

AGRADECIMIENTOS:

Me gustaría comenzar este trabajo agradeciendo a varios compañeros su apoyo y colaboración en este proyecto.

En primer lugar a Carlos Pipaón por ayudarme a ver lo fascinante que es trabajar en un laboratorio de investigación. Esta ha sido mi primera experiencia en un grupo de investigación de la que he ganado un sinfín de conocimiento y experiencia, las cuales tienen un valor incalculable. Pero además agradecer todos esos momentos en los que mis dudas sin fin encontraron una respuesta clara y entusiasta.

En segundo lugar a Lucrecia Yáñez y a Juan José Domínguez, ellos me han ayudado a ver el lado clínico de este sector. Sus consejos y guía a lo largo de mi estancia han sido de incalculable valor y elogio su gran interés por el avance de la investigación al margen de sus obligaciones como clínicos.

Finalmente me gustaría mencionar a mis compañeros de laboratorio Jose Luis Castaño y Angélica Tomé. Los días en el laboratorio se hacían más cortos con ellos, no sólo por los buenos momentos que hemos compartido sino por su ayuda en numerosos experimentos.

ÍNDICE

Antecedentes del tema7
1. Leucemia linfocítica crónica9
1.1. Herencia de genes de susceptibilidad10
1.2. Mutaciones genéticas recurrentes no heredadas en LLC11
1.3. Terapias actuales contra la LLC12
2. Bases moleculares de la ruta NF-κB13
2.1. Ruta canónica14
2.2. Ruta no canónica15
3. Modificaciones post-traduccionales. Ubiquitinación y modificaciones Ubiquitin-
like16
3.1. Ubiquitinación y NEDDilación16
3.2. Papel de la NEDDilación en la LLC18
Objetivos20
Materiales y Métodos21
1. Líneas y cultivos celulares
2. Transfección mediante el método de fosfato cálcico23
3. Extracción de RNA24
4. Obtención de cDNA
5. Clonaje y mutagénesis de genes de interés25
6. Análisis de la actividad transcripcional mediante construcciones reporteras de
luciferasa26
7. Análisis de los niveles proteicos (Western Blot)27
7.1. Extracción de proteínas27
7.2. Inmunoprecipitación27
7.3. Cuantificación de proteínas
7.4. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y
transferencia a membrana de nitrocelulosa

Resultados
1. Estudio del efecto de MLN4924 sobre la expresión de proteínas de la ruta NF-kB33
2. Estudio in vitro del efecto de la NEDDilación sobre la función de proteínas de la ruta
NF-kB
3. Estudios de la actividad de la ruta NF-κB en presencia de NEDD837
Discusión
Conclusiones43
Bibliografía44

ANTECEDENTES

1.-Leucemia linfocítica crónica.

Clásicamente se ha considerado a la leucemia linfocítica crónica (LLC) como un trastorno en el que se da lugar a una proliferación exacerbada de linfocitos de aspecto maduro e incompetentes que se acumulan masivamente en sangre, médula ósea y tejidos linfoides. La edad media de los pacientes en el momento del diagnóstico es de 65 años, de los cuales la mayoría suelen ser hombres. El curso de la enfermedad es variable, mientras que algunos pacientes con LLC tienen una esperanza de vida normal, otros mueren dentro de los cinco años posteriores al diagnóstico. Se desconoce la causa de la LLC ya que aunque se ha visto que la exposición a pesticidas, específicamente deltametrina, puede aumentar la incidencia de LLC y, aunque hay datos que respaldan una base genética, no se han identificado los genes responsables de la patología (C. Rozman, 2002; Leon et al., 2019; Omar & Mauricio, n.d.).

En el 90% de los casos son los linfocitos B las células responsables de producir esta enfermedad, el 10% restante es producida a través de linfocitos T. La evolución normal de las células de LLC es la formación de una subpoblación de linfocitos B CD5+ maduros presentes en la zona del manto de los ganglios linfáticos y también en pequeñas cantidades en la sangre. Las células B de LLC expresan niveles relativamente bajos de inmunoglobulina de la superficie de la membrana, principalmente IgM e IgD, en comparación con las células B normales de sangre periférica, y una sola cadena ligera. Los linfocitos CD5+ B neoplásicos se acumulan debido a la inhibición de la apoptosis (muerte celular programada) (Caligaris-Cappio et al., 1993).

Los linfocitos B normales responden a estímulos del exterior y del interior del cuerpo. En cada caso, la detección de antígenos por parte del receptor de células B (BCR) transmite una señal de activación que conduce a la supervivencia y el crecimiento o la muerte. Este tipo de señales promueve la supervivencia y expansión de las células B causantes de la LLC (Figura 1). En las células de LLC la región determinante de la complementariedad de la cadena pesada (HCDR3) es más larga que la media (Fais et al., 1998), y esta característica ha demostrado que desempeña un papel en la señalización de BCR. La diferencia entre pacientes con enfermedad progresiva frente una enfermedad menos agresiva se encuentra en la especificidad de la unión del antígeno por el receptor de BCR, y esto se define por el grado de mutaciones de los genes que codifican un gen del IGHV. Los pacientes con LLC que tienen células malignas portan secuencias del gen IGHV con más del 98% de homología con la secuencia de la línea germinal, estos se denominan LLC sin mutar (UM-CLL) y aquellos con menos se denominan LLC mutada (M-CLL). Esto es importante porque la BCR en las células M-CLL muestra menos especificidad antigénica y un mejor pronóstico comparado con la de las células UM-CLL, ya que el clon con genes no mutados

será polirreactivo mientras que el clon con genes mutados será más monorreactivo (Hervé et al., 2005).



Figura 1. Vía de señalización del receptor de células B (BCR). Tras la interacción del antígeno con la inmunoglobulina de membrana, Lyn se activa y, a su vez, fosforila CD79 en los residuos de tirosina, en particular, los de los motivos ITAM. Esto permite la unión de SYK y varias moléculas adaptadoras que inician la señalización que procede a través de quinasas clave, incluidas BTK, PI3Kô, IKK y AKT. (Chiorazzi et al., 2021; Slupsky, 2014).

1.1. Herencia de genes de susceptibilidad:

La LLC tiene la mayor incidencia de asociación familiar entre las leucemias ya que los familiares de primer grado tienen más de ocho veces más probabilidades de desarrollar la enfermedad (Goldin et al., 2004). Por el contrario, la baja incidencia de LLC entre los asiáticos / isleños del Pacífico, particularmente los japoneses, no aumenta cuando viven en los Estados Unidos. Ambas observaciones apuntan a la participación de alelos de susceptibilidad heredables que promueven o previenen la enfermedad (Gale et al., 2000). Se han realizado estudios de asociación de todo el genoma (GWAS) en los que se identificaron varios loci genéticos polimórficos. Eligiendo los transcripcionalmente activos en las células de LLC se observan genes involucrados en el control del desarrollo y la señalización de las células B humanas o de la función inmunológica (Chiorazzi et al., 2021; Law et al., 2017).

1.2. Mutaciones genéticas recurrentes no heredadas en células LLC:

La LLC de la mayoría de pacientes presenta un modelo secuencial de anomalías cromosómicas como impulsores tempranos, intermedios y tardíos que permiten que la LLC se genere y evolucione. Por lo general, la transformación neoplásica comienza con una alteración del material cromosómico. Dos de las primeras alteraciones son la deleción del cromosoma 13q (del13q) que provoca una pérdida de miARN (mir-15a y Mir-16-1) y se ha relacionado con impulsores intermedios como POT1 y SF3B1. La LLC también presenta la trisomía en el cromosoma 12, la cual está ligada con mutaciones posteriores de KRAS, FBXW7 y BRIC3. Las anomalías cromosómicas posteriores incluyen del11q relacionado con el gen ATM, amplificación del cromosoma 2p (Amp2p) y BIRC3 y deleción de 17p (del17p) provocando una alteración funcional de las vías TP53 (Landau et al., 2015).

En la siguiente tabla se encuentran los genes implicados más recurrentes en LLC con sus aberraciones cromosómicas:

Genes implicados	Aberraciones cromosómicas
SF3B1	del11q
	del13q
ATM	del11q
	del13q
NOTCH	Trisomia 12
BCOR	Trisomia 12
BIRC3	Trisomia 12
FBXW7	Trisomia 12
XPO1	del11q
	del13q
POT1	del11q
	del13q

 Tabla 1. Mutaciones recurrentes en células B de leucemia linfocítica crónica (LLC) que se asocian con aberraciones cromosómicas (Chiorazzi et al., 2021).

CHD2	del13q	
TP53	del13q	
	del17q	
MYD88	del13q	
SAMHD1	del13q	

Estos genes están relacionados con rutas de señalización variadas:

- Procesamiento de ARN y ribosomas
- Daño de DNA y ciclo celular
- Modificación de cromatina
- Señalización de Notch, WNT y BCR
- Procesos inflamatorios

1.3. Terapias actuales contra la LLC:

Dado que en los casos de la M-LLC la enfermedad es bastante inocua, con un largo desarrollo, las terapias tempranas estaban orientadas a reducir la masa tumoral con quimioterapia convencional, preservando la mejor calidad de vida del paciente. La fludarabina fue un gran avance en esta tarea, proporcionando mejores resultados sobre otros productos químicos, habitualmente utilizada junto a ciclofosfamida ya que era sinérgico (Ricci et al., 2009).

