, A20 resultaba una molécula esencial en el control de la inducción de esta ruta<sup>216</sup>.

## RESULTADOS. CAPÍTULO 1

Adicionalmente, los MEFs deficientes en *A20* mostraron un incremento en los niveles de lipidación de LC3 en comparación con sus homólogos WT<sup>201</sup> (ensayo efectuado en colaboración con el equipo del Dr. Van Loo, Ghent University, Ghent, Belgium). A pesar de que inicialmente la acumulación de LC3-II se interpretaba como un aumento del flujo autofágico, en la actualidad se conoce que los niveles de expresión de LC3-II pueden incrementarse en dos contextos celulares diametralmente opuestos: un incremento del flujo autofágico en sí o un bloqueo de la degradación lisosomal. Al objeto de distinguir estos dos fenómenos, se emplean inhibidores lisosomales, como bafilomicina A<sub>1</sub>, E64d o pepstatina A. Si en presencia del inhibidor, los niveles de LC3-II se equiparan entre las diferentes condiciones comparadas, el incremento en LC3-II se atribuye a un bloqueo de la ruta (pues todo el LC3-II presente en la célula se acumula al no existir una generación activa del mismo). Sin embargo, si la inducción del flujo autofágico es responsable del aumento de LC3-II, el inhibidor o inhibidores lisosomales no normalizarán los niveles de LC3-II entre las distintas condiciones, puesto que continuamente se genera nuevo LC3-II.

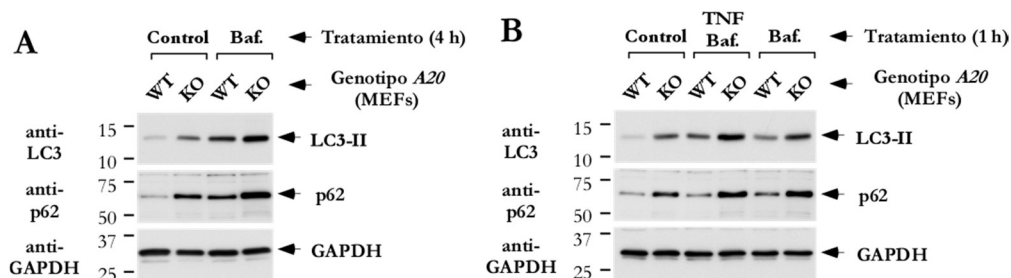
Alternativamente, para distinguir si la acumulación LC3-II se encuentra mediada por el incremento del flujo autofágico o por el bloqueo de éste, se puede recurrir al análisis de otras proteínas implicadas en la ruta autofágica, como p62 (véase apartado 4. *Selectividad del proceso de autofagia en Introducción*). p62 es un sustrato autofágico, de forma que su degradación refleja un flujo incrementado.

En el caso de los MEFs deficientes en *A20*, la acumulación de LC3-II persistía en condiciones de inhibición con bafilomicina A<sub>1</sub> (Baf.), apuntando a que, efectivamente, existía un flujo autofágico estimulado (**Figura 15A**). El incremento en la lipidación de LC3 se detectó tanto en un contexto basal o no estimulado, como en presencia de TNF- $\alpha$  (**Figuras 15A y 15B**, respectivamente). La bafilomicina A<sub>1</sub> es un inhibidor de la ATPasa-V vacuolar, con capacidad (entre otras actividades biológicas) de impedir la acidificación de orgánulos que contienen esta enzima, como lisosomas y endosomas. Actúa, como se ha descrito, bloqueando la degradación lisosomal.

No obstante, el aumento del flujo autofágico en MEFs deficientes en *A20*, manifestado en forma de acumulación de LC3-II que persistía tras el tratamiento con

bafilomicina A<sub>1</sub>, se contradecía con el incremento en los niveles de expresión de la proteína de sustrato p62. Este incremento se observaba tanto en condiciones basales como tras la estimulación con TNF- $\alpha$  (**Figuras 15A y 15B**, respectivamente). Sin embargo, cabría esperar que en células deficientes en *A20*, p62 se degradase más eficazmente, resultado de un flujo autofágico activado (según la acumulación de LC3-II observada), respecto a sus homólogos WT.

En línea con las observaciones efectuadas en la **Figura 15**, el equipo del Dr. Van Loo había descrito que la carencia de A20 en organoides intestinales causaba un fenotipo similar al observado en nuestro sistema de MEFs, con un incremento de ATG16L1, LC3-II y p62, especialmente en respuesta a TNF- $\alpha$ <sup>201</sup>. Por tanto, recapitulando toda la información disponible, la ausencia de A20 provocaba una acumulación de p62 y de LC3-II. Pero este LC3-II no podía proceder en su totalidad de la lipidación efectuada por la ruta autofágica convencional, puesto que el tratamiento con bafilomicina A<sub>1</sub> no normalizaba los niveles de LC3-II entre ambas estirpes. Esto es, el LC3-II generado mediante la ruta autofágica convencional que actúa degradando p62, coexistiría con un LC3-II producido de forma ectópica. Se hipotetizó, por tanto, que este LC3-II ectópico podría estar generándose mediante un mecanismo con características no convencionales que actuaba paralelamente a la autofagia convencional.



**Figura 15. A20 modula el flujo autofágico basal y en respuesta a TNF- $\alpha$ .** (A) LC3-II basal se acumula en células deficientes en *A20* (KO), sin degradación correlativa de p62, y no se normaliza tras el tratamiento con bafilomicina A<sub>1</sub> (Baf.). MEFs WT y deficientes en *A20* fueron tratados con 75 nM de Baf. durante 4 horas. A continuación, se lisaron y se procesaron mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican. (B) LC3-II basal e inducido por TNF- $\alpha$ /bafilomicina A<sub>1</sub> se acumula en células deficientes en *A20*, sin degradación correlativa de p62. Bafilomicina A<sub>1</sub> no normaliza los niveles de LC3-II entre las estirpes WT y KO. MEFs WT y deficientes en *A20* fueron tratados con con 75 nM de

## RESULTADOS. CAPÍTULO 1

Baf. y/o 30 ng/ml de TNF- $\alpha$  durante 1 hora. A continuación, se lisaron y se procesaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados.

Esta aparente contradicción se solventó introduciendo de forma ectópica el dominio WDD (en dos versiones diferentes, 300-607 y 320-607) en MEFs deficientes en *A20*. La presencia de cualquiera de las versiones del dominio WDD inhibía la acumulación de LC3-II inducida por TNF- $\alpha$ , actuando como dominante negativo (**Figura 16**). Dicho efecto sugería que la respuesta autofágica en células deficientes en *A20* mostraba características no convencionales mediadas por el dominio WDD.

Considerando la contribución de la autofagia no convencional en MEFs deficientes en *A20*, la contradicción existente entre el comportamiento de LC3-II y p62 podría explicarse atendiendo a la presencia de efectos no mediados por la ruta canónica, que provocarían una lipιδación ectópica de LC3. Además, p62 es un gen de respuesta a NF- $\kappa$ B<sup>217</sup>, que podría ser fuertemente estimulado en ausencia de *A20*. Este fenómeno también contribuiría a su acumulación en células deficientes en *A20*.

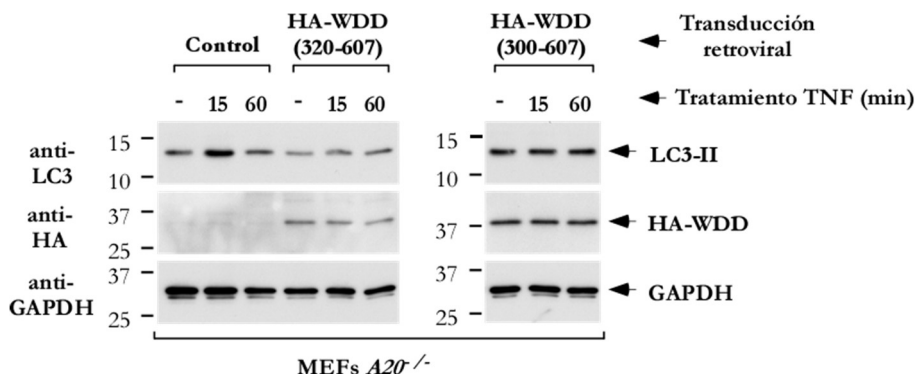


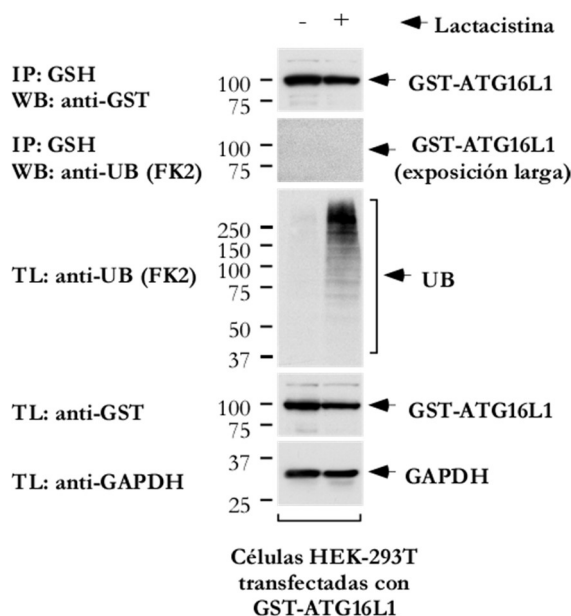
Figura 16. El dominio WDD expresado ectópicamente inhibe la acumulación de LC3-II inducida por TNF- $\alpha$  en MEFs deficientes en *A20*. MEFs deficientes en *A20* fueron transducidos retroviralmente con dos versiones del dominio WDD (320-607 y 300-607) y tratados con TNF- $\alpha$  (30 ng/ml) durante 15 y 60 minutos. Las células se lisaron y se procesaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados.

### 3. ATG16L1 REGULA LA EXPRESIÓN DE A20

#### 3.1. EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 REGULA LA EXPRESIÓN DE A20

El equipo del Dr. Van Loo había descrito que, en respuesta a TNF- $\alpha$ , ATG16L1 se inducía en organoides de intestino delgado procedentes de ratones deficientes en *A20*

<sup>201</sup>. Se hipotetizó, entonces, que podría existir un mecanismo de regulación que involucrase a ambas moléculas. Puesto que A20 puede regular la estabilidad de proteínas señalizadoras como RIPK1 (involucrada en la ruta NF- $\kappa$ B) vía ubiquitinación y degradación proteasomal (véase apartado 7.1. *Estructura y función de A20 en Introducción*), se especuló con que este mecanismo podría actuar, asimismo, en el control de la expresión de ATG16L1. Por este motivo, se efectuaron ensayos de inhibición del proteasoma, al objeto de determinar si, en este contexto, ATG16L1 se ubiquitinaba o estabilizaba. El bloqueo del proteasoma se efectuó mediante el empleo del compuesto orgánico lactacistina, que interacciona covalentemente con el residuo de treonina N-terminal en ciertas subunidades  $\beta$  catalíticas del proteasoma. No obstante, no se observó ningún efecto en los niveles de ubiquitinación o estabilización de ATG16L1 (**Figura 17**), descartándose este mecanismo de control.



**Figura 17. La inhibición del proteasoma vía lactacistina no ubiquitina ni estabiliza GST-ATG16L1.** Células HEK-293T fueron transfectadas con la quimera GST-ATG16L1 y tratadas con 10  $\mu$ M de lactacistina durante las últimas 12 horas de cultivo. A continuación, se lisaron y se inmunoprecipitó la quimera GST-ATG16L1 empleando bolas de agarosa fusionadas con GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Finalmente se procesaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados.

Una vez descartada la vía de ubiquitinación como mecanismo de control de A20 sobre ATG16L1 y dado el papel preponderante del dominio WDD como efector dominante

## RESULTADOS. CAPÍTULO 1

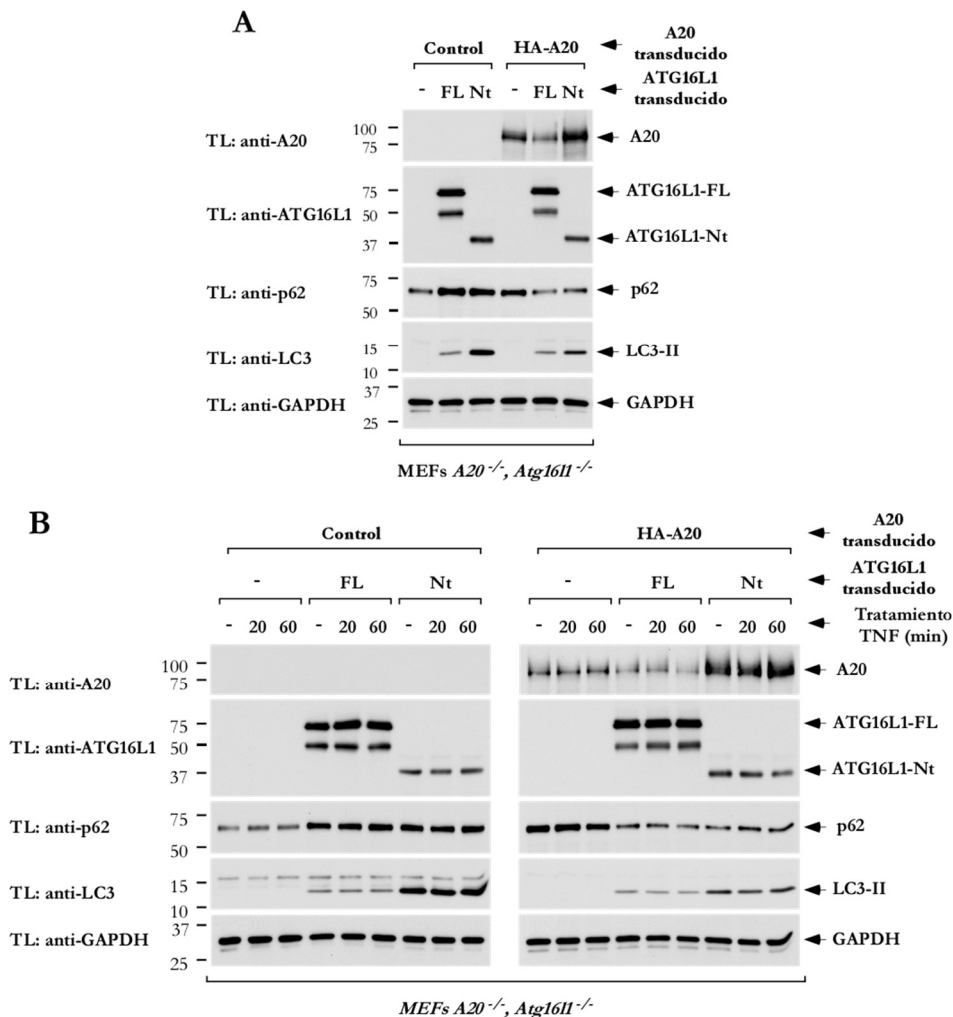
negativo, se efectuaron una serie de ensayos destinados a evaluar la contribución de este dominio al mecanismo de control que correlaciona ambas moléculas. Con esta finalidad, se reconstituyeron MEFs deficientes en *Atg16l1* y *A20* con HA-A20 y/o dos versiones de ATG16L1 (molécula completa o FL y residuos 1-299 o Nt) en paralelo con sus correspondientes controles negativos. Cabe mencionar que, en este caso, la deficiencia de *A20* no implicó un incremento de la expresión de ATG16L1 (**Figuras 18A y 18B**), esto es, no fue posible reproducir los datos obtenidos por el equipo del Dr. Van Loo en organoides. La principal hipótesis que explicaría la incapacidad para reproducir dicho efecto se sustentaría en el hecho de que nuestros ensayos fueron efectuados mediante transducción retroviral de las moléculas de interés, cuya tasa de expresión sería superior a la de las moléculas endógenas testadas en los ensayos de organoides. Esto eliminaría, probablemente, el efecto sutil observado por el equipo del Dr. Van Loo en condiciones fisiológicas.

Las células recuperadas con HA-A20 y ATG16L1-FL mostraron una reducción del nivel de expresión de HA-A20 respecto a sus homólogas reconstituidas con HA-A20 y un plásmido no codificante o control (**Figura 18A**). Este efecto se acentuó tras la estimulación con TNF- $\alpha$  (**Figura 18B**). De forma interesante, las células reconstituidas con HA-A20 y la región Nt de ATG16L1, suficiente para mantener la autofagia convencional, mostraron niveles incrementados de HA-A20, superiores incluso al control carente de ATG16L1 (**Figuras 18A y 18B**). Estos datos indicaban que la reducción en los niveles de A20 (o su desestabilización) mediada por ATG16L1, era dependiente del dominio WDD, pues no se producía en ausencia de éste.

Adicionalmente, el tratamiento con inhibidores lisosomales como bafilomicina A<sub>1</sub> o la combinación E64d y pepstatina A, normalizaba los niveles de expresión de A20 en células reconstituidas con cualquiera de las versiones de ATG16L1 (**Figura 19**). Es decir, el tratamiento con cualquiera de las dos combinaciones de inhibidores equiparó los niveles de expresión de A20 entre las estirpes reconstituidas con el plásmido no codificante, la versión completa (FL) de ATG16L1 y el dominio Nt. Este dato apuntaba, de nuevo, a la contribución de una ruta lisosomal (probablemente autofagia) al incremento de la degradación de A20 en presencia de la versión completa (FL) de

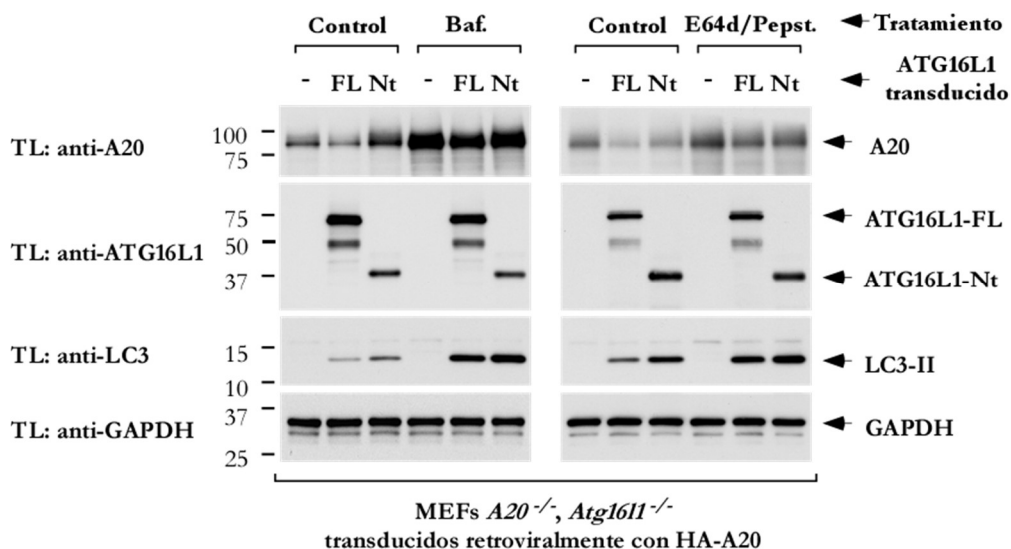


ATG16L1, E64d y pepstatina A son inhibidores de cisteín proteasas y aspartil peptidasas lisosomales, respectivamente. Actúan, por tanto, bloqueando la degradación lisosomal.



**Figura 18. ATG16L1 regula los niveles de A20 a través del dominio WDD. (A) El dominio WDD media la reducción de la expresión de A20 (o su desestabilización). El dominio Nt es suficiente para recuperar los niveles de lipidación de LC3, pero la degradación de p62 requiere el concurso adicional de A20. MEFs deficientes en *A20* y *Atg16l1* fueron transducidos retroviralmente con HA-A20 y dos versiones de ATG16L1 (molécula completa o FL y residuos 1-299 o Nt), en paralelo con sus respectivos controles negativos. Tras 5 días, se lisaron y se procesaron mediante Western-blot. (B) El efecto descrito en (A) se acentúa tras el tratamiento con TNF- $\alpha$ . MEFs deficientes en *A20* y *Atg16l1* fueron transducidos retroviralmente con HA-A20 y dos versiones de ATG16L1 (molécula completa o FL y residuos 1-299 o Nt), en paralelo con sus respectivos controles negativos. Tras 5 días, se trataron con 30 ng/ml de TNF- $\alpha$  durante los tiempos indicados en la figura. A continuación, se lisaron y se procesaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados.**

## RESULTADOS. CAPÍTULO 1

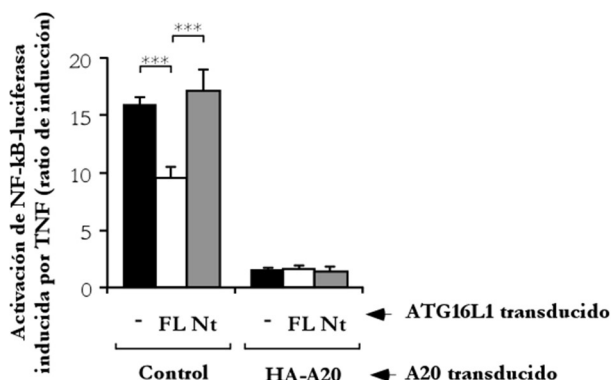


**Figura 19.** El tratamiento con inhibidores lisosomales normaliza los niveles de expresión de A20 en MEFs reconstituidos con HA-A20 y diferentes versiones de ATG16L1. Las líneas celulares indicadas fueron tratadas con bafilomicina A<sub>1</sub> (Baf.; 75 nM durante 8 horas) o E64d/pepstatina A (E64d/Pepst.; 10 µg/ml de cada compuesto durante 12 horas). A continuación, se lisaron y se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados.

### 3.2. EL DOMINIO WDD INHIBE LA ACTIVACIÓN DE LA RUTA NF- $\kappa$ B EN CÉLULAS DEFICIENTES EN A20

A continuación, se evaluó el potencial impacto que el fenómeno de degradación o desestabilización de A20 mediado por el dominio WDD podría ejercer sobre la activación de la ruta NF- $\kappa$ B. Dicha evaluación se efectuó mediante la medición de la actividad luciferasa dependiente de NF- $\kappa$ B en las estirpes celulares previamente descritas (**Figura 18 y 19**), transducidas con un plásmido retroviral que incorporaba el reportero NF- $\kappa$ B-luciferasa, susceptible de estimulación por TNF- $\alpha$ . Las estirpes recuperadas con A20 no pudieron ser evaluadas, puesto que la sobreexpresión de esta molécula bloqueaba completamente la ruta NF- $\kappa$ B (**Figura 20**). Este efecto resultaba coherente con ensayos previos, en los que se describía que A20 mediaba la inhibición de la ruta NF- $\kappa$ B<sup>193,196</sup>. No obstante, las estirpes carentes de A20 permitieron corroborar que el dominio WDD regulaba negativamente la activación de la ruta NF- $\kappa$ B, puesto que las células

reconstituidas con la versión completa (FL) de ATG16L1 presentaban una peor respuesta tras ser estimuladas con TNF- $\alpha$ , respecto a las recuperadas con la versión Nt de ATG16L1 (**Figura 20**).



**Figura 20.** El dominio WDD de ATG16L1 reprime la señalización por NF- $\kappa$ B en MEFs deficientes en A20. Las líneas celulares indicadas fueron transducidas con un plásmido retroviral que incluía un reportero NF- $\kappa$ B-luciferasa y posteriormente tratadas con 30 ng/ml de TNF- $\alpha$  durante 4 horas. A continuación, se lisaron y se evaluó la actividad luciferasa. Se muestran los valores medios de la ratio de inducción y las desviaciones estándar correspondientes a los triplicados efectuados (estadístico empleado: prueba t de Student; (\*\*\*) indica p-valor<0,001).

### 3.3. EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 MODULA LA EXPRESIÓN DE A20 ENDÓGENO

La totalidad de los ensayos encaminados a evaluar el mecanismo de regulación existente entre A20 y ATG16L1 se había efectuado en células transducidas retroviralmente con las moléculas de interés. No obstante, una serie de experimentos posteriores permitieron corroborar que la expresión de A20 endógeno se incrementaba, asimismo, en MEFs deficientes en *Atg16l1* estimulados con TNF- $\alpha$ , respecto a sus homólogos WT (**Figura 21A**). Cabe mencionar que el incremento en la expresión de A20 se acompañó de la aparición de bandas moleculares de elevado peso molecular que podrían corresponder a versiones modificadas de A20 (**Figura 21A**).

La transducción retroviral de MEFs deficientes en *Atg16l1* con HA-ATG16L1 recuperaba los niveles de expresión de A20 a ratios comparables a las de sus homólogas WT (**Figura 21A**). Sin embargo, este efecto no se reproducía tras la reconstitución de los MEFs deficientes en *Atg16l1* con el dominio N-terminal (Nt: 1-299) (**Figura 21A**). Dicha

## RESULTADOS. CAPÍTULO 1

observación contribuía a corroborar que el dominio WDD era el responsable del efecto inhibitorio que la expresión de la molécula completa de ATG16L1 ejercía sobre los niveles de A20 endógeno.

### 3.4. EL DOMINIO WDD REPRIME, DE FORMA A20-INDEPENDIENTE, LA INDUCCIÓN DE LA RUTA NF- $\kappa$ B EN RESPUESTA A TNF- $\alpha$

Adicionalmente, se efectuaron ensayos de luciferasa en las estirpes celulares anteriormente descritas (**Figura 21A**), transducidas con el plásmido reportero NF- $\kappa$ B-luciferasa (**Figura 21B**). La estirpe de MEFs deficientes en *Atg16l1* mostró la mejor respuesta al tratamiento con TNF- $\alpha$ , sugiriendo que esta molécula actuaría reprimiendo la señalización vía NF- $\kappa$ B (**Figura 21B**). En concordancia con lo anteriormente descrito, la reconstitución de las estirpes deficientes en *Atg16l1* con ATG16L1 completo (FL) o con el dominio N-terminal inhibía la señalización, si bien el efecto inhibitorio del dominio N-terminal no resultó tan potente como el de la versión completa de ATG16L1 (**Figura 21B**). Este dato apuntaba, de nuevo, al dominio WDD como responsable de la actividad inhibitoria de ATG16L1 sobre la vía NF- $\kappa$ B.

Los datos descritos sugerían la existencia de un fenómeno de regulación de la señalización de la vía NF- $\kappa$ B mediada, parcialmente, por el dominio WDD de ATG16L1. No obstante, la inhibición ejercida por ATG16L1 sobre la ruta NF- $\kappa$ B no parecía vinculada a la regulación efectuada sobre los niveles de expresión de A20. A20, considerado un inhibidor de la ruta NF- $\kappa$ B estimulada por TNF- $\alpha$ , se encontraba altamente expresado en células deficientes en *Atg16l1* (**Figura 21A**) que, paradójicamente, mostraban la mejor respuesta en los ensayos de medición de luciferasa (**Figura 21B**). De hecho, este efecto reproducía las observaciones realizadas en los ensayos de sobreexpresión, en los que las células MEFs control, deficientes en *Atg16l1* y *A20*, mostraban una elevada respuesta en ensayos de medición de luciferasa tras la estimulación con TNF- $\alpha$  (**Figura 20**).

Estos resultados apuntan a la existencia de un mecanismo de regulación post-transcripcional que involucra a ATG16L1 y A20. Ambas moléculas participarían,

recíprocamente, en el control de su propia estabilidad y, consecuentemente, regularían mutuamente su capacidad para inducir rutas como autofagia o NF- $\kappa$ B. Podría ocurrir, por ejemplo, que A20 reclutase ATG16L1 a través del dominio WDD. ATG16L1 modularía el tráfico intracelular de vesículas señalizadoras desde el complejo de señalización de TNF al que habría sido reclutado por A20, controlando así la señalización por TNF.

En conclusión, los resultados obtenidos enfatizan el amplio impacto fisiológico que la interacción A20-ATG16L1 ejerce sobre una gran variedad de rutas que regulan autofagia, inflamación y estabilidad proteica. Dicha interacción constituye un nodo de señalización que integra múltiples procesos fundamentales en el control de la homeostasis intestinal.

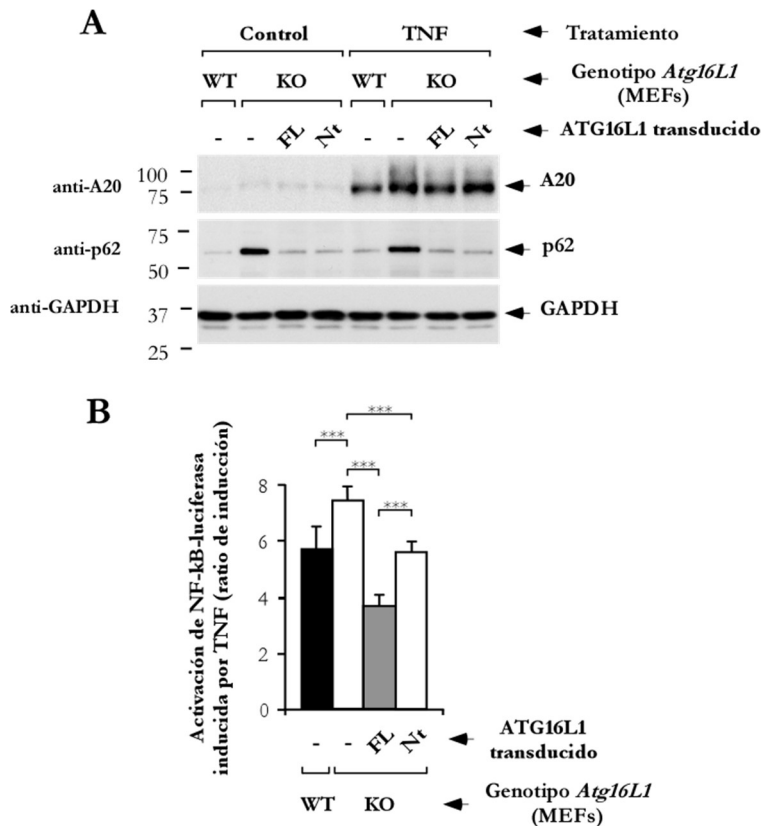


Figura 21. ATG16L1 regula la expresión de A20 endógeno a través del dominio WDD. A) La expresión de A20 endógeno se incrementa en MEFs deficientes en *Atg16l1* estimulados con TNF- $\alpha$ , respecto a sus homólogos WT, así como en las estirpes celulares recuperadas con el dominio Nt. Las líneas celulares indicadas (WT reconstituida con un plásmido no codificante (-) o deficientes en *Atg16l1*

## RESULTADOS. CAPÍTULO 1

reconstituidas con un plásmido no codificante (-), la versión completa (FL) o la región N-terminal 1-299 (Nt) de ATG16L1) fueron tratadas con 30 ng/ml de TNF- $\alpha$  durante 1 hora. A continuación, se lisaron y se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados. **B) El dominio WDD de ATG16L1 modula parcialmente la activación de NF- $\kappa$ B en respuesta a TNF- $\alpha$ .** Las líneas celulares de **A)** fueron transducidas con un plásmido retroviral que incluía un reportero NF- $\kappa$ B-luciferasa y tratadas con 30 ng/ml de TNF- $\alpha$  durante 4 horas. A continuación, se lisaron y se evaluó la actividad luciferasa. Se muestran los valores medios de la ratio de inducción y las desviaciones estándar correspondientes a los triplicados efectuados (estadístico empleado: prueba t de Student; (\*\*\*) indica p-valor<0,001).

---

## CAPÍTULO 2

Descripción y verificación del motivo proteico presente en  
moléculas que interaccionan con el dominio WDD de  
ATG16L1

# 1. LAS MOLÉCULAS CANDIDATAS A REGULACIÓN POR ATG16L1, IL-10RB E IL-31R, INTERACCIONAN *IN VITRO* CON EL DOMINIO WDD

## 1.1. LOS ENSAYOS DE MICROARRAYS PERMITEN REFINAR EL MOTIVO INICIAL DEGENERADO

En los ensayos de proteómica descritos en el apartado 1.1. *Los ensayos de proteómica identifican A20 como candidato potencial de unión al dominio WDD*, en el *Capítulo 1 de Resultados*, se describió que numerosas proteínas interactuaban, *in vitro*, con el dominio WDD de ATG16L1. Esto sugería que el motivo de unión al dominio WDD podría estar funcionalmente conservado en otras moléculas, que reclutarían ATG16L1 mediante un mecanismo similar al descrito. Identificar los miembros de esta familia resultaría de utilidad en la búsqueda de actividades no convencionales de ATG16L1 (mediadas por el dominio WDD) y, consecuentemente, en la caracterización de los procesos celulares que resultarían alterados en presencia de un dominio WDD no completamente funcional. Este podría ser el caso del alelo de riesgo A300. Su proximidad con el dominio WDD podría alterar la configuración de éste y, consecuentemente, su capacidad de interacción con moléculas funcionalmente diversas. Ello contribuiría a la alteración de la homeostasis celular.

Las versiones previas del motivo de interacción con ATG16L1 definidas en el laboratorio<sup>102,156</sup> resultaban demasiado degeneradas al objeto de establecer comparaciones, siendo prioritario refinar el mismo. El refinamiento del motivo se efectuó mediante ensayos de microarrays. El desarrollo de los ensayos de microarrays no se muestra: fue realizado por el Dr. Emilio Boada Romero. De forma general, se mutó cada posición del denominado péptido pro-autofágico (conjunto de aminoácidos de TMEM59 que interactúan con ATG16L1 y activan la ruta autofágica)<sup>102</sup>, descrito previamente en el laboratorio, a todos los posibles residuos aminoacídicos. Adicionalmente, se introdujo flexibilidad de distancias. Tras la evaluación de la capacidad de unión de las múltiples posibilidades generadas, se consensuó un motivo aminoacídico que definía qué



aminoácido era prohibitivo o permisivo en cada posición (**Figura 22A**). El motivo obtenido admitía una gran flexibilidad de distancias.

Una vez definido el motivo, se efectuó una búsqueda bioinformática mediante el algoritmo ScanProsite<sup>218</sup>, empleando su herramienta de escaneo de motivos en proteínas, con el objetivo de identificar moléculas que contuviesen el mismo. La búsqueda se realizó sobre un conjunto de secuencias importadas desde la base de datos de Prosite<sup>219</sup>, etiquetadas como “moléculas transmembrana de tipo I”. La selección se efectuó sobre la base de su similitud con TMEM59, proteína en la que se había identificado el motivo inicialmente. El elevado número de resultados generados en la búsqueda bioinformática se curó manualmente, eliminando aquellas moléculas que presentaban el motivo en regiones inaccesibles para ATG16L1, tales como centros activos de enzimas o regiones extracelulares. Esta aproximación permitió identificar, aproximadamente, 300 proteínas transmembrana de tipo I con diversas funciones biológicas. El elevado número de moléculas identificadas respondía a la gran flexibilidad de distancias que permitía acomodar el motivo descrito. No obstante, dado el proceso de refinamiento al que había sido sometido, se esperaba una mayor precisión en su capacidad predictiva, esto es, que la mayoría de las moléculas identificadas interaccionasen con el dominio WDD a través del motivo predicho.

Entre estas 300 moléculas se incluían, por ejemplo, proteínas de adhesión, moléculas de señalización o receptores virales. La gran variedad de entidades biológicas identificadas correlacionaba con la diversidad funcional que, predeciblemente, se atribuye al dominio WDD. Asimismo, confirmaría la hipótesis de que dicho dominio fue añadido a la molécula de ATG16L1 durante la evolución, al objeto de incrementar sus actividades biológicas en eucariotas superiores.

**A**

**Y**<sub>268</sub> - **V**<sub>269</sub> - **P**<sub>270</sub> - **S**<sub>271</sub> - **E**<sub>272</sub> - **K**<sub>273</sub> - **L**<sub>274</sub> - **S**<sub>275</sub> - **I**<sub>276</sub> - **Y**<sub>277</sub> - **G**<sub>278</sub> - **D**<sub>279</sub> - **L**<sub>280</sub>

[FGILWY] - [AFGHIKLPRSVWY] - X<sub>(0,4)</sub> - [AEGHIKLNQRSTVWY] - [DE] - [FIKLVWY] - [AFGHIKLMNRSTVWY] - X<sub>(0,4)</sub> - [AFGHIKLNQRSTVWY] - [AEFHILMNPQRSTVWY] - [FWY] - [DEFGHKNPRSTWY] - X - [AEFGHILPQRVWY]

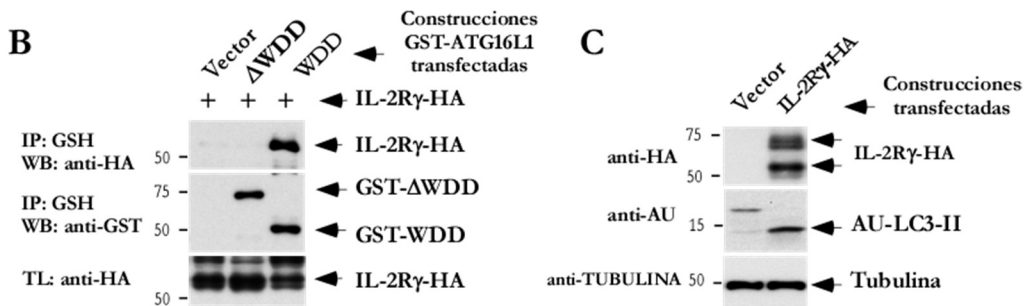


Figura 22. El motivo refinado descrito permite identificar proteínas que interaccionan con ATG16L1 a través del dominio WDD. (A) El motivo final deriva de datos de ensayos de microarrays, que permitieron efectuar variaciones en todos los residuos del péptido pro-autofágico identificado en TMEM59, y acomodar flexibilidad de distancias. En la parte superior, péptido pro-autofágico identificado en TMEM59. Se recuadran los aminoácidos funcionalmente relevantes. En la parte inferior, motivo refinado procedente de los ensayos de microarrays. (B) IL-2Rγ interacciona con el dominio WDD de ATG16L1, pero no con la región efectora N-terminal (ΔWDD). Células HEK-293T fueron co-transfectadas con el receptor IL-2Rγ-HA y la quimera GST-ATG16L1-WDD o GST-ATG16L1-ΔWDD. Transcurridas 36 horas, se lisaron y se sometieron a co-inmunoprecipitación empleando bolas de agarosa fusionadas con GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Finalmente, se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican. (C) La sobreexpresión de IL-2Rγ induce la lipidación de LC3. Células HEK-293T fueron co-transfectadas con AU-LC3 y un plásmido no codificante (vector) o el receptor IL-2Rγ. Tras 36 horas se lisaron y se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados.

## 1.2. LOS ENSAYOS DE CO-INMUNOPRECIPITACIÓN CONFIRMAN LA CAPACIDAD DE INTERACCIÓN DE DIVERSAS MOLÉCULAS CANDIDATAS CON EL DOMINIO WDD

Una vez identificado el conjunto de moléculas candidatas a interaccionar con ATG16L1, se obtuvieron los respectivos cDNAs y se realizaron ensayos de co-

inmunoprecipitación con la quimera GST-ATG16L1-WDD. En la **Figura 22B** se muestra el ejemplo del receptor IL-2R $\gamma$ . Esta modalidad de ensayos permitió corroborar que diversas moléculas candidatas interaccionaban con ATG16L1 a través del dominio WDD (GST-ATG16L1-WDD), y no a través de la región efectora N-terminal (GST-ATG16L1- $\Delta$ WDD).

Además, se efectuaron una serie adicional de ensayos de sobreexpresión, al objeto de determinar si los diferentes candidatos inducían lipidación de LC3. Diversas moléculas, como el receptor IL-2R $\gamma$  (**Figura 22C**), resultaron positivas para inducción de LC3. No obstante, la sobreexpresión de estas moléculas podría activar autofagia a través de rutas alternativas, y se requerirían ensayos de confirmación adicionales para validar que la lipidación de LC3 observada no se asocia a la inducción de la ruta autofágica convencional, sino que se trata de una activación local promovida por la interacción con ATG16L1.

Los ensayos preliminares mostraron, por tanto, que muchas de las moléculas candidatas se unían al dominio WDD e inducían lipidación de LC3 en ensayos de sobreexpresión. Entre el conjunto de moléculas identificadas, destacó una colección de receptores de citoquinas pro y antiinflamatorias. Se hipotetizó entonces, que la carencia de un dominio WDD funcional (o la presencia del polimorfismo de riesgo A300) podría provocar defectos en el tráfico intracelular y, como consecuencia, quizás también en las rutas de señalización mediadas por los receptores identificados, que controlan la respuesta inflamatoria. Ello podría contribuir, en parte, a la desregulación de la respuesta inflamatoria intestinal que caracteriza la enfermedad de Crohn.

### **1.3. EL DOMINIO WDD CO-COINMUNOPRECIPITA CON RECEPTORES PRO Y ANTIINFLAMATORIOS EN ENSAYOS DE SOBREENPRESIÓN**

Atendiendo a la argumentación realizada en el apartado 4.2. *Xenofagia* en *Introducción*, la proteína de unión a ATG16L1, TMEM59, desencadena, una vez activada, un mecanismo de autofagia no convencional en el que vesículas de membrana sencilla se marcan con LC3. El marcaje con LC3 promueve su fusión con el lisosoma. Prediciendo un comportamiento similar en el caso de los receptores identificados (que presentan una

## RESULTADOS. CAPÍTULO 2

versión del motivo similar a la contenida en TMEM59) se diseñó un amplio conjunto de experimentos dirigidos a testar la capacidad de estos receptores para interactuar con ATG16L1 a través del dominio WDD y, de esta forma, promover el marcaje con LC3-II de su propio endosoma señalizador. La finalidad última de estos ensayos era determinar si este mecanismo autofágico no convencional influenciaba el tráfico y, consecuentemente, la señalización mediada por los receptores tras la estimulación con su correspondiente ligando, así como evaluar si la ausencia de la región WDD o la presencia del alelo de riesgo A300 alteraba esta actividad.

Concretamente, de los 23 receptores de citoquinas identificados, se seleccionó un subgrupo sobre la base de su diversidad de actividades pro y antiinflamatorias y mecanismos señalizadores (**Tabla 1**). Del subconjunto de candidatos seleccionados, resultó especialmente interesante el receptor B de la citoquina antiinflamatoria IL-10, puesto que mutaciones en este receptor conducen a la aparición de una forma extremadamente grave y temprana de enfermedad de Crohn. Se ha descrito que, en un contexto inflamatorio, los pacientes con mutaciones en la ruta de señalización por IL-10 presentan un incremento de la secreción de TNF- $\alpha$  y otras citoquinas proinflamatorias, respecto a los pacientes control<sup>146</sup>.

Los ensayos iniciales realizados con el receptor IL-10RB (véase *apartado 1.3.1* y siguientes) se efectuaron, en paralelo, con el receptor IL-31R, que media la señalización por IL-31. Esta citoquina, al contrario que IL-10, participa en la respuesta proinflamatoria. IL-31 presenta cierto interés en enfermedad inflamatoria intestinal (véase *apartado 6.4. Interleucina 31 (IL-31)* en *Introducción*), si bien el tronco fundamental de este trabajo de tesis lo constituyen los ensayos relativos a la señalización mediada por IL-10, dado su relevancia en este tipo de patologías. Otros receptores preseleccionados inicialmente (**Tabla 1**) fueron sometidos a ensayos de co-inmunoprecipitación, sobreexpresión para evaluación de LC3 e incluso a test funcionales en el marco de proyectos adicionales actualmente desarrollados en el laboratorio.

MOLÉCULA (REFERENCIA UNIPROT)	MOTIVO	VÍA DE SEÑALIZACIÓN
Receptor AP de interleucina-1 (Q9NPH3)	524 IKWKGEKSKYPQG <sub>536</sub>	NF- $\kappa$ B
Receptor AP-like 1 de interleucina-1 (Q9NZN1)	573 LDVSEQGPFGEL <sub>584</sub>	NF- $\kappa$ B
Receptor $\gamma$ de interleucina-2 (P31785)	296 LEDLVTEYHGNFSAW <sub>310</sub>	STAT6
Receptor A de interleucina-4 (P24394)	780 LAPSGISEKSKSSSFHPA <sub>798</sub>	STAT6
Receptor B de interleucina-10 (Q08334)	280 FFSFPLSDENDVFDKL <sub>295</sub>	STAT3
Receptor 1 de interleucina-18 (Q13478)	350 YRVDLVLFYRHL <sub>362</sub>	NF- $\kappa$ B
Receptor AP de interleucina-18 (O95256)	382 YRHWIEIVLLYRTY <sub>395</sub>	NF- $\kappa$ B
Receptor A de interleucina-31 (Q8NI17)	603 LVIDKLVVNFGNVLQEIF <sub>620</sub> 644 FRPDCPLGKSFEEL <sub>657</sub>	STAT3

Tabla 1. Subgrupo de receptores de citoquinas seleccionados sobre la base de su diversidad de actividades pro y antiinflamatorias y mecanismos señalizadores. Se adjunta el nombre del receptor y su referencia en Uniprot, el motivo contenido en cada uno de ellos, y la vía de señalización en la que participan.

