

UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
ESCUELA DE POSTGRADO



**Rol de caveolina-1 en la quimiotaxis de las células
dendríticas hacia los nódulos linfáticos**

Sebastián Matías Cruz Gómez

TESIS PARA OPTAR AL GRADOR DE MAGISTER EN BIOQUÍMICA

DIRECTORES DE TESIS:

Prof. Dr. Álvaro Lladser

Prof. Dr. Andrew Quest

SANTIAGO – CHILE

2017

Índice de contenidos

Índice de contenidos	2
Abreviaturas	5
Resumen	7
Introducción.....	9
Figura 1. Rol de las Células Dendríticas en el inicio de la respuesta inmune.	10
Figura 2. Modelo de la formación de filopodios.	11
Hipótesis.....	14
Objetivo General	14
Objetivos Específicos	14
Materiales y Métodos	15
I. Evaluar <i>in vivo</i> la llegada de las células dendríticas de la piel a los nódulos linfáticos drenantes.	15
II. Determinar el rol de caveolina-1 en la quimiotaxis de células dendríticas en respuesta a CCL21.....	8
III. Evaluar el rol de caveolina-1 en la generación de filopodios, la localización de CCR7 y la actividad de Rac-1 y Cdc42 en células dendríticas.....	9
Resultados	22
I. Evaluar <i>in vivo</i> la llegada de las células dendríticas de la piel a los nódulos linfáticos drenantes.	22
Figura 1. Caveolina-1 promueve la llegada de células dendríticas migratorias al nódulo linfático.	23
II. Determinar el rol de caveolina-1 en la quimiotaxis de células dendríticas en respuesta a CCL21.	24
Figura 2. Caveolina-1 favorece la capacidad de células dendríticas de ingresar o migrar a través de superficies bidimensionales, siguiendo el rastro de CCL21	25
Figura 3. Caveolina-1 no favorece la capacidad de las células dendríticas de migrar a través de matrices de colágeno, siguiendo gradientes de CCL21	26
III. Evaluar el rol de caveolina-1 en la generación de filopodios, la localización de CCR7 y la actividad de Rac-1 y CDC42 en células dendríticas.	27
Figura 4. Caveolina-1 no afecta la expresión de CCR7.....	28
Figura 5. Caveolina-1 promueve la actividad de Rac1, pero no la actividad de Cdc42.	29
Figura 6. Caveolina-1 promueve la generación de filopodios.	32

Discusión.....	33
Conclusiones.....	37
Bibliografía	38

Agradecimientos

Su vida estaba velada del peligro, tenía el cuidado de la pareja que lo criaba y los progenitores de los mismos. Con o sin su consulta ellos le revelaron que se puede avanzar si pones un pie adelante, y después el otro. Le enseñaron que los sueños no requieren de párpados, si no de acciones.

Avanzó por ahí como niño normal: Caminaba, comía, dormía y hablaba bien. No normal: Cantaba, actuaba, dibujaba y bailaba bien. Había varias rutas al arte, hasta que la diferencia del decimoséptimo año llegó y en su cabeza apareció el pensar, interrogando y desplazando todo a su paso. Tuvo suerte, siempre la tiene ¿Siempre la tendrá?

Se fue a otro lugar donde le permitieron buscar problemas para resolver, y dejó en otro sitio a dos de los grandes, ambos más fuertes que él. Dos ejemplos que vale la pena recordar cuando las cosas no van bien. En el nuevo lugar encontró dos grandes más, que también buscaban resolver. Fue aliado de éstos, de la oriental y de la otra, esa que decidió no volver con los demás.

Regresó al lugar de inicio, en búsqueda de la certificación. Indagó por una flecha en su búsqueda, ésta debía tener manos que se pudieran tomar para no quedarse atrás. Cuando se dio cuenta, había encontrado un manco emisor de palabras. Pero hubo una nodriza que intento tomarlo, como a casi todos los demás perdidos, y lo hizo con más o menos éxito.

En el camino halló una bonita canción, que tenía notas secretas y un final triste.

Tuvo aprobación, por lo que caminó hacia donde se supone que todo debía ser más difícil. Pero encontró lo mismo que antes. Arriba no había diferencias, sin embargo a su lado había un viejo zorro, el cual con más o menos éxito apaleó la situación.