Las células de LLC expresan en su membrana celular algunas moléculas específicas como CD19, CD20, CD23 y el antígeno de células T CD5. Sabiendo esto se han desarrollado anticuerpos que atacan específicamente a estas moléculas. Tres anticuerpos monoclonales (mAbs) anti-CD20 están aprobados para su uso en LLC. Estos son rituximab, ofatumumab y obinutuzumab los cuales producen citotoxicidad e inducen apoptosis (Evers et al., 2018).

Linfocitos de LLC característicamente sobre expresan la proteína antiapoptotica BCL-2, la molécula encargada de controlar la supresión o el inicio de la apoptosis (Adams & Cory, 2018). Venetoclax, se encarga de inhibir selectivamente a BCL-2. Debido a la propensión a causar el síndrome de lisis tumoral, los pacientes comienzan con dosis de fármaco muy bajas inicialmente (Roberts et al., 2015). Finalmente otras líneas de tratamiento aprovechan la especificidad de determinadas vías de señalización relevantes en las células B, evitando así efectos secundarios. Por ejemplo la vía del receptor de antígeno de células B (BCR) que es esencial para la supervivencia y proliferación de los linfocitos B. Idelalisib es un inhibidor que se dirige a una isoforma de PI3K (PI3K delta) que se expresa predominantemente en las células B (Lannutti et al., 2011). La tirosina quinasa de Bruton (BTK) es una tirosina quinasa citoplasmática cuya expresión desempeña un papel central en la transducción de señales BCR. Se ha aprobado un grupo de inhibidores de BTK (ibrutinib, acalabrutinib, zanubrutinib, pirtobrutinib) para el tratamiento de la LLC con buenos resultados (Bond & Woyach, 2019). Sin embargo, todavía no se comprende completamente el mecanismo de señalización de BCR en las células de LLC, y se necesitan nuevos enfoques en esta búsqueda.

2.-Bases moleculares de la ruta de NF-κB.

Como hemos visto en el apartado anterior la ruta de BCR activa la señalización de la ruta NF- κ B, que potencia la supervivencia celular, por lo que nos hemos centrado en ella por su relevancia en la LLC.

El factor nuclear kappa B (NF-κB) es un factor de transcripción que reside inactivo en el citoplasma celular y ejerce su función translocándose al núcleo. Su activación es inducida por una amplia variedad de agentes como estrés, virus, bacterias, estímulos inflamatorios, citocinas, radicales libres, carcinógenos, promotores de tumores y endotoxinas. Al activarse, NF-κB regula la expresión de casi 400 genes diferentes, que incluyen enzimas (COX-2 e iNOS), citocinas (TNF, IL-1, IL-6, IL-8), moléculas de adhesión, moléculas reguladoras del ciclo celular y factores angiogénicos. La NF-κB se ha relacionado con una amplia variedad de enfermedades, como asma, arterosclerosis, diabetes y Alzheimer. Además se ha visto que la señalización de NF-κB también tiene un papel fundamental en el desarrollo y la progresión del cáncer. Se han identificado cinco miembros diferentes de la familia NF-κB; NF-κB 1 (p50 / p105), NF-κB 2 (p52 / p100), RelA (p65), RelB y c-Rel. Se conocen dos vías de activación de NF-κB diferentes, una vía canónica y una vía no canónica (Aggarwal, 2003).

En las células en reposo, NF- κ B se compone de p50 y RelA, los cuales están en su forma inactiva gracias a su asociación con una de las distintas moléculas inhibidoras de κ B (I κ B), las cuales son I κ B α , I κ B β , I κ B γ , p105 y p100 entre las que I κ B α es la más abundante. El complejo inactivo NF- κ B / I κ B se activa por fosforilación en en las serinas 32 y 36 de la proteina I κ B. La fosforilación de estos residuos S lleva a la poliubiquitinación de las proteínas I κ B. Esta modificación induce una rápida degradación por parte del proteasoma 26S, dejando libre NF- κ B que luego entra en el núcleo, se une al ADN y activa la transcripción (Strickland & Ghosh, 2006).

IKK es el complejo encargado de la fosforilación de las proteínas IκB. Está compuesto de tres subunidades: IKKα, IKKβ e IKKγ (modulador esencial de NF-κB (NEMO). IKKα e IKKβ son las subunidades catalíticas del complejo mientras que NEMO es la subunidad reguladora. In vitro, IKKα e IKKβ se encargan de fosforilar a dos serinas específicas en el dominio regulador N-terminal de Proteínas IκB, siendo IKKβ una quinasa más potente que IKKα. La función principal de IKK es la activación de NF-κB (Ghosh et al., 1998).

2.1. Ruta canónica:

En la vía canónica, las señales para la activación de NF- κ B son generadas por citocinas, por ejemplo, TNF- α o IL-1, por factores de crecimiento, por ligandos de receptores tipo toll (TLR) o por antígenos, que se unen al receptor de células T (TCR) o al receptor de células B (BCR). La unión del ligando a un receptor de la superficie celular, conduce a la unión de adaptadores (como TRAF) al dominio citoplásmico del receptor (Figura 2A). Estos adaptadores, a su vez, reclutan el complejo IKK activándolo. La activación exacta de diferentes quinasas involucradas en la activación de IKK no se conoce completamente. Esto finalmente conduce a la fosforilación y degradación del inhibidor I κ B (Figura 2).



Figura 2. Esquema de la vía canónica de NF-κB. Vía esquemática para la activación de NF-κB inducida por TNF, TLR y BCR/TCR que son expresados por linfocitos B y T y no actúan en una misma célula (Hellweg et al., 2016).

2.2. Ruta no canónica:

La vía no canónica está involucrada en la señalización no inflamatoria, por ejemplo, en el desarrollo de los ganglios linfáticos y la osteoclastogénesis. Es responsable de la activación de los complejos p100/Rel-B y ocurre durante el desarrollo de los órganos linfoides responsables de la generación de linfocitos B y T. Esta vía utiliza un complejo IKK formado por dos subunidades IKK α . En la vía no canónica, la activación inducida por ligando da como resultado la activación de la quinasa inductora de NF- κ B (NIK), que fosforila y activa el complejo IKK α , que a su vez fosforila p100 que conduce al procesamiento y liberación de los heterodímeros p52 y Rel-B (Figura 3).



Figura 3. Esquema de la vía no canónica de NF-κB. (Hellweg et al., 2016).

Una de las funciones de la ruta NF-κB es interferir con el proceso de apoptosis al inducir la transcripción de un conjunto de genes que codifican proteínas antiapoptóticas. Entre ellos se encuentran cIAP-1 y c-IAP-2 que bloquean directamente las funciones de las caspasas o inducen indirectamente su ubiquitinación y degradación dependiente del proteosoma. NF-κB también regula la expresión de varias proteínas TRAF que sirven para amplificar la activación de la ruta (Shishodia & Aggarwal, 2004).

Debido a que una de las causas de la LLC es la inhibición del proceso apoptótico de la célula nuestros esfuerzos se han centrado en el estudio molecular de la ruta NF-κB debido a su implicación con procesos de inhibición de la apoptosis.

3.- Modificaciones post-traduccionales: Ubiquitinación y modificaciones Ubiquitin-like.

La vía de NF-κB, está altamente regulada por ubiquitinación por lo que hemos podido ver en el apartado anterior. Las modificaciones postraduccionales (MPT) de proteínas juegan un papel crucial en la funcionalidad del proteoma. Las MPT se refieren a la adición covalente y reversible de pequeñas moléculas químicas en las proteínas diana después de la biosíntesis de proteínas para ejercer una función de control. Los avances recientes en la proteómica han impulsado el interés por descifrar las modificaciones de las proteínas y su impacto en el microambiente celular y la patofisiología de las enfermedades. Las MPT más comunes incluyen fosforilación, acetilación, glicosilación, ubiquitinación, acetilación e hidroxilación, entre otros (Lachiondo-Ortega et al., 2019).

En este trabajo nos vamos a centrar principalmente en la ubiquitinación y la modificación Ubiquitin-like llamada NEDDilación.

3.1. Ubiquitinación y NEDDilación.

La ubiquitinación juega un papel importante en la regulación de la estabilidad y función de las proteínas. El proceso de ubiquitinación mantiene la homeostasis celular mediante el control y degradación de las proteínas (Figura 4). La conjugación de ubiquitina a proteínas diana se lleva a cabo a través de una cascada de señalización que consta de enzimas activadoras de ubiquitina (E1), enzimas conjugadoras de ubiquitina (E2) y ubiquitina-proteína ligasas (E3). Las ligasas de ubiquitina E3 transfieren ubiquitina a sus sustratos, concretamente en los residuos de lisina, de una manera muy específica. La especificidad está determinada por la unión no covalente del sustrato adaptador de la ligasa E3 y la secuencia de la proteína sustrato. Este proceso puede dar lugar a monoubiquitinación o poliubiquitinación (unión de múltiples moléculas de ubiquitina entre sí para formar cadenas). Existen diferentes tipos de poliubiquitinación que dependen del residuo de lisina (K) dentro de la ubiquitina que se usa para unir la siguiente molécula de ubiquitina. Los diferentes tipos pueden ser K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63 o metionina en el extremo N-terminal. El tipo mejor caracterizado de poliubiquitinación es el ligado a K48, que

marca los sustratos proteicos para la degradación proteosomal por el complejo 26 S-proteasoma dependiente de ATP (Wirth et al., 2020).