### 1.3.1. El receptor IL-10RB interacciona con ATG16L1 a través del dominio WDD

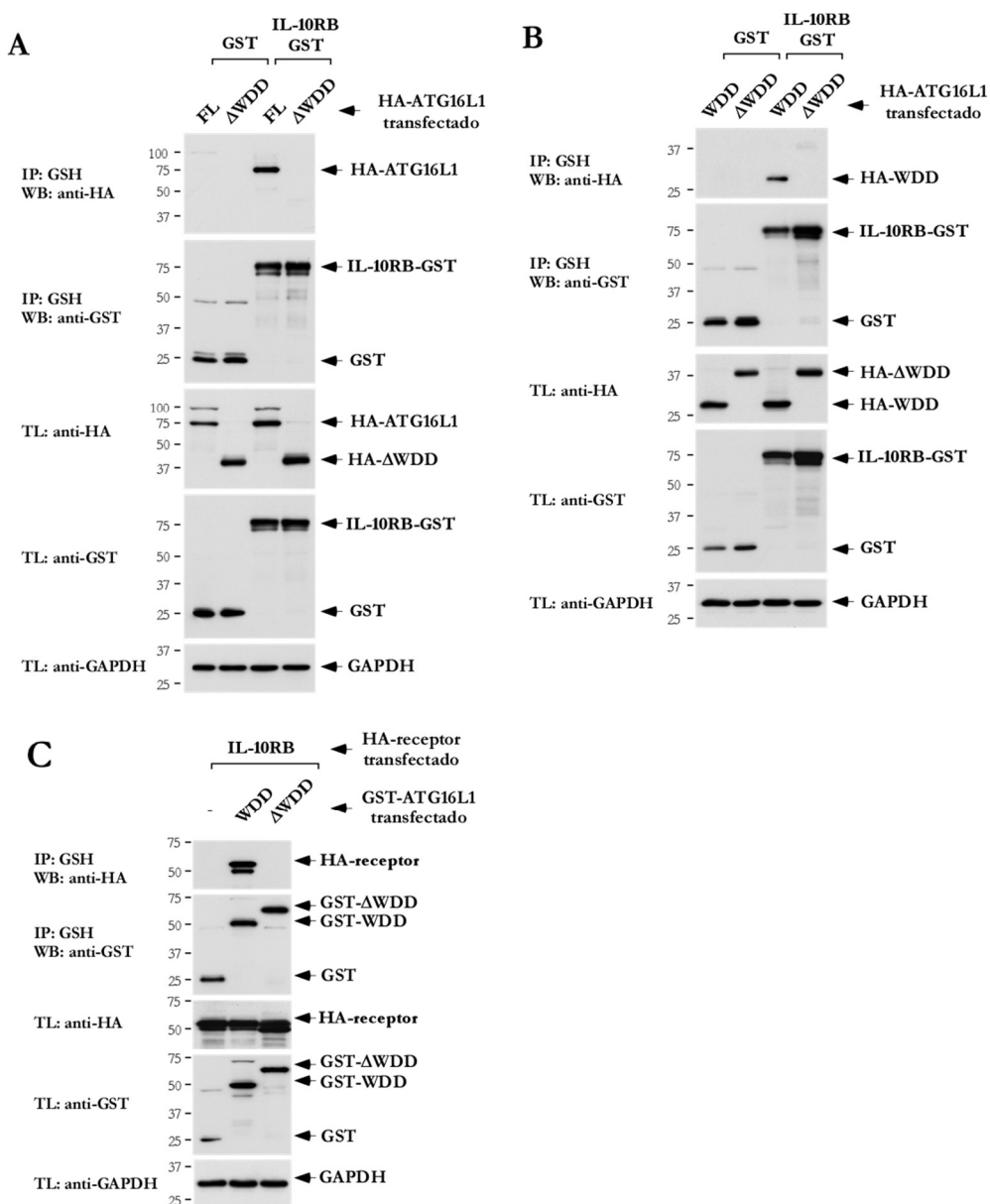
En primer lugar, se corroboró la capacidad del receptor IL-10RB para interactuar con la molécula completa de ATG16L1. En los ensayos de sobreexpresión, en los que se co-transfectó la quimera IL-10RB-GST o su control GST y ATG16L1 o el dominio  $\Delta$ WDD (región efectora N-terminal), se confirmó que el receptor interactuaba exclusivamente con la molécula completa de ATG16L1, y no con el dominio efector  $\Delta$ WDD (Figura 23A).

Asimismo, se evaluó la capacidad del receptor para interactuar con ATG16L1 a través del dominio WDD. Se co-transfectó nuevamente la quimera IL-10RB-GST o su control GST y la región WDD o  $\Delta$ WDD. Este ensayo confirmó que, efectivamente, la interacción ocurría a través del dominio WDD, sin implicación de la región efectora  $\Delta$ WDD (Figura 23B).

Dada la relevancia de los experimentos de iniciales de co-inmunoprecipitación, se optó por reproducir el dato que confirmaba la unión al dominio WDD en una nueva co-inmunoprecipitación, en esta ocasión efectuada en orientación opuesta. Esto es, se co-transfectaron el receptor IL-10RB y los dominios WDD o  $\Delta$ WDD acoplados a GST,

## RESULTADOS. CAPÍTULO 2

para ser evaluados mediante co-inmunoprecipitación. Nuevamente, el receptor IL-10RB mostró exclusiva capacidad de interacción con el dominio WDD (**Figura 23C**).



**Figura 23.** El receptor IL-10RB interacciona con ATG16L1 a través del dominio WDD. (A) IL-10RB interacciona con la molécula completa de ATG16L1, pero no con la región ΔWDD. Células HEK-293T se co-transfectaron con IL-10RB-GST o su control GST y ATG16L1 o ΔWDD. A continuación, se lisaron y sometieron a co-inmunoprecipitación. (B) IL-10RB interacciona con ATG16L1 a través del dominio WDD, sin involucración de la región ΔWDD. Células HEK-293T co-transfectadas con

IL10RB-GST o su control GST y WDD o  $\Delta$ WDD, se lisaron y se sometieron a co-inmunoprecipitación. **(C)** La co-inmunoprecipitación en orientación opuesta a **(B)** corrobora la unión de IL-10RB al dominio WDD. Células HEK-293T co-transfectadas con IL10RB y GST-WDD, GST- $\Delta$ WDD o el control GST, se lisaron y se sometieron a co-inmunoprecipitación. En **(A)**, **(B)** y **(C)**, la lisis se efectuó 36 horas tras la transfección y la co-inmunoprecipitación se realizó empleando bolas de agarosa fusionadas con GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Finalmente, se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican.

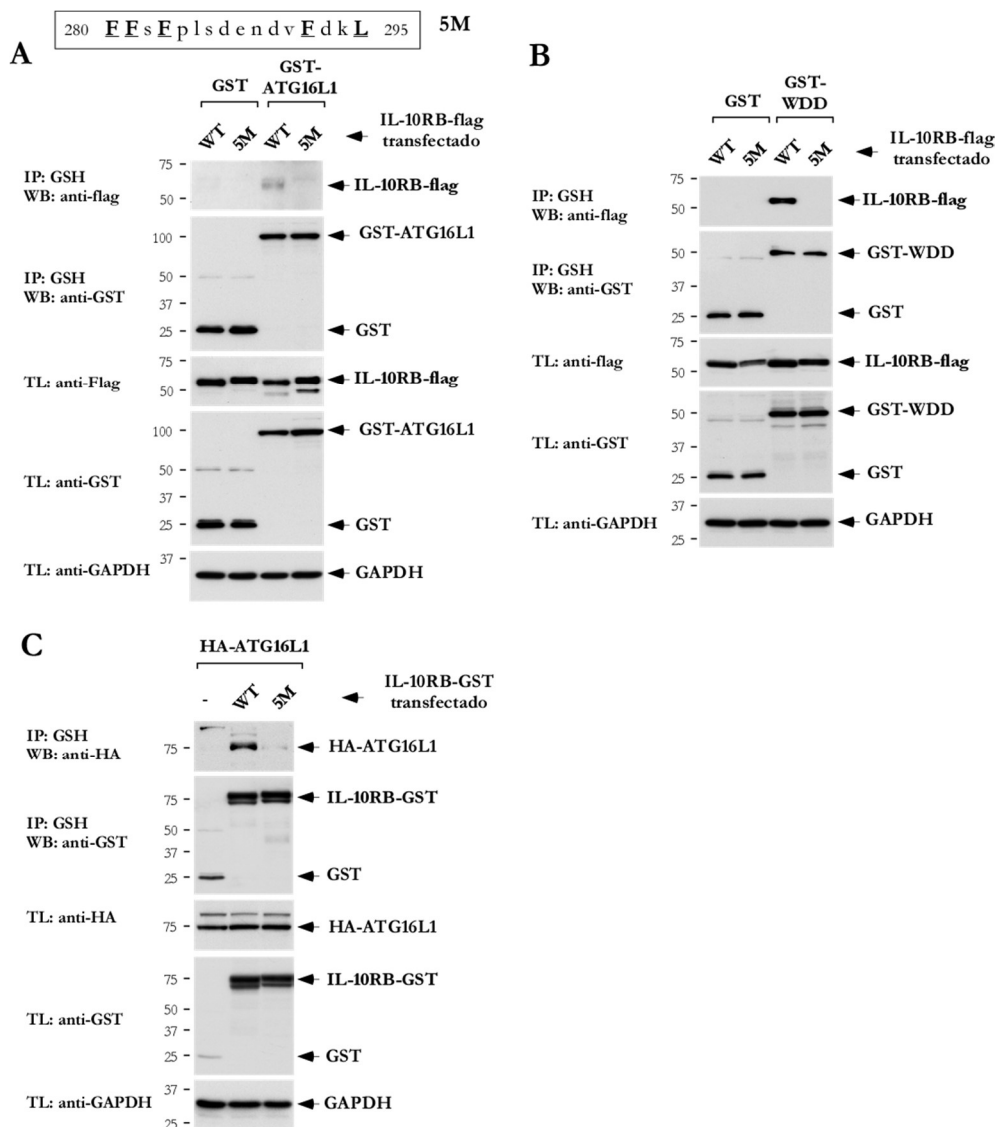


Figura 24. El receptor IL-10RB interacciona con el dominio WDD de ATG16L1 a través del motivo previamente identificado (Tabla 1). **(A)** Parte superior: motivo de unión identificado en IL-10RB. En la figura se subrayan los aminoácidos clave, mutados a alanina. **Parte inferior:** la mutación de los 5

## RESULTADOS. CAPÍTULO 2

**aminoácidos clave en el motivo de unión de IL-10RB elimina la interacción con ATG16L1.** Células HEK-293T se co-transfectaron con GST-ATG16L1 o su control GST e IL-10RB-WT o IL-10RB-5M, se lisaron y se sometieron a co-inmunoprecipitación. **(B) La mutación de los 5 aminoácidos clave en el motivo de unión de IL-10RB elimina la interacción con el dominio WDD.** Células HEK-293T se co-transfectaron con GST-WDD o su control GST e IL-10RB-WT o IL-10RB-5M, se lisaron y se sometieron a co-inmunoprecipitación. **(C) La mutación de los 5 aminoácidos clave en el motivo de unión de IL-10RB elimina la interacción con ATG16L1 en co-inmunoprecipitaciones en orientación opuesta a (A).** Células HEK-293T se co-transfectaron con ATG16L1 y GST-IL-10RB-WT, GST-IL-10RB-5M o su control GST, se lisaron y se sometieron a co-inmunoprecipitación. En **(A)**, **(B)** y **(C)**, la lisis se efectuó 36 horas tras la transfección y la co-inmunoprecipitación se realizó empleando bolas de agarosa fusionadas con GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Finalmente, se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican.

### 1.3.2. El receptor IL-10RB interacciona con el dominio WDD a través del motivo previamente descrito

Adicionalmente, se corroboró que la interacción IL-10RB-ATG16L1 estaba mediada por el motivo de unión identificado en IL-10RB (**Tabla 1**). La mutación de los 5 aminoácidos esenciales en el mismo (<sub>280</sub>**FFSFPLSDENDVFDK**<sub>295</sub> a <sub>280</sub>**AASAPLSDENDVADKA**<sub>295</sub>), denominada versión 5M, eliminaba la unión, tanto a GST-ATG16L1 como a GST-WDD, en ensayos de co-inmunoprecipitación (**Figuras 24A** y **B**, respectivamente). Dado que la co-inmunoprecipitación entre GST-ATG16L1 e IL-10RB no generaba una banda suficientemente sólida (**Figura 24A**), se efectuó nuevamente este ensayo en orientación inversa. Tras la co-transfección de ATG16L1 y GST-IL-10RB en su versión WT y 5M, se obtuvo una banda perfectamente definida, correspondiente a la interacción con la versión WT (**Figura 24C**). Así, la ausencia de señal en el carril correspondiente a la versión 5M se atribuyó a la alteración en el motivo de unión, incapaz de reconocer ATG16L1.

Se pudo concluir, entonces, que IL-10RB se une al dominio WDD de ATG16L1 a través del motivo aminoacídico previamente identificado (**Tabla 1**), pues la mutación de los aminoácidos clave presentes en este motivo imposibilita la interacción entre ambas moléculas.



#### 1.4. EL RECEPTOR IL-31R GLICOSILADO INTERACCIONA CON EL DOMINIO WDD

En paralelo a los ensayos de co-inmunoprecipitación realizados con la molécula IL-10RB, se testó la capacidad del receptor IL-31R para interactuar con el dominio WDD de ATG16L1. En presencia del dominio WDD, el receptor co-inmunoprecipitó en forma de dos bandas: una difusa y, probablemente, ampliamente glicosilada y otra banda definida (**Figura 25A**). Dado que la activación del receptor IL-31R requiere un elevado nivel de glicosilación<sup>190</sup>, se postuló que la forma difusa podría ser la versión funcionalmente relevante. Mientras que el dominio WDD presentaba capacidad de interacción con ambas versiones del receptor, en presencia de la región efectora N-terminal (o  $\Delta$ WDD), se observó exclusivamente inmunoprecipitación de la banda definida que, consideramos, corresponde a una forma no glicosilada (y probablemente inactiva) del receptor (**Figura 25A**).

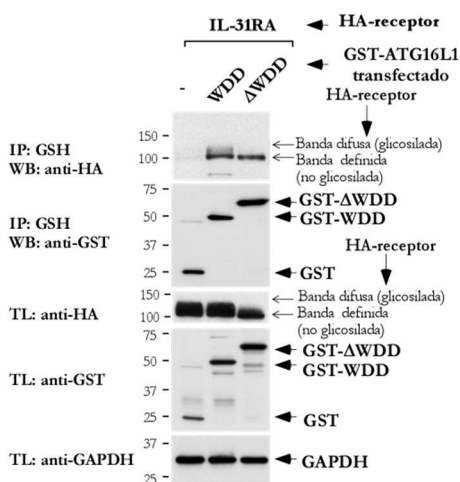
Adicionalmente, se testó si la mutación de los aminoácidos clave en alguno de los dos motivos de unión al dominio WDD identificados en el receptor IL-31R (**Tabla 1**) inhibía la interacción. Ambos se sometieron a mutagénesis dirigida, generándose las versiones 3M (FFL-644-654-657-AAA) y 4M (LFVF-603-612-615-620-AAAA). La versión 4M favorecía la co-inmunoprecipitación del dominio WDD con la banda definida, esto es, eliminaba la interacción con el receptor glicosilado (**Figura 25B**). Sin embargo, en presencia de la versión 3M, la unión se producía análogamente a la versión WT del receptor (**Figura 25B**). Estos datos sugerían que el motivo de unión relevante estaría conformado por los aminoácidos LFVF-603-612-615-620, pues su mutagénesis prevenía la interacción entre el dominio WDD y la molécula glicosilada de receptor.

Sin embargo, en la evaluación de los lisados totales, se observó también (aunque de forma menos prominente) el fenómeno de disociación de bandas del receptor, entre los puntos transfectados con el dominio WDD (banda definida y bandas difusas) y aquellos transfectados con la región  $\Delta$ WDD (banda definida) (**Figura 25A, TL: anti-HA**). Se hipotetizó, entonces, que el dominio WDD podría participar en el procesamiento y maduración del receptor IL-31R, hecho que explicaría la ausencia de co-inmunoprecipitación con la versión glicosilada en presencia de la región  $\Delta$ WDD. No

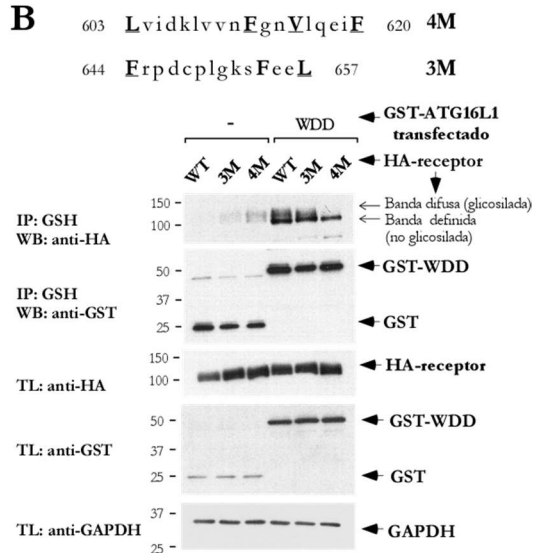
## RESULTADOS. CAPÍTULO 2

obstante, dado que el estudio de este efecto excede los objetivos de este trabajo de tesis y considerando la escasa relevancia de este receptor en enfermedad inflamatoria intestinal (en contraposición al receptor IL-10RB), el trabajo posterior se centró en el estudio del receptor IL-10RB.

**A**



**B**

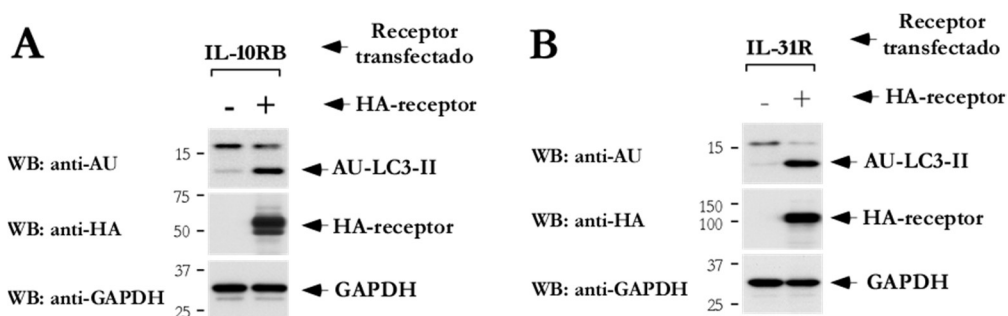


**Figura 25.** La forma glicosilada del receptor IL-31R interacciona con el dominio WDD de ATG16L1 a través de uno de los motivos previamente identificados (Tabla 1). **A)** El dominio WDD de ATG16L1 co-inmunoprecipita con las formas glicosilada y no glicosilada del receptor, mientras que la región  $\Delta$ WDD interacciona exclusivamente con la forma no glicosilada. Células HEK-293T se co-transfectaron con GST-WDD, GST- $\Delta$ WDD o su control GST e IL-31R. Tras 36 horas se lisaron y se sometieron a co-inmunoprecipitación empleando bolas de agarosa fusionadas con GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Finalmente, se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican. **(B) Parte superior:** motivos de unión al dominio WDD identificados en IL-31R. En la figura se destacan los aminoácidos clave en cada uno de ellos, mutados a alanina. **Parte inferior:** la mutación de 4 aminoácidos claves en el motivo de unión de IL-31R elimina la co-inmunoprecipitación de la forma glicosilada con el dominio WDD. Células HEK-293T se co-transfectaron con IL-31RA WT, 3M o 4M y GST-WDD o su control GST. A continuación, se lisaron y sometieron a co-inmunoprecipitación y Western-blot según lo descrito en **(A)**.

## 2. IL-10RB E IL-31R INDUCEN LC3-II EN ENSAYOS DE SOBREEXPRESIÓN

### 2.1. LA SOBREEXPRESIÓN DE IL-10RB E IL-31R EN CÉLULAS HeLa ESTIMULA LA LIPIDACIÓN DE LC3

Adicionalmente, se efectuaron una serie de ensayos preliminares con el objetivo de evaluar la capacidad para inducir lipidación de LC3 de los receptores de interés. Ambos receptores mostraron capacidad para acumular LC3-II en ensayos de sobreexpresión realizados en células HeLa (**Figura 26A y B**).



**Figura 26.** IL-10RB e IL-31R inducen lipidación de LC3 en ensayos de sobreexpresión. Células HeLa fueron co-transfectadas con los receptores IL-10RB (**A**) o IL-31R (**B**) y AU-LC3. 36 horas después se lisaron y se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados.

### 2.2. LA VERSIÓN 5M DE IL-10RB ALTERA LA INDUCCIÓN DE LC3-II MEDIADA POR EL RECEPTOR

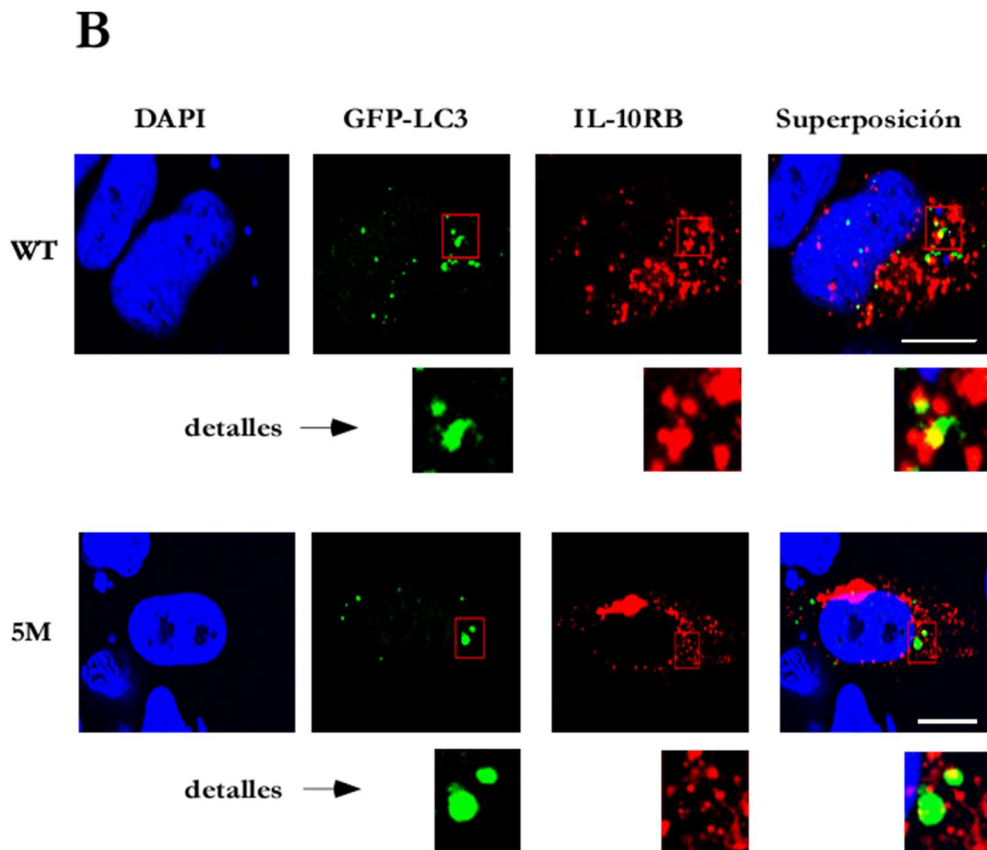
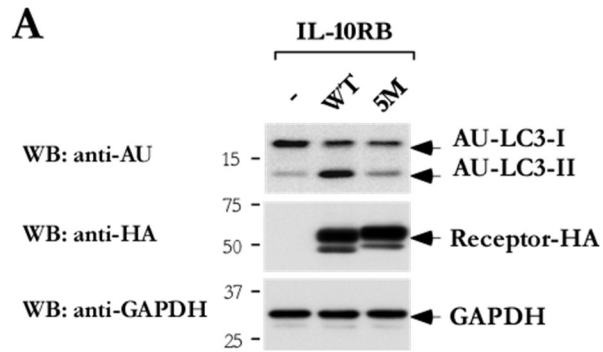
Puesto que la mutagénesis dirigida de los 5 aminoácidos de IL-10RB (versión 5M) que resultan fundamentales en la interacción con el dominio WDD de ATG16L1 interrumpe dicha unión, se hipotetizó que podría alterar, asimismo, la inducción de LC3-II mediada por IL-10RB en condiciones de sobreexpresión. ATG16L1 es clave en el proceso de lipidación: se ha descrito que este efector define en qué regiones se insertarán las moléculas de LC3 lipidadas<sup>60</sup> y, además, interacciona con el complejo ATG5-12, que proporciona la actividad ligasa<sup>59</sup>.

## RESULTADOS. CAPÍTULO 2

Efectivamente, en presencia de la versión 5M de IL-10RB se inhibe la lipidación de LC3 inducida por el receptor (**Figura 27A**). Esto es, la interrupción de la interacción entre IL-10RB y ATG16L1 repercute en la inducción de LC3-II mediada por el receptor.

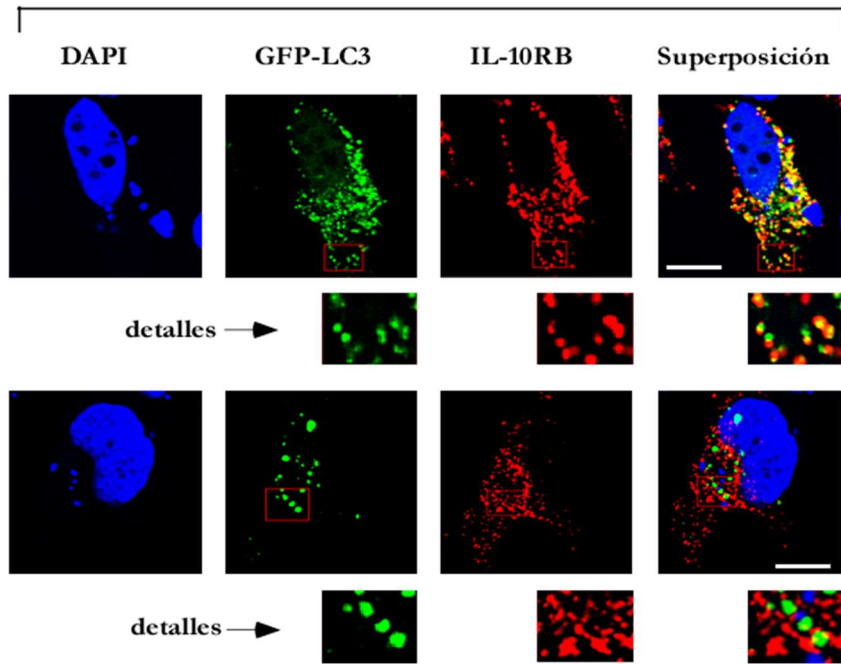
Adicionalmente, se efectuaron ensayos de inmunofluorescencia en células HeLa, con el objetivo de evaluar la existencia de colocalizaciones entre LC3-II e IL-10RB en ensayos de sobreexpresión. En presencia de la versión WT de IL-10RB se detectaron este tipo de fenómenos, que se reducían considerablemente en las células transfectadas con la versión 5M (**Figura 27B**). Sin embargo, incluso en presencia de la versión WT de IL-10RB, el número de fenómenos de colocalización detectados fue escaso. Esto se debe, probablemente, al dinamismo del proceso, que dificulta su visualización. Al objeto de facilitar su detección, se emplearon inhibidores de la función lisosomal, como bafilomicina A<sub>1</sub>/Baf. (**Figura 27C**) y E64d y pepstatina A/Pepst. (**Figura 27D**), con la finalidad de prevenir la degradación del receptor. De esta forma, se logró determinar que, efectivamente, IL-10RB colocaliza con LC3-II, pero la mutación de los cinco aminoácidos claves para la unión a ATG16L1 provocaba una reducción en el número de colocalizaciones observadas. En la **Figura 27E** se refleja gráficamente la disminución en el número de colocalizaciones en las células transfectadas con la versión 5M, respecto a las transfectadas con IL-10RB-WT, tras el bloqueo de la ruta con inhibidores lisosomales. Los efectos biológicos de bafilomicina A<sub>1</sub> y E64d y pepstatina A se describen en los apartados 2. *La ausencia de A20 altera el flujo autofágico normal* y 3.1. *El dominio WDD de ATG16L1 regula la expresión de A20* del *Capítulo 1 de Resultados*, respectivamente.

Los ensayos de evaluación de LC3-II, en paralelo con las co-inmunoprecipitaciones descritas anteriormente, otorgaron validez al motivo identificado (**Figura 22A, parte inferior**), que no sólo resultó útil en la caracterización de proteínas con capacidad de unión al dominio WDD de ATG16L1, sino también en la identificación de moléculas competentes en la inducción de lipidación de LC3. Por ello, se especuló que dominio WDD de ATG16L1 podría regular el tráfico intracelular de estos receptores mediante un mecanismo celular similar al que opera en el caso de TMEM59.



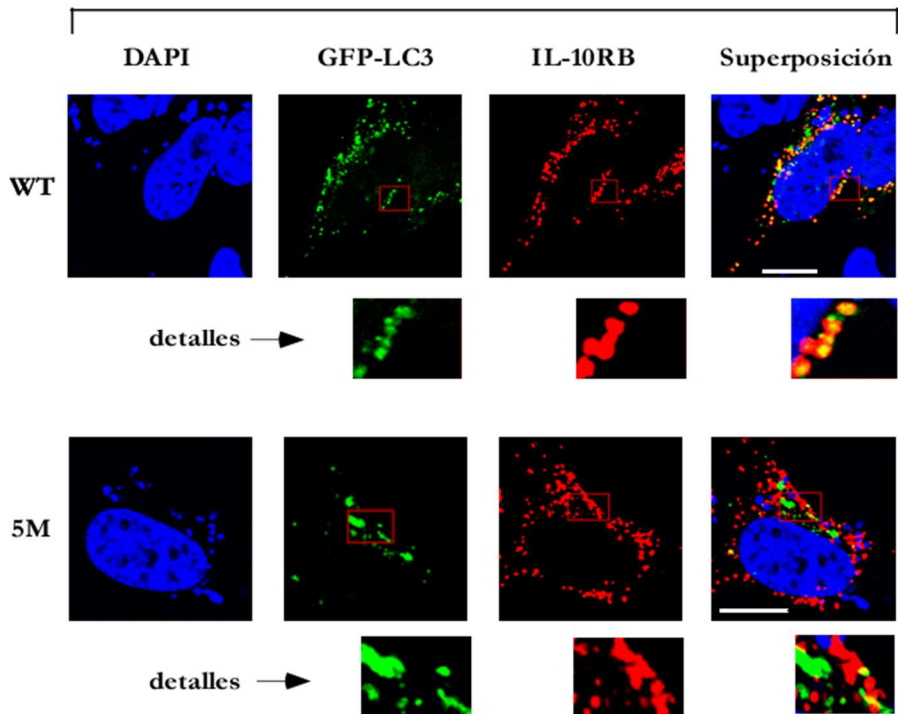
**C**

Baf. 8 h, 75 nM

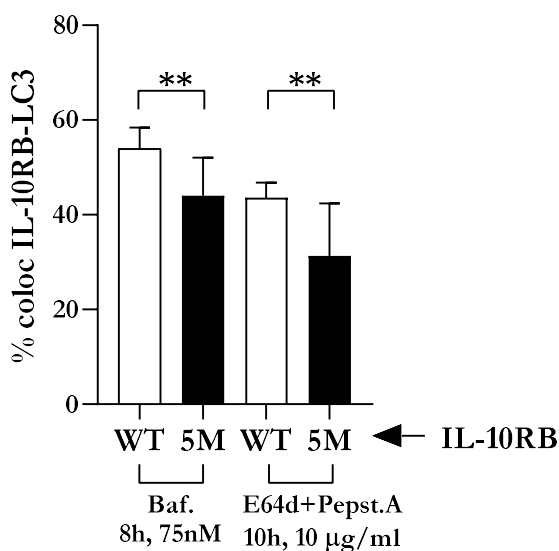


**D**

E64d/Pepst.10 h, 10 µg/µl cada



**E**



**Figura 27.** La versión 5M de IL-10RB altera la capacidad del receptor para inducir lipidación de LC3. **(A)** La mutación de los 5 aminoácidos de IL-10RB responsables de la interacción con el dominio WDD inhibe la lipidación de LC3 mediada por el receptor en ensayos de sobreexpresión. Células HeLa se co-transfectaron con IL-10RB-HA WT, IL-10RB-HA 5M o un plásmido no codificante y AU-LC3. 36 horas después se lisaron y se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican. **(B), (C), (D)** La mutación los cinco aminoácidos de IL-10RB claves para la unión a ATG16L1 inhibe los fenómenos de colocalización entre LC3-II e IL-10RB en ensayos de inmunofluorescencia. Células HeLa se co-transfectaron con IL-10RB-HA WT o IL-10RB-HA 5M y GFP-LC3. En **(B)**, las células no recibieron ningún tratamiento adicional. En **(C)**, se trataron con Baf. 75 nM durante las últimas 8 horas de cultivo. En **(D)**, se trataron con la combinación E64d/Pepst. 10 µg/µl durante las últimas 10 horas de cultivo. En **(B), (C)** y **(D)**, tras 36 horas se fijaron y se procesaron para inmunofluorescencia. Se seleccionaron imágenes representativas de cada fenotipo. En azul se muestra el núcleo teñido con DAPI; en verde, la señal de GFP-LC3 y en rojo, la señal del receptor detectada con un anticuerpo primario anti-HA de ratón y un secundario anti-ratón-Cy3. Las barras de escala representan 10 µm. **(E)** La cuantificación del número de colocalizaciones en **(C)** y **(D)** refleja la disminución de éstas en células transfectadas con la versión 5M. Se muestran los valores medios del porcentaje de colocalización proporcionado por el software LAS X y sus desviaciones estándar asociadas (n=10 células, estadístico empleado: prueba t de Student; (\*\*) indica p-valor<0,01).

### 3. LA INTERACCIÓN ENTRE IL-10RB/IL-31R Y EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 REPERCUTE FUNCIONALMENTE SOBRE LOS RECEPTORES

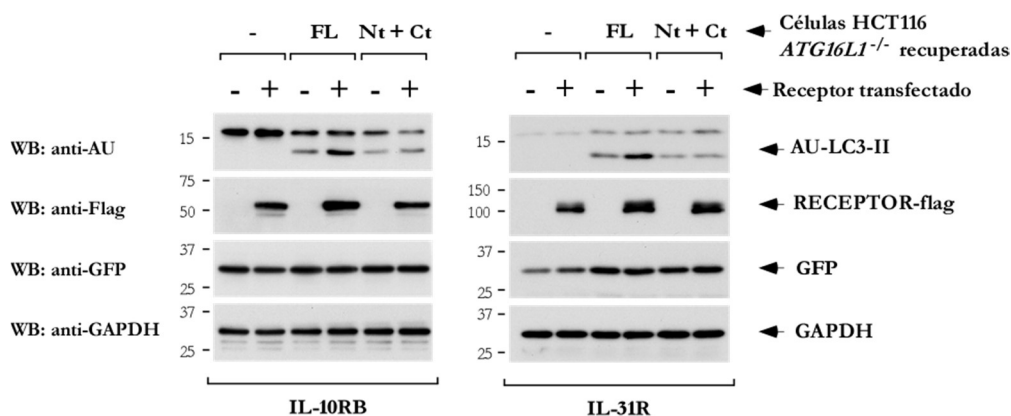
Puesto que IL-10RB e IL-31R se unen a ATG16L1 a través del motivo proteico descrito, se realizaron una serie de ensayos preliminares dirigidos a evaluar la posible repercusión funcional de las interacciones identificadas. En la realización de estos estudios iniciales de sobreexpresión se emplearon células HCT116 deficientes en *ATG16L1*<sup>160</sup>, que habían sido reconstituidas con un plásmido no codificante, la versión WT de ATG16L1 (FL) y los dominios N-terminal y C-terminal (Nt+Ct) de ATG16L1 físicamente separados<sup>156</sup>. En estas tres estirpes se sobreexpresaron de forma independiente los receptores IL-10RB e IL-31R.

En primer lugar, se evaluó la lipidación de LC3 en el ensayo previamente descrito. Atendiendo exclusivamente a los puntos en los que se había transfectado receptor, se observó un incremento de LC3-II en células de la estirpe FL, respecto a las recuperadas con un plásmido no codificante o con los dominios Nt y Ct físicamente separados (**Figura 28**). En células recuperadas con ambas regiones desacopladas, el dominio WDD no presentaba capacidad para inducir el fenómeno de lipidación local de LC3, puesto que, aún interaccionando con cualquiera de los receptores, carecía de conexión con el dominio efector (o N-terminal). El efecto observado en la lipidación diferencial de LC3 entre las distintas estirpes era común a ambos receptores (**Figura 28: IL-10RB parte izquierda; IL-31R, parte derecha**). Puesto que el fenómeno de lipidación observado era WDD-dependiente, los efectos funcionales identificados *a posteriori* se atribuyeron a un mecanismo autofágico no convencional.

Adicionalmente, en ambos casos se observó una ligera acumulación del receptor en células recuperadas con la versión WT de ATG16L1, si bien el incremento resultó más prominente en el caso del receptor IL-10RB (**Figura 28: IL-10RB parte izquierda; IL-31R, parte derecha**). Estos datos apuntaban a que la capacidad del receptor para interaccionar con ATG16L1 alteraba su estabilidad. Sin embargo, este efecto resultó sorprendente puesto que, habitualmente, el marcaje con LC3-II provoca un tráfico más



rápido hacia los lisosomas. Al margen de este dato aparentemente contradictorio, los resultados anteriormente descritos sugerían la existencia de alteraciones WDD-dependientes en el tráfico de los receptores analizados.



**Figura 28.** La interacción entre el dominio WDD de ATG16L1 e IL-10RB (izquierda) o IL-31R (derecha) repercute sobre la lipidación de LC3 y sobre los niveles de expresión del receptor. El incremento de la lipidación de LC3 en células recuperadas con la versión WT de ATG16L1 (FL) causa una acumulación de receptor (IL-10RB e IL-31R) en esta estirpe celular. Células HCT116 deficientes en *ATG16L1* fueron recuperadas con un plásmido no codificante, la versión WT de ATG16L1 (FL) y los dominios N-terminal (aminoácidos 1-299) y C-terminal (aminoácidos 300-607) (Nt+Ct) físicamente separados. Cada estirpe se co-transfectó con AU-LC3, GFP y un plásmido no codificante o el receptor IL-10RB (izquierda) o IL-31R (derecha). Tras 36 horas se lisaron y se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican.

Adicionalmente, se desconocía si la acumulación del receptor en células recuperadas con ATG16L1-WT (FL) repercutía sobre la lipidación de LC3, o si la inducción de autofagia (en forma de incremento de LC3-II) provocaba la acumulación del receptor. Una mayor acumulación del receptor en células recuperadas con ATG16L1-WT (FL) sólo podría ser explicable debido a una mayor tasa de transfección en esta línea celular. Sin embargo, los efectos a nivel de transfección fueron descartados, puesto que la co-transfección con un plásmido GFP control reflejaba que, al menos en el caso de las estirpes FL y Nt+Ct, la transfección se producía con idénticas tasas de eficiencia para ambos receptores. Por tanto, se hipotetizó que el efecto diferencial inicial sobre la lipidación de LC3 repercutiría finalmente sobre los niveles de expresión del receptor.

## RESULTADOS. CAPÍTULO 2

Aunque los ensayos de sobreexpresión descritos no representan la herramienta idónea para la evaluación de la funcionalidad, resultaron suficientemente informativos para la realización de un cribado inicial de receptores cuya interacción con el dominio WDD presentaba relevancia funcional, por analogía con TMEM59. Entre ellos destaca el receptor IL-10RB, sobre el que pivotan los ensayos descritos en los subsiguientes capítulos de este estudio.

---

## CAPÍTULO 3

La interacción entre IL-10RB y el dominio WDD de ATG16L1 modula la transducción de la señalización mediada por IL-10 en MEF

### 1. GENERACIÓN Y VALIDACIÓN DE MEFs RESPONDEDORES

#### A IL-10

#### 1.1. GENERACIÓN DE LAS LÍNEAS ESTABLES DE MEFs ATG16L1 FL Y NT

Considerando que el cribado de moléculas que integran el denominado “interactoma” del dominio WDD se efectuó por analogía con TMEM59, se especuló que los defectos en el tráfico intracelular de TMEM59, observados en ausencia del dominio WDD<sup>156</sup>, podrían reproducirse en el caso de moléculas como IL-10RB. La unión de TMEM59 con ATG16L1 promueve el marcaje con LC3 de los propios endosomas en los que se localiza TMEM59. Sin embargo, la ausencia del dominio WDD afecta al marcaje con LC3 y, consecuentemente, al tráfico intracelular de los endosomas, impactando finalmente sobre la capacidad de TMEM59 para inducir xenofagia<sup>156</sup>.

Por tanto, teniendo en consideración la analogía con TMEM59 y, una vez confirmada la existencia de una interacción específica entre IL-10RB y el dominio WDD de ATG16L1, se analizó si la ruta de señalización desencadenada por IL-10 podía estar regulada por el dominio WDD. Con esta finalidad, se transdujeron MEFs deficientes en *Atg16l1*<sup>220</sup> con un reportero STAT3x3-LUC multimerizado (véase apartado 4.8.6. *Sistema de expresión retroviral SB0001.4 en Materiales y métodos*) y STAT3, que en este sistema resultaba imprescindible para la transducción de la señal. El reportero multimerizado permitía a las células responder de forma más exacerbada ante un determinado estímulo, y superaba una dificultad inicial surgida durante los ensayos preliminares realizados: la carencia de una señal lo suficientemente elevada, esto es, distinguible del fondo y medible.

A continuación, se recuperaron las células previamente transducidas con STAT3x3-LUC y STAT3 empleando plásmidos retrovirales que expresaban una secuencia no codificante (-), ATG16L1-FL (completo, FL) o el dominio efector ATG16L1-Nt (1-299) (Nt), ambos humanos. El dominio N-terminal es suficiente para mantener la autofagia basal e inducida por estímulos convencionales<sup>150,151,154-156</sup>. En este contexto, la estirpe recuperada con la región Nt nos permitió evaluar la implicación del dominio WDD en

los ensayos funcionales descritos, por comparación con la estirpe ATG16L1-FL, que expresa la molécula completa de ATG16L1.

Finalmente, las 3 estirpes fueron transducidas con los receptores humanos IL-10RA e IL-10RB. El plásmido que codifica para el receptor IL-10RB porta una segunda ORF con GFP, que permitía monitorizar, de forma sencilla, si la expresión del receptor se encontraba condicionada por efectos dependientes de cada estirpe celular. En la **Tabla 2** se especifican las etapas efectuadas en la generación de las 3 estirpes empleadas.

Etapa de transducción/ Estirpe inicial	Etapa #1	Etapa #2	Etapa #3	Etapa #4	Denominación de la estirpe celular
<b>MEFs- <i>Atg16l1</i><sup>-/-</sup></b>	STAT3x3-LUC	STAT3	Vacío	IL-10RA-AU+ IL-10RB-flag	-
	STAT3x3-LUC	STAT3	HA-ATG16L1-FL	IL-10RA-AU+ IL-10RB-flag	<b>FL</b>
	STAT3x3-LUC	STAT3	AU-ATG16L1-Nt	IL-10RA-AU+ IL-10RB-flag	<b>Nt</b>

**Tabla 2.** Estirpes de MEFs generadas a partir de células deficientes en *Atg16l1*. En la tabla se muestran las distintas etapas de transducción efectuadas sobre MEFs-*Atg16l1*<sup>-/-</sup> para la generación de las estirpes celulares finales (-, FL y Nt). El plásmido que codifica para IL-10RB-flag porta una secuencia IRES que permite incorporar GFP en una segunda ORF.

## 1.2. LAS ESTIRPES DE MEFs RESPONDEDORES A IL-10, ATG16L1-FL Y ATG16L1-NT, SON COMPARABLES EN NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS RELEVANTES

Las tres estirpes de MEFs respondedores a IL-10 se generaron con la finalidad de evaluar la existencia de una potencial modulación de la señalización dependiente de IL-10 mediada por el dominio WDD de ATG16L1. Por tanto, resultaba imprescindible constatar que los niveles de expresión de ATG16L1 y de los receptores IL-10RA e IL-10RB eran comparables. De esta forma, las posibles diferencias observadas en futuros ensayos funcionales podrían ser atribuidas a la presencia o ausencia del dominio WDD, y no a diferentes ratios de expresión de las moléculas transducidas.

En primer lugar, se confirmó mediante Western-blot la presencia de cantidades similares de las distintas versiones de ATG16L1 (FL y Nt) en cada estirpe, y la ausencia

## RESULTADOS. CAPÍTULO 3

de expresión de esta molécula en células transducidas con el plásmido no codificante (**Figura 29A**). Cabe mencionar que los MEFs recuperados con la región Nt presentaron una expresión ligeramente inferior de este dominio, respecto a los transducidos con la versión completa de ATG16L1 (FL). No obstante, esta ligera diferencia en la expresión no repercutía sobre la capacidad de recuperar autofagia de las células Nt respecto a las células FL, evaluada en función de la lipidación de LC3 y de la degradación de p62 (**Figura 29A**). Con anterioridad se había descrito que dosis reducidas del dominio Nt eran suficientes para recuperar la autofagia basal a niveles comparables con los existentes en células reconstituidas con ATG16L1 completo<sup>156</sup>. De hecho, ensayos efectuados previamente en el laboratorio sugieren que el dominio N-terminal no vinculado a la región WDD (aislado) podría presentar un comportamiento más activo en el proceso autofágico.

A continuación, se corroboró que las tres estirpes presentaban la misma cantidad de receptores IL-10RA e IL-10RB (**Figura 29B**). De forma interesante, los niveles de receptores eran significativamente superiores en el caso de células transducidas con el plásmido no codificante (**Figura 29B**). De hecho, no resultó posible corregir la desviación observada en esta estirpe mediante transducción de los receptores en condiciones menos favorables. Hipotetizamos que podría existir un bucle de regulación que, paradójicamente, mantuviese la ratio de expresión de receptores incrementada en MEFs deficientes en *Atg16l1*. No obstante, puesto que el estudio funcional del dominio WDD constituía el objetivo final de estos ensayos, los experimentos funcionales descritos en los siguientes apartados no contemplaron a la estirpe carente de *Atg16l1*. Así, el estudio comparativo se efectuó entre células transducidas con la versión completa de ATG16L1 (estirpe FL) y células carentes del dominio WDD (estirpe Nt), que expresaban niveles comparables de ambos receptores.

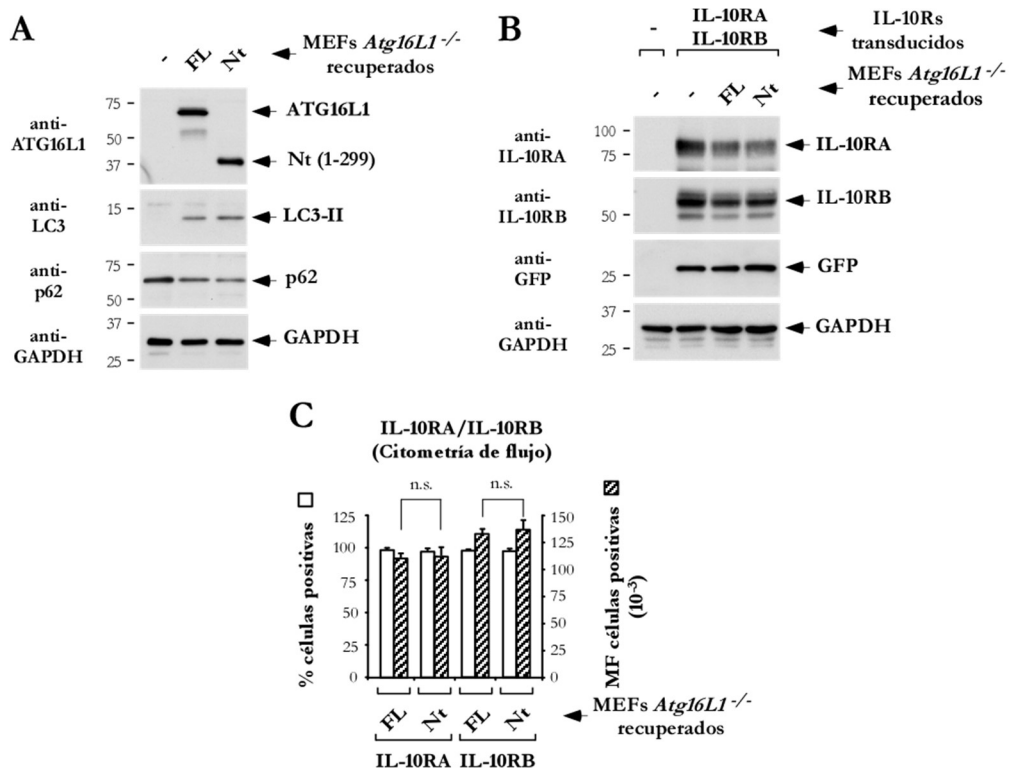


Figura 29. Las estirpes FL y Nt son comparables en niveles de expresión de las moléculas transducidas. ATG16L1 (A) y los receptores IL-10RA e IL-10RB (B) se expresan a niveles comparables entre las estirpes FL y Nt. Las tres estirpes (-, FL y Nt) fueron lisadas y analizadas mediante Western-blot para las moléculas indicadas: ATG16L1, p62 y LC3 (A) y receptores IL-10RA e IL-10RB (B). (C) Los receptores se exponen comparablemente en membrana, para las estirpes FL y Nt. Tras 24 horas en cultivo, las células se procesaron para citometría de flujo. Se efectuó la tinción de cada uno de los receptores con el correspondiente anticuerpo conjugado con Alexa Fluor® 647, en paralelo con un anticuerpo control. Se muestran los valores medios de porcentaje de células positivas y media de fluorescencia y sus desviaciones estándar asociadas, correspondientes a los triplicados efectuados (estadístico empleado: prueba t de Student; (n.s.) indica p-valor > 0,05).

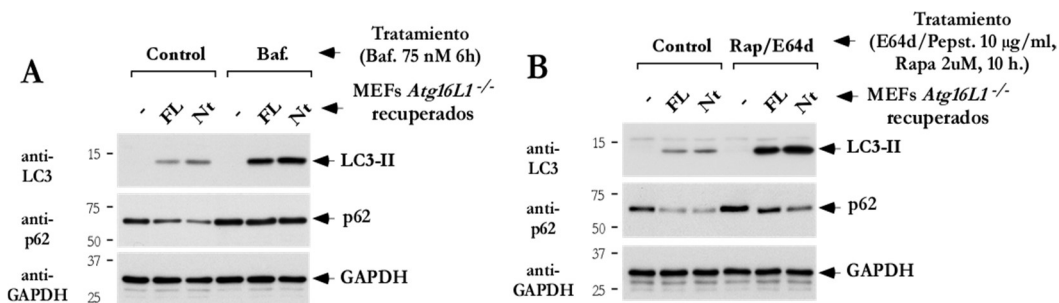
Asimismo, las dos estirpes se evaluaron mediante citometría de flujo para expresión de receptores en membrana. De esta forma, se determinó que ambos receptores se exponían en membrana a un nivel comparable, en porcentaje de células positivas y media de fluorescencia (MF) de cada una de las líneas celulares testadas (Figura 29C). La ausencia de diferencias entre los niveles de expresión en membrana de IL-10RA e IL-10RB, entre ambas estirpes evaluadas, descartaba una posible implicación del dominio WDD de ATG16L1 en la ruta de maduración de receptores a la membrana plasmática.

## RESULTADOS. CAPÍTULO 3

### 1.3. LAS ESTIRPES ATG16L1-FL Y ATG16L1-NT RECUPERAN AUTOFAGIA BASAL E INDUCIDA POR RAPAMICINA DE FORMA COMPARABLE

El tratamiento de las 3 estirpes generadas con inhibidores lisosomales (bafilomicina A<sub>1</sub> y combinación de E64d/pepstatina A e inductor rapamicina (Rapa)) generó modificaciones de similar magnitud en la lipidación de LC3 y en la degradación de p62 (**Figura 30A y B**), en concordancia con lo anteriormente descrito en el laboratorio<sup>156</sup>. La rapamicina es un macrólido que induce autofagia actuando como inhibidor negativo del complejo mTORC1. Las funciones biológicas de bafilomicina y E64d/pepstatina A se describen en el apartado 2. *La ausencia de A20 altera el flujo autofágico normal* y 3.1. *El dominio WDD de ATG16L1 regula la expresión de A20* en el *Capítulo 1* de *Resultados*. Puesto que ATG16L1 es un gen esencial en la ruta autofágica, la estirpe recuperada con el plásmido no codificante no respondía al tratamiento con ninguno de los inhibidores lisosomales.

Estos datos corroboraron que la autofagia basal e inducida por rapamicina se desarrollaban normalmente en presencia de la región N-terminal de ATG16L1, independientemente de su conexión física con el dominio WDD. La estirpe ATG16L1-Nt presentó una actividad autofágica ligeramente superior a la estirpe ATG16L1-FL tras el tratamiento con E64d/pepstatina A y rapamicina, observándose una mayor acumulación de LC3-II acompañada de un incremento de la degradación de p62. Este fenómeno, aunque de escasa magnitud, podría atribuirse a un ligero incremento de la actividad de la región N-terminal no vinculada al dominio WDD, continuando la argumentación iniciada en el anterior apartado.



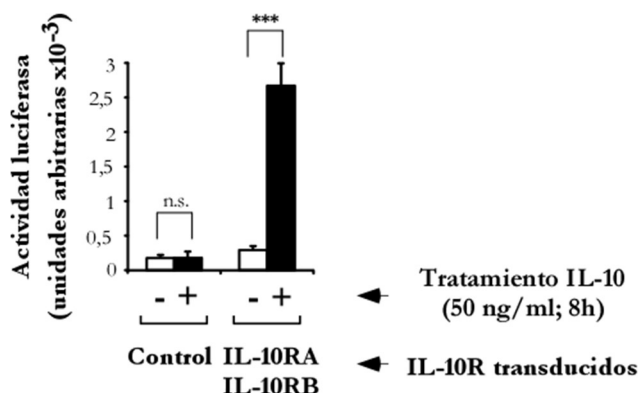
**Figura 30.** Las estirpes ATG16L1-FL (FL) y ATG16L1-Nt (Nt) recuperan autofagia basal e inducida por rapamicina de forma comparable. Las líneas celulares indicadas fueron tratadas con bafilomicina A<sub>1</sub>



(Baf.; 75 nM durante 6 horas) **(A)** o E64d/pepstatina A (E64d/Pepst.; 10 µg/ml de cada compuesto durante 10 horas) y rapamicina (Rapa; 2 µM durante 10 horas) **(B)**. Tras un tiempo final de 36 horas, se lisaron y se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican.

#### 1.4. LA CITOQUINA IL-10 HUMANA NO ESTIMULA LOS RECEPTORES IL-10RA E IL-10RB ENDÓGENOS EN MEF5

Los ensayos preliminares de medición de luciferasa se dirigieron a evaluar la capacidad de respuesta de los receptores endógenos de ratón tras el tratamiento con la citoquina IL-10 humana. El objetivo primordial de este ensayo radicaba en descartar que los potenciales efectos sobre la señalización mediada por IL-10 procediesen de una respuesta parcial originada por los propios receptores endógenos murinos. No obstante, tras el tratamiento de células ATG16L1-FL con IL-10 humana, únicamente aquellas estirpes transducidas con ambos receptores humanos respondían a la citoquina (**Figura 31**). Se pudo concluir, entonces, que los potenciales efectos observados en señalización dependerían exclusivamente de las moléculas exógenas transducidas en los MEFs objeto de estudio.



**Figura 31.** Los MEFs ATG16L1-FL responden a IL-10 exclusivamente en presencia de los receptores humanos IL-10RA e IL-10RB. Células de la estirpe ATG16L1-FL fueron tratadas con 50 ng/ml de IL-10 durante 8 horas. A continuación, se lisaron y se midió la actividad luciferasa. Únicamente la estirpe transducida con ambos receptores respondió al tratamiento con la citoquina. Se muestran los valores medios de la ratio de inducción y las desviaciones estándar correspondientes a los triplicados efectuados (estadístico empleado: prueba t de Student; (\*\*\*) indica p-valor<0,001; (n.s.) indica p-valor>0,05).

### 2. LA SEÑALIZACIÓN VÍA IL-10 ES MODULADA POR EL DOMINIO WDD

#### 2.1. EL DOMINIO WDD MODULA LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR MEDIADA POR IL-10 EN ENSAYOS DE LUCIFERASA

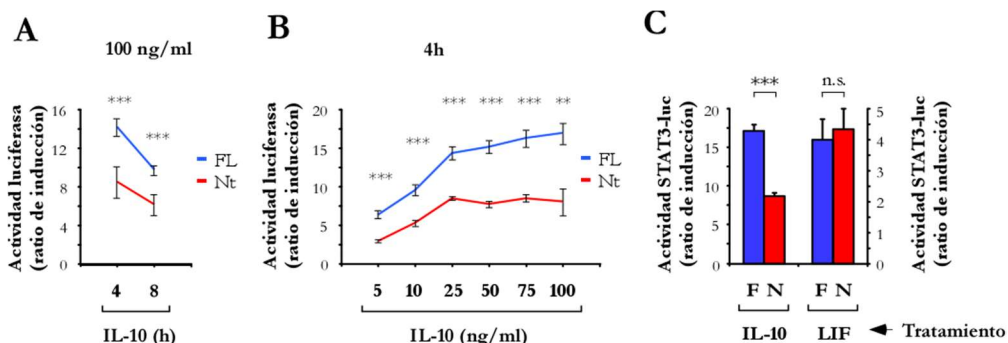
Considerando lo descrito en los apartados 1.2 a 1.4 de este capítulo, las estirpes ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt resultaron completamente comparables en test funcionales. El primer ensayo funcional efectuado permitió evaluar la respuesta a la estimulación con IL-10 humana mediante medición de luciferasa, en las líneas celulares ATG16L-FL y ATG16L1-Nt. Células de ambas estirpes se crecieron en condiciones de bajo porcentaje de FBS (0.5% del total de medio de cultivo), con el objetivo de reducir los potenciales efectos que, sobre la señalización, podrían ejercer elementos presentes en la mezcla compleja de suero. A continuación, se cultivaron durante 4 y 8 horas en presencia de IL-10 humana. Las mediciones de luciferasa reflejaron una disminución en la ratio de estimulación del reportero en células transducidas con el dominio N-terminal (Nt), respecto a sus homólogas recuperadas con la versión completa de ATG16L1 (FL), tanto a 4 como a 8 horas (**Figura 32A**).

Adicionalmente, se efectuó un ensayo dosis-respuesta en ambas estirpes, observándose una estabilización de la actividad luciferasa a dosis más bajas (aproximadamente 25 ng/ml) en el caso de células ATG16L1-Nt (**Figura 32B**). De hecho, la actividad luciferasa en células ATG16L1-FL prosiguió su incremento (aunque de forma moderada a partir de la dosis 25 ng/ml) hasta la concentración límite empleada (100 ng/ml) (**Figura 32B**). El ensayo dosis-respuesta se efectuó exclusivamente a 4 horas, al tratarse del tiempo óptimo al que se observaban las mayores ratios de inducción en ambas estirpes celulares (**Figura 32A**).

Los datos de los ensayos de luciferasa apuntaban a un mecanismo de regulación modulado por el dominio WDD, puesto que la carencia de éste reducía la inducción de la actividad luciferasa estimulada por IL-10 (células ATG16L1-Nt). No obstante, podría tratarse de un efecto de alcance generalizado, no asociado a la interacción IL-10RB-

ATG16L1. Con el objetivo de descartar esta posibilidad, se trataron ambas estirpes con el factor LIF que, al igual que la citoquina IL-10, señala a través de STAT3. Sin embargo, contrariamente a IL-10, LIF señala a través de receptores endógenos presentes de forma natural en las células. En cualquier caso, no se observaron diferencias entre las estirpes FL y Nt tratadas con LIF (**Figura 32C**). Por el contrario, las diferencias en cuanto a actividad luciferasa observadas entre células FL y Nt estimuladas con IL-10, permanecieron inalteradas (**Figura 32C**).

Estos resultados apuntaban a la existencia de un mecanismo de regulación de la señalización dependiente de IL-10 modulado por el dominio WDD. La carencia de un dominio WDD funcional reduciría la capacidad de las células para transducir la señal inducida por IL-10 u ocasionaría la finalización temprana de la misma.



**Figura 32.** El dominio WDD participa en la modulación de la señal intracelular desencadenada por IL-10. **(A)** Células de la estirpe FL presentaron una mayor ratio de inducción de actividad luciferasa respecto a sus homólogos Nt. Las líneas celulares FL y Nt se cultivaron durante 16 horas en medio con 0.5% de suero. A continuación, fueron tratadas con 100 ng/ml de IL-10 durante 4 y 8 horas (en medio con 0.5% de suero). Finalmente, se lisaron y se midió la actividad luciferasa. **(B)** Células de la estirpe FL mostraron mayores ratios de actividad luciferasa en ensayos dosis-respuesta, respecto a sus homólogos Nt. Las líneas celulares FL y Nt se incubaron durante 16 horas en medio con 0.5% de suero y, a continuación, fueron tratadas con dosis crecientes de IL-10 (5, 10, 25, 50, 75 y 100 ng/ml) durante 4 horas (en medio con 0.5% de suero). Finalmente, se lisaron y se evaluó la actividad luciferasa. **(C)** El tratamiento con LIF no provocó cambios en la ratio de inducción de actividad luciferasa entre células FL y Nt. Células de las estirpes FL (F) y Nt (N) se cultivaron durante 16 horas en medio con 0.5% de suero y, a continuación, fueron tratadas con 50 ng/ml de IL-10 durante 4 horas o 50 ng/ml de LIF durante 2 horas (en medio con 0.5% de suero). Tras la incubación, se lisaron y se midió la actividad luciferasa. En **(A)**, **(B)** y **(C)** se muestran los valores medios de la ratio de inducción y las desviaciones estándar correspondientes a

## RESULTADOS. CAPÍTULO 3

los triplicados efectuados. Cada punto se calcula respecto al valor medio (estadístico empleado: prueba t de Student; (\*\*\*) indica p-valor<0,001; (\*\*) indica p-valor<0,01; (n.s.) indica p-valor>0,05).

### 2.2. EL DOMINIO WDD PARTICIPA EN LA ACTIVACIÓN DE STAT3 EN RESPUESTA A IL-10

La fosforilación de STAT3 supone una etapa clave en la transducción de la señal en respuesta a IL-10 (véase apartado 6.4.1. *Estructura y función de IL-10 en Introducción*). Considerando la relevancia de este fenómeno en la señalización por IL-10, se postuló que el déficit observado en la transducción de la señal en respuesta a IL-10 en ausencia del dominio WDD, podía originarse como causa de una deficiente activación de STAT3.

Inicialmente, se realizó un ensayo de tratamiento continuo, en el que MEFs de las estirpes FL (F) y Nt (N) se estimularon con una dosis única de citoquina y, posteriormente, se lisaron a diferentes tiempos (**Figura 33**). El ensayo recibió la denominación de tratamiento continuo puesto que la citoquina permaneció en el medio de cultivo (en contacto con las células) durante el tiempo de duración del experimento, esto es, hasta la lisis del cultivo celular. Posteriormente, se efectuó un fraccionamiento celular con el objetivo de separar los extractos citoplasmáticos y nucleares. Dado que STAT3 se transloca al núcleo una vez fosforilado, los potenciales efectos diferenciales entre ambas estirpes podrían magnificarse en el compartimento nuclear, posibilitando su más evidente visualización. Se debe señalar, asimismo, que la activación transcripcional de STAT3 es mediada por la fosforilación de los residuos de Tyr705 (Y705) o Ser727 (S727)<sup>221</sup>. No obstante, la fosforilación de S727 se considera un evento secundario a la fosforilación de Y705<sup>221</sup>. En este conjunto de experimentos se muestra exclusivamente el estado del residuo Y705, al considerarse el evento principal responsable de la activación de STAT3.

Los datos obtenidos reflejaron la existencia de una fosforilación reducida de STAT3-Y705 en células de la estirpe Nt (N) respecto a las células FL (F) (**Figura 33**). Este efecto se detectó tanto en extractos citoplasmáticos (**Figura 33A**) como en extractos nucleares (**Figura 33B**), permaneciendo hasta el punto temporal de 120 minutos. En los extractos citoplasmáticos se producía una decadencia de la señal a partir de los 60 minutos de tratamiento, punto temporal en el que probablemente la mayor parte de pSTAT3-Y705

se habría translocado al núcleo. En ambos casos, STAT3 permanecía prácticamente invariable a lo largo del tiempo, descartando la existencia de efectos transcripcionales sobre los niveles totales de STAT3, mediados por el dominio WDD.

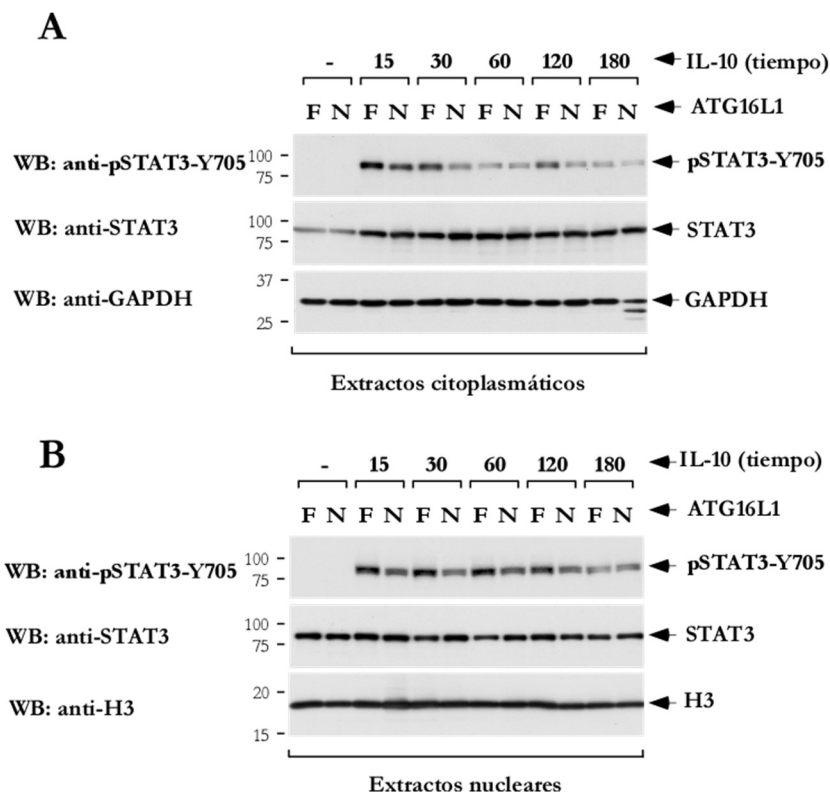


Figura 33. Los experimentos de tratamiento continuo mostraron diferencias en fosforilación de STAT3 entre células FL (F) y Nt (N). La fosforilación (activación) de STAT3 se incrementó en células de la estirpe FL, respecto a células Nt. Células de ambas estirpes se incubaron durante 4 horas en medio de cultivo con 0.5% de suero y, a continuación, se trataron con 50 ng/ml de IL-10 durante los tiempos señalados (manteniendo la proporción de suero en 0.5%). Finalmente, se lisaron y se realizó un fraccionamiento citoplasma (A) vs. núcleo (B), para ser posteriormente analizadas mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican.

Complementando los experimentos de tratamiento continuo, se efectuó la modalidad de ensayos denominados de “pulso y caza” (Figura 34). En este tipo de experimentos, se analizó la progresión de p-STAT3-Y705 a través del tiempo. Esto es, el ensayo se inició con una fase de pulso, durante la que se incorporó una dosis de 50 ng/ml de IL-10, que iniciaba la ruta intracelular de transducción de la señal. A continuación, se retiró la citoquina del medio, iniciándose la fase de caza. Durante esta etapa se efectuó un

## RESULTADOS. CAPÍTULO 3

seguimiento de la expresión de IL-10 y se analizó el efecto que, sobre la señalización celular (evaluada como inducción de p-STAT3-Y705), ejercía la estimulación mediada por IL-10 durante un corto periodo de tiempo. El “pulso y caza”, por tanto, permite evaluar procesos celulares que, como el descrito, ocurren a través del tiempo.

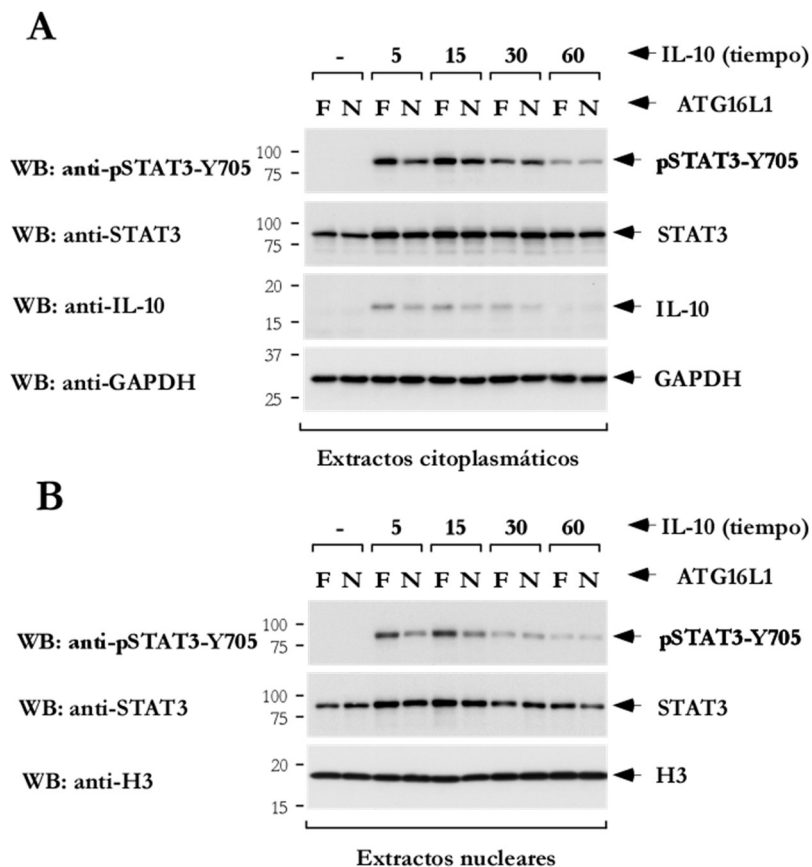


Figura 34. Los experimentos de “pulso y caza” mostraron diferencias en tráfico intracelular de IL-10 y activación de STAT3 entre células FL (F) y Nt (N). El tráfico intracelular de IL-10 y la fosforilación de STAT3 se incrementaron en células de la estirpe FL, respecto a células Nt. Células de ambas estirpes fueron incubadas en medio de cultivo con 0.5% de suero durante 4 horas y, posteriormente, tratadas con 50 ng/ml de IL-10 durante 30 minutos a 4°C. Tras el periodo de incubación, se lavaron dos veces con medio de cultivo y se mantuvieron en un incubador a 37°C (el medio de cultivo empleado en los lavados y en el periodo de reposo en el incubador contenía, asimismo, 0.5% de suero). Finalmente, se lisaron durante los puntos temporales señalados y se realizó un fraccionamiento citoplasma (A) vs. núcleo (B), para ser posteriormente analizadas mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican.

Los resultados obtenidos señalaron la existencia de un reducido tráfico intracelular de IL-10 en células de la estirpe Nt (N) respecto a células FL (F) (Figura 34A).

Adicionalmente, la evaluación de p-STAT3-Y705 permitió reproducir la información obtenida en el ensayo de tratamiento continuo (**Figura 33**). Nuevamente, las células de la estirpe Nt mostraron una fosforilación reducida de STAT3 respecto a las células FL, en este caso, observada a tiempos más cortos (5 y 15 minutos) (**Figura 34**). La fosforilación diferencial de STAT3-Y705 se observó en los extractos citoplasmáticos y nucleares (**Figura 34A y B**, respectivamente).

Los datos descritos apuntaban a la participación del dominio WDD en la regulación de la respuesta a IL-10, sobre la base de la diferencial activación de STAT3 en las dos estirpes analizadas. Además, resultaron un complemento clave a la información obtenida a través de los ensayos de medición de luciferasa, atribuyendo la deficiente señalización en células Nt a la reducida fosforilación de STAT3 respecto a la estirpe FL.

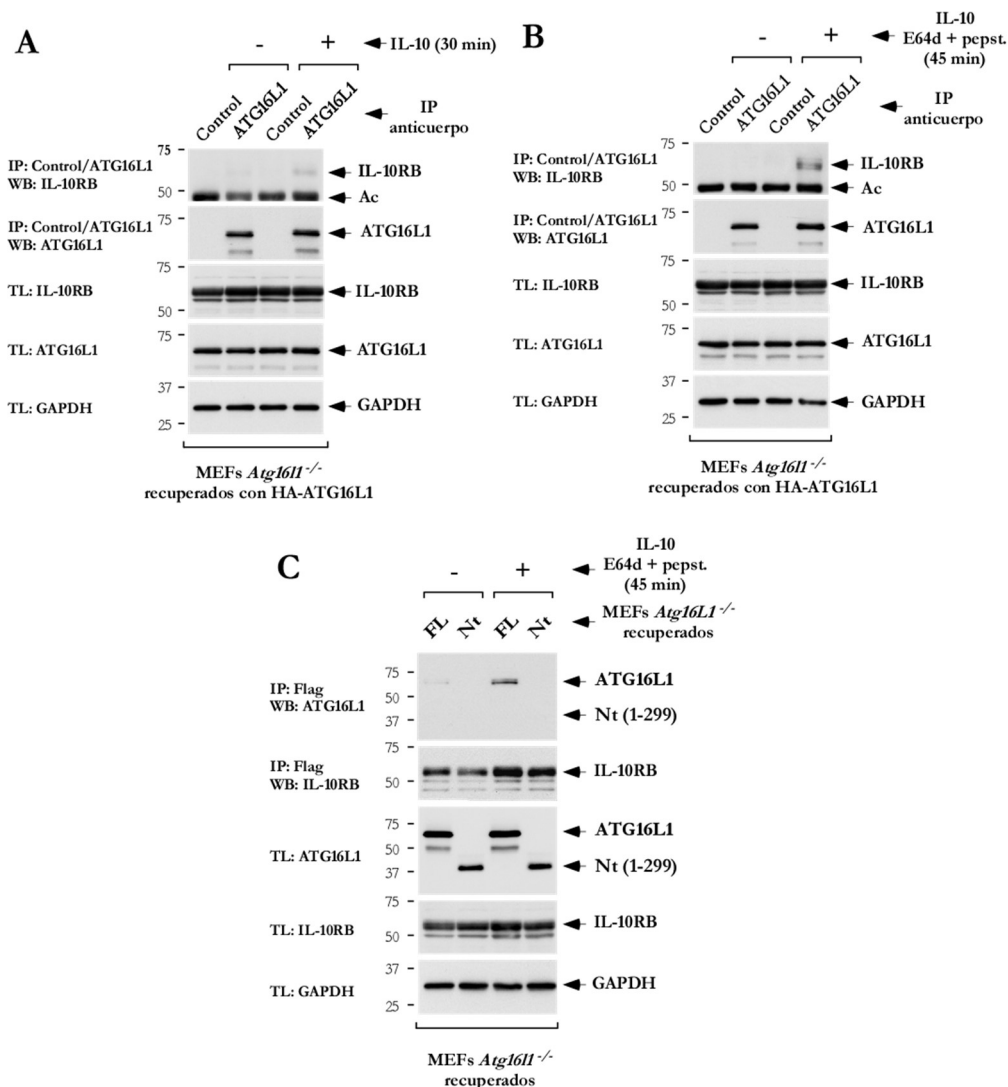
### 3. IL-10RB Y ATG16L1 INTERACCIONAN EN RESPUESTA A IL-10

Una vez corroborada la existencia de una unión específica entre IL-10RB y ATG16L1 en condiciones de sobreexpresión, se evaluó si esta interacción se producía también en condiciones fisiológicas, esto es, en respuesta a IL-10. Al objeto de confirmar la existencia de dicha interacción, se estimularon MEFs de la estirpe ATG16L1-FL con IL-10 durante 30 minutos. El tratamiento con IL-10 favoreció la co-inmunoprecipitación de IL-10RB y ATG16L1 (**Figura 35A**), revelando la existencia de una interacción específica entre ambas moléculas en respuesta a un estímulo fisiológico como IL-10. La especificidad de la unión se confirmó mediante el empleo de un anticuerpo irrelevante (Control), que presentaba la misma especificidad de especie que el anticuerpo utilizado en la inmunoprecipitación, pero incapaz de inmunoprecipitar ATG16L1 (**Figura 35A**).

No obstante, el tenue aspecto de la banda correspondiente a IL-10RB en esta primera co-inmunoprecipitación (**Figura 35A**) revelaba que se trataba de una unión débil. Se optó entonces, por mejorar la intensidad de la banda mediante el empleo de inhibidores lisosomales (E64d y pepstatina A) en conjunción con el tratamiento con IL-10, con la finalidad de inhibir la degradación del receptor y, consecuentemente, fortalecer la co-inmunoprecipitación. El tratamiento mejoró la intensidad de la banda de IL-10RB y

## RESULTADOS. CAPÍTULO 3

confirmó la existencia de una interacción específica IL-10RB-ATG16L1 en respuesta a la estimulación vía IL-10 (**Figura 35B**).



**Figura 35. IL-10RB y ATG16L1 co-immunoprecipitan en respuesta a IL-10. (A) IL-10RB co-immunoprecipita con ATG16L1, pero no con un anticuerpo irrelevante.** MEFs ATG16L1-FL cultivados durante 24 horas, fueron tratados con 50 ng/ml de IL-10 durante 30 minutos y procesados para inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-ATG16L1 (de ratón) y, en paralelo, con un anticuerpo irrelevante (control) de la misma especie. A continuación, se sometieron a Western-blot con los anticuerpos que se indican. **(B) La intensidad de la banda de receptor co-immunoprecipitado con ATG16L1 se incrementa en presencia de inhibidores lisosomales.** MEFs ATG16L1-FL cultivados durante 24 horas, fueron tratados con 10 µg/ml de E64d y pepstatina A y 50 ng/ml de IL-10 durante 45 minutos. A



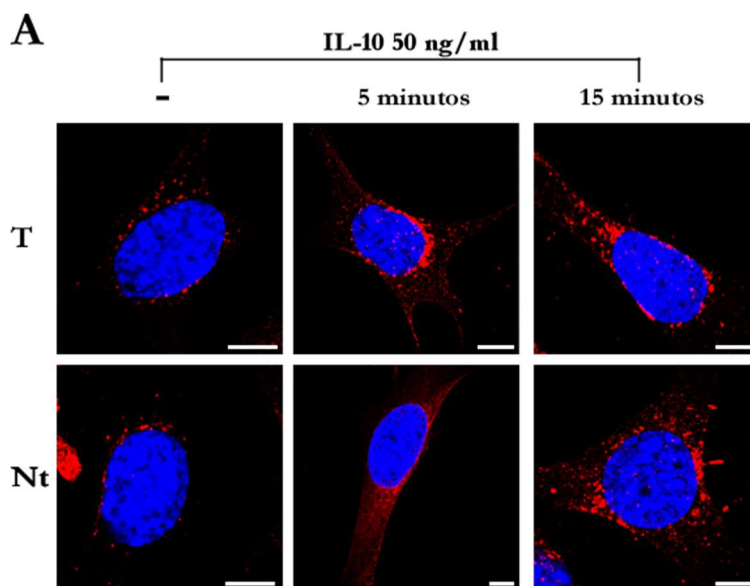
continuación, se procesaron para inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-ATG16L1 (de ratón) y un anticuerpo irrelevante (Control). Finalmente, se sometieron a Western-blot con los anticuerpos indicados. **(C) El dominio WDD de ATG16L1 media la interacción con IL-10RB en respuesta a IL-10.** MEFs ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt cultivados durante 24 horas, fueron tratados con 10  $\mu\text{g/ml}$  de E64d y pepstatina A y 50 ng/ml de IL-10 durante 45 minutos. A continuación, se procesaron para inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-flag (que reconoce IL-10RB, procedente de conejo) y se sometieron a Western-blot con los anticuerpos que se indican (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). En **(A)** y **(B)** la abreviatura Ac señala la banda remanente de la cadena pesada del anticuerpo empleado en la inmunoprecipitación. Esta banda es completamente irrelevante en la interpretación de los datos.

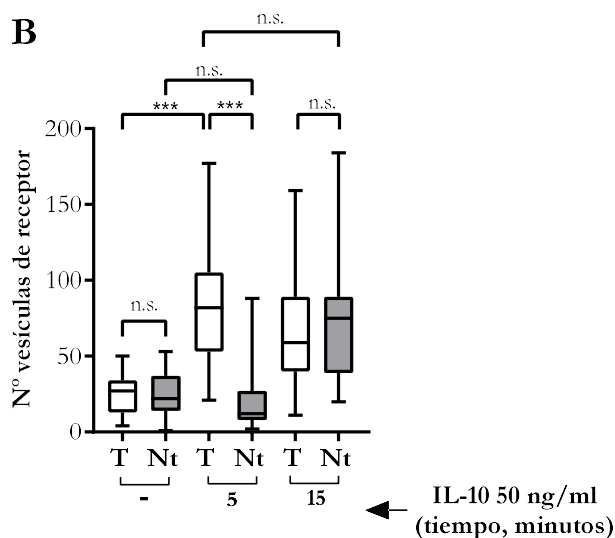
Considerando que los ensayos de co-inmunoprecipitación en condiciones de sobreexpresión habían atribuido al dominio WDD la capacidad de interactuar con IL-10RB, se confirmó que esta región era efectivamente la responsable de la unión a IL-10RB en respuesta a la estimulación por IL-10. En este caso, la co-inmunoprecipitación se efectuó en orientación opuesta, puesto que se desconocía si el anticuerpo  $\alpha$ -ATG16L1 (**Figura 35A** y **B**), presentaría idéntica capacidad para inmunoprecipitar ambas versiones de la molécula, ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt. Con la finalidad de eludir este tipo de interrogantes, se optó por inmunoprecipitar el receptor IL-10RB (empleando un anticuerpo anti-flag, que reconocía IL-10RB a través del epítipo flag). La ratio de expresión del receptor IL-10RB era prácticamente idéntica entre ambas estirpes (véase apartado 1.2. *Las estirpes de MEFs respondedores a IL-10, ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt, son comparables en niveles de expresión de las moléculas relevantes en el Capítulo 3 de Resultados*). Así, se seleccionaron las condiciones más favorables para la co-inmunoprecipitación (tratamiento con inhibidores lisosomales en conjunción con IL-10) y se observó que, tras el estímulo fisiológico, únicamente ATG16L1-FL co-inmunoprecipitaba con IL-10RB (**Figura 35C**). El fenómeno de co-inmunoprecipitación observado resultaba compatible con la información procedente de los ensayos de sobreexpresión, en los que se definía que la interacción IL-10RB-ATG16L1 se producía a través del dominio WDD. Adicionalmente, aportaba un dato relevante en este contexto: la interacción se originaba en respuesta a un estímulo fisiológico, reproduciendo más fielmente las condiciones *in vivo*.

## 4. EL DOMINIO WDD REGULA EL TRÁFICO INTRACELULAR DEL RECEPTOR IL-10RB

### 4.1. LA AUSENCIA DEL DOMINIO WDD RALENTIZA LA ENDOCITOSIS DEL RECEPTOR IL-10RB Y ALTERA LA COLOCALIZACIÓN CON EL MARCADOR DE ENDOSOMAS TEMPRANOS EEA1

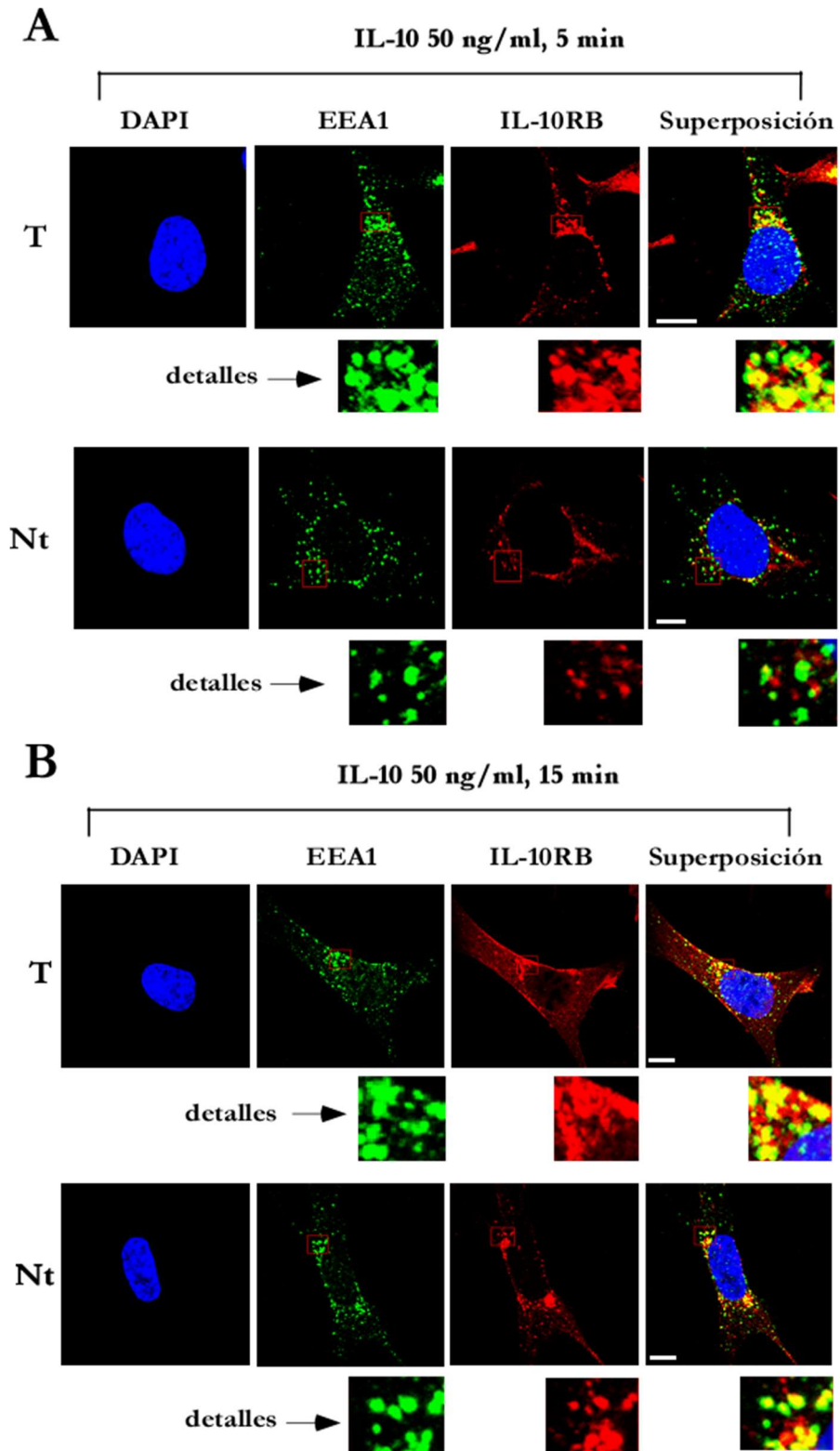
Al objeto de determinar el mecanismo mediante el cual la ausencia del dominio WDD inhibía la señalización mediada por IL-10, se efectuaron un conjunto de ensayos de inmunofluorescencia, destinados a evaluar el tráfico intracelular del receptor en respuesta a IL-10. Tras el marcaje del receptor IL-10RB, se percibieron defectos en la endocitosis de éste en células de la estirpe ATG16L1-Nt (**Figura 36A**), respecto a sus homólogas FL. Esto es, 5 minutos después de la estimulación con IL-10, las células ATG16L1-Nt presentaban únicamente un 25% del total de vesículas de receptor existente en células ATG16L1-FL (**Figura 36A y B**). A pesar de ello, tras 15 minutos de estimulación con la citoquina, el número de vesículas se normalizaba en ambas estirpes, hasta valores prácticamente idénticos (**Figura 36A y B**). Por tanto, la endocitosis de IL-10RB se hallaba alterada en presencia de la versión ATG16L1-Nt. Esto sugería que la ausencia del dominio WDD ocasionaba un retraso en la endocitosis del receptor, al menos durante los primeros minutos de estimulación de la ruta vía IL-10.

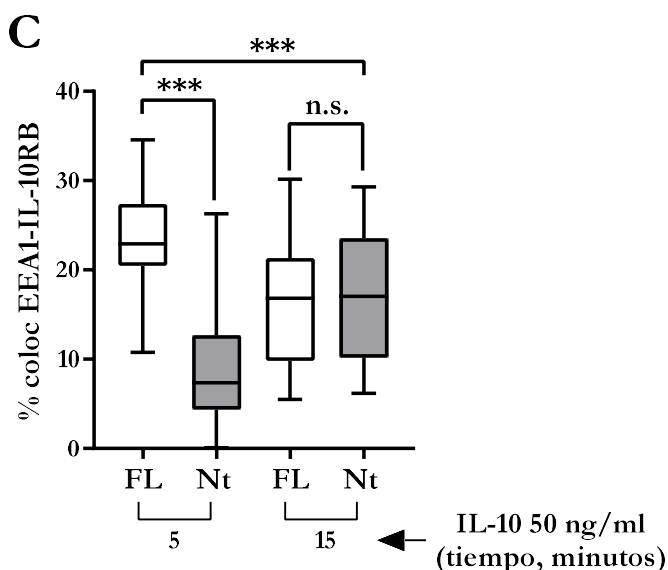




**Figura 36.** Las células de la estirpe ATG16L1-Nt presentan defectos en la endocitosis temprana del receptor. **(A)** La endocitosis del receptor se halla ralentizada en MEFs ATG16L1-Nt respecto a sus homólogos FL, a tiempos tempranos (5 minutos). MEFs ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt se incubaron durante 4 horas en medio con 0.5% de suero y, a continuación, se trataron con 50 ng/ml de IL-10 durante 5 y 15 minutos (en medio con bajo suero). Posteriormente, se procesaron para inmunofluorescencia con un anticuerpo primario anti-flag, que reconoce IL-10RB, y un secundario anti-ratón Cy3. Se seleccionaron imágenes representativas de cada fenotipo. En azul se muestra el núcleo teñido con DAPI; en rojo, la señal del receptor. Las barras de escala representan 10  $\mu$ m. **(B)** La cuantificación del número de vesículas refleja el retraso en endocitosis en MEFs ATG16L1-Nt, tras 5 minutos de estimulación con la citoquina. Tras 15 minutos, la endocitosis del receptor se normaliza entre las dos estirpes. Se muestra el número de vesículas cuantificado mediante el software *ImageJ* y la dispersión asociada en forma de box-plot. La línea central representa la mediana (n=27 células, estadístico empleado: prueba t de Student; (\*\*\*) indica p-valor<0,001, (n.s.) indica p-valor>0,05).