Figura 4. Vías de ubiquitinación y NEDDilación. (Wirth et al., 2020)

Aunque cada vía similar a la ubiquitina exhibe características estructurales y mecánicas similares de la vía de la ubiquitina (cascadas E1-E3), las consecuencias biológicas son diferentes, por lo que cada vía se asocia en última instancia con funciones diferentes.

La proteína similar a la ubiquitina, expresada en células precursoras neurales regulada negativamente en el desarrollo 8 (NEDD8) es uno de los péptidos similares a la ubiquitina (UBL), con más del 60% de homología con la ubiquitina y un mecanismo de activación y conjugación absolutamente análogo. Se une covalentemente a proteínas a través del grupo amino lateral de residuos de lisina, en un proceso denominado NEDDilación (Figura 4). Similarmente a lo que ocurre con la ubiquitina, el proceso requiere la acción secuencial de tres enzimas (E1, E2 y E3). NAE1 es la E1 específica que activa NEDD8. Las dianas más destacadas de la NEDDilación son las proteínas cullinas, que son parte primordial de las ligasas de ubiquitina Cullin-RING (CRL) (Saha & Deshaies, 2008).

Esto muestra la estrecha conexión que existe entre los procesos de ubiquitinación y NEDDilación, ya que las CRL, que son el grupo de E3 ubiquitin ligasas más abundante, deben tener su componente cullina neddilado para ser funcionales. Aquí, la CRL con su cullina neddilada actúa como un nexo que hace que la enzima E2 transfiera la ubiquitina a su proteína objetivo, como por ejemplo IkB (Pan et al., 2004). Aunque las cullinas son la diana principal de la NEDDilación, se ha informado que muchos procesos celulares están regulados por la conjugación de algunas de sus proteínas efectoras (Enchev et al., 2015).

La NEDDilación puede ser inhibida mediante un fármaco experimental, MLN4924-Pevonedistat, que inhibe específicamente a NAE (Paiva et al., 2017). Cabe destacar que la existencia de isopeptidasas que eliminan NEDD8 de las proteínas diana subraya la esencia reguladora de este proceso. La deNEDDilación de cullinas se lleva a cabo por el signalosoma COP9 (Chung & Dellaire, 2015).

3.2. Papel de la NEDDilación en LLC.

Se ha visto que la NEDDilación es una modificación postraduccional que afecta a muchos aspectos críticos del cáncer (Abidi & Xirodimas, n.d.). Por lo tanto, MLN4924-pevonedistat se está probando en ensayos clínicos para el tratamiento de diferentes tipos de tumores. Nuestro conocimiento del papel de la NEDDilación en la fisiopatología de LLC proviene de la acción reportada de MLN4924 en experimentos ex-vivo, así como en otros tipos de cáncer. Estos estudios han identificado varias vías diana en la LLC.

Las células B-LLC presentan un aumento en la señalización de NF- κ B, lo que garantiza la evasión de la apoptosis. Se ha demostrado que MLN4924 trunca con éxito la actividad de la vía NF- κ B, la supervivencia de las células B-LLC y la quimiorresistencia en un modelo de cocultivo in vitro que imita el microambiente de los ganglios linfáticos (Godbersen et al., 2014). MLN4924 extiende la vida media del inhibidor de I κ B al prevenir su ubiquitinación (Milhollen et al., 2010).

Hasta ahora se ha investigado el efecto de la NEDDilación sobre I κ B ya que intuitivamente es la proteína inhibidora de la ruta y es la encargada final de activar o inhibir la señalización. De hecho se ha visto anteriormente que MLN4924 aumenta la cantidad de pI κ B en las células (Godbersen et al., 2014; Milhollen et al., 2010). En este trabajo intentamos observar si la NEDDilación actúa también en proteínas localizadas upstream en la ruta NF- κ B ya que no ha sido explorado hasta el momento.

La elaboración de perfiles de modificaciones post-traduccionales por proteínas similares a la ubiquitina (UBL-PTM) en células completas dio un gran paso adelante con el establecimiento de un método basado en el enriquecimiento por inmunoafinidad de los péptidos que contienen un dímero de glicina unido a lisina (K-GG) remanente dejado por ubiquitina o proteínas similares a ubiquitina después de la digestión con tripsina. Los péptidos purificados son luego identificados por espectrometría de masas. Sin embargo, dada la homología entre ubiquitina, NEDD8 e ISG15, este método no es capaz de diferenciar entre los remanentes K-GG dejados por las modificaciones con cada una de estas proteínas. La aplicación de este método sobre muestras de células B-CLL y células CD19 + obtenidas de donantes sanos permitió tener una visión amplia de las variaciones en las UBL-PTM en esta patología. Para intentar conocer si las modificaciones eran NEDDilaciones o no, analizaron las mismas muestras de LLC-B pero tratadas con el inhibidor de

NEDDilación MLN4924. El procedimiento identificó un total de 3384 péptidos modificados diferencialmente en la LLC correspondientes a 1746 proteínas. De esas modificaciones, 2142 (63%) correspondieron a un aumento ≥2,5 veces en las células B-CLL con respecto a los controles sanos. De esas 2142 modificaciones aumentadas, 353 fueron revertidas notablemente por la incubación con MLN4924 (umbral de 2,5 veces). Este cribado mostró que el estado de modificación de varios miembros de la cascada de NEDDilación aumenta en LLC y que además es sensible a la acción de MLN4924 (Bravo-Navas et al., 2021).

En concreto a continuación podemos ver una tabla de las proteínas pertenecientes a la ruta NF-κB que vieron su modificación post-traduccional alterada

Tabla 2. Lista de proteínas con modificaciones presentes en lisinas de células de LLC. El color verde indica quela cantidad de modificaciones observadas es mayor que el control 2,5 veces, mientras que el color rojo indica unadisminucióndelamodificaciónmayora2,5veces.

Modificaiones de pacientes	Modificaciones con MLN	Protein Name	Site
-2.3	-4.2	TANK	§189
9.0	3.8	TANK	§189, §195
3.8	2.2	TANK	§195
7.9	3.7	TANK	§195, §199
3.9	2.7	TANK	§199
7.5	3.2	TANK	§308
3.3	1.6	TANK	310
-3.6	-1.1	IKKG;IKKG iso2	§285;353
6.6	4.8	IKKG;IKKG iso2;IKKG iso 3	§143;211;§143
3.6	5.4	IKKG;IKKG iso2;IKKG iso 3	§344;412;245
-0.3	1.4	NFkB-p100;NFkB-p100 iso3;NFkB-p100 iso4	210;210;210
3.6	7.6	IKKB;IKKB iso 2;IKKB iso 3;IKKB iso 4	§106;104;§106;47
18.3	29.3	TAB3;TAB3 iso 2	649;621
-0.9	-4.6	TRAF2;TRAF2 iso 2;TRAF2 iso 3	§176;228;165
-5.7	-8.6	TRAF2;TRAF2 iso 3;TRAF2 iso 4	§119;108;§119
-1.5	-4.6	TRAF2;TRAF2 iso 2;TRAF2 iso 3;TRAF2 iso 4	§27;§27;§27;§27
-3.0	-3.3	TRAF2;TRAF2 iso 2;TRAF2 iso 3;TRAF2 iso 4	277;329;266;252

Observando esta tabla podemos ver que numerosas proteínas clave en la ruta de NF- κ B presentan una mayor modificación post-traduccional ya sea mediante ubiquitinación, NEDDilación u otras modificaciones similares a ubiquitina. Por lo tanto un estudio exhaustivo del papel de estas modificaciones post-traduccionales en la patología LLC puede ayudar a encontrar nuevas dianas terapéuticas en el futuro.

OBJETIVOS

El objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Master es caracterizar algunas modificaciones post-traduccionales de proteínas de la ruta NF-kB halladas en la LLC para determinar su papel en el fenotipo característico de esta patología.

Para ello los objetivos específicos son los siguientes:

1) Caracterizar el efecto de la NEDDilación en proteínas clave de la ruta NF-ĸB.

2) Estudiar la expresión de proteínas pertenecientes a la ruta de NF- κ B en muestras primarias de LLC.

 Observar el efecto de MLN4924, un inhibidor de la proteína activadora de la NEDDilación (NAE), en muestras primarias y líneas celulares.

4) Comprobar el efecto final de la NEDDilación sobre la activación de la ruta NF-κB.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Líneas y cultivos celulares:

Las células HEK293T provienen de un adenocarcinoma embrionario de riñón. Se mantienen en medio DMEM suplementado con suero de ternera fetal (FBS) al 10% y cultivadas en una atmósfera humidificada con CO2 al 5% y a 37°C.La línea celular HEK293T es utilizada como modelo de cultivo para realizar las posteriores transfecciones. Las células HEK293T humanas se siembran en frascos de cultivo en una incubadora a 37 °C, en un volumen de 10 mL, de medio de cultivo DMEM (Dullbecco's Modified Eagle's médium) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino.

Para poder mantener el pase y preparar cultivos para realizar las transfecciones, en primer lugar, cuando las células están cerca de la confluencia total de la placa se aspira el medio mediante una bomba y se lavan las células con PBS el cual también se va a aspirar. A continuación se despegan mediante la digestión de la matriz extracelular añadiendo 1 mL de tripsina. Se mantiene en incubación durante 5 minutos a 37 °C.

Una vez tripsinizadas las células resuspendemos estas en 15 ml de medio DMEM para poder repartirlas en placas multipocillos (6 pocillos) para la posterior transfección. Parte del volumen se utilizará para mantener el pase utilizando 3 mL de medio mezclado con células (dilución 1:5) y añadiendo 7 mL de DMEM para dejar un volumen final de 10 ml. Las células se mantienen a 37 °C en un incubador con un 5 % de CO2 y ambiente húmedo a la espera de la transfección.

Las células B-LLC que se emplearon en estos estudios provienen de sangre periférica (PBMC) de pacientes que firmaron un consentimiento informado antes de la extracción. Se purificó la fracción mononuclear (mayoritariamente formada por linfocitos B en estos pacientes) mediante centrifugación en un gradiente de Ficoll. Una vez obtenida la fracción mononuclear se realizan 3 lavados con PBS para eliminar los restos de Ficoll de las células. Los pacientes LLC seleccionados presentan una afectación superior al 85% (más del 85% de los leucocitos son linfocitos). Estos linfocitos primarios se incuban en medio RPMI suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino.

En ambos casos, si es necesario realizar un tratamiento con MLN4924 se añadirá al cultivo entre 16 y 24 h antes de la extracción de proteínas.

2. Transfección mediante el método de fosfato cálcico.

Este método químico se basa en la formación de un precipitado de fosfato cálcico al mezclar soluciones de cloruro de calcio (CaCl2) y fosfato de sodio, que arrastra al DNA presente en las mismas. Por un lado se realiza la mezcla de ADN y CaCl2 (tubo 1), y por otro lado la

solución tamponada de fosfato de sodio (tubo 2). A continuación, se vierte la mezcla del tubo 1 sobre la solución del tubo 2 gota a gota, y durante el proceso, se forman unos agregados que las células incorporarán por endocitosis. Se deja la mezcla de los dos tubos entre 10-20 min a temperatura ambiente para que se formen los precipitados. Transcurrido ese tiempo se vierte sobre las células gota a gota. El cultivo se incuba unas 16 horas en una atmósfera humidificada. Este método de transfección proporciona un elevado rendimiento en células HEK293T, aunque posee cierta toxicidad.

3. Extracción de RNA

Se procede a extraer el mRNA de las células de pacientes de LLC para, posteriormente, obtener el DNA complementario (cDNA) y así poder realizar clonajes y mutagénesis de los genes de interés (IKK β , TANK, NEMO, Ik β , p65).

Para ello utilizamos el reactivo comercial TRIZOL. El TRIZOL es una solución monofásica inmiscible en agua de fenol e isocianato de guanidina que mantiene la integridad de los ácidos nucleicos. En este punto se pueden conservar a -80°C varios días. A este lisado se le añade una mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v) seguido de vórtex para una correcta emulsión de los componentes, y de una centrifugación (1500 rpm, 20 minutos a temperatura ambiente) para separar la muestra en dos fases, una de ellas acuosa y otra orgánica. Al pH del TRIZOL, el ARN permanecerá en la fase acuosa, mientras que el ADN y las proteínas quedan en la interfase con la fase orgánica. El ARN será recuperado posteriormente de la fase acuosa por precipitación con isopropanol (se añade un volumen de isopropanol correspondiente a 0,7 veces el volumen de la muestra y se deja unos 10 min a temperatura ambiente; centrifugación a 1500 rpm, 20 min a 4°C). Finalmente, para eliminar las posibles impurezas en forma de sales se lava el pellet de ARN con Etanol al 70% en agua DEPC (centrifugación a 1500 rpm, 10 min a 4°C). Una vez seco, se resuspende el pellet en un volumen de agua DEPC adecuado en función del pellet obtenido.

La cuantificación de las muestras se lleva a cabo mediante la lectura de su absorbancia a 260nm en un espectrofotómetro (Nanovue, GE Healthcare) que indica la concentración y la pureza de la muestra utilizando la ratio A260/A280, midiendo a 260 y 280 nm. Un resultado de 2,0 indica un ARN puro, sin contaminantes.

4. Obtención del cDNA

Para la evaluación de la expresión del ARNm de diferentes genes se utilizó una técnica basada en la PCR, para lo que es necesario convertir el ARN total extraído a ADN, que recibe el nombre de ADN complementario (cDNA). Para ello se realiza una retrotranscripción in vitro utilizando la transcriptasa inversa de MMTV (SuperScriptII) sobre el molde de nuestro ARN. Previo a esta reacción, el ARN total es desnaturalizado a 65°C y enfriamiento rápido, para deshacer las estructuras secundarias del mismo y así facilitar el acceso a la retrotranscriptasa. En la desnaturalización se incluyen 2µg de ARNm total en presencia de agua, hexámeros de oligonucleótidos como cebadores (Random Hexamers) y los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs). Tras el enfriamiento rápido en hielo, se añade una mezcla con el resto de componentes (tampón 5x, DTT, 0,25 U/µl de inhibidor de ARN y 5 U/µl de transcriptasa inversa). El emparejamiento de los hexanucleótidos al azar se consigue con una incubación a 25°C durante 5 minutos, tras lo que se incuba a 42°C durante 1 hora para que trabaje la retrotranscriptasa. La reacción se termina desnaturalizando la enzima a 95°C durante 5 minutos. Para llevar a cabo las reacciones se emplea un termociclador (VWR). Las muestras se guardan para su conservación a -20°C.

5. Clonaje y mutagénesis de genes de interés:

Para poder obtener los genes necesarios para realizar las transfecciones primero debemos obtener las regiones codificantes de los genes y clonarlas en un vector. Para realizar clonajes utilizamos el cDNA obtenido de células de pacientes del cual, mediante procedimientos de PCR convencional con cebadores específicos, obtendremos las regiones codificantes de interés. Una vez amplificadas, realizaremos un corte con las enzimas de restricción necesarias para luego realizar una ligación con el vector pCMV Tag 2B con resistencia a Kanamicina o el vector pCMV2 con resistencia a Ampicilina. A continuación transformaremos las ligaciones en bacterias y analizaremos mini-preparaciones de DNA (minipreps) de las colonias obtenidas tras su incubación en placas de LB-Agar. Para comprobar que la región codificante adecuada ha sido clonada dentro del vector, realizamos cortes de las minipreps con enzimas de restricción que nos proporcionen un patrón de corte distintivo. Finalmente realizamos una preparación de DNA a gran escala (maxiprep) para poder obtener gran cantidad del plásmido deseado purificado. Todas las construcciones fueron comprobadas mediante secuenciación.

La mutagénesis dirigida de las lisinas a estudio se llevó a cabo mediante amplificaciones parciales de las regiones codificantes ya clonadas con oligonucleótidos que portaban los cambios deseados. Los productos mutados se clonaron en los vectores originales de forma similar a como se ha explicado antes.

Canag	Secuencia cebadores		
Genes	Hebra líder (Fw)	Hebra retrasada (Rv)	
NEMO	5'-GGGG-GGATCC- ATGAATAGGCACCTCTGGAAGAG-3'	5′-GGG-CTCGAG- CTACTCAATGCACTCCATGACATG-3′	
FLAG-TANK	5'-GGG-GGATCC- ATGATAAAAACATTGGCGAGC-3'	5'-GGG-GTCGAC- TTAAGTCTCTCCATTGAAGTGTG-3'	
<i>p65</i>	Obtenido a partir del laboratorio de Jose Luis Fernández Luna		
FLAG-IKKß	Se obtuvo a partir de la casa comercial AdGene		
TANK K189/195R PCR1	5'-GGGG-GGATCC- ATGGATAAAAACATTGGCGAGC-3'	5′- TCTAGCCTGAGGCCTAAACAGCGCTTC-3′	
TANK K189/195R PCR2	5'-AGACAAGAAGCGCTGTTTC-3'	5'-GGGG-GTCGAG- TTAAGTCTCTCCATTGAAGTGTG-3'	
TANK K189/195R PCR3	Se usa como molde las PCR anteriores y se usan como cebadores los utilizados en el clonaje de TANK		
IKKβ K106R	5'-GAGGAGATCTCCGGAGGTACCTGA-3'	5'-CAGGGCCTTGAAGCAGCCATTGG-3'	
ІкВ	Se obtuvo a partir de la casa comercial Clontech		

Tabla 3: cebadores diseñados para cada gen en el protocolo de clonajes y mutagénesis

Las mutaciones realizadas en las proteinas de interes fueron cambios de lisinas a argininas. En primer lugar observamos las lisinas modificadas en las proteinas (ver antecedentes) y posteriormente modificamos su codon de manera que codifique para una arginina. Realizamos este cambio ya que las argininas no pueden ser NEDDiladas y ambos residuos son similares tanto en carga y tamaño por lo que en principio se mantendra la funcionalidad normal de la proteina.