Adicionalmente, se testó si la carencia del dominio WDD podía repercutir en el tráfico del receptor a través de la ruta endolisosomal. Esto es, se efectuaron un conjunto de ensayos dirigidos a evaluar la colocalización entre vesículas de receptor y marcadores de la ruta endolisosomal como EEA1, con la finalidad de determinar si existían diferencias en el tráfico intracelular entre ambas estirpes de MEFs. En estos experimentos se detectó una reducción en el número de colocalizaciones IL-10RB-EEA1 en la estirpe ATG16L1-Nt respecto a su homóloga FL, tras 5 minutos de estimulación con la citoquina (**Figura 37A y C**). Este defecto se mantenía al confrontar el número de colocalizaciones detectado





**Figura 37.** El dominio WDD facilita el tráfico a través de la ruta endolisosomal. (A) y (B) El número de colocalizaciones IL-10RB-EEA1 se reduce considerablemente en la estirpe ATG16L1-Nt respecto a su homóloga FL. MEFs ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt se incubaron durante 4 horas en medio con 0.5% de suero y, a continuación, se trataron con 50 ng/ml de IL-10 durante 5 y 15 minutos, respectivamente (en medio con bajo suero). Posteriormente, se procesaron para inmunofluorescencia con los anticuerpos primarios anti-flag (que reconoce IL-10RB) y anti-EEA1. Finalmente, se efectuó la tinción con los anticuerpos secundarios correspondientes: anti-ratón Cy3 para IL-10RB y anti-conejo Cy5 para EEA1. Se seleccionaron imágenes representativas de cada fenotipo. En azul se muestra el núcleo teñido con DAPI; en rojo, la señal del receptor y en verde, el marcador EEA1. Las barras de escala representan 10  $\mu$ m. (C) Las cuantificaciones efectuadas sobre las imágenes de (A) y (B) reflejan la reducción del número de colocalizaciones en células ATG16L1-Nt respecto a sus homólogas FL. Se adjuntan los porcentajes de colocalización proporcionados por el software LAS X y la dispersión asociada en forma de box-plot. La línea central representa la mediana (n=27 células, estadístico empleado: prueba t de Student; (\*\*\*) indica p-valor<0,001; (n.s.) indica p-valor>0,05).

en células de la estirpe ATG16L1-FL tras 5 minutos de estimulación *versus* el número de colocalizaciones en MEFs ATG16L1-Nt después de 15 minutos de inducción con la citoquina (Figuras 37 A, B y C). Los datos de endocitosis del receptor (Figura 36) sugerían que, en estos puntos temporales, las vesículas de receptor detectadas en cada estirpe se encontrarían en un estadio similar.

## RESULTADOS. CAPÍTULO 3

Por tanto, la comparativa establecida entre las estirpes FL y Nt, permitió detectar un defecto en el número de vesículas de receptor en endosomas tempranos, observado en ausencia del dominio WDD (**Figura 37**). Esto es, el número de colocalizaciones IL-10RB-EEA1 era significativamente inferior en células de la estirpe ATG16L1-Nt (**Figura 37C**). La cuantificación efectuada confirmaba las observaciones realizadas visualmente sobre las imágenes obtenidas (**Figura 37A y B**).

Los datos derivados de los ensayos de colocalización apuntaban a un mecanismo en el que el dominio WDD facilitaría el tráfico a través de la ruta endolisosomal. Este fenómeno resultó ciertamente relevante, puesto que los endosomas, además de participar en el transporte de receptores, pueden actuar como plataformas de señalización para diversos receptores celulares (véase *Capítulo 3 en Discusión*)<sup>222</sup>. Este mecanismo explicaría, además, el impacto observado en señalización.

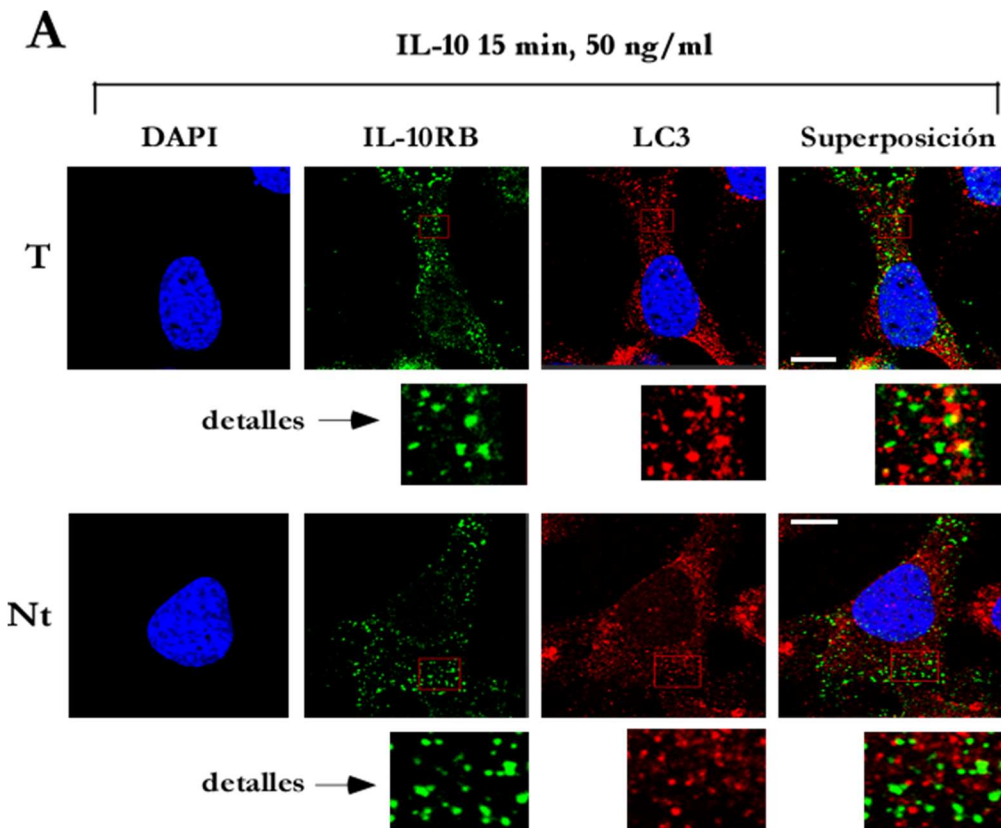
### 4.2. LA AUSENCIA DEL DOMINIO WDD REDUCE EL MARCAJE DE LAS VESÍCULAS DE RECEPTOR IL-10RB CON LC3

Finalmente, se evaluó la magnitud del marcaje con LC3 en las vesículas del receptor. Por analogía con TMEM59, se podía predecir que una mayor eficiencia en el marcaje con LC3 alterase el tráfico del receptor, dirigiéndolo más eficazmente a degradación lisosomal y, consecuentemente, dando lugar a una finalización temprana de la señalización<sup>156</sup>.

Transcurridos 15 minutos desde la estimulación con la citoquina, se detectaba una notoria y significativa diferencia en el número de colocalizaciones IL-10RB-LC3 entre las estirpes ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt, cayendo aproximadamente a la mitad en células carentes del dominio WDD (**Figura 38A y C**). Pese a la significativa diferencia existente entre ambas estirpes celulares, el número de colocalizaciones detectado era muy reducido (**Figura 38C**). Por tanto, se repitió el ensayo en presencia de un inhibidor lisosomal (bafilomicina A<sub>1</sub>), alargando el tiempo de tratamiento hasta las 2 horas. El ensayo efectuado en las condiciones descritas (**Figura 38B**) magnificó las observaciones realizadas a 15 minutos (**Figura 38A**), con un incremento ostensible en el número de colocalizaciones que facilitaba la visualización del fenotipo descrito (**Figura 38C**). Los

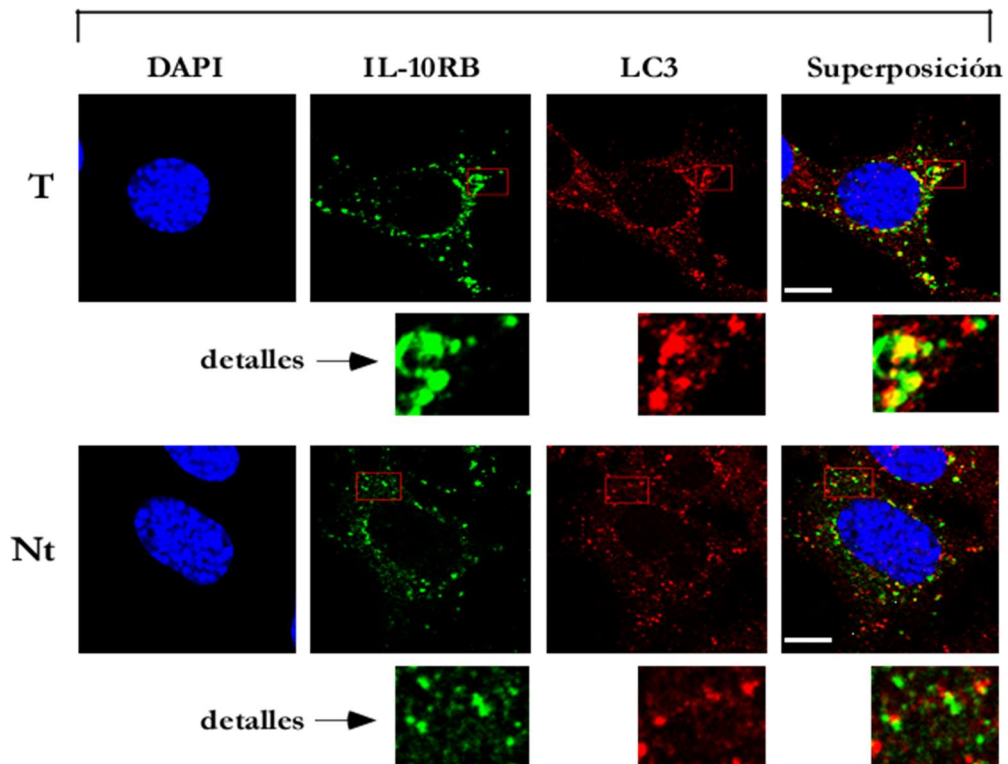
efectos biológicos de la bafilomicina A<sub>1</sub> se describen en el apartado 2. *La ausencia de A20 altera el flujo autofágico normal en el Capítulo 1 de Resultados.*

Como se señalaba anteriormente, en el caso de TMEM59, el marcaje con LC3 de las propias vesículas en las que se localiza esta molécula provoca una fusión más eficiente con el compartimento lisosomal<sup>156</sup>. Sin embargo, en este caso, un incremento del marcaje con LC3 de las vesículas de receptor IL-10RB (en células ATG16L1-FL), prolonga la señalización en respuesta a IL-10. Estos datos sugieren que, en este contexto en particular, el marcaje con LC3 no tendría una finalidad degradativa, puesto que ello determinaría una finalización temprana de la señalización, sino que podría ejercer su impacto sobre el correcto acceso del receptor a los compartimentos señalizadores pertinentes. E incluso podría ser que, en este caso en particular, LC3 fuese completamente irrelevante, y el fenotipo observado estuviese regido exclusivamente por la actividad de ATG16L1.

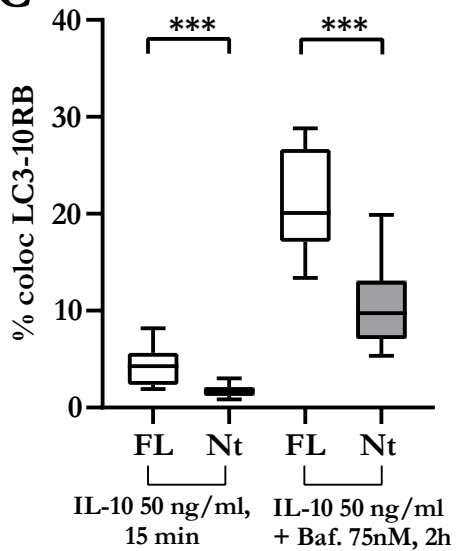


**B**

Baf. 75 nM + IL-10 50 ng/ml, 2 h



**C**





**Figura 38. El dominio WDD promueve el marcaje de las vesículas de receptor IL-10RB con LC3. (A) y (B) El número de colocalizaciones LC3-IL10RB se reduce en células carentes del dominio WDD (ATG16L1-Nt). Este fenotipo resulta más ostensible a tiempos largos (2 h), tras el tratamiento con el inhibidor lisosomal bafilomicina A<sub>1</sub> en combinación con IL-10.** MEFs ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt se incubaron durante 4 horas en medio con 0.5% de suero y, a continuación, se trataron con 50 ng/ml de IL-10 durante 15 minutos o la combinación 50 ng/ml de IL-10 y 75 nM de bafilomicina A<sub>1</sub> durante 2 horas (en medio con bajo suero), respectivamente. La bafilomicina A<sub>1</sub> se añadió a las células en cultivo 10 minutos antes que la citoquina. Posteriormente, se procesaron para inmunofluorescencia con los anticuerpos primarios anti-flag (que reconoce IL-10RB) y anti-LC3. Finalmente, se efectuó la tinción con los anticuerpos secundarios correspondientes: anti-conejo Cy5 para IL-10RB y anti-ratón Cy3 para anti-LC3. Se seleccionaron imágenes representativas de cada fenotipo. En azul se muestra el núcleo teñido con DAPI; en verde, la señal del receptor y en rojo, el marcador autofágico LC3. Las barras de escala representan 10 µm.

**(C) Las cuantificaciones efectuadas sobre (A) y (B) reflejan la reducción en el número de colocalizaciones LC3-IL-10RB en ausencia del dominio WDD.** Se muestran los porcentajes de colocalización proporcionados por el software LAS X y la dispersión asociada en forma de box-plot. La línea central representa la mediana (n=12 células para 15 minutos de tratamiento; n=20 células para 2 horas de tratamiento, estadístico empleado: prueba t de Student; (\*\*\*) indica p-valor<0,001).



---

## CAPÍTULO 4

El dominio WDD de ATG16L1 participa en la regulación  
de la señal antiinflamatoria en células THP1

### 1. CÉLULAS MONOCÍTICAS THP1 DEFICIENTES EN EL DOMINIO WDD RECAPITULAN LOS DEFECTOS EN ACTIVACIÓN DE STAT3 DESCRITOS EN MEFs

#### 1.1. GENERACIÓN DE CÉLULAS THP1 ATG16L1-FL Y ATG16L1-NT

La evaluación de los efectos que el dominio WDD ejerce sobre la señalización en respuesta a IL-10, se realizó adicionalmente en la estirpe de monocitos THP1. Al tratarse de un sistema celular susceptible a IL-10 de forma natural, no se requirió la transducción exógena de los receptores IL-10RA e IL-10RB, sino que se estudió el comportamiento de los receptores endógenos en respuesta a IL-10. Por tanto, únicamente fue necesario manipular las células con la finalidad de expresar la versión ATG16L1-Nt (1-299), que no existe en circunstancias fisiológicas.

En este caso, se transdujeron células THP1 WT (denominadas FL en las subsiguientes figuras) con un plásmido lenti-CRISPR-Cas9 (CRISPRV2-hΔWD 1025, véase *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*). La guía incorporada al plásmido se había diseñado con el objetivo de eliminar la región correspondiente al dominio WDD. Sin embargo, esta aproximación eliminó por completo la expresión de ATG16L1 (**Figura 39A**), por lo que esta estirpe recibió la denominación de “-“. Se requirió, por tanto, una transducción retroviral convencional al objeto de restaurar la expresión del dominio Nt (**Figura 39A**). La línea celular generada como resultado de esta transducción retroviral se denominó “Nt”. Asimismo, se deletionó ATG16L1 completo, empleando un plásmido que incorporaba una guía diseñada para eliminar la totalidad de la expresión de la molécula (CRISPRV2-hATG16L1(78-97), véase *Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR*), **Figura 39A**), si bien estas células no fueron empleadas en los ensayos descritos este capítulo.

En cuanto a la estirpe que expresaba ATG16L1-FL, se optó por mantener los niveles endógenos de la molécula. Esto es, las células ATG16L1-FL fueron transducidas lentiviralmente con un plásmido lenti-CRISPR-Cas9-Control, que carecía de diana en el genoma de THP1 (**Figura 39A**). Por tanto, la estirpe ATG16L1-FL era homóloga a THP1 WT. De esta forma, se lograba incrementar los niveles de expresión del dominio

Nt (transducido retroviralmente) y normalizarlos respecto a los niveles de expresión de ATG16L1-FL (**Figura 39A**). Esta normalización no habría sido posible si ambas estirpes hubiesen sido transducidas retroviralmente (véase apartado 1.1. *Generación de MEFs respondedores a IL-10* en el *Capítulo 3 de Resultados*). Por tanto, dicha aproximación pretendía superar los interrogantes suscitados acerca de los efectos funcionales que una menor expresión del dominio Nt podría originar en MEFs. De esta forma, la equiparación de los niveles de expresión de ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt (**Figura 39A**) excluía cualquier posibilidad de que una leve diferencia de expresión entre ambas versiones de ATG16L1 repercutiese funcionalmente en el sistema.

La caracterización inicial del sistema corroboró que los niveles inducción de LC3 y degradación de p62 eran comparables entre las estirpes de THP1 ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt (**Figura 39A**).

### **1.2. LAS ESTIRPES DE THP1, ATG16L1-FL Y ATG16L1-NT, RECUPERAN AUTOFAGIA BASAL DE FORMA COMPARABLE TRAS EL TRATAMIENTO CON INHIBIDORES LISOSOMALES**

Como se ha descrito en el anterior apartado, las estirpes ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt presentaban similares niveles lipidación de LC3 y degradación de p62. Para corroborar dicha observación, se trataron ambas líneas celulares (así como la estirpe control deficiente en *ATG16L1*) con el inhibidor lisosomal bafilomicina A<sub>1</sub>. El bloqueo lisosomal reflejó la existencia de prácticamente idénticos niveles de acumulación de LC3-II y de degradación de p62 entre ambas estirpes (**Figura 39B**).

Estos resultados confirmaban que la presencia de la región N-terminal de ATG16L1 era suficiente para un desarrollo normal de la autofagia basal, con independencia de la presencia o conexión con el dominio WDD.

### **1.3. LAS ESTIRPES DE THP1, ATG16L1-FL Y ATG16L1-NT, EXPRESAN IDÉNTICA CANTIDAD DE RECEPTORES IL-10RA E IL-10RB**

Finalmente, se requirió confirmar que ambas estirpes expresaban la misma cantidad de receptores IL-10RA e IL-10RB. Con la finalidad de inducir susceptibilidad a IL-10, se

## RESULTADOS. CAPÍTULO 4

estimularon las células con forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). El PMA es un éster de forbol con capacidad para, entre otros efectos biológicos, activar PKC (proteína quinasa C). La pre-activación con PMA es esencial para que la línea celular THP1 responda a IL-10. En condiciones de estimulación con PMA, se observaban similares niveles de receptores entre las estirpes ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt (**Figura 39C**), si bien la estirpe deficiente en *ATG16L1* presentaba una expresión considerablemente superior de los receptores A y B de IL-10 (**Figura 39C**). Este fenómeno, de naturaleza desconocida, reproducía las observaciones efectuadas previamente en MEFs (véase apartado 1.2. *Las estirpes de MEFs respondedores a IL-10, ATG16L1 y ATG16L1-Nt, son comparables en niveles de expresión de las moléculas relevantes*, en el *Capítulo 3 de Resultados*). El tratamiento con PMA redujo la tasa de expresión del receptor IL-10RA en las tres estirpes. Este efecto también resultó de entidad desconocida, e hipotéticamente fue catalogado como un evento secundario a la diferenciación de las células THP1 tras la estimulación con PMA. No obstante, dado que el estudio comparativo destinado a evaluar el efecto del dominio WDD en la respuesta a IL-10 debía efectuarse entre las estirpes ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt, este tipo de observaciones carecieron de relevancia en los ensayos funcionales realizados *a posteriori*. Esto es, los niveles de receptores IL-10RA e IL-10RB eran perfectamente comparables entre las líneas celulares FL y Nt tras la estimulación con PMA.

Adicionalmente, las estirpes ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt fueron evaluadas para expresión de receptores en membrana. Nuevamente, con la finalidad de activar los receptores, se efectuó un tratamiento con PMA durante 48 horas. La evaluación de IL-10RA e IL-10RB no mostró cambios significativos en la media de fluorescencia (MF) entre las estirpes FL y Nt (**Figura 39D**). Al tratarse de receptores endógenos, la señal específica en el citofluorograma resultaba reducida, por lo que se consideró que la representación de las medias crudas de fluorescencia reflejaba más fielmente los niveles relativos de expresión entre células de la estirpe FL y Nt.

La información recabada en cuanto a lipidación de LC3 y degradación de p62, niveles de expresión de receptores y exposición de estos en membrana, apuntaba a que las dos estirpes de THP1 generadas, ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt, constituían un sistema adecuado para reproducir los ensayos efectuados en MEFs.

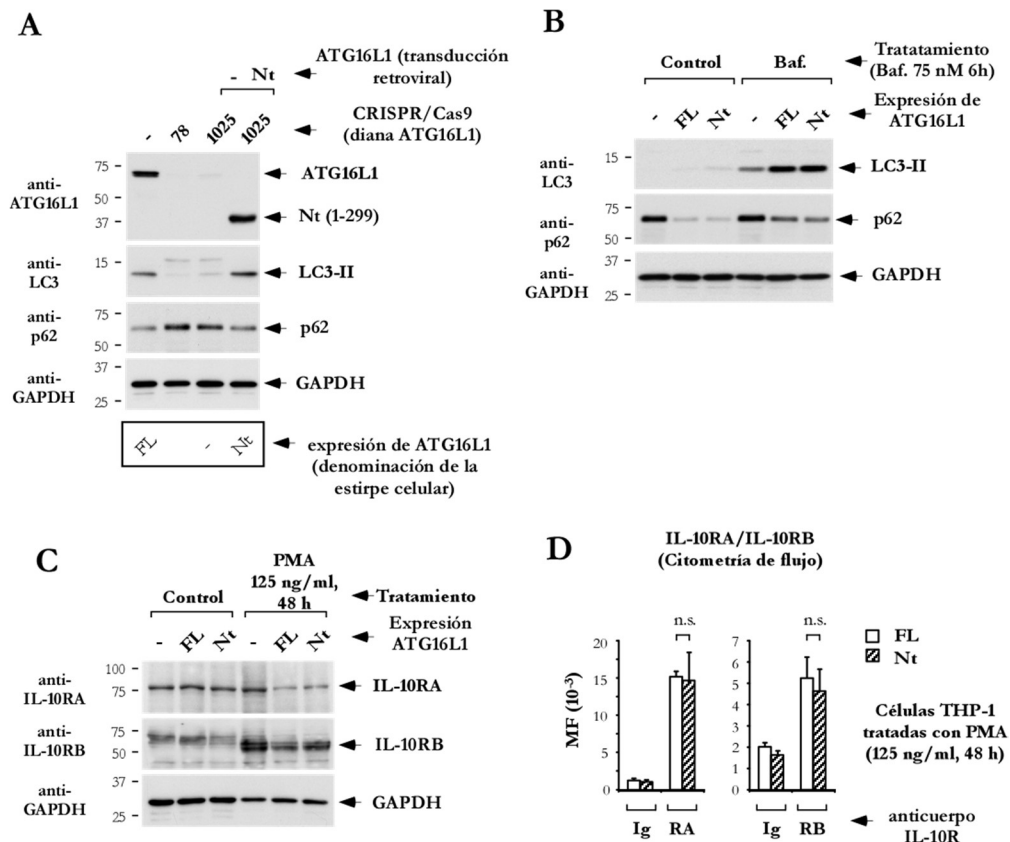


Figura 39. Las estirpes de THP1, ATG16L1-FL Y ATG16L1-Nt, son comparables en niveles de expresión de las moléculas relevantes y recuperación de la autofagia basal. (A) ATG16L1 y el dominio Nt presentan similares niveles de expresión en las estirpes de THP1 generadas, así como análogos ratios de lipidación de LC3 y degradación de p62. Células THP1 se transdujeron lentiviralmente con un plásmido CRISPR-Cas9 que incorporaba las guías Control (FL), hATG16L1 (78-97) (deficientes en *ATG16L1*) y hAWD 1025 (deficientes en *ATG16L1*, -). Éstas últimas se sometieron, posteriormente, a una transducción retroviral para expresión del dominio N-terminal (1-299, Nt). Las cuatro estirpes fueron lisadas y analizadas mediante Western-blot para las moléculas indicadas: ATG16L1, p62 y LC3. (B) Las estirpes de THP1 FL y Nt presentan niveles similares de lipidación de LC3 y degradación de p62 tras el tratamiento con inhibidores de la función lisosomal. THP1 -, FL y Nt se trataron con 75 nM de Baf. durante 6 horas, se lisaron y se analizaron mediante Western-blot para LC3 y p62. (C) Las estirpes de THP1, FL y Nt, expresan niveles similares de receptores tras la estimulación con PMA. THP1 -, FL y Nt se activaron con 125 ng/ml de PMA durante 48 horas, se lisaron y se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican. (D) Los receptores se exponen de forma comparable en membrana, para las estirpes FL y Nt. THP1 FL y Nt se activaron con 125 ng/ml de

## RESULTADOS. CAPÍTULO 4

PMA durante 48 horas y se procesaron mediante citometría de flujo para evaluación de los receptores IL-10RA e IL-10RB. La tinción de cada uno de los receptores se efectuó mediante el correspondiente anticuerpo conjugado con Alexa Fluor® 647, en paralelo con un anticuerpo control del mismo isotipo (denominado Ig). Se muestran los valores de las medias de fluorescencia crudos (MF) y sus desviaciones estándar asociadas, correspondientes a los triplicados efectuados (estadístico empleado: prueba t de Student; (n.s.) indica p-valor>0,05).

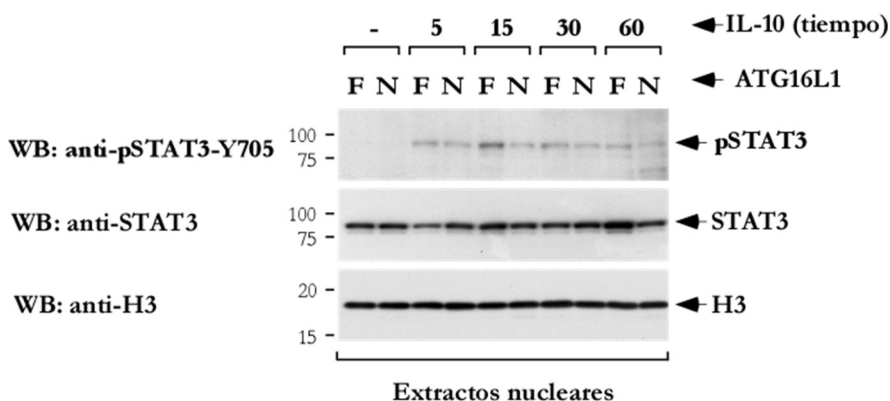
### 2. EL DOMINIO WDD PARTICIPA EN LA ACTIVACIÓN DE STAT3 EN RESPUESTA A IL-10 EN CÉLULAS THP1

Inicialmente, se pretendió reproducir los ensayos de medición de luciferasa efectuados en MEFs, pero no resultó posible hallar las condiciones en las que el reportero multimerizado STAT3x3-LUC generaba una señal detectable y medible. Ni la introducción de diversos elementos del sistema de señalización de respuesta a IL-10, como STAT3 o TYK2 (individual o conjuntamente transducidos), ni la transducción de distintas dosis del reportero permitían detectar estimulación de éste. Por tanto, todos los intentos efectuados resultaron improductivos, por razones de entidad desconocida.

Una vez descartados los ensayos de medición de luciferasa como método de evaluación de la señalización en respuesta a IL-10, se optó por estudiar la fosforilación de STAT3 en ensayos de “pulso y caza”, análogos a los descritos en el apartado 2.2. *El dominio WDD participa en la activación de STAT3 en respuesta a IL-10*, en el *Capítulo 3 de Resultados*. Se efectuó exclusivamente esta modalidad de ensayos puesto que, con anterioridad, se había determinado que resultaba la más idónea en el estudio de un proceso dinámico como el descrito. Se requirió efectuar un pretratamiento de 48 horas con PMA, previo al tratamiento con la citoquina, al objeto de promover la activación de los receptores endógenos. Así, el análisis de la fosforilación de STAT3 en los extractos nucleares de células THP1 ATG16L1-FL (F) y ATG16L1-Nt (N) reveló la existencia de una menor tasa de fosforilación en células carentes del dominio WDD (**Figura 40**). Esta reducción en la fosforilación de STAT3 se observaba ostensiblemente tras 15 y 30 minutos de estimulación con la citoquina, sin existir una concomitante disminución en la abundancia de STAT3 total (**Figura 40**), descartando la existencia de posibles efectos transcripcionales que pudiesen repercutir en la ruta de señalización.



Los datos procedentes de los ensayos realizados en THP1 recapitulaban las observaciones efectuadas en MEFs, en lo que respecta a los defectos existentes en la señalización promovida por IL-10 en ausencia del dominio WDD (**Figura 34**), otorgando validez a la información recabada en el *Capítulo 3*.



**Figura 40. La ausencia del dominio WDD en células THP1 provoca defectos en la activación de STAT3.** Células THP1 ATG16L1-FL (F) y ATG16L1-Nt (N) fueron activadas con 125 ng/ml de PMA durante 48 horas y, a continuación, sometidas a un periodo de incubación de 4 horas en medio con 1% de suero. Posteriormente, se trataron con 50 ng/ml de IL-10 durante 30 minutos, a 4°C. Tras el periodo de tratamiento, se lavaron dos veces con medio de cultivo y se incubaron a 37°C durante los puntos temporales señalados (el medio de cultivo empleado en lavados y periodo de reposo a 37°C contenía 1% de suero). Finalmente, se lisaron a los tiempos indicados y se realizó un fraccionamiento citoplasma vs. núcleo, para ser posteriormente analizadas mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican. Se muestra exclusivamente un Western-blot representativo, correspondiente a los extractos nucleares.

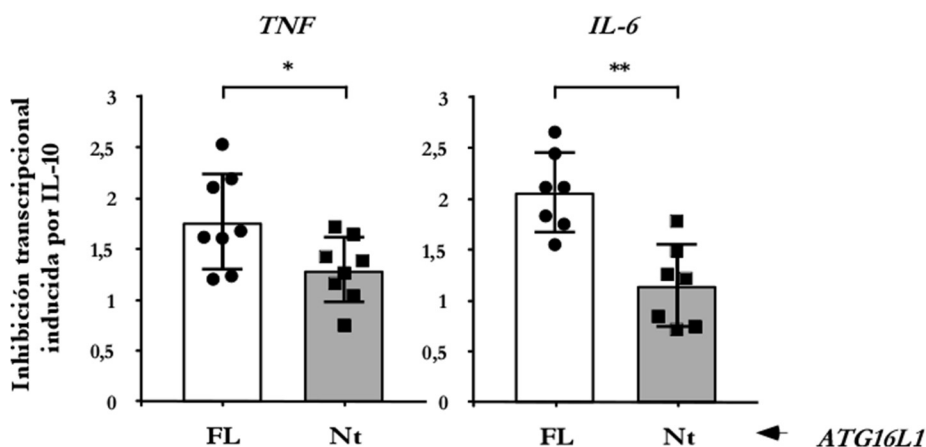
### 3. EL DOMINIO WDD MODULA LA RESPUESTA ANTIINFLAMATORIA MEDIADA POR IL-10

Considerando que la ausencia del dominio WDD reduce el nivel de fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-10 y, consecuentemente, su translocación nuclear, se postuló que probablemente la inducción de genes STAT3-dependientes también se hallase alterada en este contexto. Muchos de estos genes codifican proteínas que participan en el control de la secreción de citoquinas proinflamatorias<sup>177</sup>, modulando su liberación, al objeto de prevenir el desarrollo de una respuesta inflamatoria exacerbada. Por ello, se testó si la carencia del dominio WDD incrementaba la inducción de citoquinas

## RESULTADOS. CAPÍTULO 4

proinflamatorias en ausencia de uno de los posibles mecanismos de control de su producción.

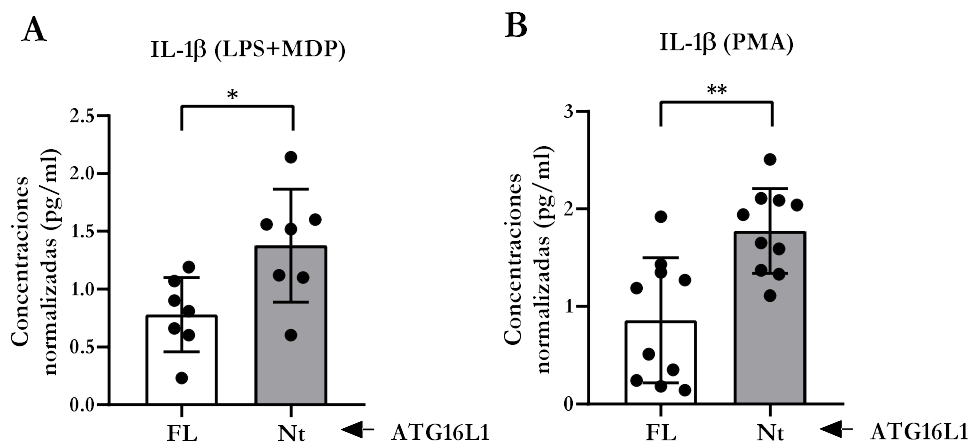
Los ensayos de qPCR reflejaron que, en respuesta a IL-10, las células ATG16L1-FL inhibían más eficazmente la transcripción de los genes que codifican para los mediadores proinflamatorios TNF- $\alpha$  e IL-6, respecto a sus homólogas Nt (**Figura 41**). La estimulación transcripcional de *TNF* e *IL-6* se efectuó mediante un tratamiento con lipopolisacárido (LPS), que activa la respuesta inflamatoria mediante el reconocimiento del receptor TLR4. Estos datos sugerían que el dominio WDD participaba en la modulación de la señalización antiinflamatoria en respuesta a IL-10.



**Figura 41.** El dominio WDD participa en la inhibición transcripcional de los genes *TNF* e *IL-6*, inducida por IL-10 tras el estímulo inflamatorio en forma de LPS. Células THP1 ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt se activaron durante 48 horas en presencia de 125 ng/ml de PMA. A continuación, se cultivaron 5 horas en medio con 1% de suero y se trataron durante 5 horas adicionales con 60 ng/ml de LPS +/- 50 ng/ml de IL-10. IL-10 se añadió 20 minutos antes que LPS. Finalmente, se procesaron para qPCR, normalizando la ratio de inhibición transcripcional de *TNF* e *IL-6* (parte izquierda y derecha, respectivamente) respecto a los genes controles GAPDH y ACTINA. Se muestran los valores medios y desviaciones estándar asociadas a la ratio de inhibición de la inducción transcripcional de ambos genes, para experimentos efectuados por duplicado en diferentes días (n=8 para *TNF*, n=7 para *IL-6*; estadístico empleado: prueba t de Student; (\*) indica p-valor<0.05; (\*\*) indica p-valor<0.01).

Adicionalmente, se efectuaron un conjunto de ensayos de ELISA con la finalidad de evaluar la secreción al medio de otra citoquina inflamatoria clásica, IL-1 $\beta$ . Tal y como se describía en el apartado 12. *Ensayos ELISA en BMDMs y THP1 en Resultados*, IL-1 $\beta$  se

genera como una forma citosólica inactiva de 31 kDa y requiere un procesamiento proteolítico para su activación. Dicho procesamiento se indujo con una combinación de LPS y MDP (muramildipéptido) o un estímulo único en forma de PMA. En ambos casos se detectó una secreción incrementada de esta citoquina en los sobrenadantes de células de la estirpe ATG16L1-Nt (**Figura 42**). Por tanto, los resultados obtenidos sugieren que el dominio WDD participa en la regulación de la secreción de la citoquina proinflamatoria



IL-1 $\beta$ , ejerciendo un efecto inhibitorio sobre la producción de esta.

**Figura 42.** El dominio WDD participa en la regulación de la secreción de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ . Células THP1 ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt se trataron durante 48 horas con 125 ng/ml de PMA. A continuación, se cultivaron durante 24 horas en medio completo (carente de PMA) con LPS 100 ng/ml y MDP 10 ng/ml o PMA 50 ng/ml ((**A**) y (**B**), respectivamente) +/- 50 ng/ml de IL-10. Se muestran las concentraciones de IL-1 $\beta$  en el sobrenadante, normalizadas respecto a la inducción mediada por LPS+MDP o PMA, respectivamente, y considerando la concentración basal (esto es, la concentración representada es el cociente entre concentración de citoquina final/ratio de estimulación por LPS+MDP o PMA). Los experimentos fueron efectuados por duplicado y en diferentes días (n=7 para LPS+MDP, n=10 para PMA; estadístico utilizado: prueba t de Student; (\*) indica p-valor<0.05; (\*\*\*) indica p-valor<0.01).



---

## CAPÍTULO 5

El dominio WDD de ATG16L1 modula la transducción de  
la señal antiinflamatoria en macrófagos

# 1. EL DOMINIO WDD CONTROLA LA TRANSCRIPCIÓN DE GENES REGULADOS POR LA VÍA STAT3, COMO BCL3, EN MACRÓFAGOS DERIVADOS DE LA MÉDULA ÓSEA DE RATÓN (BMDMs)

## 1.1. OBTENCIÓN DE BMDMs Y VERIFICACIÓN DE SU IDENTIDAD

En primer lugar, se implementó en el laboratorio un protocolo para la obtención de macrófagos (M $\phi$ ) de la médula ósea (véase apartado 9. *Ensayos con macrófagos derivados de médula ósea (BMDMs)* en *Materiales y Métodos*). Una vez establecido, se obtuvieron extractos proteicos de macrófagos procedentes ratones WT (FL) y E230 (Nt, carentes del dominio WDD)<sup>162,163</sup> con la finalidad de verificar su identidad. Los Western-blot realizados confirmaron la presencia de las bandas correspondientes a la versión completa de ATG16L1 y a la región Nt (1-230), respectivamente, en cada par de ratones ensayado (**Figura 43A**).

Considerando que el éxito de los ensayos funcionales dependía de la correcta diferenciación de los macrófagos desde la población celular heterogénea procedente de la médula ósea, se efectuó un conjunto de ensayos de citometría de flujo, al objeto de evaluar la presencia de marcadores macrofágicos en membrana tras el periodo de diferenciación. Las células de la médula ósea se cultivaron en presencia de 20 ng/ml del factor M-CSF (véase apartado 1.2. *Condiciones de cultivo celular* en *Materiales y Métodos*), adquiriendo capacidades de adherencia durante la semana de diferenciación. De hecho, el cultivo de estas células generó la aparición de una gran cantidad de material en suspensión, que fue necesario eliminar al objeto de favorecer el crecimiento de las células adheridas (potenciales macrófagos).

Como se mencionaba anteriormente, la adhesión celular no resultó suficiente para confirmar la diferenciación macrofágica, requiriéndose la evaluación de los marcadores CD11b y F4/80 en membrana (véase apartado 10. *Citometría de flujo* en *Materiales y Métodos*). Ambos marcadores son antígenos de superficie que permiten identificar de forma precisa el porcentaje de macrófagos presentes en una población celular.

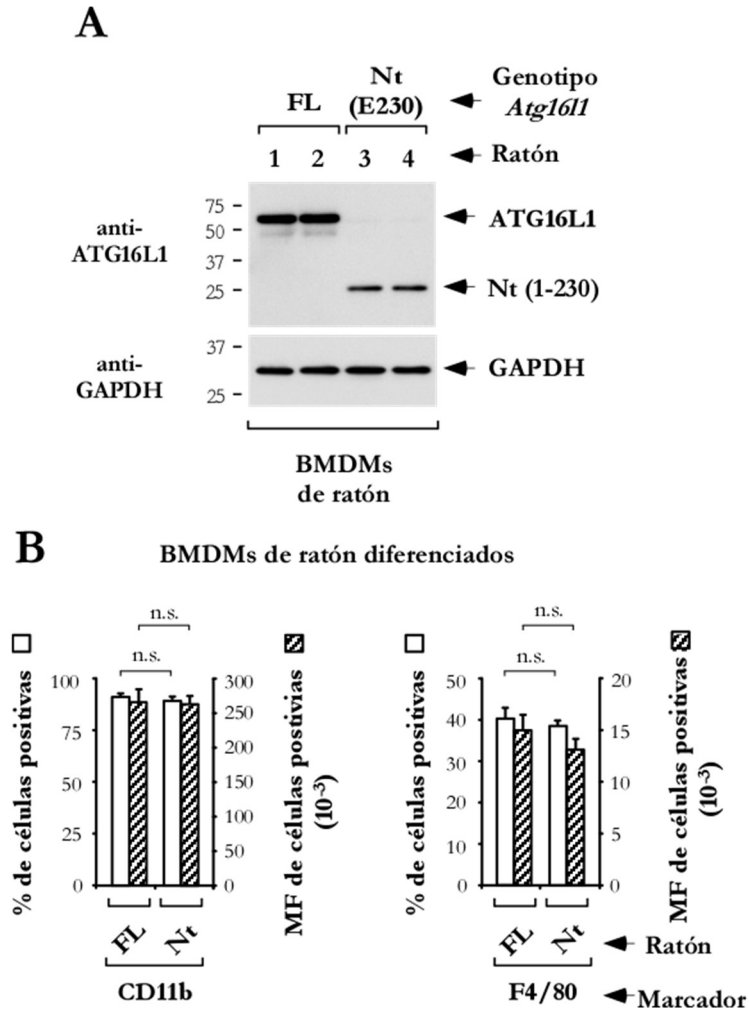


Figura 43. Los ensayos de Western-blot verificaron la identidad de los ratones FL y Nt (E230), que presentaron idéntica capacidad de diferenciación macrofágica. (A) Los ratones Nt (E230) expresan exclusivamente el dominio Nt (1-230) de ATG16L1, mientras que sus homólogos FL expresan la proteína ATG16L1 completa. BMDMs procedentes de ratones FL y Nt se lisaron y procesaron mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican. Se muestran dos ratones representativos de cada genotipo. (B) Las células procedentes de la médula ósea de ratones FL y Nt presentan idéntica capacidad de diferenciación macrofágica. BMDMs de ratones FL y Nt se diferenciaron durante una semana en presencia de 20 ng/ml del factor humano recombinante M-CSF. A continuación, se procesaron para citometría de flujo. Se efectuó la tinción de cada uno de los marcadores (CD11b y F4/80) con su correspondiente anticuerpo conjugado con BB515® o Alexa Fluor® 647 (respectivamente), en paralelo con un anticuerpo control del mismo isotipo. Se muestran los valores medios de porcentaje de células positivas y media de fluorescencia y sus desviaciones estándar asociadas, correspondientes a los triplicados efectuados (estadístico empleado: prueba t de Student; (n.s.) indica p-valor>0,05).

## RESULTADOS. CAPÍTULO 5

La tinción de los dos marcadores en las estirpes FL y Nt permitió corroborar que ambas se diferenciaban a células CD11b y F4/80 positivas de forma prácticamente idéntica, tanto en lo que respecta a porcentaje de células positivas para cada marcador, como a media de fluorescencia (**Figura 43B**). Aunque no se adjunta en la **Figura 43B**, el uso de un anticuerpo control del mismo isotipo permitió confirmar la especificidad de la tinción. Curiosamente, el porcentaje de células positivas se encontraba próximo al 90% para el marcador CD11b y apenas alcanzaba el 40% en el caso de F4/80 (**Figura 43B**). Cabe mencionar que, pese al extendido uso del marcador F4/80 en los paneles de diferenciación macrofágica, la tinción independiente de F4/80 no es la idónea para la caracterización de macrófagos, puesto que otros tipos celulares, como monocitos y eosinófilos, expresan este mismo marcador. A causa de este hecho, resultó difícil definir las regiones del citofluorograma correspondientes a los macrófagos F4/80 positivos, más aún, considerando que las tinciones para CD11b y F4/80 se habían efectuado simultánea pero independientemente. En cualquier caso, la información recabada mediante citometría de flujo confirmaba que las células de la médula ósea procedentes de ratones carentes del dominio WDD se diferenciaban correctamente a macrófagos en presencia del factor M-CSF.

Una vez corroborada la identidad de los animales y la idéntica capacidad de diferenciación macrofágica en ambas estirpes de ratones, se iniciaron los ensayos dirigidos a la detección de posibles divergencias funcionales entre los mismos.