6. Análisis de la actividad transcripcional mediante construcciones reporteras de luciferasa.

Para analizar la actividad funcional de NF-kB se ha utilizado la construcción testigo pBVI, que contienes varios elementos de respuesta a NF-kB en tándem, controlando la transcripción del gen de luciferasa. Las células HEK293T se cotransfectaron por triplicado por el método del fosfato cálcico, con 2 μ g del vector pBVI, 1 μ g de los vectores de expresión indicados en cada experimento y 0,2 μ g de pCMV-galactosidasa, como control interno de transfección. Las actividades de luciferasa y β -galactosidasa se miden en un luminómetro (Luminoskan Ascent, Thermo científic), a las 24 h de la transfección, incubando los extractos celulares con sus

respectivos sustratos, lo que generan las reacciones bioluminiscentes. Las actividades de luciferasa se normalizan frente a las de β -galactosidasa para obtener una actividad de luciferasa relativa.

7. Análisis de los niveles proteicos (Western Blot)

Extracción de proteínas:

En primer lugar se retira el medio de cultivo de las células y se añade 1 mL de PBS. Se separan las células rascando la base de la placa. Seguidamente se recoge la solución obtenida de las placas en tubos eppendorf y se centrifugan a 13200 rpm durante 1 min.

A continuación se descarta el sobrenadante y se añade el tampón de lisis que contiene (50mM Tris-Cl pH=7.4; 150mM NaCl; 5mM MgCl2; 1mM EGTA; 10% Glicerol; 0,1% NP-40) al que se le añaden los inhibidores de proteasas y fosfatasas (NaF 1M; Ortovanadato de sodio 1M; DTT 100mM; Aprotinina 5mg/ml; Leupeptina 5mg/ml; PMSF (fluoruro de fenilmetanosulfonilo) 100mM; β -glicerofosfato 1M).

Habiendo añadido el tampón de lisis se resuspende el pellet en un volumen de 100 µl o 500 µl dependiendo de si vamos a realizar un Western Blot o una inmunoprecipitación, respectivamente. A partir de este momento deberemos mantener las muestras en hielo para evitar la degradación de las proteínas. Después de una incubación en hielo de 10 minutos se centrifuga durante 20 min a 15000 rpm a una temperatura de 4°C. Finalmente se traspasa el sobrenadante a un tubo de microfuga en el que se encuentra el extracto proteico.

Inmunoprecipitación:

En el caso de que necesitásemos realizar una inmunoprecipitación, lisamos las células en 500 µl de tampón de lisis con proteasas y realizamos una preincubacion con 45 µl de bolas de sepharosa durante 1 hora para retirar proteínas que se unen inespecíficamente. Transcurrida esa hora se añadirán 2 µl del anticuerpo que se requiera para el experimento y se dejará incubar toda la noche en agitación a 4°C. Transcurrida la noche se añadirán 45 µl de bolas de sepharosa y se dejara incubar en agitación a 4°C durante 1 hora. Las bolas se recuperan por centrifugación y se lavan cuatro veces: 1 mL de TBS-T (50mM Tris, 150mM NaCl y 0,1% Tween 20) en las tres primeras centrifugaciones y TBS (50mM Tris, 150mM NaCl) en la última. Hechos los 4 lavados ,retiramos la mayor cantidad de líquido posible de las bolas de sepharosa recogidas en el fondo del tubo eppendorf.

A continuación resuspendemos las bolas de sepharosa en 15 μ l de agua HELIX y 5 μ l de tampón de carga. Finalmente se incuban las muestras durante 5 min a 95°C, se realiza un vortex a las muestras y se hace una pequeña centrifugación para que todo el material este en el fondo del eppendorf listo para cargarse en los pocillos de electroforesis.

Cuantificación de proteínas:

La concentración de proteína de los extractos celulares se determina por la técnica del BCA (Ácido Bicinconínico). Se realiza una recta patrón con cantidades conocidas de seroalbúmina bovina (BSA), necesaria para calcular la concentración proteica de los extractos a estudio. Para ello, seguimos las instrucciones del fabricante, realizando la cuantificación en placas multipocillo de 96 en el espectrofotómetro Multiskan FC Microplate Photometer (Thermo Scientific, Inc). Con los valores de absorción de BCA obtenidos se establece una recta patrón a partir de la cual, mediante regresión lineal, se determina la concentración de proteína de cada extracto celular.

Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y transferencia a membrana de nitrocelulosa:

Se transfieren cantidades equivalentes de extracto proteico (alrededor de 20 μ g) a tubos eppendorf y se mezclan con un volumen de tampón de carga 5x de 5 μ l. A esta mezcla se la añade agua hasta llegar a 25 μ l.

Las proteínas se incuban a 95°C durante 5 min para desnaturalizar las proteínas y que la estructura terciaria no afecte a su migración. Se resuelven por electroforesis vertical en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE) de un porcentaje de acrilamida del 10%. La electroforesis se realiza a un voltaje constante de 120V, en una cubeta (BioRad) empleando un tampón de electroforesis TRIS-Glicina (2,5 mM Tris, 19,2 mM glicina, 0,1% SDS).

Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfieren a una membrana Amersham Hyband PVDF de 0,45µm de poro (GE Healthcare, Life Sciences) durante 1 hora por aplicación de un campo eléctrico constante de 360mA evitando el sobrecalentamiento. Como tampón de transferencia se emplea 2,5 mM Tris, 19,2 mM glicina y 20% MeOH. Finalizada la transferencia, se hacen tres lavados de 5 minutos con agua destilada de la membrana en agitación y a temperatura ambiente. A continuación, se incuba la membrana durante 1 hora con solución de bloqueo (2mg/ml i-block y 0,1% TWEEN20 (v/v) en TBS (50mM Tris, 150mM NaCl)) en agitación y a temperatura ambiente para bloquear las uniones inespecíficas y seguidamente comienza la incubación con el anticuerpo primario.

El anticuerpo primario va diluido en solución de bloqueo, y la incubación se lleva a cabo durante 12-14 horas a 4°C en agitación. Las membranas se incuban con los correspondientes anticuerpos primarios durante toda la noche indicados en la Tabla 3.

Anticuerpo	Referencia	Casa comercial	Hospedador
NEMO	Sc-8032	Santa Cruz Biotechnology	Ratón
p-NEMO	Sc-293135	Santa Cruz Biotechnology	Ratón
IkBa	Sc-1643	Santa Cruz Biotechnology	Ratón
p65	Sc-8008	Santa Cruz Biotechnology	Ratón
p-IkBa	Sc-8404	Santa Cruz Biotechnology	Ratón
р-р65	Sc-136548	Santa Cruz Biotechnology	Ratón
NEDD8	Ab81264	AbCam	Conejo
GAPDH	Sc-47724	Santa Cruz Biotechnology	Ratón
FLAG	Ma1-91878	Invitrogen	Ratón

 Tabla 4: anticuerpos primarios utilizados en el protocolo de Western Blot junto con la casa comercial a la que pertenecen y el hospedador.

Finalizada la incubación, se retira el anticuerpo primario y se realizan tres lavados de 10 minutos con TBS-T (50mM Tris, 150mM NaCl y 0,1% Tween 20). Finalmente, se realiza la incubación con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios se utilizan diluidos 1:10000 en solución de bloqueo.

El anticuerpo unido se detectó mediante un ensayo de quimioluminiscencia, utilizando como sustrato SuperSignal® West Dura, en un sistema fotográfico Image Quant LAS4000 (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, Reino Unido). Los anticuerpos secundarios empleados en los estudios se muestran a continuación:

 Tabla 5: anticuerpos secundarios utilizados en el protocolo de Western Blot junto con la casa comercial a la que pertenecen y el hospedador.

Anticuerpo	Referencia	Casa comercial	Hospedador
AntiRabbit IgG-HRP	Sc-2357	Santa Cruz Biotechnology	Ratón
m-IgGк BP-HRP	sc-516102	Santa Cruz Biotechnology	Proteína sintética

Como control interno para normalizar los niveles de proteína, se utiliza la inmunodetección de la proteína GAPDH.

RESULTADOS

1. Estudio del efecto de MLN4924 sobre la expresión de proteínas de la ruta NF-kB.

El rastreo realizado previamente en nuestro laboratorio encontró variaciones notables en las UBL-PTM de una serie de proteínas de la ruta NF-kB en la LLC. Con el objetivo de estudiar el efecto que la NEDDilación ejerce sobre la expresión de esas proteínas en pacientes de LLC, se trataron ex-vivo células B de diferentes pacientes con el inhibidor de NEDDilación MLN4924 (pevonedistat) y sus extractos proteicos fueron analizados por western blot. En la figura 5 puede observarse la expresión de IKKß, NEMO, p65, IkB y TANK. Se analizó también la NEDDilación de cullina 1 para comprobar la funcionalidad de MLN4924.