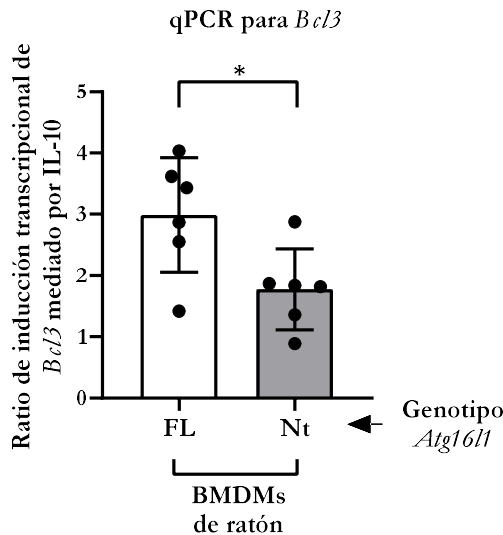
### **1.2. LA AUSENCIA DEL DOMINIO WDD REPERCUTE FUNCIONALMENTE SOBRE LA INDUCCIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES STAT3-DEPENDIENTES**

El primer ensayo funcional efectuado en macrófagos se destinó a la evaluación de la actividad transcripcional de genes directamente regulados por la vía STAT3. Con este objetivo, los macrófagos diferenciados se mantuvieron en medio de cultivo completo durante 16 horas (etapa de reposo) y, a continuación, se cultivaron durante 4 horas en medio con bajo porcentaje de suero (1%). Finalmente, se estimularon durante 5 horas con IL-10, al objeto de inducir la expresión de genes STAT3-dependientes.



Una vez concluido el periodo de inducción, se evaluó mediante PCR cuantitativa la ratio de transcripción de los genes de interés. Pese a que *Sox3* es una de las dianas más relevantes en la vía de STAT3, no fue posible detectar su inducción transcripcional en ninguna de las condiciones (dosis y tiempos) ensayados. Sin embargo, *Bcl3*, otra de sus principales dianas, se inducía transcripcionalmente tras la incubación con IL-10. De hecho, la estimulación transcripcional era significativamente diferente en macrófagos procedentes de ratones FL y Nt. En ausencia del dominio WDD, la ratio de inducción transcripcional de *Bcl3* se reducía prácticamente a la mitad (**Figura 44**).

Este dato contribuía a confirmar la participación del dominio WDD en la vía de señalización inducida por IL-10. De hecho, reproducía, en un ensayo metodológicamente diferente, las observaciones efectuadas en MEFs y THP1 respecto a la implicación del dominio WDD en la transducción de la señal intracelular en respuesta a IL-10.



**Figura 44.** La ausencia del dominio WDD inhibe la activación transcripcional de genes STAT3-dependientes. BMDMs de ratones FL y Nt fueron diferenciados durante una semana en medio DMEM completo, suplementado con 20 ng/ml del factor humano recombinante M-CSF. Tras un periodo de reposo de 16 horas en medio de cultivo completo carente del factor M-CSF, se cultivaron durante 5 horas en medio de cultivo con 1% de suero. Finalmente, se incubaron en presencia de 50 ng/ml de IL-10 murina durante 4 horas y se procesaron para qPCR. La ratio de inducción transcripcional de *Bcl3* se normalizó respecto a los genes controles *GAPDH* y *ACTINA*. Se muestran los valores medios de la ratio de inducción transcripcional de *Bcl3* y sus desviaciones estándar asociadas (n=6, estadístico empleado: prueba t de Student; (\*) indica p-valor<0,05).

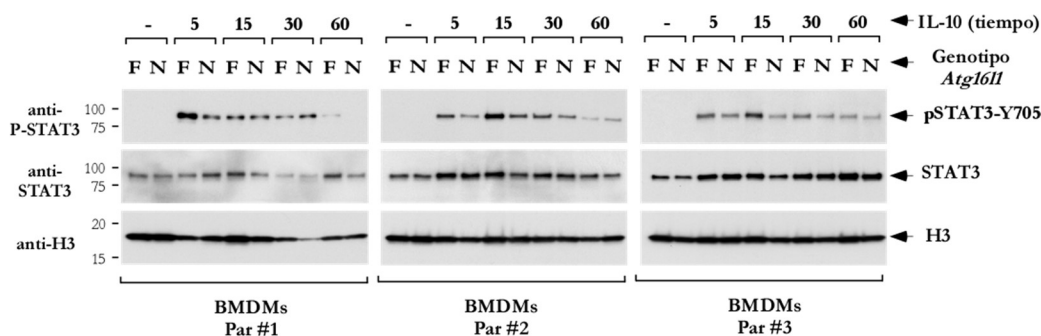
### 2. LA AUSENCIA DEL DOMINIO WDD ALTERA LA ACTIVACIÓN DE STAT3 EN BMDMs

Como se ha descrito en el anterior apartado, la activación transcripcional de *Bcl3* se halla alterada en ratones carentes del dominio WDD (Nt), respecto a sus homólogos FL. Al tratarse de un gen STAT3-dependiente, se postuló que los defectos observados en la activación transcripcional de éste podían originarse a consecuencia de una alteración en la fosforilación de STAT3. En MEFs y THP1 se habían detectado, previamente, alteraciones en la activación de STAT3 en ausencia del dominio WDD (*Capítulos 3 y 4*, respectivamente), por lo que este fenómeno podría reproducirse en los macrófagos derivados de ratones Nt. La deficiente fosforilación de STAT3 repercutiría sobre su capacidad de translocación al núcleo. Consecuentemente, las alteraciones en la translocación nuclear se traducirían en cambios en la activación transcripcional de sus genes diana, como *Bcl3*.

Con la finalidad de evaluar comparativamente la activación de STAT3 entre ambas estirpes de ratones, los macrófagos diferenciados se cultivaron durante 16 horas en ausencia del factor M-CSF. A continuación, se incubaron en medio con 1% de suero durante 4 horas, y se sometieron a un ensayo de “pulso y caza”, lisando las células a los tiempos indicados (**Figura 45**).

Las tres parejas de ratones mostradas (3 FL y 3 Nt) se asociaron de forma completamente arbitraria (**Figura 45**). En los tres casos se observó una reducción de la fosforilación de STAT3-Y705 (y, consecuentemente, una menor translocación nuclear de STAT3) en los extractos nucleares de células procedentes de ratones Nt (**Figura 45**). Este fenómeno de disminución de la fosforilación de STAT3 se solidificó dada la inexistencia de cambios correlativos en la expresión de STAT3 total (**Figura 45**). Esto es, el fenotipo descrito no podía atribuirse a alteraciones transcripcionales. La **Figura 45** incluye exclusivamente los Western-blot procedentes de los extractos nucleares, al tratarse del compartimento de interés en la evaluación de la fosforilación de STAT3, y dado la mayor dificultad para visualizar este fenómeno en el citoplasma.

Las alteraciones detectadas en la fosforilación de STAT3 eran coherentes con los datos obtenidos en MEFs y THP1. Además, los defectos existentes en la activación de STAT3 y en la inducción transcripcional de genes STAT3-dependientes en ausencia de dominio WDD, apuntaban a una contribución de éste a la modulación de la respuesta antiinflamatoria mediada por IL-10, a través de la estimulación transcripcional de sus genes diana, como *Bcl3*.



**Figura 45. La carencia del dominio WDD reduce la fosforilación de STAT3 en BMDMs.** BMDMs de ratones FL (F) y Nt (N) fueron diferenciados durante una semana en medio completo suplementado con 20 ng/ml del factor humano recombinante M-CSF. Tras un periodo de reposo de 16 horas en medio de cultivo completo carente del factor M-CSF, se cultivaron durante 5 horas en medio con 1% de suero. A continuación, se efectuó un ensayo de “pulso y caza”, incubando las células en presencia de 40 ng/ml de IL-10 murina, durante 30 minutos y a 4°C (en medio de cultivo con 1% de suero). Tras la incubación, las células se lavaron, al objeto de eliminar la citoquina, y se mantuvieron en un incubador a 37°C, lisándose a los tiempos indicados (el medio de cultivo para los lavados y para la incubación a 37°C incorporó 1% de suero). Durante la lisis, se efectuó un fraccionamiento núcleo vs. citoplasma y los extractos proteicos se procesaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados. Se muestran exclusivamente los Western-blot correspondientes a los extractos nucleares. Cada par de ratones fue emparejado de forma completamente arbitraria.

### 3. LA AUSENCIA DEL DOMINIO WDD ALTERA LA SEÑALIZACIÓN ANTIINFLAMATORIA MEDIADA POR IL-10

Según lo descrito en el apartado 6.3.1. *Estructura y función de IL-10* en *Introducción*, STAT3, una vez fosforilado, se transloca al núcleo, dónde induce genes STAT3-dependientes, como *BCL3*. Estos genes participan en el control de la secreción de citoquinas proinflamatorias como INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ <sup>177</sup>. Así, *BCL3* interfiere

## RESULTADOS. CAPÍTULO 5

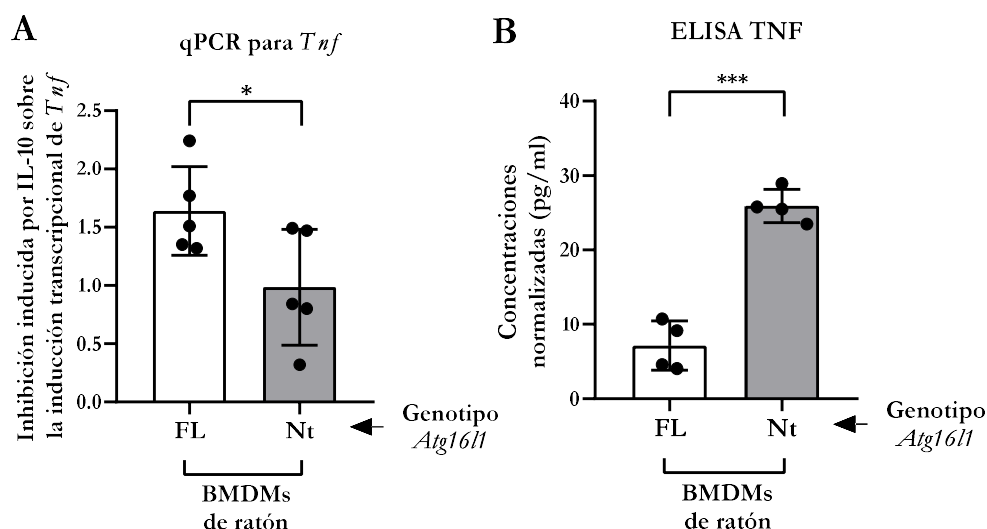
en la capacidad de la ruta NF- $\kappa$ B para interactuar con el DNA mediante el reclutamiento de la histona deacetilasa HDAC1, inhibiendo finalmente la producción de TNF- $\alpha$ <sup>181</sup>.

Considerando los defectos observados en la inducción transcripcional de *Bcl3* en macrófagos carentes del dominio WDD (**Figura 44**), se podría predecir que estas alteraciones redundarían en una reducida capacidad de BCL3 para interferir en la ruta NF- $\kappa$ B y controlar, así, la producción de mediadores inflamatorios como TNF- $\alpha$ . Por tanto, se efectuaron un conjunto de ensayos destinados a evaluar del potencial efecto que la ausencia del dominio WDD ejercería sobre la actividad antiinflamatoria mediada por IL-10 en macrófagos.

En estos experimentos, macrófagos diferenciados procedentes de ratones FL y Nt fueron tratados con LPS, que estimula la respuesta inflamatoria. Al igual que en THP1, los puntos tratados exclusivamente con LPS actuaron como control de la inducción inflamatoria, esto es, como comparativa respecto a las condiciones a las que adicionalmente se añadió IL-10. De esta forma, se pudo evaluar la capacidad de la citoquina para inhibir la activación transcripcional de mediadores inflamatorios en cada estirpe. Los macrófagos procedentes de ratones Nt mostraron una menor capacidad de inhibición de la inducción transcripcional de *Tnf* respecto a sus homólogos FL (**Figura 46A**). Esto es, en ausencia del dominio WDD, la citoquina presentaba escasa capacidad de inhibición de la respuesta inflamatoria evaluada en base a la inducción transcripcional de *Tnf*.

Adicionalmente, se analizaron los sobrenadantes de macrófagos procedentes de ratones FL y Nt, al objeto de medir la secreción de TNF- $\alpha$  al medio de cultivo. Una vez diferenciados, los macrófagos se estimularon con la combinación LPS/MDP e IL-10 (en su caso). Transcurridas 24 horas, se evaluó la secreción de TNF- $\alpha$  al sobrenadante celular mediante ELISA. Los resultados obtenidos reflejaban una incrementada concentración del mediador proinflamatorio en los sobrenadantes de macrófagos Nt (**Figura 46B**). En cualquier caso, cabe mencionar que el número de ratones empleados en estos ensayos de ELISA fue reducido (n=4), por lo que los datos resultantes deben ser interpretados con cautela, y siempre como un complemento a los ensayos de qPCR anteriormente descritos.

En conclusión, la información obtenida en macrófagos contribuye a confirmar la participación del dominio WDD en la transducción de la señal antiinflamatoria mediada por IL-10. Aunque los ratones carentes del dominio WDD no presentan un fenotipo inflamatorio espontáneo<sup>162,163</sup>, una vez estimulados con endotoxinas, sus macrófagos muestran deficiencias en la actividad antiinflamatoria en respuesta a IL-10.



**Figura 46.** La ausencia del dominio WDD altera la respuesta antiinflamatoria mediada por IL-10 en macrófagos. **(A)** Los ensayos de qPCR reflejan un incremento de la tasa de inducción transcripcional de *Tnf* en ratones Nt respecto a sus homólogos FL, en macrófagos estimulados con LPS e IL-10. Células procedentes de la médula ósea de ratones FL y Nt fueron diferenciadas durante una semana en medio de cultivo completo, suplementado con 20 ng/ml del factor humano recombinante M-CSF. Tras un periodo de reposo de 16 horas en medio completo carente del factor M-CSF, se cultivaron durante 5 horas en medio de cultivo con 1% de suero. A continuación, se incubaron durante 6 horas en presencia de 1 ng/ml de LPS +/- 40 ng/ml de IL-10 (en medio con 1% de suero). IL-10 se añadió 20 minutos antes que LPS. Finalmente, se procesaron para qPCR, normalizando la ratio de inhibición transcripcional de *Tnf* respecto a los genes controles *GAPDH* y *ACTINA*. Se muestran los valores medios de la ratio de inhibición de la inducción transcripcional de *Tnf* y sus desviaciones estándar asociadas (n=5, estadístico empleado: prueba t de Student; (\*) indica p-valor<0,05). **(B)** Los ensayos de ELISA muestran un incremento de la concentración de TNF- $\alpha$  en sobrenadantes de macrófagos procedentes de ratones Nt respecto a sus homólogos FL, tras la estimulación con LPS/MDP e IL-10. Células procedentes de la médula ósea fueron diferenciadas durante una semana en medio de cultivo completo, suplementado con 20 ng/ml del factor humano recombinante M-CSF. Tras un periodo de reposo de 16 horas en medio completo carente del factor M-CSF, se estimularon durante 24 horas con 100 ng/ml de LPS y 10 ng/ml de MDP +/- 30 ng/ml de IL-10 en medio de cultivo completo. IL-10 se añadió 20 minutos antes que

## RESULTADOS. CAPÍTULO 5

LPS/MDP. Se muestran las concentraciones de TNF- $\alpha$  en el sobrenadante, normalizadas respecto a la inducción mediada por LPS/MDP y considerando la concentración basal de TNF- $\alpha$  (esto es, la concentración representada es el cociente entre concentración de citoquina final/ratio de estimulación por LPS/MDP). Los experimentos fueron efectuados por duplicado y en diferentes días (n=4; estadístico utilizado: prueba t de Student; (\*\*\*) indica p-valor<0.001).

---

## CAPÍTULO 6

El polimorfismo de riesgo para enfermedad de Crohn  
A300 no impacta en la respuesta antiinflamatoria  
mediada por IL-10

### 1. GENERACIÓN DE LAS ESTIRPES DE MEFs T300 Y A300 PARA SU ANÁLISIS COMPARATIVO

#### 1.1. GENERACIÓN DE MEFs ATG16L1-A300 RESPONDEDORES A IL-10

Los resultados presentados a lo largo de los capítulos 2 a 5 confirmaron que el dominio WDD modula la ruta de señalización antiinflamatoria inducida en respuesta a IL-10. Considerando la proximidad espacial de la posición T300 de ATG16L1 con el dominio WDD y la relevancia del polimorfismo A300 en enfermedad inflamatoria intestinal<sup>167-169</sup>, se postuló que la presencia del alelo de riesgo podría, asimismo, modular la respuesta antiinflamatoria mediada por IL-10. Esto es, la proximidad del polimorfismo de riesgo podría causar algún tipo de alteración estructural en el dominio WDD, que modificase su capacidad de interacción con IL-10RB y, consecuentemente, las actividades biológicas en las que el receptor se halla implicado.

Trabajo previo de nuestro laboratorio había desvelado que la presencia del polimorfismo A300 en ATG16L1 alteraba el tráfico intracelular de la molécula TMEM59, puesto que afectaba a la interacción entre ATG16L1 y el motivo de unión presente en TMEM59. La presencia del polimorfismo de riesgo, en este contexto, provocaba una reducción del flujo autofágico, del tráfico intracelular y de la xenofagia inducida por TMEM59, sin detección de alteraciones en la autofagia convencional. Por analogía del receptor IL-10RB con TMEM59 y, considerando los defectos existentes en respuesta a IL-10 en ausencia del dominio WDD, se propuso evaluar los efectos que el polimorfismo A300 podría ejercer sobre las actividades biológicas de IL-10.

De esta forma, y en paralelo a la producción de MEFs respondedores a IL-10 (véase apartado 1.1. *Generación de MEFs respondedores a IL-10* en el *Capítulo 3 de Resultados*) se generó una estirpe adicional, a partir de MEFs deficientes en *Atg16l1* que habían sido transducidos con el reportero STAT3x3-LUC multimerizado y STAT3. Estas células se recuperaron con un plásmido retroviral que codificaba para ATG16L1-A300 (A300), en paralelo a las restantes estirpes generadas (-, FL y Nt). En el paso final de infección retroviral, los MEFs se transdujeron con los receptores humanos IL-10RA e IL-10RB.



Se adjunta la **Tabla 2** modificada, incorporando la estirpe A300 (**Tabla 3**). Se especifican, nuevamente, las etapas efectuadas en la generación de las estirpes de MEFs empleadas. A partir de este momento, los MEFs ATG16L1-FL (FL) recibieron la denominación de ATG16L1-T (T), al objeto de simplificar la interpretación de los resultados, efectuada por comparación con la estirpe ATG16L1-A (A).

Etapa de transducción/ Estirpe inicial	Etapa #1	Etapa #2	Etapa #3	Etapa #4	Denominación de la estirpe celular
MEFs- <i>Atg16l1</i> <sup>-/-</sup>	STAT3x3-LUC	STAT3	Vacío	IL-10RA-AU+ IL-10RB-flag	-
	STAT3x3-LUC	STAT3	HA-ATG16L1-T300	IL-10RA-AU+ IL-10RB-flag	<b>T (FL)</b>
	STAT3x3-LUC	STAT3	AU-ATG16L1-Nt	IL-10RA-AU+ IL-10RB-flag	<b>Nt</b>
	STAT3x3-LUC	STAT3	HA-ATG16L1-A300	IL-10RA-AU+ IL-10RB-flag	<b>A</b>

**Tabla 3.** Estirpes de MEFs generadas a partir de células deficientes en *Atg16l1*. Incluye la estirpe transducida con ATG16L1-A300. En la tabla se muestran las distintas etapas de transducción efectuadas sobre MEFs-*Atg16l1*<sup>-/-</sup> para generar las estirpes celulares finales (-, T (FL), Nt y A). El plásmido que codifica para IL-10RB-flag porta una secuencia IRES que permite incorporar GFP en una segunda ORF.

## 1.2. LAS ESTIRPES DE MEFs RESPONDEDORES A IL-10, ATG16L1-T Y ATG16L1-A, PRESENTAN NIVELES COMPARABLES DE ATG16L1 Y DE LOS RECEPTORES IL-10RA E IL-10RB

En los ensayos preliminares, se evaluó la expresión de las moléculas ATG16L1 e IL-10RA/B en las líneas celulares producidas. Puesto que estas estirpes habían sido generadas con el objetivo final de evaluar el potencial efecto que, sobre la señalización mediada por IL-10, podría ejercer el polimorfismo de riesgo A300, resultaba fundamental que este sistema expresase, de forma comparable, las moléculas de interés. De esta forma, se descartaba la contribución de diferencias en la expresión de ATG16L1 o IL-10RA/B a los potenciales efectos detectados en ensayos funcionales efectuados posteriormente.

En primer lugar, se corroboró que ambas estirpes presentaban niveles idénticos de la molécula ATG16L1 (**Figura 47A**). Los aminoácidos 296-299 de ATG16L1 constituyen

## RESULTADOS. CAPÍTULO 6

un sitio de corte por caspasa 3. En condiciones de estrés celular, la versión A300 de ATG16L1 se degrada más eficazmente que la versión T300<sup>167</sup>, hecho que implica una reducción generalizada de la autofagia. A esta reducción de la autofagia se asocian defectos en la eliminación de microorganismos, así como una exacerbada respuesta inflamatoria<sup>168</sup>. Sin embargo, en condiciones normales, esto es, en ausencia de un fenómeno de muerte celular que estimule el corte de la versión A300 por caspasa 3, se esperaría que ambas estirpes expresasen ATG16L1 de forma comparable (**Figura 47A**). En este mismo ensayo, se pudo confirmar que los MEFs T y A presentaban niveles similares de lipidación de LC3 y degradación de p62 (**Figura 47A**).

Adicionalmente, los niveles de expresión de los receptores transducidos (IL-10RA e IL-10RB) podían considerarse prácticamente idénticos (**Figura 47B**). Nuevamente, observamos que la ratio de expresión de receptores (especialmente perceptible en el caso de IL-10RA) resultaba superior en el caso de células transducidas con el plásmido no codificante (**Figura 46B**). Este fenómeno, descrito previamente en el apartado 1.2. *Las estirpes de MEFs respondedores a IL-10, ATG16L1-FL y ATG16L1-Nt, son comparables en niveles de expresión de las moléculas relevantes* en el *Capítulo 3 de Resultados*, resultó incorregible. No obstante, los ensayos efectuados posteriormente tenían como finalidad la detección de alteraciones en la señalización medida por IL-10 en presencia del polimorfismo de riesgo A300, hecho por cual no se contempló el estudio de la estirpe transducida con el plásmido no codificante.

Finalmente se corroboró, mediante citometría de flujo, que ambos receptores se exponían comparablemente en la membrana plasmática. Se evaluó nuevamente el porcentaje de células positivas y la media de fluorescencia para IL-10RA e IL-10RB (**Figura 47C**), resultando significativamente no diferentes. El hecho de que ambos receptores se expresasen de forma prácticamente idéntica en la membrana plasmática descartaba una posible implicación del polimorfismo A300 en la maduración de estos.

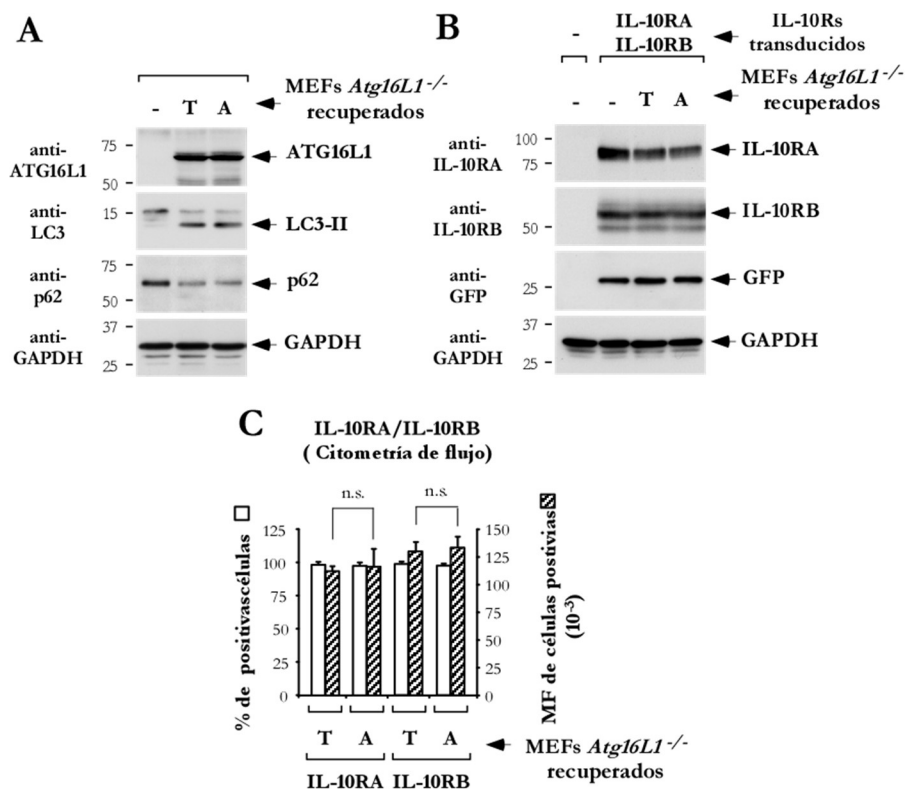


Figura 47. Los MEFs T y A son comparables en niveles de expresión de ATG16L1 e IL10RA/B. (A) Las estirpes T y A presentan idénticos niveles de expresión de ATG16L1, y similares ratios de lipidación de LC3 y degradación de p62. Las tres estirpes (-, T y A) fueron lisadas y analizadas mediante Western-blot para las moléculas indicadas: ATG16L1, p62 y LC3. (B) Los receptores IL-10RA e IL-10RB se expresan comparablemente en las estirpes T y A. Las tres líneas celulares (-, T y A) fueron lisadas y analizadas mediante Western-blot para las moléculas indicadas: IL-10RA, IL-10RB y GFP. (C) Los receptores IL-10RA e IL-10RB se exponen de forma comparable en membrana en las estirpes T y A. Células T y A se cultivaron durante 24 horas y, a continuación, se procesaron mediante citometría de flujo. Cada receptor se tiñó con su correspondiente anticuerpo conjugado con Alexa Fluor® 647, en paralelo con un anticuerpo control. Se muestran los valores medios del porcentaje de células positivas y media de fluorescencia y sus desviaciones estándar asociadas, correspondientes a los triplicados efectuados (estadístico empleado: prueba t de Student; (n.s.) indica p-valor>0,05).

### 1.3. LAS ESTIRPES DE MEFs ATG16L1-T y ATG16L1-A RECUPERAN AUTOFAGIA BASAL E INDUCIDA POR RAPAMICINA DE FORMA COMPARABLE

Las líneas celulares generadas (-, T y A) se trataron con inhibidores lisosomales (bafilomicina A<sub>1</sub> y combinación de E64d/pepstatina A e inductor rapamicina), con la

## RESULTADOS. CAPÍTULO 6

finalidad de evaluar comparativamente su capacidad para recuperar autofagia basal e inducida por rapamicina. Los datos resultantes reflejaron la existencia de una similar lipidación de LC3 y degradación de p62, entre las estirpes T y A (**Figura 48**). Por tanto, y en concordancia con las observaciones efectuadas previamente en el laboratorio<sup>156</sup>, los MEFs T y A recuperaban autofagia convencional de forma prácticamente idéntica. Asimismo, la estirpe transducida con el plásmido no codificante no respondía a ninguno de los inhibidores lisosomales, hecho esperable considerando la esencialidad de ATG16L1 en la ruta autofágica. Los efectos biológicos de los inhibidores lisosomales empleados se describen en los apartados 2. *La ausencia de A20 altera el flujo autofágico normal* y 3.1. *El dominio WDD de ATG16L1 regula la expresión de A20* en el *Capítulo 1 de Resultados* (bafilomicina A<sub>1</sub> y combinación de E64d/pepstatina A, respectivamente) y 3.1. *Las estirpes ATG16L1-FL y ATG16L1-NT recuperan autofagia basal e inducida por rapamicina de forma comparable* en el *Capítulo 3 de Resultados* (rapamicina).

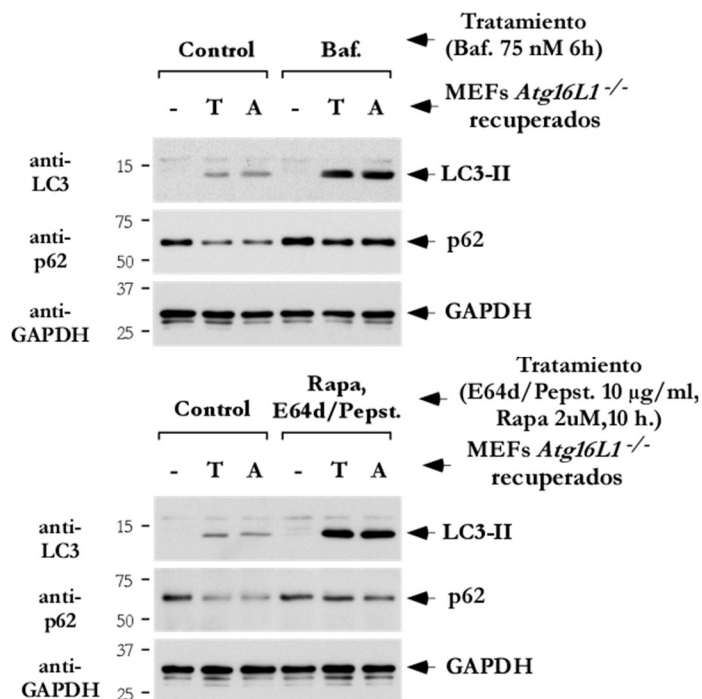
Los datos obtenidos reflejan que, en un contexto celular fisiológico (esto es, en ausencia de un fenómeno de muerte celular), la autofagia convencional se desarrolla normalmente en las estirpes T y A. Por tanto, la presencia del polimorfismo de riesgo no afecta a las funciones básicas de la autofagia, pero podría alterar actividades no convencionales mediadas por el dominio WDD, como ocurre en el caso de TMEM59<sup>156</sup>.

## **2. LA PRESENCIA DEL POLIMORFISMO DE RIESGO A300 EN ATG16L1 NO ALTERA SU CAPACIDAD DE INTERACCIÓN CON EL RECEPTOR IL-10RB**

### **2.1. EL POLIMORFISMO A300 NO MODIFICA LA INTERACCIÓN IL-10RB-ATG16L1 EN ENSAYOS DE SOBREEXPRESIÓN**

Considerando que la interacción entre IL-10RB y ATG16L1 se establece a través del dominio WDD, se postuló que la presencia del polimorfismo A300 podría afectar a dicha unión, tal y como ocurre en el caso de TMEM59. Como se mencionaba previamente, la deficiente unión de TMEM59 a la versión A300 de ATG16L1 provoca alteraciones en el tráfico intracelular y repercute en el fenómeno de xenofagia que participa en la respuesta frente a *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, los ensayos de co-inmunoprecipitación en

condiciones de sobreexpresión de ambas moléculas, no mostraron la existencia de diferencias en la unión tras la transfección de las células HEK-293T con la versión A300 de ATG16L1 (**Figura 49**).



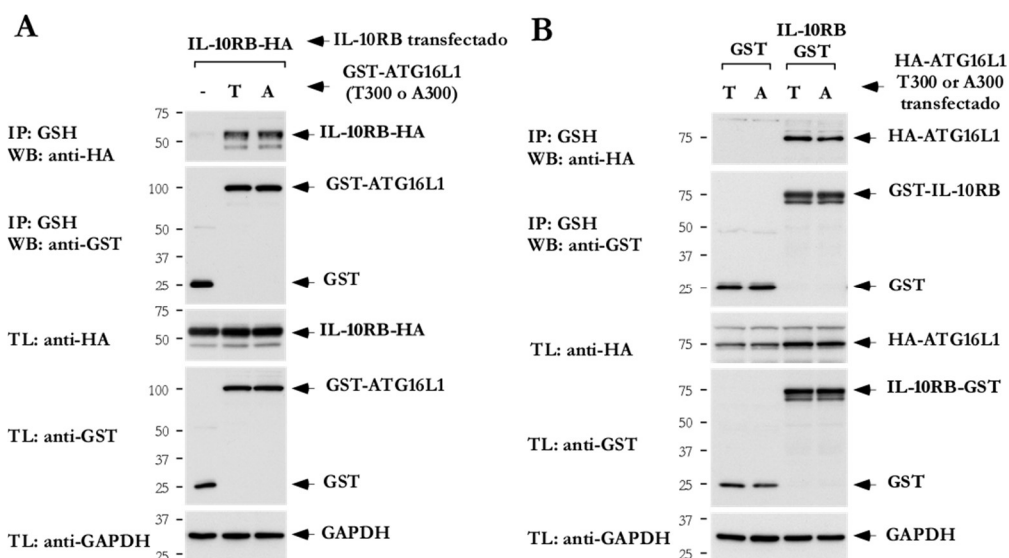
**Figura 48.** Los MEFs ATG16L1-T (T) y ATG16L1-A (A) recuperan autofagia basal e inducida por rapamicina de forma comparable. Las estirpes celulares -, T y A fueron tratadas con bafilomicina A<sub>1</sub> (Baf.; 75 nM durante 6 horas) (A) o E64d/pepstatina A (E64d/Pepst.; 10 µg/ml de cada compuesto durante 10 horas) y rapamicina (Rapa; 2 µM durante 10 horas) (B). Tras un tiempo final de 36 horas, se lisaron y se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados.

Dada la relevancia central de este dato, los ensayos de sobreexpresión se efectuaron en ambas orientaciones. Sobre la base de trabajo previo del laboratorio, se predecía que un potencial defecto en la unión de IL-10RB a ATG16L1-A300 sería sutil<sup>156</sup>, por lo que se postuló que una de las dos orientaciones en las que podía ser efectuada la co-inmunoprecipitación podría ser más precisa en la detección de ligeras variaciones en la unión. Así, en un primer ensayo, se co-transfectaron GST-ATG16L1-T, GST-ATG16L1-A o su control GST e IL-10RB (**Figura 49A**), mientras que, en un segundo ensayo, se co-transfectaron ATG16L1-T o ATG16L1-A y GST o IL-10RB-GST (**Figura 49B**). Sin embargo, en ninguno de los casos se detectaron alteraciones en la capacidad de

## RESULTADOS. CAPÍTULO 6

interacción entre el receptor IL-10RB y las versiones T300 y A300 de ATG16L1 (**Figura 49A y B**).

No obstante, los ensayos de sobreexpresión no resultaban apropiados para la detección de variaciones sutiles como las esperadas. Así, se optó por efectuar una nueva serie de experimentos de co-inmunoprecipitación con la finalidad de evaluar la capacidad de interacción de IL-10RB con ATG16L1 en respuesta a IL-10, puesto que la sobreexpresión de las moléculas relevantes podría enmascarar defectos leves en la unión de IL-10RB a la versión A300 de ATG16L1.



**Figura 49.** El receptor IL-10RB interacciona indistintamente con las versiones T300 o A300 de ATG16L1, en condiciones de sobreexpresión. **(A)** La interacción IL-10RB-ATG16L1 no se altera en presencia del polimorfismo A300. Células HEK-293T se co-transfectaron con GST-ATG16L1-T, GST-ATG16L1-A o su control GST e IL-10RB. A continuación, se lisaron y se sometieron a co-inmunoprecipitación. **(B)** La co-inmunoprecipitación en orientación opuesta a **(A)** no muestra alteraciones en la interacción entre IL-10RB y la versión A300 de ATG16L1. Células HEK-293T se co-transfectaron con ATG16L1-T o ATG16L1-A y GST-IL-10RB o su control GST, se lisaron y se sometieron a co-inmunoprecipitación. En **(A)** y **(B)** la lisis se efectuó 36 horas tras la transfección y la co-inmunoprecipitación se realizó empleando bolas de agarosa fusionadas con GSH (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). Finalmente, se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados.

## 2.2. EL POLIMORFISMO A300 NO ALTERA LA CAPACIDAD DE INTERACCIÓN DE ATG16L1 CON EL RECEPTOR IL-10RB EN REPUESTA A IL-10

Continuando con la argumentación iniciada en el anterior apartado, la incapacidad para detectar alteraciones en la interacción entre IL-10RB y la versión A300 de ATG16L1, podría proceder de una excesiva expresión de ambas moléculas. En este contexto de sobreexpresión, no resultaría posible observar modificaciones sutiles en la interacción IL-10RB-ATG16L1-A300. Por ello, se efectuó un conjunto de experimentos de co-inmunoprecipitación destinados a evaluar la posible interacción diferencial entre IL-10RB y ATG16L1 en sus versiones T300 y A300, en respuesta a IL-10. Estos ensayos se realizaron en las estirpes de MEFs T y A descritas en el apartado 1.1. *Generación de MEFs ATG16L1-A300 respondedores a IL-10* en el Capítulo 6 de Resultados.

Sin embargo, ni la inmunoprecipitación del receptor IL-10RB (**Figura 50A**) ni la de ATG16L1 (**Figura 50B**) reflejó alteraciones en la interacción introducidas por el alelo de riesgo. Por tanto, en presencia de la versión A300 de ATG16L1, no existía una unión diferencial al receptor IL-10RB respecto a la forma WT de ATG16L1.

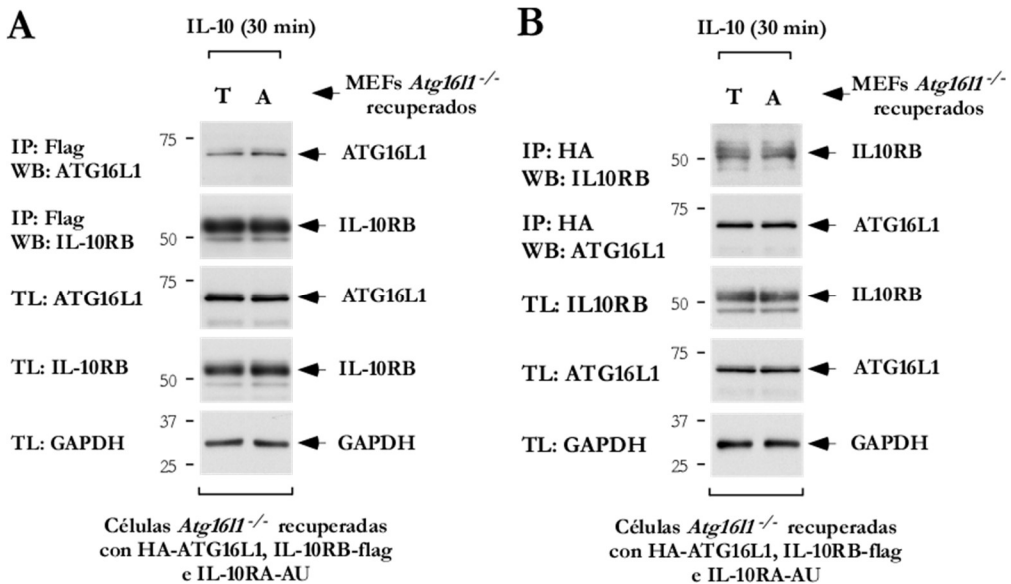


Figura 50. El receptor IL-10RB interacciona indistintamente con las versiones T300 y A300 de ATG16L1 en respuesta a IL-10. (A) La inmunoprecipitación del receptor IL-10RB no refleja

## RESULTADOS. CAPÍTULO 6

**diferencias en los niveles de ATG16L1 T300 y A300 co-inmunoprecipitados.** MEFs ATG16L1-T300 (T) y ATG16L1-A300 (A) cultivados durante 24 horas, fueron tratados con 50 ng/ml de IL-10 durante 30 minutos y procesados para inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-flag de conejo, que reconoce el receptor IL-10RB. Finalmente, se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total). **(B) La inmunoprecipitación de ATG16L1 (T300 o A300) no muestra diferencias en los niveles de receptor IL-10RB co-inmunoprecipitado.** MEFs ATG16L1-T300 (T) y ATG16L1-A300 (A) cultivados durante 24 horas, fueron tratados con 50 ng/ml de IL-10 durante 30 minutos y procesados para inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-HA de conejo. Finalmente, se analizaron mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican (IP: inmunoprecipitación; TL: lisado total).

En cualquier caso, considerando que el impacto del polimorfismo de riesgo podría ser sutil, se realizaron un conjunto de ensayos funcionales análogos a los descritos en los *Capítulos 3 a 5 de Resultados*, con la finalidad de descartar definitivamente la existencia de defectos en la señalización en respuesta a IL-10 originados en presencia del alelo A300 de ATG16L1.

### **3. EL POLIMORFISMO DE RIESGO A300 NO MODULA LA SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR EN RESPUESTA A IL-10**

MEFs de las estirpes T300 (T) y A300 (A) se sometieron a una serie de ensayos de medición de luciferasa con la finalidad de evaluar la señalización desencadenada en respuesta a la citoquina. En paralelo, se incorporó la línea celular de MEFs Nt (N) como control. (véase apartado *1.1. Generación de MEFs respondedores a IL-10* en el *Capítulo 3 de Resultados*). Los datos previos resultantes del análisis comparativo entre la estirpe Nt (N) y su homóloga recuperada con la versión completa de ATG16L1 (T), reflejaron la existencia de evidentes defectos en la señalización en respuesta a IL-10 en ausencia del dominio WDD (**Figura 32**).

Sin embargo, tras el análisis comparativo efectuado entre las estirpes T y A, se pudo concluir que no existían defectos en la señalización en presencia del alelo de riesgo A300 (**Figura 51**). Mientras que las estirpes ATG16L1-T300 (T) y ATG16L1-Nt (N) recapitulaban el fenotipo previamente descrito (esto es, una deficiente transducción de la señal en respuesta a IL-10 en ausencia del dominio WDD), no se detectó ningún efecto diferencial en presencia de la versión A300 de ATG16L1, respecto a su homóloga T300



(Figura 51). Este ensayo se efectuó en diferentes condiciones, tanto en lo que respecta a dosis de citoquina como a tiempos de incubación. En la Figura 51 se muestran las condiciones más favorables para la señalización por IL-10, en las que no se detectaron diferencias entre T y A.

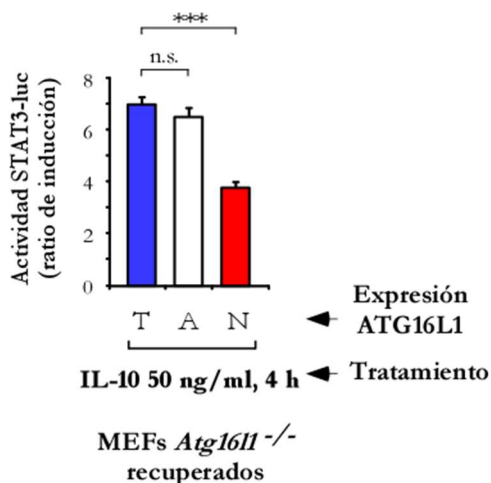


Figura 51. El polimorfismo de riesgo A300 no modifica la transducción de la señal intracelular en respuesta a IL-10. MEFs ATG16L1-T300 (T), ATG16L1-A300 (A) y ATG16L1-Nt (N) se cultivaron durante 16 horas en medio con 0.5% de suero. A continuación, se trataron con 50 ng/ml de IL-10 durante 4 horas (en medio con 0.5% de suero). Finalmente, se lisaron y se midió la actividad luciferasa. Se muestran los valores medios de la ratio de inducción y las desviaciones estándar correspondientes a los triplicados efectuados. Cada punto se calcula respecto al valor medio (estadístico empleado: prueba t de Student; (\*\*\*) indica p-valor<0,001; (n.s.) indica p-valor>0,05).

## 4. EL POLIMORFISMO DE RIESGO A300 NO MODIFICA LA ACTIVACIÓN DE STAT3 EN THP1

### 4.1. GENERACIÓN DE THP1 ATG16L1-T300 (T) Y ATG16L1-A300 (A)

La generación de células THP1 que expresasen ambas versiones de ATG16L1 requirió, inicialmente, la delección de *ATG16L1* en células THP1 WT, empleando un plásmido CRISPR-Cas9 diseñado para eliminar la molécula completa de ATG16L1, CRISPRV2-hATG16L1(78-97) (Figura 39). A continuación, estas células se recuperaron utilizando plásmidos retrovirales que codificaban para las versiones T300 y A300 de ATG16L1. Estos plásmidos habían sido mutagenizados para evitar el corte por la Cas9. Esto es, se había modificado, a nivel de nucleótido, la secuencia diana de la guía

## RESULTADOS. CAPÍTULO 6

introducida previamente (véase apartado 4.8.5. *Sistema de expresión retroviral p12-MMP en Materiales y Métodos*). De esta forma se evitaba que la Cas9 cortase el DNA retroviral exógeno. Esta estrategia permitía que ambos plásmidos se expresaran de forma semejante.

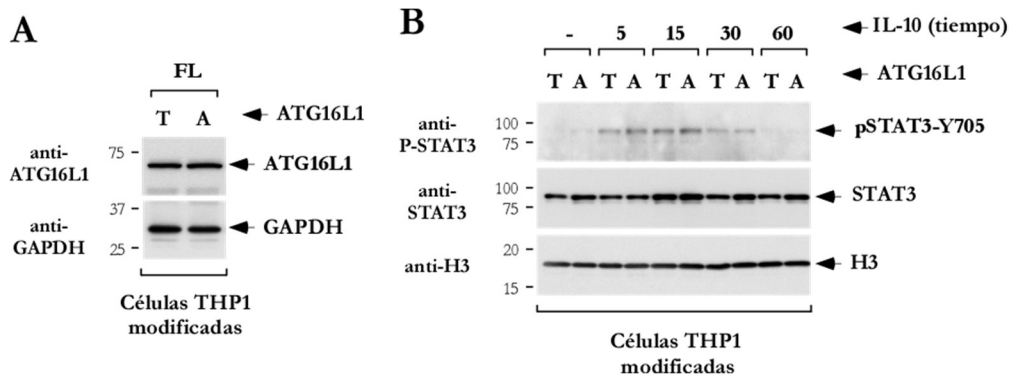
En primer lugar, se corroboró que las células THP1 modificadas eran comparables en cuanto al nivel de expresión de ATG16L1. Efectivamente, los ensayos de Western-blot mostraron que ambas estirpes expresaban ATG16L1 de forma prácticamente idéntica (**Figura 52A**).