Figura 5: Efecto de MLN4924 en proteínas de pacientes de LLC.

Aunque hay una amplia variabilidad entre pacientes, los resultados muestran una desestabilización de TANK en presencia de MLN4924. Asimismo, y en concordancia con lo publicado por otros autores, la inhibición de NAE induce una acumulación de la forma fosforilada de IkB. Sin embargo, es llamativo que no fuésemos capaces de detectar ni IKK ni IkB (Figura 5). Sólo cuando las células eran tratadas con un inhibidor del proteosoma como Bortezomib, IkB podía ser detectado por western blot. Sin embargo, MLN4924 no fue capaz de estabilizar IkB (figura 8A). Por otro lado, MLN4924 no tuvo un efecto claro sobre la expresión de otras proteínas de la ruta como NEMO o p65.

2. Estudio in vitro del efecto de la NEDDilación sobre la función de proteínas de la ruta NFkB.

Para el estudio del papel que las variaciones en las UBL-PTM encontradas en la LLC desempeñan en su fisiopatología, clonamos los marcos de lectura de IKKB, NEMO, p65, IkB o

TANK en vectores de expresión con epítopos FLAG. Asimismo, mutamos las lisinas receptoras de algunas de esas modificaciones en la LLC (ver tabla 2), para estudiar su efecto diferencial y estudiar modificaciones individuales.

IKKß juega un papel central en la activación de la ruta NF-kB, fosforilando a otros miembros de la ruta y regulando así su poliubiquitinación y degradación en el proteosoma. IKKß presenta un incremento en la modificación de la lisina 106 en la LLC (ver tabla 2). Sin embargo, el tratamiento con MLN4924 aumenta esta modificación.

Comenzamos estudiando el efecto que la NEDDilación de la lisina 106 juega sobre la estabilidad de IKKß. Transfectamos formas etiquetadas con FLAG de IKKß y de su mutante K106R en células HEK293T junto con un vector de expresión de NEDD8, o bien las tratamos con el inhibidor MLN4924.



Figura 6: **Efecto de la NEDDilación sobre IKKβ. A**) Comportamiento de IKK en presencia de NEDD8, MLN4924, MLN7243 y Bortezomib. **B**) Efecto de IKKβ sobre NEMO. **C**) Efecto de IKKβ sobre p65

Los resultados muestran una disminución en su estabilidad en presencia de NEDD8 mientras que con el tratamiento de MLN4924 su estabilidad aumenta. La lisina 106 de IKKß parece mediar este efecto ya que su mutación a arginina (K106R) lo bloquea. Utilizamos también MLN7243, que es un inhibidor de la activación de la ubiquitina, para determinar el papel de la

ubiquitinación en este proceso. En la figura 6A puede observarse una disminución de la cantidad de IKKß a medida que aumenta la concentración de MLN7243.

Viendo el efecto de la NEDDilación sobre la estabilidad de IKK β , decidimos investigar si esto afectaba a otras proteínas de la ruta con las que interacciona funcionalmente. NEMO (IKK γ) es la subunidad reguladora del complejo IKK. En nuestros experimentos de coinmunoprecipitación pudimos comprobar que ambas proteínas interaccionan cuando se expresan conjuntamente, y que la sobrexpresión de NEDD8 bloquea dicha interacción. La mutación K106R, además, altera también el proceso, lo que sugiere un papel de la NEDDilación en la interacción entre estas dos proteínas (figura 7). Fue llamativo observar que la sobrexpresión de ambas proteínas derivaba en una disminución de la cantidad de NEMO inmunoprecipitada (figura 7). Para descartar que IKK β estuviese mediando la degradación de NEMO, sobrexpresamos ambas proteínas en células HEK293T. En la figura 6B puede observarse que, aunque NEMO es una diana de fosforilación de IKK β , no parece mediar su degradación.





Otra proteína diana de IKKß es p65, uno de los componentes del factor de transcripción NF-kB junto a p50. Efectivamente, cuando expresamos ambas proteínas juntas pudimos detectar una fosforilación clara de p65 en la serina 536, que no se producía con un mutante inactivo de IKKß (figura 6C). Esta coexpresión iba acompañada de una desestabilización de la proteína p65, pero no dependía de la actividad kinasa de IKKß, ya que la forma inactiva producía el mismo efecto desestabilizador (figura 6C). Para determinar si el proteosoma estaba involucrado en este efecto, utilizamos el inhibidor del proteosoma MG132. La incubación con MG132 revertía la

degradación de p65 mediada por IKKß, lo que sugiere un papel del sistema ubiquitin-proteosoma en la misma (Figura 8). Algo similar ocurre cuando utilizamos el mutante K106R de IKKß. Indagamos también el papel de la NEDDilación sobre la desestabilización de p65 por IKKß. MLN4924 producía también una cierta reversión de dicha desestabilización. Sin embargo, esto no ocurría cuando utilizábamos el mutante K106R.



Figura 8: **Participacion del proteosoma en la degradación de p65**. Observamos los niveles de p65 en presencia de MG132 y MLN4924.

La diana más conocida de IKKß en la activación de la ruta NF-kB es IkB. De forma similar a lo que ocurría en células primarias de LLC, sólo pudimos detectar la expresión de la proteína IkB en presencia de un inhibidor de proteosoma . En la Figura 8 podemos observar que MLN4924 afecta mínimamente a la estabilidad de IkB y de su forma fosforilada.

En el perfil de las UBL-PTM de la LLC, otra de las proteínas con numerosas lisinas aberrantemente modificadas era TANK, con la peculiaridad de que dichas modificaciones eran parcialmente revertidas por el tratamiento con MLN4924, lo que sugería que pudiesen ser NEDDilaciones directas. Para demostrar que TANK puede ser NEDDilada en esos residuos, utilizamos unas construcciones de interferencia (shRNA) para la enzima de-NEDDilante SENP8 (DEN1). Cuando coexpresamos estas construcciones de interferencia junto a TANK en células HEK293T, observamos un incremento de su NEDDilación en experimentos de pull-down (Figura 9). Mientras que la mutación de dos de las lisinas con modificación alterada en LLC produjo una drástica bajada en su NEDDilación. Estos datos demuestran que las lisinas 189 y 195 de TANK pueden ser NEDDiladas. La sobrexpresión de NEDD8 induce un incremento en la cantidad de

TANK. Curiosamente, el mutante K189/195R de TANK mostró una expresión basal más elevada, pero esta se redujo en presencia de NEDD8 (figura 8B).



Figura 8: **Efecto de la NEDDilación sobre IκB y sobre TANK. A)** Comportamiento de IκB en presencia de MLN4924 y Bortezomib. **B**) Comportamiento de TANK en presencia de NEDD8



Figura 9: Comprobación de la NEDDilación en TANK mediante inmunoprecipitación.

3. Estudios de la actividad de la ruta NF-KB en presencia de NEDD8.

Para comprobar si la actividad de la ruta se ve afectada por la NEDDilación, analizamos la actividad transcripcional mediante construcciones testigo de luciferasa. Los resultados muestran que la función de la ruta NF- κ B aumenta en presencia de IKK y p65. TANK no tuvo ningún efecto adicional sobre la transcripción. En consonancia con su efecto desestabilizador sobre IKK β , NEDD8 produjo una inhibición del efecto transcripcional de este último (Figura 10).



Figura 10: Análisis de la actividad transcripcional de NF- κ B mediante construcciones reporteras de luciferasa. Las barras indican el aumento de actividad transcripcional normalizado con la presencia de un reporter de β Galactosidasa.

Dado que, como habíamos visto antes, la lisina 106 parecía mediar el efecto de la NEDDilación sobre la estabilidad de IKKß, estudiamos si la mutación K106R afectaba al efecto de NEDD8 sobre la transactivación de NF-kB mediada por IKKß. Efectivamente, como puede verse en la figura 11, la mutación K106R impidió el efecto inhibidor de NEDD8 sobre la transcripción de NF-kB.



Figura 11: Análisis de la actividad transcripcional de NF- κ B mediante construcciones reporteras de luciferasa centrado en IKK β . Las barras indican el aumento de actividad transcripcional normalizado con la presencia de un reporter de β Galactosidasa. La columna verde corresponde a una cantidad de NEDD8 de 0,1 µg, mientras que la columna amarilla corresponde a 1 µg.

DISCUSIÓN

El papel de la ruta NF-κB es clave en la supervivencia prolongada de la célula, lo cual es una característica especifica de la patología de la LLC. En trabajo anteriores se ha visto que proteínas pertenecientes a esta ruta, que juegan un papel esencial en su funcionamiento, presentan niveles de modificaciones post-traduccionales altos (Bravo-Navas et al., 2021). No solo eso sino que el uso de MLN4924 como inhibidor de la NEDDilación está siendo usado en el tratamiento de LLC ya que produce senescencia, apoptosis y parada del ciclo celular (Godbersen et al., 2015).

En estudios anteriores se mostró que MLN4924 parecía atenuar el efecto sobre la fosforilación de IKK β (Fu et al., 2019). Pero no se han realizado ensayos en los que se observe el efecto directo que tiene la NEDDilación sobre la estabilidad de IKK β .

En nuestro trabajo se puede observar que la cantidad de IKK β en presencia de NEDD8 sufre una bajada considerable afectando esto a la señalización de la ruta. Además parece que la lisina 106 es la que media esta degradación ya que una mutación en ese residuo cambia completamente la forma de actuar de la proteína en presencia de NEDD8, tanto en cuanto a su estabilidad como funcionalmente, como vimos en ensayos funcionales de luciferasa. Además, observando el efecto que tiene MLN4924 sobre IKKβ podemos ver que tiende a estabilizar la proteína. En parte estos descubrimientos son contradictorios ya que IKK β es una quinasa que juega un papel esencial en la activación de la ruta NF-κB, al ser la quinasa que fosforila a IκB y la marca para su degradación. Que IKK β baje su concentración en presencia de grandes cantidades de NEDD8 contradice el comportamiento que se ha observado hasta la fecha en LLC ya que, como se comento anteriormente, la LLC presenta una sobreactivación de la ruta NF-κB además de un aumento general de las UBL-PTM (referencia de nuestro paper). Sin embargo, nuestros resultados también han descubierto un efecto desestabilizador de IKKß sobre p65, independiente de su actividad kinasa, lo que concordaría con un efecto potenciador de la actividad NF-kB por parte de NEDD8, ya que relajaría la degradación de p65 mediada por IKKB. Además, no hemos sido capaces de detectar IKKß en muestras de pacientes, lo que podría correlacionarse con la elevada actividad NF-kB en esta patología, según nuestros hallazgos. Determinar si esta baja expresión de IKKß depende del sistema ubiquitin-proteosoma y por tanto, podrías ser regulado por NEDDilación, está entre nuestros objetivos inmediatos. Estos datos concuerdan en parte con los de Mao et al. que describen cómo IKKß media la degradación de p65 a través de la histona acetiltransferasa GCN5 y una ubiquitin transferasa que incluye la cullina 2 (Mao et al., 2009). Necesitamos profundizar más en estos estudios para armonizar estas presuntas contradicciones.

Se ha descrito una estrecha relación de IKKβ con el signalosoma COP9, que juega un papel principal en la regulación de la maquinaria de ubiquitinación. Se ha visto que la interacción entre IKKβ y el signalosoma COP9 pueden ser responsables de la rápida degradación de IκB tras

el inicio de la señalización. Además se ha visto que IKK β no solo fosforilaría a I κ B sino que también lo haría a JAB1 (componente de COP9) activándolo y marcándolo así para degradación mediada por ubiquitina (Orel et al., 2010). Por lo tanto es posible que este mecanismo no solo esté presente para la degradación de I κ B sino para otras proteínas, como puede ser el caso de p65 dentro de la ruta.

Estudios previos han mostrado que NEMO ayuda a la fosforilación de I κ B a través de IKK β , pero que IKK β también puede llegar a fosforilar NEMO con una consiguiente pérdida del efecto potenciador mencionado anteriormente (Prajapati & Gaynor, 2002). Nuestros resultados confirman la interacción y fosforilación de NEMO por IKK β y además apuntan a un papel de la NEDDilación en dicha interacción, ya que la sobrexpresión de NEDD8 la disminuye. Más aún, la lisina 106 de IKK β , cuya modificación por UBL está alterada en la LLC, parece mediar este efecto, ya que su mutación a arginina impide la interacción con NEMO.

Finalmente, nuestro estudio se ha centrado en TANK cuya modificación en la LLC tiene la particularidad con respecto a las otras de que MLN4924 la revierte, lo que sugiere que podría ser una NEDDilación directa. Nuestros datos obtenidos en células HEK293T apoyan esta posibilidad, ya que la interferencia de la expresión de la proteína deNEDDilante DEN1 (SENP8) produjo un aumento de la cantidad de NEDD8 conjugada a TANK, de forma dependiente de la dosis. Esta conjugación se vio claramente mermada cuando se sustituyeron las lisinas 189 y 195 de TANK por argininas. Este hallazgo demuestra que TANK puede NEDDilarse al menos en esos dos residuos y sugieren un papel de la NEDDilación en la regulación de la actividad de TANK en LLC. La sobrexpresión de NEDD8 indujo un aumento de la estabilidad de TANK, pero una disminución de la misma en el mutante K189/195R. Cabe destacar que a las dosis más alta de NEDD8, TANK wild-type parece desestabilizarse (ver figura 8B), quizá debido a un aumento de la NEDDilación de cullinas que favorece la ubiquitinación y degradación de la proteína. Aunque la utilizamos habitualmente para inducir la NEDDilación de proteínas, la sobrexpresión de NEDD8 puede secuestrar la maquinaria de ubiquitinación y producir NEDDilaciones aberrantes (Enchev et al., 2015). Por este motivo es conveniente complementar estos resultados con los obtenidos con MLN4924 y otros métodos.

El hecho de que la NEDDilación aumente la estabilidad de TANK podría encajar con la actividad constitutivamente activa de la ruta NF-kB en células de LLC (Nomura et al., 2000).

CONCLUSIONES

Aunque aún queda trabajo por hacer, los datos presentados en esta memoria de máster apoyan un papel significativo de las modificaciones post-traduccionales tipo ubiquitina en la modulación de la ruta NF-κB en la leucemia linfocítica crónica. Como conclusiones parciales destacamos:

1) La NEDDilación modula la activación de la ruta NF- κ B en parte por su efecto sobre la modificación de la lisina 106 de IKK β .

2) La NEDDilación de lisinas cuya modificación está alterada en LLC afecta a la estabilidad, interacciones y función de las proteínas de la ruta NF-kB que las albergan.

3) El efecto de MLN4924 sobre la ruta NF-kB se extiende sobre otras proteínas distintas a IkB.

BIBLIOGRAFÍA:

- Abidi, N., & Xirodimas, D. P. (n.d.). Regulation of cancer-related pathways by protein NEDDylation and strategies for the use of NEDD8 inhibitors in the clinic. *Endocrine-Related Cancer*, 22(1), T55–T70. https://doi.org/10.1530/ERC-14-0315
- Adams, J. M., & Cory, S. (2018). The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell Death and Differentiation*, 25(1), 27–36. https://doi.org/10.1038/cdd.2017.161
- Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature Reviews. Immunology*, *3*(9), 745–756. https://doi.org/10.1038/nri1184
- Bond, D. A., & Woyach, J. A. (2019). Targeting BTK in CLL: Beyond Ibrutinib. *Current Hematologic Malignancy Reports*, 14(3), 197–205. https://doi.org/10.1007/s11899-019-00512-0
- Bravo-Navas, S., Yáñez, L., Romón, Í., Briz, M., Domínguez-García, J. J., & Pipaón, C. (2021).
 Map of ubiquitin-like post-translational modifications in chronic lymphocytic leukemia.
 Role of p53 lysine 120 NEDDylation. *Leukemia*. https://doi.org/10.1038/s41375-021-01184-7
- C. Rozman, E. M. (2002). CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA. Social Work Education, 21(1), 117–123. https://doi.org/10.1080/02615470120107068
- Caligaris-Cappio, F., Gottardi, D., Alfarano, A., Stacchini, A., Gregoretti, M. G., Ghia, P., Bertero, M. T., Novarino, A., & Bergui, L. (1993). The nature of the B lymphocyte in Bchronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells*, 19(3), 601–613.
- Chiorazzi, N., Chen, S. S., & Rai, K. R. (2021). Chronic lymphocytic leukemia. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 11(2), 1–35. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a035220
- Chung, D., & Dellaire, G. (2015). The Role of the COP9 Signalosome and Neddylation in DNA Damage Signaling and Repair. *Biomolecules*, 5(4), 2388–2416. https://doi.org/10.3390/biom5042388
- Enchev, R. I., Schulman, B. A., & Peter, M. (2015). Protein neddylation: beyond cullin–RING ligases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 16(1), 30–44. https://doi.org/10.1038/nrm3919
- Evers, M., Jak, M., & Leusen, J. H. W. (2018). The latest developments with anti-CD20 monoclonal antibodies in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 18(9), 973–982. https://doi.org/10.1080/14712598.2018.1508444