### 4.2. EL POLIMORFISMO A300 NO ALTERA LA FOSFORILACIÓN DE STAT3 EN CÉLULAS THP1

La realización de ensayos de “pulso y caza” para la evaluación de la fosforilación de STAT3 en extractos nucleares, no reflejó la existencia de diferencias en la activación de este factor transcripcional en respuesta a IL-10, entre las estirpes T y A (**Figura 52B**). Cabe señalar que, pese al ensayo de diferentes dosis (10, 25, 50, 75 o 100 ng/ml) y tiempos de estimulación (1, 3, 5, 10, 15, 30 y 60 minutos) con la citoquina, no se detectó ninguna diferencia entre las estirpes analizadas, en lo que a activación de STAT3 se refiere.

Por otra parte, y de forma similar a lo descrito para las estirpes testadas en el *Capítulo 4*, no fue posible evaluar la activada luciferasa mediante la estimulación del reportero viral multimerizado STAT3x3-LUC introducido en las líneas T y A. Nuevamente, ninguna de las dosis o tiempos de estimulación con IL-10 ensayados generaba una señal distinguible del basal no estimulado.

Los datos de activación de STAT3 sugerían que no existían diferencias funcionales entre las estirpes de THP1 T y A, esto es, la presencia del alelo A300 no modificaba la fosforilación de STAT3 en células THP1.



**Figura 52.** La presencia del alelo de riesgo A300 no modifica la fosforilación de STAT3 en células THP1. **(A)** Las estirpes de THP1 T y A expresan los mismos niveles de ATG16L1. Células THP1 ATG16L1-T300 (T) y ATG16L1-A300 (A) se lisaron y se procesaron mediante Western-blot con los anticuerpos indicados. FL, del inglés “full-length”, refiere a la molécula completa de ATG16L1. **(B)** El polimorfismo A300 de ATG16L1 no altera la fosforilación de STAT3 en células THP1. Células THP1 ATG16L1-T300 (T) y ATG16L1-A300 (A) se activaron con 125 ng/ml de PMA. Transcurridas 48 horas, se incubaron en medio de cultivo con 1% de suero durante 4 horas y, posteriormente, se trataron con 50 ng/ml de IL-10 durante 30 minutos y 4°C. Tras el periodo de incubación, se eliminó la citoquina mediante dos lavados y se mantuvieron en un incubador a 37°C (el medio empleado en lavados e incubación a 37°C incorporaba, asimismo, 1% de suero). Finalmente, se lisaron a los tiempos señalados y se realizó un fraccionamiento citoplasma *vs.* núcleo, para ser posteriormente analizadas mediante Western-blot con los anticuerpos que se indican. Se adjunta exclusivamente el Western-blot correspondiente a los extractos nucleares. La imagen es representativa del conjunto de ensayos efectuados en diferentes condiciones de dosis y tiempo de estimulación.

## 5. EL POLIMORFISMO DE RIESGO A300 NO ALTERA LA SEÑALIZACIÓN ANTIINFLAMATORIA EN RESPUESTA A IL-10 EN BMDMs

### 5.1. EL POLIMORFISMO A300 NO MODULA LA FOSFORILACIÓN DE STAT3 EN BMDMs

En primer lugar, se obtuvieron macrófagos (M $\phi$ ) de la médula ósea de ratones WT (T) y knock-in para el polimorfismo A300 (A)<sup>168</sup>, al objeto de confirmar que ambas estirpes de animales expresaban los mismos niveles de proteína ATG16L1. Los Western-blot efectuados confirmaron que los niveles de expresión de ATG16L1 eran similares en cada par de ratones ensayado (**Figura 53A**).

## RESULTADOS. CAPÍTULO 6

Una vez confirmado que el protocolo de diferenciación de células de la médula ósea en presencia de M-CSF permitía la obtención de un elevado número de células positivas para los marcadores macrofágicos F4/80 y CD11b (véase *Capítulo 5*), se soslayó el requerimiento de efectuar nuevamente los ensayos de citometría de flujo.

Transcurrido el periodo de diferenciación, los macrófagos de ambas estirpes de ratones se sometieron a un ensayo de “pulso y caza” para evaluar la fosforilación de STAT3. Se emplearon 3 ratones de genotipo T y 3 de genotipo A, que se emparejaron arbitrariamente. Tras la evaluación de los extractos nucleares, se pudo concluir que en ninguno de los 3 pares de ratones testados existían defectos reproducibles en la fosforilación de STAT3 (**Figura 53B**). Las mínimas variaciones observadas podían atribuirse a ligeras modificaciones en los niveles de STAT3 total o incluso a la carga, evaluada mediante la histona H3 (**Figura 53B**). Curiosamente, se observó cierta acumulación de STAT3 total en BMDMs de genotipo A, en diferentes puntos temporales y para las tres parejas de ratones ensayadas (**Figura 53B**). Este hecho sugería la existencia de un efecto transcripcional de entidad desconocida, que provocaba un incremento de los niveles totales de STAT3 en macrófagos de la estirpe A.

### 5.2. EL POLIMORFISMO A300 DE ATG16L1 NO MODIFICA LA INDUCCIÓN TRANSCRIPCIONAL DE GENES STAT3-DEPENDIENTES

Puesto que la ausencia del dominio WDD en BMDMs procedentes de ratones Nt provocaba una reducción de la tasa de transcripción de genes regulados por STAT3, como *Bcl3* (**Figura 44**), se postuló que este defecto podría ser recapitulado en presencia del polimorfismo de riesgo. Sin embargo, los ensayos efectuados en BMDMs de ratones T y A no mostraron diferencias en la inducción transcripcional de *Bcl3* (**Figura 54**). El ensayo de diferentes dosis de citoquina y tiempos de estimulación resultó improductivo, pues en ninguna de las condiciones testadas se observaron diferencias en la inducción transcripcional de *Bcl3*, entre las dos estirpes de ratones. Este dato era coherente con la información procedente de los ensayos destinados a evaluar fosforilación de STAT3 en estos mismos animales, puesto que la presencia del polimorfismo de riesgo no modificaba la ratio de activación de STAT3 en ninguno de los pares de ratones ensayados (**Figura**

53B). En consecuencia, resultaba altamente improbable que, en ausencia de alteraciones en los niveles de fosforilación de STAT3 y, por tanto, de translocación al núcleo de este factor de transcripción, se observasen alteraciones en la tasa de inducción transcripcional de genes regulados por el mismo.

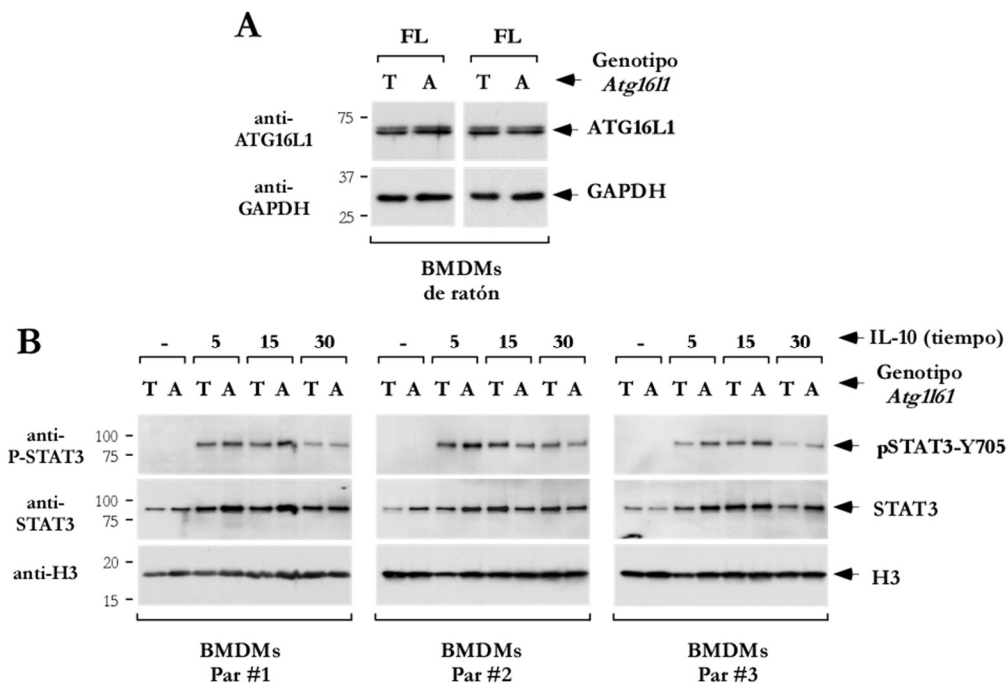
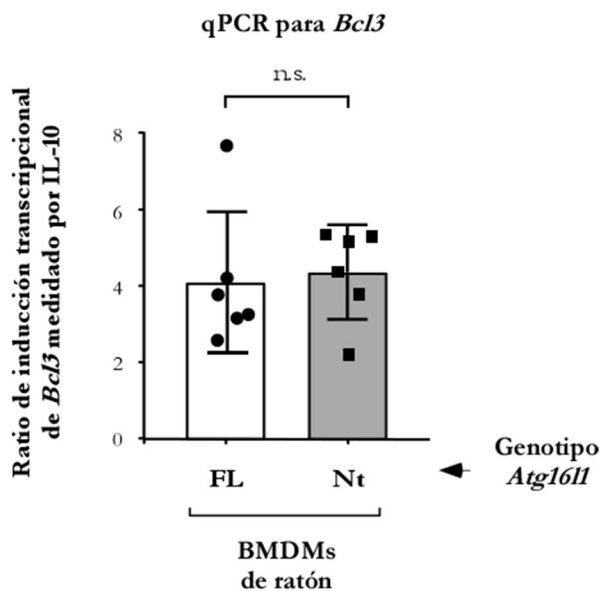


Figura 53. Los BMDMs de ratones A300 no presentan defectos en la fosforilación de STAT3. (A) La expresión de ATG16L1 es similar en BMDMs de ratones T y A. BMDMs de ratones WT (T) y A300 (A) se lisaron y se analizaron para Western-blot con los anticuerpos que se indican. (B) La fosforilación de STAT3 no se encuentra alterada en BMDMs de ratones A300 respecto a sus homólogos WT. BMDMs de ratones WT (T) y A300 (A) se diferenciaron durante una semana, en medio completo suplementado con 20 ng/ml del factor M-CSF. Tras un periodo de reposo de 16 horas en medio de cultivo completo sin M-CSF, se cultivaron durante 5 horas en medio con 1% de suero. A continuación, se sometieron a un ensayo de “pulso y caza”, incubando las células en presencia de 40 ng/ml de IL-10 murina, durante 30 minutos y a 4°C (en medio con 1% de suero). Tras la incubación, se lavaron dos veces para eliminar la citoquina y se mantuvieron en un incubador a 37°C, lisándose a los tiempos indicados (tanto el medio de cultivo para los lavados como para la incubación a 37°C incorporó 1% de suero). Durante la lisis se efectuó un fraccionamiento núcleo vs. citoplasma, y los extractos proteicos se procesaron para Western-blot con los anticuerpos que se indican. Se muestran exclusivamente los Western-blot correspondientes a los extractos nucleares. Cada par de ratones fue emparejado de forma totalmente arbitraria.

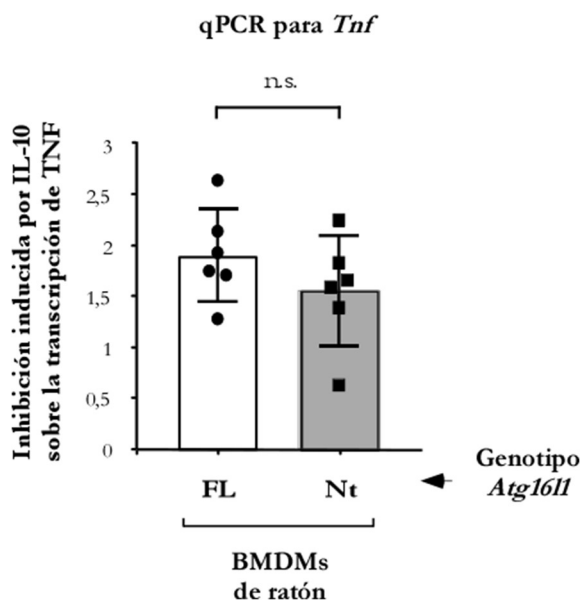


**Figura 54. El polimorfismo A300 de ATG16L1 no altera la tasa de inducción transcripcional de genes STAT3-dependientes, como *Bcl3*.** BMDMs de ratones T y A se diferenciaron durante una semana en medio de cultivo suplementado con 20 ng/ml del factor M-CSF. Tras un periodo de reposo de 16 horas en medio de cultivo no suplementado con M-CSF, se cultivaron durante 5 horas en medio con 1% de suero. Finalmente, se incubaron en presencia de 50 ng/ml de IL-10 murina durante 4 horas y se procesaron para qPCR. La incubación con la citoquina se efectuó, asimismo, en medio conteniendo 1% de suero. La ratio de inducción transcripcional de *Bcl3* se normalizó respecto a los genes controles *GAPDH* y *ACTINA*. Se muestran los valores medios de la ratio de inducción transcripcional de *Bcl3* y sus desviaciones estándar asociadas (n=6, estadístico empleado: prueba t de Student; (n.s.) indica p-valor>0,05).

### 5.3. EL POLIMORFISMO A300 DE ATG16L1 NO ALTERA LA SEÑALIZACIÓN ANTIINFLAMATORIA EN RESPUESTA A IL-10

Finalmente, se evaluó si la presencia del polimorfismo de riesgo A300 podía modular la transducción de la señalización antiinflamatoria en respuesta a IL-10. Puesto que no existía ninguna indicación previa de una posible implicación del alelo A300 en la alteración de la respuesta antiinflamatoria mediada por IL-10, este ensayo constituía la evidencia definitiva de que el polimorfismo A300 no modulaba la capacidad de interacción ni la funcionalidad del receptor IL-10RB. En efecto, el estudio de la inhibición transcripcional de *Tnf* tras la estimulación inflamatoria y el tratamiento con la citoquina IL-10, reflejó que ambas estirpes de ratones, T y A, presentaban idéntica capacidad de inhibición de la señal inflamatoria, al menos en lo que respecta a *Tnf* (Figura 55).

Cabe señalar que, como se había descrito previamente en el laboratorio, distintas versiones del motivo presentan diferente sensibilidad al polimorfismo de riesgo A300<sup>156</sup>. Ello implica que, aunque en el caso particular del receptor IL-10RB, la funcionalidad de la molécula no se encuentre afectada por la presencia del alelo A300, otros de los receptores de citoquinas (**Tabla 1**) u otras entidades biológicas identificadas inicialmente mediante los ensayos de microarrays, sí podrían ver alterada su funcionalidad en presencia de la versión A300 de ATG16L1.



**Figura 55.** El polimorfismo A300 de ATG16L1 no altera la señalización antiinflamatoria en respuesta a IL-10. Las tasas de inhibición transcripcional de *Tnf* son significativamente no diferentes entre ratones T y A. Células procedentes de la médula ósea de ratones T y A se diferenciaron durante una semana en medio de cultivo completo, suplementado con 20 ng/ml de factor humano recombinante M-CSF. Tras un periodo de reposo de 16 horas en medio carente del factor M-CSF, se cultivaron durante 5 horas en medio de cultivo con 1% de suero. A continuación, se trataron durante 6 horas con 1 ng/ml de LPS +/- 40 ng/ml de IL-10 (en medio con 1% de suero). IL-10 se añadió 20 minutos antes que LPS. Finalmente, se procesaron para qPCR, normalizando la ratio de inhibición transcripcional de *Tnf* respecto a los genes controles *GAPDH* y *ACTINA*. Se muestran los valores medios de la ratio de inhibición de la inducción transcripcional de *Tnf* y sus desviaciones estándar asociadas (n=6, estadístico empleado: prueba t de Student; (n.s.) indica p-valor>0,05).





# DISCUSIÓN



## **CAPÍTULO 1. LA INTERACCIÓN ENTRE A20 Y EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 PARTICIPA EN EL CONTROL DE LA HOMEOSTASIS INTESTINAL**

Durante los últimos años, la identificación de genes de susceptibilidad a IBD en pacientes y en modelos experimentales, ha puesto de manifiesto la variabilidad y complejidad de las rutas moleculares involucradas en el inicio y progresión de la enfermedad. Como se describía en la *Introducción*, alteraciones en genes involucrados en respuesta innata, mantenimiento del epitelio intestinal o autofagia, se han vinculado a susceptibilidad a IBD<sup>143-145</sup>.

Entre las moléculas asociadas a IBD se encuentran A20 y ATG16L1. A20 es una molécula antiinflamatoria, responsable del control de la estimulación de la vía NF- $\kappa$ B<sup>193</sup>. En pacientes de IBD con disfunción en A20, la ruta NF- $\kappa$ B se encuentra excesivamente estimulada, fenómeno que involucra la generación de una elevada cantidad de mediadores inflamatorios<sup>200</sup>. Finalmente, la barrera epitelial intestinal se destruye, contribuyendo a la infiltración de bacterias al lumen intestinal.

Por el contrario, el mecanismo mediante el cual la autofagia contribuye al mantenimiento de la homeostasis intestinal no se conoce con exactitud. Se hipotetiza que el estrés celular estimula la vía autofágica que, asimismo, participa en la respuesta inmune innata<sup>223</sup>. De esta forma, defectos en autofagia alterarían la respuesta inmune del organismo y contribuirían a la generación de respuestas inflamatorias exacerbadas. Sin embargo, sí se encuentra completamente establecido que animales deficientes en diferentes genes de la ruta son altamente susceptibles a infecciones o al desarrollo de enfermedades autoinmunes<sup>130</sup>. De hecho, los defectos en xenofagia se han asociado a susceptibilidad al desarrollo de IBD<sup>167,168</sup>. Adicionalmente, alteraciones en ATG16L1 se han ligado a defectos en exocitosis de gránulos antimicrobianos en células de Paneth, fenómeno que desestabiliza la barrera epitelial intestinal<sup>169</sup>. También, polimorfismos en NOD2 alteran el reclutamiento de ATG16L1 a la región de entrada de la bacteria a la célula, afectando a la xenofagia mediada por el receptor y contribuyendo a la patogénesis de la enfermedad de Crohn<sup>101</sup>.

## DISCUSIÓN

Trabajo publicado en colaboración con el equipo del Dr. Van Loo (Ghent University, Ghent, Belgium) ha permitido establecer que los ratones deficientes en *A20* o en *Atg16l1* a nivel de las células epiteliales intestinales son viables y se desarrollan normalmente<sup>201</sup>. En cambio, los dobles knock-out para ambos genes desarrollan una patología inflamatoria intestinal espontánea. Se postula que el desarrollo espontáneo de este fenotipo inflamatorio se debe a la elevada susceptibilidad de estos animales a la muerte inducida por citoquinas<sup>186,195,224,225</sup>. La muerte celular es un mecanismo central de la enfermedad inflamatoria intestinal, y tanto A20 como ATG16L1 serían indispensables en la prevención de la destrucción de la barrera epitelial en condiciones inflamatorias. Esto es, ambas moléculas actuarían cooperativamente en el control de la homeostasis intestinal, evitando la apoptosis de enterocitos que comprometería la integridad de la barrera intestinal<sup>186,225</sup>. Por otra parte, en condiciones normales, en las que la exposición a citoquinas es mínima, A20 y ATG16L1 se compensarían mutuamente, evitando el desarrollo del fenotipo inflamatorio en ausencia de uno de ellos.

Además, los ratones deficientes en *A20* y *Atg16l1* a nivel del epitelio intestinal, presentan una reducción en el número de células caliciformes y, sobre todo, de células de Paneth, acompañado de alteraciones morfológicas en las mismas. Dicho fenotipo es coherente con la información procedente de modelos experimentales de IBD y de pacientes<sup>226</sup>. Sin embargo, pese a la concordancia entre todas las observaciones realizadas, no se ha definido con exactitud el mecanismo mediante el cual la carencia de estas dos moléculas desemboca en la patología intestinal espontánea anteriormente descrita.

Los ensayos reunidos en el *Capítulo 1* de *Resultados* han permitido demostrar la interacción física y funcional existente entre A20 y ATG16L1, proporcionando una base molecular a esta interacción genética. Esta unión, mediada por el dominio OTU de A20 y el dominio WDD de ATG16L1, podría actuar como un punto de control importante para el mantenimiento de la homeostasis intestinal. Adicionalmente, el aumento de los niveles de expresión de ATG16L1 (descrito por el equipo del Dr. Van Loo)<sup>201</sup> y LC3 en ausencia de A20, refleja la existencia de un fenómeno autofágico estimulado por un mecanismo de regulación no convencional dependiente del dominio WDD. Dicho fenómeno no convencional inhibe la activación de la ruta NF- $\kappa$ B. Esto es, ATG16L1

actuaría modulando la activación de la ruta NF- $\kappa$ B en ausencia del control ejercido por A20.

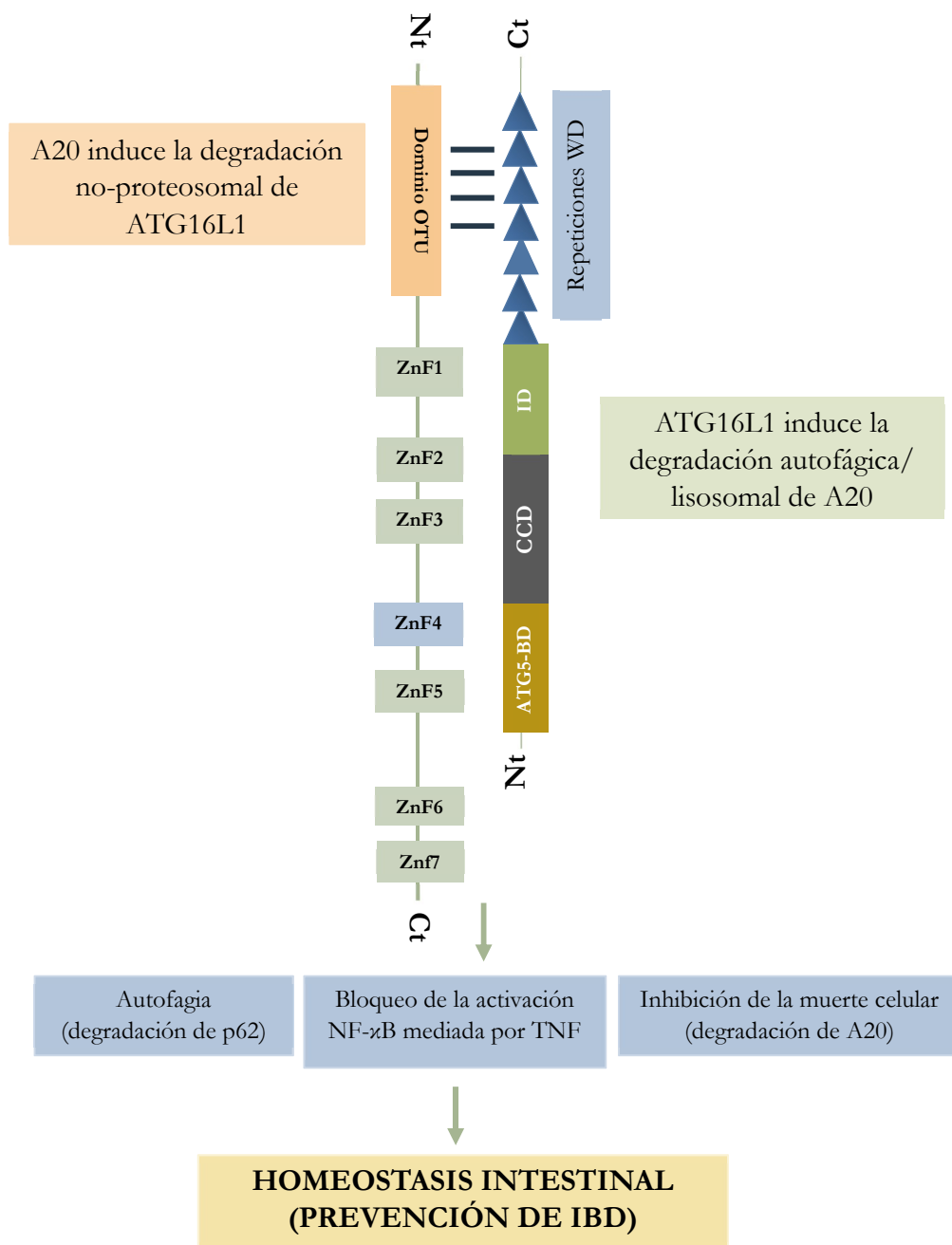
Por otra parte, en ausencia de *Atg161l*, se incrementan los niveles de expresión de A20, debido a la carencia del mecanismo lisosomal de degradación de A20, que es dependiente del dominio WDD. En la **Tabla 4** se describen de forma sintética los fenotipos de los ratones WT, deficientes en *A20*, en *Atg161l* o en ambas moléculas.

	WT	<i>A20</i> <sup>-/-</sup>	<i>Atg161l</i> <sup>-/-</sup>	<i>A20/Atg161l</i> <sup>-/-</sup>
<b>Niveles proteicos de A20 y Atg16L1</b>	Niveles homeostáticos equilibrados	Estabilización de ATG16L1	Estabilización de A20	Ausente
<b>Autofagia</b>	Equilibrada	Incrementada (aumento LC3-II)	Defectiva	Defectiva
<b>Activación de NF-<math>\kappa</math>B</b>	Equilibrada	Compensada	Incrementada, pese a la estabilización de A20	Incrementada
<b>Muerte celular <i>in vivo</i></b>	Inhibida	Inhibida en condiciones basales (sensible a muerte inducida por TNF)	Inhibida en condiciones basales (sensible a muerte inducida por TNF)	Espontánea

**Tabla 4. Resumen de los efectos observados en ratones WT, *A20*<sup>-/-</sup>, *Atg161l*<sup>-/-</sup> y *A20/Atg161l*<sup>-/-</sup>.** Se señalan los efectos descritos respecto a los niveles proteicos de A20, Atg16L1, autofagia, activación de la ruta NF- $\kappa$ B y muerte celular *in vivo*.

Por tanto, ATG16L1 y A20 modulan su nivel de expresión recíprocamente y, probablemente, de forma postranscripcional, debido a su interacción directa. La carencia de una de estas dos moléculas desencadena un mecanismo compensatorio por parte de la otra, al objeto de restringir la reacción inflamatoria intestinal agresiva que podría originarse. Las rutas activadas mediante este mecanismo compensatorio se desconocen; no obstante, hemos hipotetizado que la elevada ratio de expresión de ATG16L1 en MEFs deficientes en *A20* tendría su origen en la estabilización de ATG16L1 mediada por una prolongada activación de la ruta NF- $\kappa$ B. Es decir, esta activación prolongada conduciría a una amplia inducción de autofagia, que actuaría como mecanismo compensatorio<sup>223</sup>.

# DISCUSIÓN



**Figura 56. Esquema del modelo de regulación propuesto para A20-ATG16L1 en el control de la homeostasis intestinal.** La interacción entre ATG16L1 y A20 está mediada por sus dominios WDD y OTU, respectivamente. La inducción de ATG16L1 en células deficientes en A20 induce un mecanismo de autofagia no convencional, incrementándose la expresión de p62 e inhibiéndose la activación de la ruta NF-κB. La inducción de ATG16L1 restringe la activación exacerbada de la ruta NF-κB, consecuencia de la

ausencia de A20. Por otra parte, el incremento de la expresión de A20 en células carentes de *Atg16L1* correlaciona con elevados niveles de p62, inducción de la ruta NF- $\kappa$ B y protección contra la muerte celular. La carencia de ambas moléculas causa inflamación dependiente de NF- $\kappa$ B y una patología intestinal espontánea acompañada de muerte celular.

En este contexto, la activación de IKK $\alpha$ , en respuesta a citoquinas y a la estimulación microbiana, fosforilaría ATG16L1, estabilizándola y previniendo el estrés reticular<sup>227</sup>. En cualquier caso, estas hipótesis requerirían ser confirmadas experimentalmente. En la **Figura 56** se adjunta un esquema de la propuesta de modelo de regulación A20-ATG16L1 en el control de la homeostasis intestinal.

Continuando la argumentación iniciada en la *Introducción*, el dominio WDD se encuentra ausente en levaduras<sup>56</sup>, por lo que se le atribuyen diversas funciones adicionales en organismos multicelulares. De hecho, trabajo previo de nuestro laboratorio ha revelado que este dominio se comporta como una región de ensamblaje para moléculas adaptadoras que interactúan con el complejo de lipidación de LC3 en compartimentos no convencionales. De esta forma, ATG16L1 promueve la síntesis de LC3-II a través de la región N-terminal, que une ATG5-12<sup>102,156,162,228</sup>. Adicionalmente, al dominio WDD se le han atribuido funciones no autofágicas, como control inflamatorio, tráfico de vesículas secretoras en células de Paneth y xenofagia<sup>159,160</sup>. Nuestros resultados señalan, asimismo, que este dominio jugaría un papel relevante en la regulación de la respuesta inflamatoria, interactuando con diversos moduladores de la ruta. Entre estos moduladores se encuentran A20 y otras moléculas identificadas en los ensayos de proteómica, como las ya mencionados NALP2, NALP4 o MDA5<sup>201</sup>.

En conclusión, nuestros datos revelan la existencia de una interacción física y funcional entre A20 y ATG16L1, con una elevada relevancia fisiológica en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial intestinal y, consecuentemente, en la prevención del desarrollo de un fenotipo crónico de inflamación intestinal.

## DISCUSIÓN

### **CAPÍTULO 2. DESCRIPCIÓN Y VERIFICACIÓN DEL MOTIVO PROTEICO PRESENTE EN MOLÉCULAS QUE INTERACCIONAN CON EL DOMINIO WDD DE ATG16L1**

Como se señalaba en el epígrafe anterior, el dominio WDD de ATG16L1 se encuentra ausente en levaduras, por lo que no es necesario para las funciones básicas de la autofagia en organismos unicelulares. Tampoco es necesario, como se ha mencionado anteriormente, en el mantenimiento de la autofagia basal o inducida por ayuno en eucariotas superiores, pues la región  $\Delta$ WDD es suficiente para sustentarla<sup>150,151,154-156</sup>. Sin embargo, se ha relacionado con control inflamatorio, tráfico de vesículas secretoras en diversos tipos celulares especializados y xenofagia<sup>159,160</sup>. Por tanto, se postula que este dominio podría haberse adicionado a la molécula de ATG16L1 al objeto de incrementar su funcionalidad en organismos eucariotas superiores.

Puesto que, tal y como se había descrito previamente en el laboratorio, la molécula transmembrana TMEM59 presenta la capacidad de interactuar con el dominio WDD de ATG16L1 y desencadenar un mecanismo de autofagia no convencional en el que la propia vesícula en la que se encuentra TMEM59 se marca con LC3<sup>102</sup>, podrían existir otras moléculas con capacidad para unir el dominio WDD e inducir fenómenos similares de tipo no convencional, en diferentes contextos biológicos. De hecho, trabajo previo de nuestro laboratorio había contribuido a identificar proteínas adicionales que interactúan con ATG16L1 a través de su dominio WDD, como DEDD2, T3JAM, NOD2 o TLR2<sup>102,156</sup>. Esto es, los datos recabados hasta el momento sugerían la existencia de un “interactoma” específico del dominio WDD, responsable de la modulación de las funciones atípicas de ATG16L1. En este contexto, disponer de una herramienta que permitiese identificar con relativa precisión miembros adicionales del “interactoma” del dominio WDD, podría ampliar nuestro conocimiento acerca de los fenómenos no convencionales en los que participa dicho dominio e, hipotéticamente, de sus implicaciones fisiopatológicas. Con esa finalidad, el laboratorio había trabajado en la definición del motivo que figura en este trabajo de tesis (**Figura 22A**), que permitió identificar moléculas adicionales que efectivamente interactúan con ATG16L1 a través del dominio WDD.

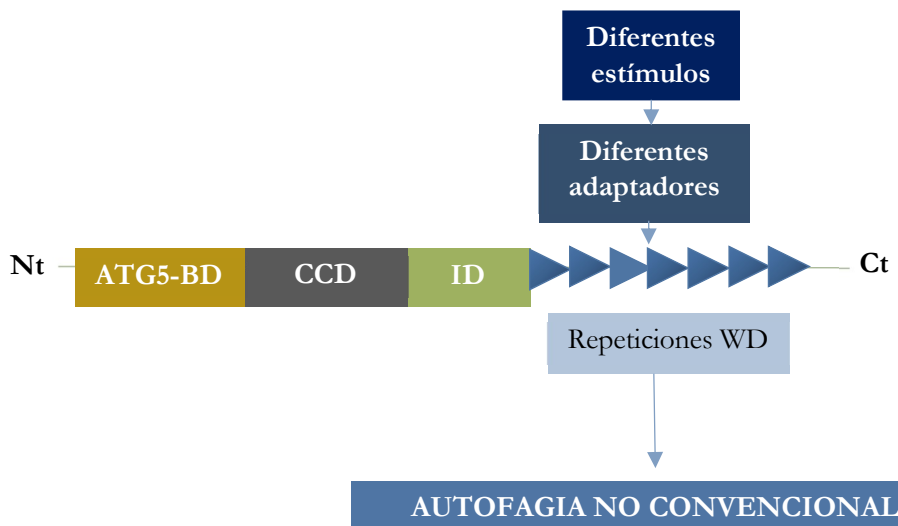


Dicho motivo es lo suficientemente refinado como para poseer una mejorada capacidad predictiva. De hecho, aunque este estudio se centra en el análisis del receptor B de IL-10, también se describe que otras moléculas predichas por el motivo, como IL-2R $\gamma$  o IL-31R, interaccionan con ATG16L1 a través del dominio WDD. Un elevado porcentaje de las moléculas candidatas, identificadas mediante la búsqueda bioinformática realizada sobre la base del motivo descrito, co-inmunoprecipitaba con el dominio WDD *in vitro*. Además, cabe mencionar que dentro del conjunto de moléculas candidatas no sólo se encuentran receptores de citoquinas como los señalados en la **Tabla 1**, sino que también figuran proteínas de adhesión o receptores virales. Esta variabilidad funcional es coherente con la elevada diversidad biológica atribuida al dominio WDD. En la **Figura 57** se esquematiza el proceso de integración de señales propuesto para ATG16L1, que desembocaría en la inducción de fenómenos autofágicos no convencionales en distintos contextos biológicos.

El caso del receptor B de IL-10 resultó especialmente interesante en el contexto del estudio de la enfermedad inflamatoria intestinal. Como se señalaba anteriormente, el desarrollo de IBD se encuentra estrechamente vinculado a alteraciones en ATG16L1<sup>147,148</sup> y en la vía de señalización de IL-10<sup>146</sup>, entre otros. De hecho, mutaciones en los receptores A y B de IL-10, o en la propia citoquina, se han asociado con una forma especialmente grave y temprana de enfermedad de Crohn<sup>146</sup>. En el caso del receptor IL-10RB, los ensayos realizados señalaban que la interacción con ATG16L1 se producía a través del dominio WDD. Además, dicha interacción otorgaba validez al motivo de unión descrito, puesto que la mutación de los aminoácidos clave en el mismo inhibía la unión entre las dos moléculas.

Adicionalmente, los ensayos preliminares efectuados reflejaban la capacidad del receptor IL-10RB para inducir lipidación de LC3 en un contexto de sobreexpresión. Sin embargo, cabe señalar que los sistemas de sobreexpresión no resultan idóneos para el estudio de la lipidación de LC3, puesto que ésta podría originarse como consecuencia de la inducción de la ruta autofágica convencional, y no como resultado de la activación local promovida por la interacción con ATG16L1.

## DISCUSIÓN



**Figura 57. Esquema del modelo de regulación propuesto para ATG16L1.** ATG16L1 integraría una gran diversidad de señales biológicas a través de diferentes adaptadores que interaccionan con el dominio WDD. De esta forma, ATG16L1 induciría fenómenos de autofagia no convencional implicados en diversos procesos biológicos.

Sorprendentemente, pese a que la mutación de los cinco aminoácidos de IL-10RB esenciales en la interacción con ATG16L1 inhibe completamente la unión entre ambas moléculas, en los ensayos de inmunofluorescencia se observó un relativamente elevado número de colocalizaciones entre la versión 5M del receptor y LC3. Aunque el número de colocalizaciones es significativamente inferior al detectado en células transfectadas con la versión WT del receptor, considerando la información procedente de las co-inmunoprecipitaciones y ensayos de sobreexpresión para evaluación de LC3 en Western-blot, se esperaría que el número de colocalizaciones detectadas fuese prácticamente cero. Sin embargo, parte de estas colocalizaciones podrían reflejar el marcaje de anfisomas con LC3. Los anfisomas son entidades de naturaleza mixta, formadas por la fusión de endosomas tardíos con autofagosomas. Hipotéticamente, las colocalizaciones observadas tras la sobreexpresión de la versión 5M del receptor podrían proceder de la detección de anfisomas. Si se bloquease la autofagia convencional en etapas previas a ATG16L1 (por ejemplo, silenciando ATG14 o ATG13), se eliminaría el flujo autofágico procedente de los anfisomas. En caso de que las colocalizaciones permaneciesen en presencia de la versión WT del receptor, pero no de la versión 5M, se podrían atribuir exclusivamente al

mecanismo propuesto. No obstante, puesto que el sistema descrito constituye exclusivamente una metodología de cribado inicial, no se realizaron experimentos adicionales. Posteriormente, se efectuaron un conjunto de ensayos destinados a evaluar la contribución del dominio WDD a la señalización por IL-10, así como el mecanismo que regía este fenómeno (véase *Resultados y Discusión del Capítulo 3* y subsiguientes). Como se describirá a continuación, la información procedente de los diversos ensayos realizados apuntaba a una contribución menor o, en todo caso, cualitativa, del marcaje con LC3. Esto es, *a posteriori* se especuló con la posibilidad de que este fenómeno fuese exclusivamente ATG16L1-dependiente y no regulado por LC3, por lo que la información procedente de los ensayos de inmunofluorescencia en HeLa perdió cierta relevancia.

Los ensayos de co-inmunoprecipitación y lipidación de LC3 que implicaron al receptor IL-10RB proporcionaron una metodología relativamente rápida y sencilla para la evaluación de moléculas candidatas identificadas mediante el motivo descrito. Esta metodología, basada en la analogía de los distintos candidatos con TMEM59, permitía efectuar un cribado inicial de moléculas que posteriormente serían evaluadas en estudios funcionales.

Por otra parte, en el caso del receptor de IL-31, los ensayos de co-inmunoprecipitación reflejaron la existencia de un desdoblamiento de bandas, consecuencia, probablemente, del diferente grado de glicosilación de las distintas isoformas del receptor. Las isoformas cortas del receptor son solubles e inactivas y, además, se comportan como dominantes negativos de la señalización por IL-31<sup>190,229,230</sup>. La banda definida identificada en los ensayos de co-inmunoprecipitación podría corresponder a una forma corta no glicosilada y funcionalmente inactiva. Si bien el dominio WDD co-inmunoprecipita con esta isoforma del receptor, también interacciona con diversas versiones de mayor peso molecular. Sin embargo, el dominio  $\Delta$ WDD co-inmunoprecipita exclusivamente con la versión corta que, postulamos, es inactiva.

Sin embargo, el desdoblamiento de bandas observado se detectó igualmente en los lisados totales correspondientes a dichas co-inmunoprecipitaciones. Por tanto, la detección de una versión corta de apariencia no glicosilada en presencia de la región Nt (o  $\Delta$ WDD) sugería la existencia de un mecanismo de control de maduración del receptor

## DISCUSIÓN

mediado por el dominio WDD. A pesar del comportamiento diferencial del receptor en presencia de cada una de las regiones de ATG16L1 y de que la mutación del motivo responsable de la unión (versión 4M) inhibía la interacción de isoformas largas y glicosiladas con el dominio WDD, el estudio de este receptor se desvinculó de este trabajo de tesis doctoral. En el caso de IL-31R, se apunta a la existencia de un mecanismo de regulación distinto al que opera en el caso IL-10RB. Dicho mecanismo probablemente estaría involucrado en el control de la maduración del receptor, y constituye un cuerpo de trabajo independiente en nuestro laboratorio.

Finalmente, los ensayos funcionales preliminares efectuados en modelos de sobreexpresión de ambos receptores, reflejaron un prominente incremento de la lipidación de LC3 en células recuperadas con la versión completa de ATG16L1, respecto a las estirpes transducidas con un plásmido no codificante o con las regiones Nt y Ct físicamente separadas. El aumento en la lipidación de LC3 se acompañaba de una ligera acumulación del receptor en células ATG16L1-WT (FL). La co-tranfección con el reportero GFP descartó la existencia de efectos diferenciales en la transfección de las estirpes FL y Nt+Ct. Por tanto, se hipotetizó que la incrementada lipidación de LC3 en células recuperadas con la versión completa de ATG16L1 provocaba una alteración en el tráfico intracelular del receptor. Este efecto resultó paradójico, puesto que un incremento del marcaje con LC3 provocaría, intuitivamente, un aumento de la velocidad de tráfico del receptor hacia los lisosomas. Sin embargo, el incremento en la lipidación de LC3 se reprodujo en diferentes contextos celulares (véase *Capítulo 3* y sucesivos), y resultó coherente con los datos obtenidos en los subsiguientes ensayos funcionales.

Estos datos preliminares sugerían que el tráfico intracelular y, consecuentemente, la señalización por ambos receptores de citoquinas, podrían ser modulados a través del dominio WDD de ATG16L1. Considerando la relevancia central de IL-10RB en enfermedad inflamatoria intestinal<sup>143,146</sup>, los estudios sucesivos se centraron en el análisis funcional de este receptor.

### **CAPÍTULO 3. LA INTERACCIÓN ENTRE IL-10RB Y EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 MODULA LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR IL-10 EN MEFs**

El sistema de MEFs proporcionó una indudable evidencia acerca de la participación del dominio WDD en la modulación de la señal intracelular transducida en respuesta a IL-10. Aunque éste no fue el sistema de primera elección, resultó realmente informativo, puesto que todos los efectos descritos resultaron consecuencia, inequívocamente, de las actividades biológicas de las moléculas humanas transducidas, descartando la contribución de efectos endógenos no controlables en este contexto.

El sistema inicialmente seleccionado para efectuar los ensayos funcionales que figuran en el *Capítulo 3*, fue el de HCT116 deficientes en *Atg16l1*<sup>160</sup> y transducidas secuencialmente según lo indicado en la **Tabla 2**. Sin embargo, y pese al empleo del plásmido reportero multimerizado STAT3x3-LUC, resultó inviable la generación de estirpes celulares que respondiesen a la estimulación mediada por IL-10 con una señal lo suficientemente robusta y distinguible del fondo. De hecho, la introducción de elementos adicionales del complejo señalizador, como TYK2, no generó ventajas en la detectabilidad de la señal. Por tanto, aunque el sistema de HCT116 presentaba como indudable atractivo su origen en células epiteliales colónicas humanas, no fue posible efectuar su puesta a punto para ser utilizado en los ensayos de señalización.

Cabe señalar que la generación del sistema de MEFs recuperados con diferentes versiones de ATG16L1 permitió corroborar, nuevamente, que el dominio N-terminal era suficiente para mantener la autofagia basal e inducida por estímulos convencionales<sup>150,151,154-156</sup>. La estirpe transducida con el dominio N-terminal de ATG16L1 resultaba indispensable en el estudio de los efectos mediados por el dominio WDD. Puesto que el cribado de moléculas que permitió identificar a IL-10RB como miembro del “interactoma” de ATG16L1 se efectuó por analogía con TMEM59 y, considerando que IL-10RB interacciona con ATG16L1 a través del dominio WDD de éste, se postuló que los efectos sobre la señalización mediada por IL-10RB podrían ser WDD-dependientes.

## DISCUSIÓN

Los defectos observados en la activación de STAT3 en MEFs deficientes en el dominio WDD fueron similares a los descritos en pacientes con mutaciones en cualquiera de las dos subunidades del receptor IL-10R, que manifestaban clínicamente una enterocolitis grave y temprana, caracterizada por una exacerbada respuesta inflamatoria a nivel intestinal<sup>146</sup>. Concretamente, el paciente que portaba la mutación “nonsense” W159X en el receptor IL-10RB y el paciente con la mutación de cambio de sentido G141R en IL-10RA, al igual que los MEFs deficientes en el dominio WDD, mostraron alteraciones en la fosforilación de STAT3 a nivel de la Tyr705<sup>146</sup>. Aunque no se adjunta, los MEFs deficientes en el dominio WDD no presentaban modificaciones relevantes a nivel de la fosforilación de Ser727, respecto a sus homólogos recuperados con la molécula completa de ATG16L1. Por tanto, la ausencia de efectos en la fosforilación de Ser727 resultaba coherente con las observaciones efectuadas en pacientes<sup>146</sup>. Los defectos en la activación de STAT3 se traducen directamente en alteraciones en la señalización mediada por IL-10, puesto que STAT3 es el principal factor responsable de la activación de genes de respuesta a esta citoquina, que mediarían las actividades biológicas antiinflamatorias atribuidas a la misma.