- Fais, F., Ghiotto, F., Hashimoto, S., Sellars, B., Valetto, A., Allen, S. L., Schulman, P.,
 Vinciguerra, V. P., Rai, K., Rassenti, L. Z., Kipps, T. J., Dighiero, G., Schroeder, H. W.,
 Ferrarini, M., & Chiorazzi, N. (1998). Chronic lymphocytic leukemia B cells express
 restricted sets of mutated and unmutated antigen receptors. *The Journal of Clinical Investigation*, *102*(8), 1515—1525. https://doi.org/10.1172/jci3009
- Fu, Z., Liao, W., Ma, H., Wang, Z., Jiang, M., Feng, X., & Zhang, W. (2019). Inhibition of neddylation plays protective role in lipopolysaccharide-induced kidney damage through CRL-mediated NF-κB pathways. *American Journal of Translational Research*, 11(5), 2830–2842. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31217857
- Gale, R. P., Cozen, W., Goodman, M. T., Wang, F. F., & Bernstein, L. (2000). Decreased chronic lymphocytic leukemia incidence in Asians in Los Angeles County. *Leukemia Research*, 24(8), 665–669. https://doi.org/10.1016/s0145-2126(00)00038-2
- Ghosh, S., May, M. J., & Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 16, 225–260. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.16.1.225
- Godbersen, J. C., Humphries, L. A., Danilova, O. V, Kebbekus, P. E., Brown, J. R., Eastman, A., & Danilov, A. V. (2014). The Nedd8-Activating Enzyme Inhibitor MLN4924 Thwarts Microenvironment-Driven NF-κB Activation and Induces Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia B Cells. *Clinical Cancer Research*, 20(6), 1576 LP 1589. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-0987
- Godbersen, J. C., Paiva, C., Danilova, O. V, Berger, A., Brown, J. R., & Danilov, A. V. (2015). Targeting neddylation effectively antagonizes nuclear factor-κB in chronic lymphocytic leukemia B-cells. *Leukemia & Lymphoma*, 56(5), 1566–1569. https://doi.org/10.3109/10428194.2014.990901
- Goldin, L. R., Pfeiffer, R. M., Li, X., & Hemminki, K. (2004). Familial risk of lymphoproliferative tumors in families of patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the Swedish Family-Cancer Database. *Blood*, 104(6), 1850–1854. https://doi.org/10.1182/blood-2004-01-0341
- Hellweg, C., Spitta, L., Henschenmacher, B., Diegeler, S., & Baumstark-Khan, C. (2016).
 Transcription Factors in the Cellular Response to Charged Particle Exposure. *Frontiers in Oncology*, 6. https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00061
- Hervé, M., Xu, K., Ng, Y.-S., Wardemann, H., Albesiano, E., Messmer, B. T., Chiorazzi, N., & Meffre, E. (2005). Unmutated and mutated chronic lymphocytic leukemias derive from self-reactive B cell precursors despite expressing different antibody reactivity. *The Journal* of Clinical Investigation, 115(6), 1636—1643. https://doi.org/10.1172/jci24387

- Lachiondo-Ortega, S., Mercado-Gómez, M., Serrano-Maciá, M., Lopitz-Otsoa, F., Salas-Villalobos, T. B., Varela-Rey, M., Delgado, T. C., & Martínez-Chantar, M. L. (2019).
 Ubiquitin-Like Post-Translational Modifications (Ubl-PTMs): Small Peptides with Huge Impact in Liver Fibrosis. *Cells*, 8(12). https://doi.org/10.3390/cells8121575
- Landau, D. A., Tausch, E., Taylor-Weiner, A. N., Stewart, C., Reiter, J. G., Bahlo, J., Kluth, S., Bozic, I., Lawrence, M., Böttcher, S., Carter, S. L., Cibulskis, K., Mertens, D., Sougnez, C. L., Rosenberg, M., Hess, J. M., Edelmann, J., Kless, S., Kneba, M., ... Wu, C. J. (2015). Mutations driving CLL and their evolution in progression and relapse. *Nature*, *526*(7574), 525–530. https://doi.org/10.1038/nature15395
- Lannutti, B. J., Meadows, S. A., Herman, S. E. M., Kashishian, A., Steiner, B., Johnson, A. J., Byrd, J. C., Tyner, J. W., Loriaux, M. M., Deininger, M., Druker, B. J., Puri, K. D., Ulrich, R. G., & Giese, N. A. (2011). CAL-101, a p110δ selective phosphatidylinositol-3-kinase inhibitor for the treatment of B-cell malignancies, inhibits PI3K signaling and cellular viability. *Blood*, *117*(2), 591–594. https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-275305
- Law, P. J., Berndt, S. I., Speedy, H. E., Camp, N. J., Sava, G. P., Skibola, C. F., Holroyd, A., Joseph, V., Sunter, N. J., Nieters, A., Bea, S., Monnereau, A., Martin-Garcia, D., Goldin, L. R., Clot, G., Teras, L. R., Quintela, I., Birmann, B. M., Jayne, S., ... Slager, S. (2017). Genome-wide association analysis implicates dysregulation of immunity genes in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature Communications*, *8*, 14175. https://doi.org/10.1038/ncomms14175
- Leon, M. E., Schinasi, L. H., Lebailly, P., Beane Freeman, L. E., Nordby, K.-C., Ferro, G., Monnereau, A., Brouwer, M., Tual, S., Baldi, I., Kjaerheim, K., Hofmann, J. N., Kristensen, P., Koutros, S., Straif, K., Kromhout, H., & Schüz, J. (2019). Pesticide use and risk of non-Hodgkin lymphoid malignancies in agricultural cohorts from France, Norway and the USA: a pooled analysis from the AGRICOH consortium. *International Journal of Epidemiology*, 48(5), 1519–1535. https://doi.org/10.1093/ije/dyz017
- Mao, X., Gluck, N., Li, D., Maine, G. N., Li, H., Zaidi, I. W., Repaka, A., Mayo, M. W., & Burstein, E. (2009). GCN5 is a required cofactor for a ubiquitin ligase that targets NFκB/RelA. *Genes & Development*, 23(7), 849–861. https://doi.org/10.1101/gad.1748409
- Milhollen, M. A., Traore, T., Adams-Duffy, J., Thomas, M. P., Berger, A. J., Dang, L., Dick, L. R., Garnsey, J. J., Koenig, E., Langston, S. P., Manfredi, M., Narayanan, U., Rolfe, M., Staudt, L. M., Soucy, T. A., Yu, J., Zhang, J., Bolen, J. B., & Smith, P. G. (2010).
 MLN4924, a NEDD8-activating enzyme inhibitor, is active in diffuse large B-cell lymphoma models: rationale for treatment of NF-kB-dependent lymphoma. *Blood*, *116*(9), 1515–1523. https://doi.org/10.1182/blood-2010-03-272567

- Nomura, Kawai, Nakanishi, K., & Akira, S. (2000). NF-κB activation through IKK-i-dependent I-TRAF/TANK phosphorylation. *Genes to Cells*, 5(3), 191–202. https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00315.x
- Omar, A. J., & Mauricio, V. J. (n.d.). Leucemia linfocítica crónica. 29-38.
- Orel, L., Neumeier, H., Hochrainer, K., Binder, B. R., & Schmid, J. A. (2010). Crosstalk between the NF-κB activating IKK-complex and the CSN signalosome. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, *14*(6b), 1555–1568. https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00866.x
- Paiva, C., Godbersen, J. C., Rowland, T., Danilova, O. V, Danes, C., Berger, A., & Danilov, A.
 V. (2017). Pevonedistat, a Nedd8-activating enzyme inhibitor, sensitizes neoplastic B-cells to death receptor-mediated apoptosis. *Oncotarget*, 8(13), 21128–21139. https://doi.org/10.18632/oncotarget.15050
- Pan, Z.-Q., Kentsis, A., Dias, D. C., Yamoah, K., & Wu, K. (2004). Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction. *Oncogene*, 23(11), 1985–1997. https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207414
- Prajapati, S., & Gaynor, R. B. (2002). Regulation of IκB Kinase (IKK)γ/NEMO Function by IKKβ-mediated Phosphorylation*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(27), 24331–24339. https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M201393200
- Ricci, F., Tedeschi, A., Morra, E., & Montillo, M. (2009). Fludarabine in the treatment of chronic lymphocytic leukemia: A review. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 5(1), 187–207. https://doi.org/10.2147/tcrm.s3688
- Roberts, A. W., Davids, M. S., Pagel, J. M., Kahl, B. S., Puvvada, S. D., Gerecitano, J. F.,
 Kipps, T. J., Anderson, M. A., Brown, J. R., Gressick, L., Wong, S., Dunbar, M., Zhu, M.,
 Desai, M. B., Cerri, E., Heitner Enschede, S., Humerickhouse, R. A., Wierda, W. G., &
 Seymour, J. F. (2015). Targeting BCL2 with Venetoclax in Relapsed Chronic
 Lymphocytic Leukemia. *New England Journal of Medicine*, *374*(4), 311–322.
 https://doi.org/10.1056/NEJMoa1513257
- Saha, A., & Deshaies, R. J. (2008). Multimodal Activation of the Ubiquitin Ligase SCF by Nedd8 Conjugation. *Molecular Cell*, 32(1), 21–31. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.08.021
- Shishodia, S., & Aggarwal, B. B. (2004). Nuclear factor-kappaB: a friend or a foe in cancer? *Biochemical Pharmacology*, 68(6), 1071–1080. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.04.026
- Slupsky, J. R. (2014). Does B cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukaemia cells differ from that in other B cell types? *Scientifica*, 2014, 208928.

https://doi.org/10.1155/2014/208928

- Strickland, I., & Ghosh, S. (2006). Use of cell permeable NBD peptides for suppression of inflammation. Annals of the Rheumatic Diseases, 65 Suppl 3(Suppl 3), iii75-82. https://doi.org/10.1136/ard.2006.058438
- Wirth, M., Schick, M., Keller, U., & Krönke, J. (2020). Ubiquitination and Ubiquitin-Like Modifications in Multiple Myeloma: Biology and Therapy. *Cancers*, 12(12). https://doi.org/10.3390/cancers12123764