Adicionalmente, el sistema de MEFs permitió corroborar que el receptor IL-10RB y ATG16L1 interaccionan en respuesta a IL-10. Esto es, se descartó que las observaciones efectuadas en el *Capítulo 2* acerca de la capacidad de interacción de estas dos moléculas, procediesen de un artefacto fruto de la sobreexpresión de éstas.

Como se mencionaba anteriormente, la ausencia del dominio WDD provoca disfunciones en la señalización intracelular en respuesta a IL-10. El mecanismo por el cual se originarían estas alteraciones parece estar relacionado con defectos en el tráfico a través de la ruta endolisosomal. Los ensayos de inmunofluorescencia descritos apuntan a que las células carentes del dominio WDD presentan una endocitosis retrasada del receptor IL-10RB, acompañada de alteraciones en el tráfico temprano del receptor (en endosomas positivos para EEA1) una vez endocitado.

Clásicamente se consideraba que los receptores que entran en la célula incluidos en endosomas, o bien se degradan en el lisosoma o bien se reciclan, lo que implicaría la finalización o el mantenimiento la transmisión de la señal de procedencia extracelular,

respectivamente. Sin embargo, el paradigma actual apunta a que el sistema endosomal constituye, en sí mismo, un lugar esencial para la transducción de la señal, incluso a regiones distantes<sup>222</sup>. De hecho, muchos receptores activados se acumulan en endosomas, y ciertos componentes de la señalización se localizan en estos compartimentos. Además, los receptores activados pueden transmitir distintas señales desde la membrana plasmática y desde los endosomas, originando diferentes respuestas fisiológicas en función del compartimento celular desde el que señalicen. Así, los mecanismos celulares que controlan la disponibilidad, el acoplamiento del receptor a la maquinaria de señalización y su acceso a los diferentes compartimentos subcelulares, se hallan estrictamente regulados<sup>222</sup>. Algunos ejemplos de receptores que señalizan desde endosomas son EGFR<sup>231</sup>, PI3K activada por insulina<sup>232</sup> o TrkA<sup>233,234</sup>.

Apoyándose en el conocimiento desarrollado en el laboratorio acerca del comportamiento de TMEM59, se podría predecir que el incremento del marcaje con LC3 provocaría el término más temprano de la señal transducida, debido a una eficiente fusión con el compartimento lisosomal<sup>156</sup>. No obstante, como se señalaba anteriormente, el marcaje de endosomas con LC3 no sólo determina la vida media del receptor, sino que también podría influir en su correcto acceso a los compartimentos señalizadores. Por tanto, se postula que la lipidación de LC3 no presenta carácter exclusivamente cuantitativo, sino también cualitativo, de forma que la transmisión de la señal intracelular sería menos eficiente si los receptores no se localizan en los compartimentos adecuados o si, aun accediendo a ellos, no señalizan correctamente.

El hecho de que determinados receptores o factores transcripcionales precisen localizarse en compartimentos intracelulares concretos para su correcta señalización, ha sido ampliamente estudiado en el caso de receptores como los anteriormente mencionados (EGFR<sup>231</sup>, PI3K activada por insulina<sup>232</sup> o TrkA<sup>233,234</sup>). Un caso particular es el del receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). La versión mutada o sobreexpresada del receptor (el oncogén c-Met) no activa STAT3 desde la membrana plasmática, sino que se libera a un compartimento endosomal perinuclear. Este fenómeno determina el mantenimiento de una fosforilación sostenida de STAT3 en el núcleo y, consecuentemente, el inicio del proceso tumorigénico<sup>235</sup>. Otro ejemplo

## DISCUSIÓN

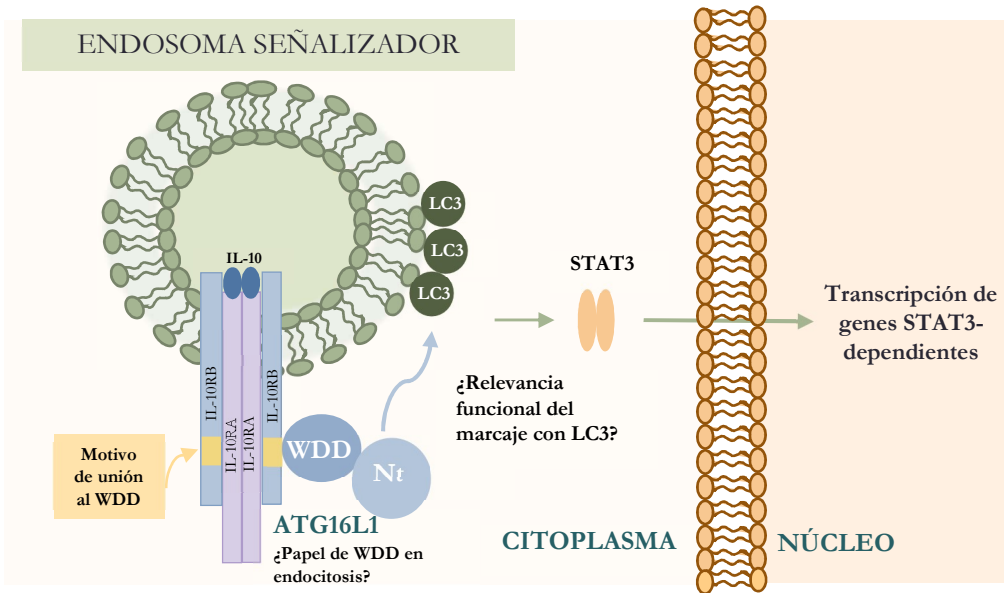
interesante lo constituyen las integrinas  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha 5\beta 1$ , que regulan la señalización de receptores de factores de crecimiento modulando su tráfico intracelular<sup>236,237</sup>. Las integrinas  $\alpha v$  también modulan la señalización vía TLR, favoreciendo el reclutamiento de LC3 a los endosomas que portan el receptor TLR. Este mecanismo es esencial para la progresión de una respuesta de tipo NF- $\kappa$ B a una respuesta modulada por el factor 7 de regulación de interferón (IRF7) y, finalmente, para la fusión con los lisosomas y la consecuente finalización de la señalización<sup>238</sup>.

Sin embargo, carecemos de una evidencia concreta que demuestre que el marcaje con LC3 determina el correcto acceso del receptor IL-10RB o de su maquinaria de señalización a los compartimentos intracelulares señalizadores. De hecho, en este caso particular, existe la posibilidad de que LC3 sea completamente irrelevante y se trate de un fenómeno exclusivamente ATG16L1-dependiente, como se ha mencionado anteriormente. Esta suposición estaría amparada por la débil colocalización observada en los ensayos de sobreexpresión (*Capítulo 2*) y por la escasa colocalización detectada en MEFs en respuesta a IL-10 (*Capítulo 3*). En este último caso, el número de colocalizaciones se incrementa en presencia de bafilomicina A<sub>1</sub>, pero este inhibidor lisosomal puede ejercer múltiples y complejos efectos, por lo que la interpretación de dichos datos resulta dificultosa.

La bafilomicina A<sub>1</sub> bloquea la degradación lisosomal y, simultáneamente, incrementa la cantidad de receptor en la célula, al evitar su degradación. Además, facilita la visualización de vesículas de receptor en diferentes estadios. Sin embargo, bafilomicina A<sub>1</sub> presenta capacidad exclusiva para incrementar los niveles de LC3-II bloqueando el flujo autofágico convencional, no actuando sobre la lipidación ectópica de compartimentos endolisosomales durante fenómenos autofágicos no canónicos como el que involucra al receptor IL-10RB<sup>162,239</sup>. En cualquier caso, si LC3 desempeñase un rol fundamental en el mecanismo de señalización, el efecto debería observarse de forma prominente tras 15 minutos de estimulación únicamente con la citoquina, a nivel de número de colocalizaciones. Por tanto, existe la posibilidad de que LC3 sea completamente irrelevante en estas circunstancias, y el mecanismo sea exclusivamente ATG16L1-dependiente.



En cualquier caso, los datos obtenidos sugieren la existencia de un nuevo mecanismo que opera en adición a la maquinaria endocítica convencional en el control del tráfico intracelular y la capacidad señalizadora del receptor IL-10RB, y que podría ser común a miembros del conjunto de receptores de citoquinas que contienen el motivo de unión al dominio WDD de ATG16L. En la **Figura 58** se adjunta el modelo propuesto para la señalización desencadenada tras la interacción IL-10RB-WDD.



**Figura 58.** Esquema del modelo propuesto para la señalización intracelular desencadenada tras la interacción **IL-10RB-WDD**. La interacción entre IL-10RB y ATG16L1 se produce a través del motivo aminoacídico identificado (véase Tabla 1) y el dominio WDD, respectivamente. ATG16L1 podría inducir el marcaje con LC3 del propio endosoma señalizador, desconociéndose la relevancia funcional de este fenómeno. La interacción entre el receptor y el dominio WDD activa la translocación nuclear de STAT3, y la consecuente transcripción de genes STAT3-dependientes, mayormente involucrados en la señalización antiinflamatoria.

Por tanto, el sistema de MEFs resultó altamente informativo, puesto que, al tratarse de una aproximación completamente artificial, todos los efectos funcionales observados dependían exclusivamente de las moléculas humanas que habían sido previamente transducidas en estas células. No obstante, requerían ser corroborados en un sistema celular adicional naturalmente susceptible a IL-10. Así, las observaciones descritas en MEFs se recapitulaban *a posteriori* en células THP1 (véase *Capítulo 4* en *Resultados*).

## DISCUSIÓN

### **CAPÍTULO 4. EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 PARTICIPA EN LA REGULACIÓN DE LA SEÑAL ANTIINFLAMATORIA EN CÉLULAS THP1**

Aunque, como se mencionaba anteriormente, el sistema de MEFs resultó ampliamente informativo, la línea celular monocítica THP1 proporcionó una valiosa información acerca del papel del dominio WDD en un sistema naturalmente susceptible a IL-10. Adicionalmente, los datos obtenidos en THP1 otorgaron validez a la información recabada en MEFs, superando el interrogante acerca de los efectos funcionales que podrían derivarse de un reducido nivel de expresión del dominio Nt en comparación con la molécula completa ATG16L1 (efecto observado en MEFs). De todas formas, el reducido nivel de expresión del dominio Nt en MEFs resultaba suficiente para mantener la autofagia basal o inducida por rapamicina, de acuerdo con los datos obtenidos en este trabajo de tesis doctoral y con la información procedente de ensayos previamente efectuados en el laboratorio<sup>156</sup>.

Como se señalaba anteriormente, mutaciones en los genes que codifican las dos subunidades del receptor IL-10 (IL-10RA e IL-10RB) y de la propia IL-10, predisponen a una forma severa y extremadamente temprana de enfermedad de Crohn<sup>146</sup>. Puesto que IL-10 es una citoquina antiinflamatoria secretada por variedad de células inmunes<sup>177</sup> y teniendo en cuenta su considerable relevancia en enfermedad inflamatoria intestinal, resulta realmente interesante estudiar su comportamiento en un contexto celular como la línea THP1, de naturaleza monocítica. Aunque no resultó posible optimizar las condiciones experimentales al objeto de evaluar la señalización mediante ensayos de luciferasa, la medición de la fosforilación de STAT3 mediante Western-blot y de diversos mediadores inflamatorios vía qPCR y ELISA, nos proporcionó una evidencia experimental del rol del dominio WDD en la transducción de la señal en respuesta a IL-10. Como se señalaba previamente, el reportero STAT3x3-LUC tampoco generó una señal lo suficientemente elevada como para ser distinguible del fondo en células HCT116, y los ensayos de optimización en diversas condiciones experimentales resultaron infructuosos. Por una razón de naturaleza desconocida, el reportero STAT3x3-LUC no funciona apropiadamente en ciertos sistemas celulares.

Mientras que los estudios en MEFs se habían restringido a la evaluación de la fosforilación de STAT3 en respuesta a IL-10, en THP1 no sólo se recapituló el defecto observado en la activación de STAT3 en ausencia del dominio WDD, sino que, como se señalaba anteriormente, se atribuyó una consecuencia funcional directa a dicho defecto. Sobre la base de la información recabada, IL-10, que actúa limitando la secreción de moléculas proinflamatorias como TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-6, IL-1, IL-8, quimiocinas y prostaglandinas, presenta una respuesta antiinflamatoria limitada en ausencia del dominio WDD de ATG16L1. Este defecto en señalización se produce como consecuencia de la ausencia del dominio WDD, que provoca alteraciones en la fosforilación de STAT3 y, consecuentemente, en su translocación al núcleo celular<sup>177</sup>. En este contexto, genes que codifican para citoquinas proinflamatorias, como IL-6 o TNF- $\alpha$ , se transcriben más activamente, en ausencia del efecto inhibitorio mediado por IL-10. Asimismo, la secreción al medio de citoquinas inflamatorias como IL-1 $\beta$  se halla incrementada en ausencia de la actividad represora ejercida por IL-10. En este caso, no se detectaron cambios en la ratio de transcripción de IL-1 $\beta$  en ausencia del dominio WDD, apuntando a que la regulación podría efectuarse a nivel postranscripcional, como ocurre en el caso de los macrófagos deficientes en ATG16L1<sup>240</sup>.

Por tanto, la información procedente de los ensayos de qPCR y ELISA permitía definir, por primera vez, la existencia de una consecuencia funcional del papel regulador del dominio WDD en la señalización mediada por IL-10, atribuyendo los defectos observados en la transducción de la señal antiinflamatoria a la carencia del dominio WDD. Además, reforzaría la idea de que, aunque el dominio WDD es prescindible para la autofagia canónica, participa en diversidad de actividades celulares como el tráfico de vesículas secretoras, la xenofagia o, como en el caso que nos ocupa, el control inflamatorio<sup>159,160</sup>.

El papel del dominio WDD en el control inflamatorio se había establecido previamente en el *Capítulo 1* de este trabajo. La interacción física y funcional existente entre la molécula antiinflamatoria A20 y el dominio WDD de ATG16L1 presenta una considerable relevancia fisiológica en el mantenimiento de la barrera epitelial intestinal, esto es, en la prevención de una respuesta inflamatoria exacerbada con capacidad para

## DISCUSIÓN

alterar la homeostasis intestinal. De hecho, el establecimiento de una vinculación entre ATG16L1 y control inflamatorio se remonta años atrás. En 2008, Saitoh et al. describieron que los macrófagos procedentes de ratones deficientes en ATG16L1 presentaban una incrementada producción de citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$  e IL-18, tras la estimulación con LPS. Adicionalmente, los ratones carentes de *Atg16l1* a nivel de las células hematopoyéticas mostraban una elevada susceptibilidad al desarrollo de un fenotipo de colitis aguda inducida por dextrano sulfato sódico (DSS), que podía ser contrarrestada mediante la inyección de anticuerpos anti-IL-1 $\beta$  y anti-IL-18<sup>240</sup>. En 2013, Sorbara et al. describieron el papel no autofágico de ATG16L1 en la inhibición de respuestas inflamatorias reguladas por los sensores bacterianos Nod. En este caso, el knock-down de ATG16L1 en MEFs favorecía la producción de citoquinas proinflamatorias mediada por receptores tipo Nod<sup>174</sup>.

Sin embargo, la información procedente del *Capítulo 4* atribuye el incremento en la producción de mediadores inflamatorios como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 no a la carencia de la proteína ATG16L1 completa, sino a la exclusiva deficiencia del dominio WDD, que no puede ser compensada por el dominio efector N-terminal.

### **CAPÍTULO 5. EL DOMINIO WDD DE ATG16L1 MODULA LA TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL ANTIINFLAMATORIA EN MACRÓFAGOS**

Aunque los sistemas celulares de MEFs y THP1 resultaron realmente informativos, los ensayos efectuados en macrófagos proporcionaron la confirmación definitiva respecto a la contribución del dominio WDD a la señalización mediada por IL-10. De hecho, la generación de los ratones carentes del dominio WDD (Nt o E230)<sup>162,163</sup> prácticamente imponía la necesidad de efectuar ensayos funcionales en macrófagos, que constituyen la principal diana celular de IL-10.

Los ratones Nt son viables<sup>162,163</sup>, al contrario que los knock-out para la molécula completa de ATG16L1. Esto implica que son completamente competentes en lo que respecta a la autofagia convencional. A pesar de no desarrollar un fenotipo inflamatorio espontáneo (como los ratones *RUBCN*<sup>-/-</sup>, deficientes en LAP), ni intestinal ni sistémico, Fletcher et al. describieron que los BMDMs procedentes de ratones Nt presentaban

defectos en fagocitosis asociada a LC3 (o LAP), resultado funcional de la inhibición de la autofagia no canónica mediante la eliminación del dominio WDD<sup>162</sup>. Además, los animales Nt mostraban alteraciones en la presentación antigénica mediada por el complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), consecuencia de los defectos existentes en el procesamiento de antígenos. Sin embargo, el mecanismo descrito por Fletcher et al. es completamente dependiente de la lipidación no convencional de LC3 mediada por el dominio WDD, mientras que la hipótesis que se plantea en nuestro trabajo apunta a una función no degradativa de LC3 o incluso a su completa prescindencia en el contexto de la señalización mediada por IL-10.

El efecto sobre la señalización intracelular descrito en nuestro trabajo tampoco puede ser explicado mediante el mecanismo de LAP propuesto por Martínez et al., en el que LC3 se comporta como un regulador esencial del proceso y determina la fusión de los “LAPosomas” con el lisosoma<sup>241</sup>. Sin embargo, los efectos observados en la señalización en respuesta a IL-10 podrían ser exclusivamente dependientes de ATG16L1 y no estar vinculados a otros componentes de la ruta autofágica. De hecho, se ha descrito que ATG16L1 puede reducir las respuestas inflamatorias mediadas por receptores de tipo NOD interfiriendo y reclutando en complejos señalizadores al efector de la NOD-quinasa RIPK2, independientemente de autofagia<sup>174</sup>. En este caso, ATG16L1 también podría modular la señalización antiinflamatoria en respuesta a IL-10 a través del dominio WDD, actuando como un módulo de andamiaje y, asimismo, de forma independiente de autofagia.

Sin embargo, el fenómeno descrito en este estudio presenta algunas características comunes al proceso de endocitosis asociada a LC3 (o LANDO), descrito por Heckmann et al<sup>242</sup>. Aunque se trata de un proceso no canónico, LANDO requiere ciertos efectores de la ruta convencional, como ATG5 y RUBCN. Funcionalmente, se encuentra involucrado en el reciclaje del receptor del péptido  $\beta$ -amiloide y oligómeros, confiriendo protección frente a la agregación de este y promoviendo la generación de una respuesta antiinflamatoria en células de la microglía. De hecho, su déficit en células de la microglía murina, perfectamente competentes en la autofagia convencional, desencadena un incremento en la producción de citoquinas proinflamatorias<sup>242</sup>. Pero, mientras que

## DISCUSIÓN

LANDO es un fenómeno tardío, involucrado en el reciclaje de receptores a la membrana plasmática, la modulación de la señalización por IL-10 mediada por el dominio WDD se produce de forma más temprana (aproximadamente 5-15 minutos tras la estimulación con IL-10) y regula la endocitosis primaria del receptor. Además, LANDO es un proceso completamente dependiente de LC3, en contraposición al fenómeno descrito en este trabajo de tesis, en el que LC3 podría resultar completamente irrelevante.

Adicionalmente, cabe mencionar que puesto que los defectos en señalización observados en ausencia del dominio WDD se detectaron de forma muy temprana, se descartó, asimismo, que el mecanismo responsable del mismo fuese el descrito por Fraser et al. respecto a la endocitosis del receptor EGFR<sup>243</sup>. Fraser et al. definieron que el eficiente reciclaje del receptor EGFR a la membrana plasmática, vía endosomas positivos para Rab11, requería la presencia de una ruta autofágica plenamente competente. En ausencia de una autofagia funcional, las vesículas de EGFR sufrían daños que impedían el reciclaje del receptor a la membrana plasmática. Sin embargo, en contraposición a nuestros datos, no observaron diferencias en la señalización mediada por EGF a tiempos tempranos, esto es, la endocitosis del receptor EGFR no se encontraba alterada. En el caso de EGFR, los defectos en el reciclaje reducían su disponibilidad a nivel de la membrana plasmática<sup>243</sup>. Adicionalmente (y aunque esta información no se adjunta en el apartado de *Resultados*), cabe mencionar que nuestros ensayos no detectaron diferencias en el marcaje endosomal con Rab11, entre células recuperadas con ATG16L1 y con la región Nt. Considerando lo descrito, se descartó la existencia de defectos en el reciclaje de receptores que justificasen el déficit en la señalización en respuesta a IL-10 detectado en ausencia del dominio WDD.

Por otra parte, también es reseñable que, en 2015, Wu et al. caracterizaron que la degradación del receptor Notch1 se producía en vesículas precursoras de autofagosomas positivas para ATG16L1, siendo éste un fenómeno clave en la regulación del destino de las células madre en diversos tejidos<sup>136</sup>. El mecanismo descrito en este caso apuntaba a un efecto mediado por la autofagia convencional, en el que los defectos en la degradación de Notch1 se observaban no sólo en ausencia de ATG16L1, sino también tras el silenciamiento de ATG7, la sobreexpresión de BECN1 o la inducción autofágica vía tratamiento con rapamicina o ausencia de nutrientes<sup>136</sup>. Sin embargo, el fenómeno

descrito en esta tesis doctoral apunta a un mecanismo no convencional y, probablemente, independiente de la maquinaria autofágica que actúa de forma previa a los dos complejos similares a ubiquitina. De hecho, tal y como se ha mencionado en diversas ocasiones, podría tratarse de un fenómeno exclusivamente ATG16L1-dependiente.

Cabe destacar que, aunque no se descarta que en el futuro puedan describirse efectos inflamatorios intestinales o sistémicos en los ratones carentes del dominio WDD, nuestros ensayos atribuyen un papel clave a este dominio en la modulación de la señal antiinflamatoria en respuesta a IL-10. El papel del dominio WDD resultaría especialmente relevante en tejidos mucosos como el intestino o los pulmones, en los que la interleucina 10 es secretada en grandes cantidades con el objetivo de controlar las respuestas inmunológicas indeseadas o incontroladas que podrían ocasionar un daño tisular grave. De forma interesante, se ha descrito que la inhibición de ATG16L1 mediante RNA de interferencia (siRNA) reduce la secreción de IL-10 y la maduración de células dendríticas<sup>244</sup>, ligando dos factores involucrados en la patogénesis de la enfermedad de Crohn.

Curiosamente, el intestino es el órgano que contiene la mayor cantidad de macrófagos del organismo. Como se señalaba en la *Introducción*, los macrófagos no sólo son la diana principal de IL-10, sino que una vez activados pueden producir esta citoquina antiinflamatoria, fundamental para el mantenimiento de la homeostasis mucosal. De hecho, la IL-10 secretada por los macrófagos intestinales o colónicos participa activamente en la regeneración epitelial durante diferentes tipos de daño intestinal o inflamatorio<sup>245</sup>. Sin embargo, la totalidad de los ensayos funcionales descritos en el *Capítulo 5* se efectuaron en macrófagos diferenciados desde células de la médula ósea. La selección del nicho de macrófagos se efectuó basándose en dos criterios: rendimiento y homogeneidad. Esto es, el rendimiento en número de células procedentes de la médula ósea es ampliamente superior al de tejidos como el intestino (lámina propia mucosal), el peritoneo o el hígado<sup>246</sup>, puesto que es en la médula ósea donde se produce la división y diferenciación de los progenitores mieloides a células del linaje monocito/macrófago. Además, los macrófagos de la médula ósea presentan una mayor homogeneidad (en

## DISCUSIÓN

cuanto a tamaño y número de gránulos)<sup>246</sup>, puesto que se diferencian mediante factores de crecimiento bien definidos.

La obtención de macrófagos procedentes de tejidos, como los macrófagos intestinales, es un proceso de mayor complejidad técnica y reducido rendimiento. No obstante, podría resultar interesante reproducir alguno de los ensayos funcionales efectuados en el *Capítulo 5* en macrófagos intestinales. Los macrófagos de los tejidos suelen presentar un estado de maduración superior al de los BMDMs<sup>246</sup>. Si el estado de maduración de los macrófagos intestinales es, efectivamente, superior al de los BMDMs, los ensayos efectuados podrían proporcionar resultados incluso más sólidos, considerando la mayor estabilidad funcional y fenotípica de los mismos. En cualquier caso, cabe señalar que la elección de la fuente de macrófagos es esencialmente relevante en el caso de terapia celular, pero no resulta limitante en este estudio concreto.

### **CAPÍTULO 6. EL POLIMORFISMO DE RIESGO PARA ENFERMEDAD DE CROHN A300 NO IMPACTA EN LA RESPUESTA ANTIINFLAMATORIA MEDIADA POR IL-10**

Las funciones no convencionales atribuidas al dominio WDD en lo que respecta a la señalización antiinflamatoria en respuesta a IL-10, apuntaban a que la presencia del polimorfismo de riesgo para enfermedad de Crohn, ATG16L1-A300, podría, dada su proximidad espacial con el dominio WDD, provocar defectos en la señalización mediada por IL-10. Sin embargo, tal y como se mencionaba anteriormente, distintas versiones del motivo pueden presentar diferente sensibilidad a la presencia de este polimorfismo. Mientras que moléculas como T3JAM o DEDD2 son incapaces de unirse a la versión A300 de ATG16L1, NOD2 y TLR2 interaccionan con la versión A300 con igual o mayor afinidad<sup>156</sup>. Por tanto, cabe señalar que lo descrito en el *Capítulo 6* respecto al receptor IL-10RB no es directamente aplicable a otros de los receptores y moléculas que interaccionan con ATG16L1 a través del dominio WDD. Cada una de estas moléculas presenta una versión diferente del motivo, y la existencia de alteraciones en la interacción con el dominio WDD en presencia del alelo de riesgo dependerá de la sensibilidad relativa de cada versión del mismo.



## DISCUSIÓN

De hecho, una extensión de los ensayos de microarrays en la que se evaluase comparativamente la capacidad de interacción de ATG16L1-T300 y ATG16L1-A300 con cada versión del motivo identificada, en función de los residuos presentes en el mismo, permitiría predecir la sensibilidad relativa de cada molécula candidata a la presencia del alelo de riesgo.

Mientras algunos autores han descrito que sistemas celulares reconstituidos con la versión A300 de ATG16L1 presentan defectos en la xenofagia en respuesta a *Salmonella typhimurium*<sup>159</sup>, otros argumentan que células con la variante alélica A300 son más eficientes en la eliminación del patógeno, respecto a sus homólogas WT<sup>160</sup>. Por tanto, la contribución del alelo de riesgo a la alteración de la homeostasis celular es dependiente de factores genéticos, epigenéticos o ambientales adicionales. De hecho, el polimorfismo de riesgo A300 no representa, aisladamente, un factor desencadenante de enfermedad inflamatoria intestinal<sup>247</sup>. Esto explicaría por qué un elevado porcentaje de la población (55% de los alelos en la población europea y entre el 20-40% en otras poblaciones)<sup>247</sup> porta la variante de riesgo sin padecer ningún tipo de sintomatología clínica. Por tanto, resultaría imprescindible un profundo estudio del alcance patológico del polimorfismo A300 en combinación con otros factores, con el fin de establecer un patrón causativo en este tipo de patologías.

Cabe señalar, asimismo, que los efectos inflamatorios asociados a la versión A300 de ATG16L1 son altamente específicos de tipo celular, y consecuentemente, no reproducibles en otros contextos biológicos<sup>247</sup>. Aunque la contribución de alelo de riesgo al fenotipo de inflamación intestinal en enfermedad de Crohn, mediante mecanismos inmunes dependientes o independientes de autofagia, parece estar completamente establecida, algunos autores cuestionan su rol en el inicio de la patología<sup>248</sup>. Esto es, mientras que la correlación entre la variante de riesgo A300 y el curso clínico de la enfermedad ílica, así como la aparición de un elevado número de recidivas, se encuentra inequívocamente descrita, no se considera que la mutación en ATG16L1 sea el agente etiológico de este desorden. Así, las estrategias terapéuticas actuales para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal se basan en la manipulación de la autofagia en combinación con otras rutas, en las que se encuentran implicadas citoquinas como IL-

## DISCUSIÓN

1 $\beta$ , receptores NOD1/2 o estrés reticular, en función de genotipo específico de cada paciente.

Como se señalaba en la *Introducción*, la subunidad IL-10RB forma parte del complejo receptor de diversas citoquinas, entre las que destacan la propia IL-10, IL-22, IL-26, IL-28A, IL-28B e IL-29. En el estudio de la enfermedad inflamatoria intestinal resultan especialmente interesantes IL-22 e IL-26.

IL-22 señala a través de un receptor constituido por las subunidades IL-22RA e IL-10RB y es secretada por diversas poblaciones de células inmunes en regiones inflamadas. Esta citoquina estimula la supervivencia celular, la proliferación y la síntesis de moléculas antimicrobianas, ejerciendo prioritariamente sus efectos sobre células no hematopoyéticas, principalmente epiteliales y estromales<sup>178</sup>. Por otra parte, IL-26 señala a través de un complejo constituido por las subunidades IL-20R1 e IL-10RB. Se trata de una citoquina secretada por linfocitos Th17, implicada en el reconocimiento inmune de bacterias y células huéspedes que han sufrido un proceso de muerte. De hecho, ejerce su función biológica actuando como un péptido antimicrobiano, eliminando bacterias intracelulares mediante la formación de poros en la membrana de las mismas<sup>249</sup>.

Tal y como se mencionaba en la *Introducción*, tanto la interleucina 22 como la 26 modulan la respuesta inmune a nivel de la piel. Considerando que las mutaciones que afectan a la subunidad IL-10RB, común al complejo receptor de ambas citoquinas, predisponen al desarrollo de una forma temprana y extremadamente grave de enfermedad de Crohn, se postula que la foliculitis crónica que desarrollan pacientes con alteraciones en IL-10RB podría estar causada por una inapropiada señalización en respuesta a IL-22 o IL-26<sup>146</sup>. Por ello, resultaría interesante reproducir el sistema de señalización para ambas citoquinas en MEFs o, de forma más sencilla, estudiar el efecto de ambas citoquinas en células THP1 o macrófagos de ratón deficientes en el dominio WDD, en comparación con sus homólogas WT. Hipotéticamente, el polimorfismo de riesgo A300 podría provocar defectos en la señalización por alguna de estas citoquinas, alterando su respuesta biológica.

Otras citoquinas como IL-28 (en sus dos isoformas, A y B) e IL-29, que también señalizan a través de un complejo receptor que incluye a IL-10RB, median señales

antivirales y antiproliferativas en células intestinales epiteliales en respuesta a la infección por el citomegalovirus humano (HCMV). La infección por este virus ubicuo provoca lesiones en la mucosa del tracto gastrointestinal, similares a las descritas en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal<sup>250</sup>. Sin embargo, y a pesar de su potencial asociación con el desarrollo de IBD, la relevancia de IL-22 e IL-26 resta importancia al estudio de IL-28 e IL-29.

Con independencia del rol del polimorfismo de riesgo en la señalización en respuesta a IL-10, en este estudio se ha establecido la existencia de una evidente contribución del dominio WDD a la transducción de la señal antiinflamatoria mediada por la citoquina IL-10. La disfunción de este dominio provoca alteraciones en la modulación de la respuesta inflamatoria. La noción de que el dominio WDD participa en la respuesta inflamatoria, esto es, en actividades no asociadas a la autofagia convencional, contribuye a reforzar la hipótesis de que su adición a la molécula de ATG16L1 es consecuencia del proceso evolutivo que tendría como finalidad incrementar la funcionalidad de este efector autofágico en eucariotas superiores.



# CONCLUSIONES



## CONCLUSIONES

1. A20 y ATG16L1 interactúan a través de sus dominios OTU y WDD, respectivamente. Esta interacción modula una amplia variedad de rutas que controlan autofagia, inflamación y estabilidad proteica, constituyendo un bucle de señalización que integra múltiples procesos celulares al objeto de mantener la homeostasis intestinal.
2. El sistema de cribado establecido permite identificar moléculas que interactúan *in vitro* con el dominio WDD de ATG16L1.
3. IL-10RB interactúa con ATG16L1 a través del dominio WDD. La mutación de los aminoácidos clave en el motivo de unión interrumpe la interacción.
4. La ausencia del dominio WDD provoca alteraciones en la señalización en respuesta a IL-10. La señal inducida por la citoquina se transduce con reducida eficacia en células carentes del dominio WDD, en sistemas de diversa entidad biológica.
5. Las células carentes del dominio WDD presentan una endocitosis ralentizada del receptor IL-10RB, acompañada de alteraciones en el tráfico temprano del receptor una vez endocitado.
6. Los defectos en la transducción de la señal inducida por IL-10, observados en ausencia del dominio WDD, se traducen en una deficitaria respuesta antiinflamatoria. El dominio WDD regula la respuesta antiinflamatoria mediada por IL-10.
7. El polimorfismo de riesgo para enfermedad de Crohn en ATG16L1, A300, no impacta sobre la señalización en respuesta a IL-10.





# REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mizushima, N. Autophagy : process and function. *Genes Dev.* **21**, 2861–2873 (2007).
2. De Duve, C. General Properties of Lysosomes. *Ciba Found. Symp. Lysosomes* 1–35 (1963).
3. Levine, B. & Klionsky, D. J. Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker’s yeast fuel advances in biomedical research. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, 201–205 (2017).
4. Klionsky, D. J. & Levine, B. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* **6**, 463–477 (2004).
5. Münch, C. & Dikic, I. Hitchhiking on selective autophagy. *Nat. Cell Biol.* **20**, 122–124 (2018).
6. Anding, A. L. & Baehrecke, E. H. Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles. *Dev. Cell* **41**, 10–22 (2017).
7. Cuervo, A. M. Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* **14**, 70–77 (2004).
8. Baehrecke, E. H. Autophagy: Dual roles in life and death? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 505–510 (2005).
9. Bursch, W., Ellinger, A., Gerner, C. H. & Fröhwein, U. Programmed Cell Death (PCD) Apoptosis, Autophagic PCD, or Others ? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **926**, 1–12 (2000).
10. Debnath, J., Baehrecke, E. H. & Kroemer, G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* **1**, 66–74 (2005).
11. Shen, S., Kepp, O. & Kroemer, G. The end of autophagic cell death? *Autophagy* **8:1**, 1–3 (2012).
12. Yin, Z., Pascual, C. & Klionsky, D. Autophagy: machinery and regulation. *Microb. Cell* **3**, 588–596 (2016).
13. Eskelinen, E. L. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells. *Autophagy* **1**, 1–10 (2005).
14. Arstila, A. U. & Trump, B. F. Studies on cellular autophagocytosis. The formation of autophagic vacuoles in the liver after glucagon administration. *Am. J. Pathol.* **53**, 687–733 (1968).
15. Tekirdag, K. & Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy and endosomal

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- microautophagy: Joint by a chaperone. *J. Biol. Chem.* **293**, 5414–5424 (2018).
16. Codogno, P., Mehrpour, M. & Proikas-Cezanne, T. Canonical and non-canonical autophagy: Variations on a common theme of self-eating? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 7–12 (2012).
  17. Chiang, H. L. & Dice, J. F. Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J. Biol. Chem.* **263**, 6797–6805 (1988).
  18. Arndt, V. *et al.* Chaperone-Assisted Selective Autophagy Is Essential for Muscle Maintenance. *Curr. Biol.* **20**, 143–148 (2010).
  19. Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A. M. & Klionsky, D. J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**, 1069–1075 (2008).
  20. Tsukada, M. & Ohsumi, Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **333**, 169–174 (1993).
  21. Koch, B. *et al.* Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **349**, 275–280 (1994).
  22. Harding, T. M., Morano, K. A., Scott, S. V. & Klionsky, D. J. Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway. *J. Cell Biol.* **131**, 591–602 (1995).
  23. Klionsky, D. J. *et al.* A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell* **5**, 539–545 (2003).
  24. Mizushima, N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. *Nat. Cell Biol.* **20**, 521–527 (2018).
  25. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* **149**, 274–293 (2012).
  26. Mammucari, C. *et al.* FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo. *Cell Metab.* **6**, 458–471 (2007).
  27. Sarkar, S. *et al.* Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J. Cell Biol.* **170**, 1101–1111 (2005).
  28. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K. L. AMPK and mTOR regulate autophagy

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **13**, 132–141 (2011).
29. Kim, J. *et al.* Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell* **152**, 290–303 (2013).
  30. Rubinsztein, D. C., Shpilka, T. & Elazar, Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr. Biol.* **22**, R29–R34 (2012).
  31. Ganley, I. G. *et al.* ULK1·ATG13·FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* **284**, 12297–12305 (2009).
  32. Hosokawa, N. *et al.* Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13. *Autophagy* **5**, 973–979 (2009).
  33. Itakura, E. & Mizushima, N. Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* **6**, 764–776 (2010).
  34. Burman, C. & Ktistakis, N. T. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett.* **584**, 1302–1312 (2010).
  35. Karanasios, E. *et al.* Dynamic association of the ULK1 complex with omegasomes during autophagy induction. *J. Cell Sci.* **126**, 5224–5238 (2013).
  36. Maria Fimia, G. *et al.* Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* **447**, 1121–1125 (2007).
  37. Russell, R. C. *et al.* ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* **15**, 741–750 (2013).
  38. Polson, H. E. J. *et al.* Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* **6**, 506–522 (2010).
  39. Proikas-Cezanne, T. *et al.* WIPI-1 $\alpha$  (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. *Oncogene* **23**, 9314–9325 (2004).
  40. Axe, E. L. *et al.* Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **182**, 685–701 (2008).
  41. Velikkakath, A. K. G., Nishimura, T., Oita, E., Ishihara, N. & Mizushima, N. Mammalian

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol. Biol. Cell* **23**, 896–909 (2012).
42. Suzuki, K. *et al.* The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J.* **20**, 5971–5981 (2001).
43. Hurley, J. H. & Young, L. N. Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annu Rev Biochem.* **86**, 225–244 (2017).
44. Hamasaki, M. *et al.* Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* **495**, 389–93 (2013).
45. Orsi, A. *et al.* Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* **23**, 1860–1873 (2012).
46. Lamb, C. A., Yoshimori, T. & Tooze, S. A. The autophagosome: Origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 759–774 (2013).
47. Yang, Z. & Klionsky, D. J. Eaten alive: A history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* **12**, 814–822 (2010).
48. Hailey, D. W. *et al.* Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. *Cell* **141**, 656–667 (2010).
49. Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C. & Rubinsztein, D. C. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* **12**, 747–757 (2010).
50. Longatti, A. & Tooze, S. A. Recycling endosomes contribute to autophagosome formation. *Autophagy* **8**, 1682–1683 (2012).
51. Ge, L., Melville, D., Zhang, M. & Schekman, R. The ER–Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *Elife* **2**, 1–23 (2013).
52. Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. A New Protein Conjugation System in Human. *J. Biol. Chem.* **273**, 33889–33893 (1998).
53. Ohsumi, Y. Molecular dissection of autophagy: Two ubiquitin-like systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 211–216 (2001).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

54. Geng, J. & Klionsky, D. J. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. *EMBO Rep.* **9**, 859–864 (2008).
55. Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N. & Ohsumi, Y. Formation of the 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 Multimeric Complex, Mediated by Apg16 Oligomerization, Is Essential for Autophagy in Yeast. *J. Biol. Chem.* **277**, 18619–18625 (2002).
56. Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A. & Matsubae, M. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12- Apg5 conjugate. *J. Cell Sci.* **116**, 1679–1688 (2003).
57. Kirisako, T. *et al.* The Reversible Modification Regulates the Membrane-Binding State of Apg8/Aut7 Essential for Autophagy and the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway. *J. Cell Biol.* **151**, 263–275 (2000).
58. Ichimura, Y. *et al.* A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**, 488–492 (2000).
59. Hanada, T. *et al.* The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**, 37298–37302 (2007).
60. Fujita, N. *et al.* The Atg16L Complex Specifies the Site of LC3 Lipidation for Membrane Biogenesis in Autophagy. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2092–2100 (2008).
61. Agrotis, A. *et al.* Redundancy of human ATG4 protease isoforms in autophagy and LC3/GABARAP processing revealed in cells processing revealed in cells. *Autophagy* **15**, 976–997 (2019).
62. Weidberg, H. *et al.* LC3 and GATE-16 N Termini Mediate Membrane Fusion Processes Required for Autophagosome Biogenesis. *Dev. Cell* **20**, 444–454 (2011).
63. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313–26 (2010).
64. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**, 1–222 (2016).
65. Young, A. R. J. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J. Cell Sci.* **119**, 3888–3900 (2006).
66. Monastyrska, I., Rieter, E., Klionsky, D. J. & Reggiori, F. Multiple roles of the

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- cytoskeleton in autophagy. *Biol. Rev.* **84**, 431–448 (2009).
67. Gordon, P. B. & Seglen, P. O. Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **151**, 40–47 (1988).
68. Nakamura, S. & Yoshimori, T. New insights into autophagosome–lysosome fusion. *J. Cell Sci.* **130**, 1209–1216 (2017).
69. Liang, C. *et al.* Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat. Cell Biol.* **10**, 776–787 (2008).
70. Sun, Q. *et al.* The RUN domain of Rubicon is important for hVps34 binding, lipid kinase inhibition, and autophagy suppression. *J. Biol. Chem.* **286**, 185–191 (2011).
71. Itoh, T., Kanno, E., Uemura, T., Waguri, S. & Fukuda, M. OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *J. Cell Biol.* **192**, 838–853 (2011).
72. Fujita, N. *et al.* Genetic screen in *Drosophila* muscle identifies autophagy-mediated T-tubule remodeling and a Rab2 role in autophagy. *Elife* **6**, 1–30 (2017).
73. Fader, C. M., Sánchez, D. G., Mestre, M. B. & Colombo, M. I. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1793**, 1901–1916 (2009).
74. Weber, T. *et al.* SNAREpins: Minimal machinery for membrane fusion. *Cell* **92**, 759–772 (1998).
75. Itakura, E., Kishi-Itakura, C. & Mizushima, N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* **151**, 1256–1269 (2012).
76. Jiang, P. *et al.* The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol. Biol. Cell* **25**, 1327–1337 (2014).
77. Wijdeven, R. H. *et al.* Cholesterol and ORP1L-mediated ER contact sites control autophagosome transport and fusion with the endocytic pathway. *Nat. Commun.* **7**, 1–14 (2016).
78. Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* **36**,



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1811–1836 (2017).
79. Zhu, J. H. *et al.* Regulation of autophagy by extracellular signal-regulated protein kinases during 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced cell death. *Am. J. Pathol.* **170**, 75–86 (2007).
80. Mauthe, M. *et al.* Resveratrol-mediated autophagy requires WIPI-1-regulated LC3 lipidation in the absence of induced phagophore formation. *Autophagy* **7**, 1448–1461 (2011).
81. Grishchuk, Y., Ginet, V., Truttmann, A. C., Clarke, P. G. H. & Puyal, J. Beclin 1-independent autophagy contributes to apoptosis in cortical neurons. *Autophagy* **7**, 1115–1131 (2011).
82. Arsov, I. *et al.* A Role for Autophagic Protein Beclin 1 Early in Lymphocyte Development. *J. Immunol.* **186**, 2201–2209 (2011).
83. Mestre, M. B., Fader, C. M., Sola, C. & Colombo, M. I.  $\alpha$ -hemolysin is required for the activation of the autophagic pathway in *Staphylococcus aureus*-infected cells. *Autophagy* **6**, 110–125 (2010).
84. Nishida, Y. *et al.* Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* **461**, 654–658 (2009).
85. Zhang, J. *et al.* Mitochondrial clearance is regulated by Atg7-dependent and -independent mechanisms during reticulocyte maturation. *Blood* **114**, 157–164 (2009).
86. Tsuboyama, K. *et al.* The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science (80-. ).* **354**, 1036–1041 (2016).
87. Andrade, R. M., Wessendarp, M., Gubbels, M. J., Striepen, B. & Subauste, C. S. CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J. Clin. Invest.* **116**, 2366–2377 (2006).
88. Sanjuan, M. A. *et al.* Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* **450**, 1253–1257 (2007).
89. Florey, O., Kim, S. E., Sandoval, C. P., Haynes, C. M. & Overholtzer, M. Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1335–1343 (2011).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

90. Komatsu, M. & Ichimura, Y. Selective autophagy regulates various cellular functions. *Genes to Cells* **15**, 923–933 (2010).
91. Mizushima, N. & Komatsu, M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* **147**, 728–741 (2011).
92. Pimentel-Muiños, F. X. & Boada-Romero, E. Selective autophagy against membranous compartments: Canonical and unconventional purposes and mechanisms. *Autophagy* **10**, 397–407 (2014).
93. Kirkin, V. *et al.* A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates. *Mol. Cell* **33**, 505–516 (2009).
94. Pankiv, S. *et al.* p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J. Biol. Chem.* **282**, 24131–24145 (2007).
95. Thurston, T. L. M., Ryzhakov, G., Bloor, S., Muhlinen, N. Von & Randow, F. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat. Immunol.* **10**, 1215–1221 (2009).
96. Formstone, A. *et al.* Phosphorylation of the Autophagy Receptor Optineurin Restricts *Salmonella* Growth. *Science (80-. )*. **333**, 228–233 (2011).
97. Noda, N. N., Ohsumi, Y. & Inagaki, F. Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy. *FEBS Lett.* **584**, 1379–1385 (2010).
98. Heckmann, B. L., Boada-Romero, E., Cunha, L. D., Magne, J. & Green, D. R. LC3-Associated Phagocytosis and Inflammation. *J. Mol. Biol.* **429**, 3561–3576 (2017).
99. Martinez, J. *et al.* Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 17396–17401 (2011).
100. Lee, H. K. *et al.* *In Vivo* Requirement for Atg5 in Antigen Presentation by Dendritic Cells. *Immunity* **32**, 227–239 (2010).
101. Travassos, L. H. *et al.* Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.* **11**, 55–62 (2010).
102. Boada-Romero, E. *et al.* TMEM59 defines a novel ATG16L1-binding motif that promotes local activation of LC3. *EMBO J.* **32**, 566–582 (2013).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

103. Pujol, C. *et al.* *Yersinia pestis* can reside in autophagosomes and avoid xenophagy in murine macrophages by preventing vacuole acidification. *Infect. Immun.* **77**, 2251–2261 (2009).
104. Jackson, W. T. *et al.* Subversion of cellular autophagosomal machinery by RNA viruses. *PLoS Biol.* **3**, 0861–0871 (2005).
105. Ravikumar, B. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 1107–1117 (2002).
106. Pickford, F. *et al.* The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid  $\beta$  accumulation in mice. *J. Clin. Invest.* **118**, 2190–2199 (2008).
107. Ravikumar, B. *et al.* Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* **36**, 585–595 (2004).
108. Webb, J. L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J. N. & Rubinsztein, D. C.  $\alpha$ -synuclein Is Degraded by Both Autophagy and the Proteasome. *J. Biol. Chem.* **278**, 25009–25013 (2003).
109. Lu, K., Psakhye, I. & Jentsch, S. A new class of ubiquitin-Atg8 receptors involved in selective autophagy and polyQ protein clearance. *Autophagy* **10**, 2381–2382 (2014).
110. Clausen, T. H. *et al.* p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy* **6**, 330–344 (2010).
111. Sandoval, H. *et al.* Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* **454**, 232–235 (2008).
112. Liu, L., Sakakibara, K., Chen, Q. & Okamoto, K. Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems. *Cell Res.* **24**, 787–795 (2014).
113. Wei, Y., Chiang, W. C., Sumpter, R., Mishra, P. & Levine, B. Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell* **168**, 224–238.e10 (2017).
114. Zhang, N. *et al.* PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biol.* **2**, 120080 (2012).
115. Chu, C. T. *et al.* Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat. Cell Biol.* **15**, 1197–1205 (2013).
116. Nordgren, M. *et al.* Export-deficient monoubiquitinated PEX5 triggers peroxisome removal in SV40 large T antigen-transformed mouse embryonic fibroblasts. *Autophagy* **11**, 1326–1340 (2015).
117. Hara-Kuge, S. & Fujiki, Y. The peroxin Pex14p is involved in LC3-dependent degradation of mammalian peroxisomes. *Exp. Cell Res.* **314**, 3531–3541 (2008).
118. Khaminets, A. *et al.* Regulation of endoplasmic reticulum turnover by selective autophagy. *Nature* **522**, 354–358 (2015).
119. Changou, C. A. *et al.* Arginine starvation-associated atypical cellular death involves mitochondrial dysfunction, nuclear DNA leakage, and chromatin autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 14147–14152 (2014).
120. Maejima, I. *et al.* Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J.* **32**, 2336–2347 (2013).
121. White, E. & DiPaola, R. S. The double-edged sword of autophagy modulation in cancer. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5308–5316 (2009).
122. Levine, B. & Kroemer, G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell* **132**, 27–42 (2008).
123. Apel, A., Herr, I., Schwarz, H., Rodemann, H. P. & Mayer, A. Blocked autophagy sensitizes resistant carcinoma cells to radiation therapy. *Cancer Res.* **68**, 1485–1494 (2008).
124. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
125. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, L. B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**, 672–76 (1999).
126. Fernández, Á. F. & López-Otín, C. The functional and pathologic relevance of autophagy proteases. *J. Clin. Invest.* **125**, 33–41 (2015).
127. Rosenfeldt, M. T. *et al.* P53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. *Nature* **504**, 296–300 (2013).
128. Lock, R., Kenific, C. M., Leidal, A. M., Salas, E. & Debnath, J. Autophagy-dependent

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- production of secreted factors facilitates oncogenic RAS-Driven invasion. *Cancer Discov.* **4**, 466–479 (2014).
129. Papandreou, M. E. & Tavernarakis, N. Autophagy and the endo/exosomal pathways in health and disease. *Biotechnol. J.* **12**, 1–11 (2017).
130. Dikic, I. & Elazar, Z. Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 349–364 (2018).
131. Komatsu, M. *et al.* Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nat. Lett.* **441**, 880–884 (2006).
132. Hara, T. *et al.* Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nat. Lett.* **441**, 885–889 (2006).
133. Seibenhener, M. L. *et al.* Sequestosome 1/p62 Is a Polyubiquitin Chain Binding Protein Involved in Ubiquitin Proteasome Degradation. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 8055–8068 (2004).
134. Walden, H. & Muqit, M. M. K. Ubiquitin and Parkinson’s disease through the looking glass of genetics. *Biochem. J.* **474**, 1439–1451 (2017).
135. Yue, Z., Jin, S., Yang, C., Levine, A. J. & Heintz, N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 15077–15082 (2003).
136. Wu, X. *et al.* Autophagy regulates Notch degradation and modulates stem cell development and neurogenesis. *Nat. Commun.* **7**, 1–17 (2016).
137. Boya, P., Esteban-martínez, L., Serrano-puebla, A., Raquel, G. & Villarejo-zori, B. Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging. *Prog. Retin. Eye Res.* **55**, 206–245 (2016).
138. Ma, Y., Galluzzi, L., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Autophagy and cellular immune responses. *Immunity* **39**, 211–227 (2013).
139. Gomes, L. C. & Dikic, I. Autophagy in antimicrobial immunity. *Mol. Cell* **54**, 224–233 (2014).
140. Van Wijk, S. J. L. *et al.* Linear ubiquitination of cytosolic *Salmonella Typhimurium* activates NF- $\kappa$ B and restricts bacterial proliferation. *Nat. Microbiol.* **2**, 1–10 (2017).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

141. Khor, B., Gardet, A. & Xavier, R. J. Genetics and pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **474**, 307–317 (2011).
142. Baumgart, D. C. & Sandborn, W. J. Crohn's disease. *Lancet* **380**, 1590–1605 (2013).
143. Franke, A. *et al.* Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat. Genet.* **42**, 1118–1125 (2010).
144. Barrett, J. C. *et al.* Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nat. Genet.* **40**, 955–962 (2008).
145. Imielinski, M. *et al.* Common variants at five new loci associated with early-onset inflammatory bowel disease. *Nat. Genet.* **41**, 1335–1340 (2009).
146. Glocker, E.-O. *et al.* Inflammatory Bowel Disease and Mutations Affecting the Interleukin-10 Receptor. *N. Engl. J. Med.* **361**, 2033–2045 (2009).
147. Hampe, J. *et al.* A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nat. Genet.* **39**, 207–211 (2007).
148. Rioux, J. D. *et al.* Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat. Genet.* **39**, 596–604 (2007).
149. Racanelli, A. C., Kikkers, S. A., Choi, A. M. K. & Cloonan, S. M. Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease. *Autophagy* **14**, 221–232 (2018).
150. Gammoh, N., Florey, O., Overholtzer, M. & Jiang, X. Interaction between FIP200 and ATG16L1 distinguishes ULK1 complex-dependent and -independent autophagy. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 144–149 (2012).
151. Nishimura, T. *et al.* FIP200 regulates targeting of Atg16L1 to the isolation membrane. *EMBO Rep.* **14**, 284–291 (2013).
152. Voorn, L. Van Der & Ploegh, H. L. The WD-40 repeat. *FEBS Lett.* **307**, 131–134 (1992).
153. Smith, T. F., Gaitatzes, C., Saxena, K. & Neer, E. J. The WD repeat: A common architecture for diverse functions. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 181–185 (1999).
154. Fujita, N. *et al.* Differential Involvement of Atg16L1 in Crohn Disease and Canonical Autophagy. *J. Biol. Chem.* **284**, 32602–32609 (2009).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

155. Choi, J. *et al.* The Parasitophorous Vacuole Membrane of *Toxoplasma gondii* Is Targeted for Disruption by Ubiquitin-like Conjugation Systems of Autophagy. *Immunity* **40**, 924–935 (2014).
156. Boada-Romero, E. *et al.* The T300A Crohn's disease risk polymorphism impairs function of the WD40 domain of ATG16L1. *Nat. Commun.* **7**, 1–13 (2016).
157. Dooley, H. C. *et al.* WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12-5-16L1. *Mol. Cell* **55**, 238–252 (2014).
158. Ishibashi, K., Uemura, T., Waguri, S. & Fukuda, M. Atg16L1, an essential factor for canonical autophagy, participates in hormone secretion from PC12 cells independently of autophagic activity. *Mol. Biol. Cell* **23**, 3193–3202 (2012).
159. Kuballa, P., Huett, A., Rioux, J. D., Daly, M. J. & Xavier, R. J. Impaired autophagy of an intracellular pathogen induced by a Crohn's disease associated ATG16L1 variant. *PLoS One* **3**, 1–8 (2008).
160. Messer, J. S. *et al.* The Crohn's disease: associated ATG16L1 variant and *Salmonella* invasion. *BMJ Open* **3**, 1–8 (2013).
161. Fujita, N. *et al.* Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. *J. Cell Biol.* **203**, 115–128 (2013).
162. Fletcher, K. *et al.* The WD40 domain of ATG16L1 is required for its non-canonical role in lipidation of LC3 at single membranes. *EMBO J.* **37**, e97840 (2018).
163. Rai, S. *et al.* The ATG5-binding and coiled coil domains of ATG16L1 maintain autophagy and tissue homeostasis in mice independently of the WD domain required for LC3-associated phagocytosis. *Autophagy* **15**, 599–612 (2019).
164. He, Y. J., McCall, C. M. & Hu, J. DDB1 functions as a linker to recruit receptor WD40 proteins to CUL4-ROC1 ubiquitin ligases. *Genes Dev.* **20**, 2949–2954 (2006).
165. Hu, J. *et al.* TMEM166/EVA1A interacts with ATG16L1 and induces autophagosome formation and cell death. *Cell Death Dis.* **7**, 1–13 (2016).
166. Kimura, T. *et al.* TRIM-mediated precision autophagy targets cytoplasmic regulators of innate immunity. *J. Cell Biol.* **210**, 973–989 (2015).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

167. Murthy, A. *et al.* A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3. *Nature* **506**, 456–462 (2014).
168. Lassen, K. G., Kuballa, P., Conway, K. L., Patel, K. K. & Becker, C. E. Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**, 7741–7746 (2014).
169. Cadwell, K. *et al.* A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nat. Lett.* **456**, 259–264 (2008).
170. Cadwell, K. *et al.* Virus-Plus-Susceptibility Gene Interaction Determines Crohn's Disease Gene Atg16L1 Phenotypes in Intestine. *Cell* **141**, 1135–1145 (2010).
171. Cooney, R. *et al.* NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat. Med.* **16**, 90–97 (2009).
172. Ogura, Y., Inohara, N., Benito, A., Chen, F. F. & Yamaoka, S. Nod2, a Nod1/Apaf-1 Family Member That Is Restricted to Monocytes and Activates NF- $\kappa$ B. *J. Biol. Chem.* **276**, 4812–4818 (2001).
173. Inohara, N. *et al.* Host Recognition of Bacterial Muramyl Dipeptide Mediated through NOD2. *J. Biol. Chem.* **278**, 5509–5513 (2003).
174. Sorbara, M. T. *et al.* The Protein ATG16L1 Suppresses Inflammatory Cytokines Induced by the Intracellular Sensors Nod1 and Nod2 in an Autophagy-Independent Manner. *Immunity* **39**, 858–873 (2013).
175. Spencer, S. D. *et al.* The Orphan Receptor CRF2-4 Is an Essential Subunit of the Interleukin 10 Receptor. *J. Exp. Med.* **187**, 571–578 (1998).
176. Kuhn, R. K., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. & Muller, W. Interleukin-10-Deficient Mice Develop Chronic Enterocolitis. *Cell* **75**, 263–274 (1993).
177. Shouval, D. S. *et al.* Interleukin-10 receptor signaling in innate immune cells regulates mucosal immune tolerance and anti-inflammatory macrophage function. *Immunity* **40**, 706–719 (2014).
178. Ouyang, W., Rutz, S., Crellin, N. K., Valdez, P. A. & Hymowitz, S. G. Regulation and Functions of the IL-10 Family of Cytokines in Inflammation and Disease. *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 71–109 (2011).



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

179. Pestka, S. *et al.* Interleukin-10 and related cytokines and receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **22**, 929–979 (2004).
180. Commins, S., Steinke, J. W. & Borish, L. The extended IL-10 superfamily: IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28, and IL-29. *J. Allergy Clin Immunol* **121**, 1108–1111 (2008).
181. Hutchins, A. P., Diez, D. & Miranda-Saavedra, D. The IL-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response: Recent developments and future challenges. *Brief. Funct. Genomics* **12**, 489–498 (2013).
182. Kasmi, K. C. El *et al.* Cutting Edge: A Transcriptional Repressor and Corepressor Induced by the STAT3-Regulated Anti-Inflammatory Signaling Pathway. *J. Immunol.* **179**, 7215–7219 (2007).
183. Braun, D. A., Fribourg, M. & Sealfon, S. C. Cytokine Response Is Determined by Duration of Receptor and Signal Transducers and Activators of Transcription 3 (STAT3) Activation. *J. Biol. Chem.* **288**, 2986–2993 (2013).
184. Yasukawa, H. *et al.* IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat. Immunol.* **4**, 551–556 (2003).
185. Marlow, G. J. *et al.* Why interleukin-10 supplementation does not work in Crohn’s disease patients. *World J. Gastroenterol.* **19**, 3931–3941 (2013).
186. Pott, J., Kabat, A. M. & Maloy, K. J. Intestinal Epithelial Cell Autophagy Is Required to Protect against TNF-Induced Apoptosis during Chronic Colitis in Mice. *Cell Host Microbe* **23**, 191-202.e4 (2018).
187. Ip, W. K. E., Hoshi, N., Shouval, D. S., Snapper, S. & Medzhitov, R. Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science (80-. ).* **356**, 513–519 (2017).
188. Cornelissen, C., Lüscher-firzlaff, J., Malte, J. & Lüscher, B. Signaling by IL-31 and functional consequences. *Eur. J. Cell Biol.* **91**, 552–566 (2012).
189. Dambacher, J. *et al.* Interleukin 31 mediates MAP kinase and STAT1/3 activation in intestinal epithelial cells and its expression is upregulated in inflammatory bowel disease. *Gut* **56**, 1257–1265 (2007).
190. Diveu, C. *et al.* Predominant expression of the long isoform of GP130-like (GPL) receptor

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- is required for interleukin-31 signaling. *Eur. Cytokine Netw.* **15**, 291–302 (2004).
191. Yagi, Y. *et al.* Interleukin-31 stimulates production of inflammatory mediators from human colonic subepithelial myofibroblasts. *Int. J. Mol. Med.* **19**, 941–946 (2007).
  192. Lee, E. G. *et al.* Failure to regulate TNF-induced NF- $\kappa$ B and cell death responses in A20-deficient mice. *Science (80-. )*. **289**, 2350–2354 (2000).
  193. Ma, A. & Malynn, B. A. A20: Linking a complex regulator of ubiquitylation to immunity and human disease. *Nat. Rev. Immunol.* **12**, 774–785 (2012).
  194. Maloy, K. J. & Powrie, F. Intestinal homeostasis and its breakdown in inflammatory bowel disease. *Nature* **474**, 298–306 (2011).
  195. Vereecke, L., Beyaert, R. & Loo, G. Van. Enterocyte death and intestinal barrier maintenance in homeostasis and disease. *Trends Mol. Med.* **17**, 584–593 (2011).
  196. Vereecke, L., Beyaert, R. & Loo, G. Van. Genetic relationships between A20/TNFAIP3, chronic inflammation and autoimmune disease. *Biochem. Soc. Trans* **39**, 1086–1091 (2011).
  197. Garcia-Carbonell, R. *et al.* Elevated A20 promotes TNF-induced and RIPK1-dependent intestinal epithelial cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, E9192–E9200 (2018).
  198. Jin, Z. *et al.* Cullin3-Based Polyubiquitination and p62-Dependent Aggregation of Caspase-8 Mediate Extrinsic Apoptosis Signaling. *Cell* **137**, 721–735 (2009).
  199. Won, M. *et al.* Novel anti-apoptotic mechanism of A20 through targeting ASK1 to suppress TNF-induced JNK activation. *Cell Death Differ.* **17**, 1830–1841 (2010).
  200. Catrysse, L., Vereecke, L., Beyaert, R. & Loo, G. Van. A20 in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* **35**, 22–31 (2014).
  201. Slowicka, K. *et al.* Physical and functional interaction between A20 and ATG16L1-WD40 domain in the control of intestinal homeostasis. *Nat. Commun.* **10**, 1–15 (2019).
  202. Burton, P. R. *et al.* Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* **447**, 661–678 (2007).
  203. Klee, M., Pallauf, K., Fleischer, A., Alcalá, S. & Pimentel-Muñoz, F. X. Mitochondrial apoptosis induced by BH3-only endoplasmic reticular Bak. *EMBO J.* **28**, 1757–1768 (2009).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

204. Green, N. *et al.* Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin. *Cell* **28**, 477–487 (1982).
205. Lim, P. S. *et al.* Distribution and Specific Identification of Papillomavirus Major Capsid Protein Epitopes by Immunocytochemistry and Epitope Scanning of Synthetic Peptides. *J. Infect. Dis.* **162**, 1263–1269 (1990).
206. Munro, S. & Pelham, H. R. Use of peptide tagging to detect proteins expressed from cloned genes: deletion mapping functional domains of *Drosophila* hsp 70. *EMBO J.* **3**, 3087–3093 (1984).
207. Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W. W. & Prasher, D. C. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. *Adv. Sci.* **263**, 802–805 (2008).
208. Cormack, B. P., Valdivia, R. H. & Falkow, S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33–38 (1996).
209. Smith, D. B. & Johnson, K. S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* **67**, 31–40 (1988).
210. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
211. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–685 (1970).
212. Schneider, C. A., Rasband, W. S. & Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **9**, 671–675 (2012).
213. Kotlyarov, A. *et al.* MAPKAP kinase 2 is essential for LPS-induced TNF- $\alpha$  biosynthesis. *Nat. Cell Biol.* **1**, 94–97 (1999).
214. Brough, D. & Rothwell, N. J. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death. *J. Cell Sci.* **120**, 772–781 (2007).
215. Bajagic, M., Archana, A., Büsing, P. & Scrima, A. Structure of the WD40-domain of human ATG16L1. *Protein Sci.* **26**, 1828–1837 (2017).
216. Vereecke, L., Beyaert, R. & van Loo, G. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends Immunol.* **30**, 383–391 (2009).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

217. Vadlamudi, R. K. & Shin, J. Genomic structure and promoter analysis of the p62 gene encoding a non-proteasomal multiubiquitin chain binding protein. *FEBS Lett.* **435**, 138–142 (1998).
218. Castro, E. De *et al.* ScanProsite: detection of PROSITE signature matches and ProRule-associated functional and structural residues in proteins. *Nucleic Acids Res.* **34**, 362–365 (2006).
219. Cuche, A. *et al.* New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.* **41**, 344–347 (2013).
220. Conway, K. L. *et al.* Atg16l1 is required for autophagy in intestinal epithelial cells and protection of mice from *Salmonella* infection. *Gastroenterology* **145**, 1347–1357 (2013).
221. Huang, G., Yan, H., Ye, S., Tong, C. & Ying, Q. Phosphorylation at Tyrosine 705 and Serine 727 Differentially Regulates Mouse ESC Fates. *Stem Cells* **32**, 1149–1160 (2014).
222. Murphy, J. E., Padilla, B. E., Hasdemir, B., Cottrell, G. S. & Bunnett, N. W. Endosomes: A legitimate platform for the signaling train. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 17615–17622 (2009).
223. Levine, B., Mizushima, N. & Virgin, H. W. Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **469**, 323–335 (2011).
224. Vereecke, L. *et al.* A20 controls intestinal homeostasis through cell-specific activities. *Nat. Commun.* **5**, 1–12 (2014).
225. Ishimoto, Y. M. *et al.* Autophagy protein ATG16L1 prevents necroptosis in the intestinal epithelium. *J. Exp. Med.* **214**, 3687–3705 (2017).
226. Adolph, T. E. *et al.* Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation. *Nature* **503**, 272–276 (2003).
227. Diamanti, M. A. *et al.* IKK $\alpha$  controls ATG16L1 degradation to prevent ER stress during inflammation. *J. Exp. Med.* **214**, 423–437 (2017).
228. Serramito-Gómez, I., Boada-Romero, E. & Pimentel-Muiños, F. X. Unconventional autophagy mediated by the WD40 domain of ATG16L1 is derailed by the T300A Crohn disease risk polymorphism. *Autophagy* **12**, 2254–2255 (2016).
229. Zhang, Q., Putheti, P., Zhou, Q., Liu, Q. & Gao, W. Structures and biological functions

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- of IL-31 and IL-31 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* **19**, 347–356 (2008).
230. Dillon, S. R. *et al.* Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat. Immunol.* **5**, 752–760 (2004).
231. Baass, P. C., Di Guglielmo, G. M., Authier, F., Posner, B. I. & Bergeron, J. J. M. Compartmentalized signal transduction by receptor tyrosine kinases. *Trends Cell Biol.* **5**, 465–470 (1995).
232. Kelly, K. L. & Ruderman, N. B. Insulin-stimulated phosphatidylinositol 3-kinase. Association with a 185-kDa tyrosine-phosphorylated protein (IRS-1) and localization in a low density membrane vesicle. *J. Biol. Chem.* **268**, 4391–4398 (1993).
233. Grimes, M. L. *et al.* Endodytosis of activated TrkA: Evidence that nerve growth factor induces formation of signaling endosomes. *J. Neurosci.* **16**, 7950–7964 (1996).
234. Delcroix, J.-D. *et al.* NGF Signaling in Sensory Neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron* **39**, 69–84 (2003).
235. Kermorgant, S. & Parker, P. J. Receptor trafficking controls weak signal delivery: a strategy used by c-Met for STAT3 nuclear accumulation. *J. Cell Biol.* **182**, 855–863 (2008).
236. Caswell, P. T., Vadrevu, S. & Norman, J. C. Integrins: Masters and slaves of endocytic transport. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10**, 843–853 (2009).
237. White, D. P., Caswell, P. T. & Norman, J. C.  $\alpha v\beta 3$  and  $\alpha 5\beta 1$  integrin recycling pathways dictate downstream Rho kinase signaling to regulate persistent cell migration. *J. Cell Biol.* **177**, 515–525 (2007).
238. Acharya, M. *et al.*  $\alpha v$  Integrins combine with LC3 and atg5 to regulate Toll-like receptor signalling in B cells. *Nat. Commun.* **7**, 1–15 (2016).
239. Florey, O., Gammoh, N., Kim, S. E., Jiang, X. & Overholtzer, M. V-ATPase and osmotic imbalances activate endolysosomal LC3 lipidation. *Autophagy* **11**, 88–99 (2015).
240. Saitoh, T. *et al.* Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1B production. *Nat. Lett.* **456**, 264–269 (2008).
241. Martinez, J. *et al.* Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat. Cell Biol.* **17**, 893–906 (2015).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

242. Heckmann, B. L. *et al.* LC3-Associated Endocytosis Facilitates  $\beta$ -Amyloid Clearance and Mitigates Neurodegeneration in Murine Alzheimer's Disease. *Cell* **178**, 536-551.e14 (2019).
243. Fraser, J. *et al.* Targeting of early endosomes by autophagy facilitates EGFR recycling and signalling. *EMBO Rep.* **20**, 1–17 (2019).
244. Strisciuglio, C. *et al.* Impaired autophagy leads to abnormal dendritic cell-epithelial cell interactions. *J. Crohn's Colitis* **7**, 534–541 (2013).
245. Morhardt, T. L. *et al.* IL-10 produced by macrophages regulates epithelial integrity in the small intestine. *Sci. Rep.* **9**, 1–10 (2019).
246. Wang, C. *et al.* Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunol.* **14**, 1–10 (2013).
247. Salem, M., Ammitzboell, M., Nys, K., Seidelin, J. B. & Nielsen, O. H. ATG16L1: A multifunctional susceptibility factor in Crohn disease. *Autophagy* **11**, 585–594 (2015).
248. Gazouli, M. *et al.* NOD2/CARD15, ATG16L1 and IL23R gene polymorphisms and childhood-onset of Crohn's disease. *World J. Gastroenterol.* **16**, 1753–1758 (2010).
249. Meller, S. *et al.* TH17 cells promote microbial killing and innate immune sensing of DNA via interleukin 26. *Nat. Immunol.* **16**, 970–979 (2015).
250. Brand, S. *et al.* IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **289**, 960–968 (2005).

# ANEXOS





## Anexo 1. Oligonucleótidos para PCR

Denominación	Secuencia
A20-Not-1-fw	5' GGGCCCGCGGCCGCAATGGCTGAACAAGTCCCTCCCTC 3'
A20-Xho-stop-263-rev	5' CCCGGGCTCGAGTTTACAGGGTCACCAAGGGTACAAAATGATGGC 3'
A20-Not-264-fw	5' GGGCCCGCGGCCGCAAAGGACAGTGGGCTGAAATCCGAGCTGTTC 3'
A20-Not-357-fw	5' GGGCCCGCGGCCGCACAGGAAAACAGCGAGCAGGGGAGGAGAG 3'
A20-Xho-stop-790-rev	5' CCCGGGCTCGAGTTTAGCCATACATCTGCTTGAACGTAAAGCATTC 3'
A20-Not-92-fw	5' GGGCCCGCGGCCGCACTTGTGGCGCTGAAAACGAAACGGGTGACGG 3'
A20-Xho-stop-91-rev	5' CCCGGGCTCGAGTTTACTTCCGGACTTCTCGACACCAGTTGAGTTTC 3'
A20-F127A,L130A-TOP	5' GTACTGAGGAAGGCGCTGGCCAGCACGGCCAAGGAAACAGACACAGCAAC 3'
A20-F127A,L130A-BOTT	5' GTTGGCTGTGTCTGTTCCTTGGCCGTGCTGGCCAGCGCTTCCCTCAGTAC 3'
A20-W168A,L171A-TOP	5' CGGAACTGGAATGATGAAGCCGACAATGCTATCAAAATGGCTTCCACAG 3'
A20-W168A,L171A-BOTT	5' CTGTGGAAGCCATTTTGATAGCATGTGTCGGCTTCATCATCCAGTTCCG 3'
A20-Y188A,L191A-TOP	5' GCCCGAAGTGGACTTCAGGCCAACTCAGCCGAAAGAAATACACATATTG 3'
A20-Y188A,L191A-BOTT	5' CAAATATGTGTATTCTTCGGCTGAGTTGGCCITGAAGTCCACTTCGGGC 3'
A20-F224A,L227A-TOP	5' GTTTGGAATCAGGTTCCAAATGCCGCCCTGCGAAAGTGGTGGAAATTTACTTG 3'
A20-F224A,L227A-BOTT	5' CAAGTAAATTCACCCACITTCGCGAGGGCGGCATITGGAACCTGATCCAAAC 3'
A20-Y233A,L236A-TOP	5' CTTTGAAAGTGGGTGGAATTCCTTGGCTGCCACTGGCTGCCAGGAATG 3'
A20-Y233A,L236A-BOTT	5' CATTCCTGGGCAGGCCAGTGGGCAGGCAAGGCAATTCACCCACTTCAAAG 3'
A20-L227A,Y233A,L236A-TOP	5' CTGCGAAAGTGGGTGGAATTCCTTGGCTGCCACTGGCTGCCAGGAATG 3'
A20-L227A,Y233A,L236A-BOTT	5' CATTCCTGGGCAGGCCAGTGGGCAGGCAAGGCAATTCACCCACTTTCGACG 3'
A20-Y246A,V249A-TOP	5' GCCCAGGAATGCTACAGAGCCCCATTTGCTCTCGGCTATGACAGCCATC 3'
A20-Y246A,V249A-BOTT	5' GATGGCTGTATAGCCGAGAGCAATGGGGCTCTGTAGCATTCCTGGGC 3'
A20-F257A,L260A-TOP	5' GGCTATGACAGCCATCATGTCTGTACCCGCGGTGACCCITGAAGGACAGT 3'
A20-F257A,L260A-BOTT	5' CACTGTCCCTCAGGGTCACCGCGGTACAGCATGATGGCTGTATAGCC 3'
A20-A125V-TOP	5' CTTGGTACTGAGGAAGGTGCTGTTCAGCACGCTCAAG 3'
A20-A125V-BOTT	5' CTTGAGCGTGTGAAACAGCACCTTCCCTCAGTACCAAG 3'
A20-F127C-TOP	5' CTGAGGAAGGCGCTGTGACAGCACGCTCAAGGAAAC 3'
A20-F127C-BOTT	5' GTTTCCTTGAGCGTGTGACAGCGCTTCCCTCAG 3'
flag-Ct-BspHI-fw	5' CATGAGCGGCGGCAGCGACTACAAGGACGATGACGACAAGTAAAGC 3'
flag-Ct-NotI-rev	5' GGCCGCTTACTGTGCTCATCTGCTTGTAGTTCGCTGCCGCCCT 3'
myc-Ct-BspHI-fw	5' CATGAGCGGCGGCAGCGAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTGTAAAGC 3'
myc-Ct-NotI-rev	5' GGCCGCTTACAGGTCCCTCGCTGATCAGCTTCTGCTCGCTGCCGCCCT 3'
STAT3-HindIII-fw	5' GGGCCCAAGCTTGCACCATTGCCCAATGGAATCAGCTACAGCAGC 3'
STAT3-BspHI-rev	5' CCCGGGTATGAGCATGGGGAGGTAGCGCCTCCGAGGTC 3'
STAT3op-HpaXho-TOP	5' AACCTCGAGTGTCTCCGAAACGTTGCTTCCGAAACGTTGCTTCCGAAACGTTGCTTCC CGAACGT 3'
STAT3op-HpaXho-BOTT	5' TCGAACGTTCCGGAAGCAACGTTCCGGAAGCAACGTTCCGGAAGCAACGTTCCGGG AAGCACTCGAGGT 3'
IL-10RB-HindIII-fw	5' GGGCCCAAGCTTGCACCATTGGCGTGGAGCCTTGGGAGCTGGCTGGG 3'
IL-10RB-NotI-rev	5' CCCGGGTATGAGCCTTGGGGCCCTGCCAGGCGGGTTC 3'
IL-10RB-FL-292-295-AA-TOP	5' GTCGGATGAGAATGATGTTGCTGACAAGGCAAGTGTTCATTGCAGAAGAC 3'
IL-10RB-FL-292-295-AA-BOTT	5' GTCTTCIGCAATGACACTTGCTTGTGACGAACATCATCTCATCCGAC 3'

# ANEXOS

<b>IL-10RB-FFF-280-281-283-AAA-</b>	
<b>TOP</b>	5' CTCATCATAACACACTTCTGGCTGCCCTCCGCTCCATTGTCCGGATGAGAAATGATG 3'
<b>IL-10RB-FFF-280-281-283-AAA-</b>	5' CATCATTCATCCGACAATGGAGCGGAGGCAGCCAGAAGTGTGTTATGATGAG 3'
<b>BOTT</b>	
<b>IL-31RA-(MKLS)-HindIII-kz-fw</b>	5' GGGCCCAAGCTTGGCCACCATGAAGCTCTCTCCCCAGCCTTCATGTGTTAACCTG 3'
<b>IL31R-Bsph-Stop-Not-rev</b>	5' CCCGGGGCGGCCGCTTTAGCTCATGACGACTTCTCCCTTGGTGTGCTCTGGGAAG 3'
<b>IL-31RA-L603A-TOP (4M)</b>	5' CCACCCCAGTGACAAGGCGGTGATTGACAAGTTGGTG 3'
<b>IL-31RA-L603A-BOTT (4M)</b>	5' CACCAACTTGTCAATCACCGCCTTGTCACTGGGGGTGG 3'
<b>IL-31RA-F612A,V615A-TOP (4M)</b>	5' GACAAGTTGGTGGTGAACGCTGGGAAATGCTCTGCAAGAAATTTACAGATG 3'
<b>IL-31RA-F612A,V615A-BOTT (4M)</b>	5' CATCTGTGAAAATTTCTTGCAGAGCATTCCAGCGTTCACCACCAACTTGTG 3'
<b>IL-31RA-F620A-TOP (4M)</b>	5' GAATGCTCTGCAAGAAATGGCACAGATGAAGCCAGAACG 3'
<b>IL-31RA-F620A-BOTT (4M)</b>	5' CGTTCIGGCTTCATCTIGTGGCAATTCCTGTCAGAGCATTG 3'
<b>IL-31RA-F644A-TOP (3M)</b>	5' GGGTATGTGACCTGCCCGCCAGGCCGTGATTGTCCCTG 3'
<b>IL-31RA-F644A-BOTT (3M)</b>	5' CAGGGGACAATCAGGCCITGGCGGGCAGGTCACATACCC 3'
<b>IL-31RA-F654A,L657A-TOP (3M)</b>	5' GATTGTCCCTGGGGAAAAGTGTGAGGAGGCCCCAGTTTCACCTGAGATTCC 3'
<b>IL-31RA-F654A,L657A-BOTT (3M)</b>	5' GGAATCTCAGGTGAAACTGGGGCCTCCTCAGCATTTCCTCCAGGGGACAATC 3'
<b>ATG16L1-T300A-TOP</b>	5' CAGGACAATGTGGATGCTCATCTCGGTTCTIGG 3'
<b>ATG16L1-T300A-BOTT</b>	5' CCAGAACCCAGGATGAGCATCCACATGTGCTCG 3'
<b>ATG16L1-81G&gt;C, 87A&gt;G, 91G&gt;A, 94G&gt;C, 100G&gt;A-TOP</b>	5' GGAGCAACTGAGGCCCGGGACCGGCTCCAGAGGCAAGCCTCGAAGAGATC ATCCITGCAGTATAACAAATG 3'
<b>ATG16L1-81G&gt;C, 87A&gt;G, 91G&gt;A, 94G&gt;C, 100G&gt;A-BOTT</b>	5' CAATTGTATTATACITGCAGGATGATCTCTCGAAGGCITGCCTCTGGAGCCGGTC CCGGCGCCTCAGTGTCTCC 3'
<b>CRISPRV2-hΔWD 1025-TOP</b>	5' CACCGTGGACCGCAGGGTTAAGCTT 3'
<b>CRISPRV2-hΔWD 1025-BOTT</b>	5' AAACAAGCTTAACCTGCGGTCCAC 3'
<b>CRISPRV2-hATG16L1(78-97)-TOP</b>	5' CACCGGCTGCAGAGACAGCGTTCG 3'
<b>CRISPRV2-hATG16L1(78-97)-BOTT</b>	5' AAACCGAACGCCITGTCITGCAGCC 3'

**Tabla 1. Oligonucleótidos utilizados en PCR.** Se indica el nombre del oligonucleótido y su secuencia. Las siglas *fw* indican oligonucleótido forward y las *rev*, oligonucleótido reverse. En el caso de oligonucleótidos empleados en mutagénesis dirigida o para anillamiento, se utiliza la nomenclatura TOP (forward) y BOTTOM (reverse).

## Anexo 2. Anticuerpos primarios

Anticuerpo	Especie	Especificidad	Aplicación	Dilución	Casa comercial	Referencia
$\alpha$ -A20 (A-12)	Ratón	Monoclonal	WB	1:500 (Generar en leche al 5%)	Santa Cruz Biotechnology	sc-166692
$\alpha$ -ATG16L1 (1F12)	Ratón	Monoclonal	WB IP	1:2000 1:150	MBL Life Science	M150-3
$\alpha$ -ATG16L1	Conejo	Policlonal	WB IP	1:1000 1:100	MBL Life Science	PM-040
$\alpha$ -AU	Conejo	Policlonal	WB IF	1:1000 1:4000	Thermo Scientific	PA1-26548
$\alpha$ -AU	Ratón	Monoclonal	IP	1:150 Control	BioLegend (antes Covance)	901901 (MMP-130P de Covance)
$\alpha$ -ACTINA (AC40)	Ratón	Monoclonal	WB	1:1000	Sigma-Aldrich	A4700
$\alpha$ -CD63 (EPR21155)	Ratón	Monoclonal	IF	1:100	Abcam	ab217345
$\alpha$ -EEA1 (EPR4245)	Ratón	Monoclonal	IF	1:750	Abcam	ab109110
$\alpha$ -FLAG (D6W5B)	Conejo	Monoclonal	WB IF IP	1:1000 1:2000 1:150	Cell Signaling Technology	#2368
$\alpha$ -FLAG (M2)	Ratón	Monoclonal	WB IF IP	1:1000 1:200 1:150	Sigma-Aldrich	F3165
$\alpha$ -GAPDH (6C5)	Ratón	Monoclonal	WB	1:10000	Abcam	ab8245
$\alpha$ -GFP (B34)	Ratón	Monoclonal	WB	1:5000	BioLegend	902601
$\alpha$ -GST (B-14)	Ratón	Monoclonal	WB	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-138
$\alpha$ -GST	Ratón	Policlonal	WB	1:1000	Cell Signaling Technology	#2622
$\alpha$ -HA (16B12)	Ratón	Monoclonal	WB IF IP	1:1000 1:1000 1:75	BioLegend	901501
$\alpha$ -HA (C29F4)	Conejo	Monoclonal	WB IP	1:1000 1:100	Cell Signaling Technology	#3724

## ANEXOS

$\alpha$ -H3 (D1H2)	Conejo	Monoclonal	WB	1:1000	Cell Signaling Technology	#4499
$\alpha$ -IL10 (D13A11)	Conejo	Monoclonal	WB	1:1000	Cell Signaling Technology	#12163
$\alpha$ -IL10RA (A3)	Ratón	Monoclonal	WB	1:500	Santa Cruz Biotechnology	sc-365374
$\alpha$ -IL10RB (F6)	Ratón	Monoclonal	WB IP	1:500 1:50	Santa Cruz Biotechnology	sc-271969
$\alpha$ -LAMP1 (EPR21026)	Ratón	Monoclonal	IF	1:100	Abcam	ab208943
$\alpha$ -LC3 (5F10)	Ratón	Monoclonal	IF	1:200	Nanotools	0231-100
Normal mouse IgG	Ratón	Policlonal	Control de IP	1:200	Merck Millipore	12-371
Normal rabbit IgG	Conejo	Policlonal	Control de IP	1:200	Merck Millipore	12-370
$\alpha$ -p62 (SQSTM1) (clone 3)	Ratón	Monoclonal	WB	1:1000	BD Biosciences	610833
$\alpha$ -p62 (SQSTM1)	Conejo	Policlonal	WB	1:1000	MBL Life Science	PM045
$\alpha$ -Rab11 (D45S)	Conejo	Monoclonal	IF	1:100	Cell Signaling Technology	#5589
$\alpha$ -Ubiquitin (polyUB) (FK2)	Ratón	Monoclonal	WB	1:1000 (Bloqueo en BSA)	Enzo	PW8810

**Tabla 2. Anticuerpos primarios.** Se indica la especie, especificidad, aplicación, dilución, casa comercial y referencia de cada anticuerpo en particular. **WB:** Western-blot, **IP:** inmunoprecipitación, **IF:** inmunofluorescencia.

## Anexo 3. Anticuerpos secundarios

Anticuerpo	Fluorocromo		Aplicación Dilución	Casa comercial	Referencia
	/HRP conjugado Especie	Reactividad			
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-mouse IgG (H+L)	HRP	Ratón	WB	Jackson	115-035-003
	Cabra	IgG (H+L)	1:10000	ImmunoResearch	
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit IgG (H+L)	HRP	Conejo	WB	Jackson	111-035-003
	Cabra	IgG (H+L)	1:10000	ImmunoResearch	
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-Mouse IgG (H+L) (minimal cross- reaction to Human, Bovine, Horse, Rabbit and Swine serum proteins)	HRP	Ratón	WB	Jackson	115-035-146
	Cabra	IgG (H+L)	1:5000	ImmunoResearch	
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat anti-Rabbit IgG (H+L) (minimal cross- reaction to Human, Mouse and Rat serum proteins)	HRP	Conejo	WB	Jackson	111-035-144
	Cabra	IgG (H+L)	1:500	ImmunoResearch	
anti-ratón-Cy <sup>TM3</sup> (Cy <sup>TM3</sup> AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L))	Cy <sup>TM3</sup>	Ratón IgG	IF	Jackson	115-165-146
	Cabra	(H+L)	1:400	ImmunoResearch	
anti-conejo-Cy <sup>TM3</sup> (Cy <sup>TM3</sup> AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L))	Cy <sup>TM3</sup>	Conejo	IF	Jackson	111-165-144
	Cabra	IgG (H+L)	1:400	ImmunoResearch	
anti-ratón-Cy <sup>TM5</sup> (Cy <sup>TM5</sup> AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L))	Cy <sup>TM5</sup>	Ratón IgG	IF	Jackson	115-175-166
	Cabra	(H+L)	1:400	ImmunoResearch	
anti-conejo-Cy <sup>TM5</sup> (Cy <sup>TM5</sup> AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L))	Cy <sup>TM5</sup>	Conejo IgG	IF	Jackson	111-175-144
	Cabra	(H+L)	1:400	ImmunoResearch	

Tabla 3. Anticuerpos secundarios. Se indica el fluorocromo/HRP conjugado, especie, reactividad, aplicación, dilución, casa comercial y referencia de cada anticuerpo en particular. **WB**: Western-blot, **IF**: inmunofluorescencia.

## ANEXOS

### Anexo 4. Anticuerpos primarios conjugados con fluorocromos para citometría de flujo

Anticuerpo	Fluorocromo conjugado	Especie	Reactividad	Dilución	Casa comercial	Referencia
$\alpha$ -CD11b (M1/70)	BB515®	Rata	Ratón	1:100	BD Horizon	564454
$\alpha$ -F4/80 (T45-2342)	Alexa Fluor® 647	Rata	Ratón	1:100	BD Pharmingen	565853
$\alpha$ -IgG1 isotipo $\alpha$ (MOPC-21) (Control)	Alexa Fluor® 647	Rata	Ratón	1:100	BD Pharmingen	557714
$\alpha$ -IgG2b isotipo $\alpha$ (27-35) (Control)	BB515®	Rata	Ratón	1:100	BD Horizon	564421
$\alpha$ -IL-10RA (CD210A) (3F9)	Alexa Fluor® 647	Rata	Humano	1:100	BD Pharmingen	565255
$\alpha$ -IL-10RB (CD210B) (90220)	Alexa Fluor® 647	Ratón	Humano	1:100	BD Pharmingen	564372

**Tabla 4. Anticuerpos primarios conjugados con fluorocromos.** Se indica el fluorocromo conjugado, especie, reactividad, aplicación, dilución, casa comercial y referencia de cada anticuerpo en particular. Todos los anticuerpos que figuran en la tabla se emplearon exclusivamente en citometría de flujo.

## Anexo 5. Oligonucleótidos para qPCR

Gen diana	Secuencia del oligonucleótido	Línea celular
<b>TNF-<math>\alpha</math> (ratón)</b>	5' CCTCAGACTCAGATCATCTTCT 3' 5' GCTACGACGTGGGCTACAG 3'	Macrófagos
<b>BCL3 (ratón)</b>	5' CCGGAGGCCCTTTACTACCA 3' 5' GGAGTAGGGGTGAGTAGGCAG 3'	Macrófagos
<b>ETV3 (ratón)</b>	5' ATGAAAGCAGGCTGTAGCATC 3' 5' ATGGCGGAACCTTCCTTCTG 3'	Macrófagos
<b>GAPDH (ratón)</b>	5' AGGTCGGTGTGAACGGATTIG 3' 5' TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA 3'	Macrófagos
<b>ACTINA (ratón)</b>	5' GGCTGTATTCCCCTCCATCG 3' 5' CCAGTTGGTAACAATGCCATGT 3'	Macrófagos
<b>TNF-<math>\alpha</math> (humano)</b>	5' CCTCTCTTAATCAGCCCTCTG 3' 5' GAGGACCTGGGAGTAGATGAG 3'	THP1
<b>IL-6 (humano)</b>	5' ACTCACCTCTTCAGAACGAATTG 3' 5' CCATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG 3'	THP1
<b>GAPDH (humano)</b>	5' GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT 3' 5' GGCTGTTGTCATACTTCATGG 3'	THP1
<b>ACTINA (humano)</b>	5' CATGTACGTTGCTATCCAGGC 3' 5' CTCCTTAATGTCACGCACGAT 3'	THP1

**Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en qPCR.** Se indica el nombre y especie del gen diana, la secuencia de cada oligonucleótido y la línea celular en la que han sido empleados. En primer lugar, figura el oligonucleótido forward y tras éste, el reverse.





“Si de verdad quieres algo, y trabajas muy duro, y aprovechas las oportunidades, y nunca te rindes, vas a encontrar el camino”

Jane Goodall