Tenía que cumplir una nueva certificación, pero el viejo zorro ya había partido. ¿Habría problemas? Siempre los hubo, siempre los habrá. Aun así todas las cosas ocurrieron, casi todas. Sin quererlo encontró dos aliados más. Uno de ellos siempre quiere tener la última palabra. Con el tiempo se volverá más aliado, al nivel de los anteriores. La otra sentía que era ella misma, y no lo era, al mismo tiempo. Ella lo ayudo a llegar a un tercer lugar. El no pudo ayudarla. Decidió (¿Quién?) que ya no estará.

¿Qué encontrará en el tercer lugar? A todos ellos, con sus muchos aciertos y sus muchas falencias, gracias.

Abreviaturas

Arp 2/3	Proteína relacionada a actina (Actin-Related Proteins)
BMDCs	Células dendríticas derivadas desde médula ósea (Bone-Marrow Derived Cells)
Cav-1^{-/-}	Célula deficiente en la expresión de caveolina-1
CCR7	Receptor de quimioquinas C-C de tipo 7 (C-C chemokine receptor type 7)
CCL19	Quimioquina 19 con motivo C-C (Chemokine C-C motif ligand 19)
CCL21	Quimioquina 21 con motivo C-C (Chemokine C-C motif ligand 21)
Cdc42	Proteína de control de división celular 42 (Cell division control protein 42 homolog)
DC	Célula Dendrítica (Dendritic Cell)
dDC	Célula Dendrítica dermal (Dermal Dendritic Cell)
Erk	Kinasas reguladas por señalización extracelular (Extracellular signal-regulated kinases)
FBS	Suero fetal bovino (Fetal Bovine Serum)
GPI	Glicosilfosfatidilinositol (Glycosylphosphatidylinositol)
GM-CSF	Factor Estimulante de Colonias de Granulocitos y Monocitos (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor)
MAPK	Proteína quinasas activadas por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase)
mDIA	Proteína diáfana homóloga 1 (Mouse Diaphanous Homolog 1)
MHC-I	Complejo mayor de histocompatibilidad clase I (Major Histocompatibility Complex I)
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad clase II (Major Histocompatibility Complex II)
LC	Célula de Langerhans (Langerhans Cells)

LPS	Lipopolisacarido proveniente de <i>Salmonella Typhimurium</i>
PBS	Tampón fosfato salino (Phosphate Buffered Saline)
MFI	Media de la intensidad de fluorescencia (Mean Fluorescence Intensity)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos (Pathogen-Associated Molecular Patterns)
Rac1	Sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionado con Ras (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1)
RIPA	Tampón de radioinmunoprecipitación (Radioimmunoprecipitation assay buffer)
TLR	Receptor tipo Toll (Toll-like Receptor)
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alpha)

Resumen

Las células dendríticas (DCs) son células presentadoras de antígeno capaces de capturar y procesar antígenos que luego son presentados a linfocitos T específicos en órganos linfoides. Para activar a los linfocitos T, las DCs deben pasar por un proceso de maduración y migración hacia los nódulos linfáticos. Para esto, las DCs deben percibir el rastro de quimioquinas como CCL21, a través de receptores como CCR7, que las dirigen hacia los vasos linfáticos y finalmente al nódulo linfático. Dicho proceso se denomina quimiotaxis y es dependiente de la formación de protrusiones celulares formadas por haces de filamentos de actina, que están especializadas en percibir el medio por el cual transita la célula. Caveolina-1 es una proteína de andamiaje, la cual se ha relacionado con la migración celular, regulando a las GTPasas pequeñas Rac-1 y Cdc42, por lo tanto incidiendo en la capacidad de la célula de reorganizar el citoesqueleto y formar protrusiones celulares. Resultados de nuestro laboratorio han demostrado que caveolina-1 aumenta su expresión en DCs al ser estimuladas con LPS y que juega un rol fundamental en la llegada de las DC al nódulo linfático, así como en la generación de las respuestas de linfocitos T CD8+ citotóxicos *in vivo*. Sin embargo, caveolina-1 no participa en la maduración de las DCs ni en su capacidad de activar linfocitos T CD8+ *in vitro*. En este trabajo postulamos que caveolina-1 promueve la llegada de DCs al nódulo linfático regulando su capacidad quimiotáctica a través de la generación de filopodios vía Rac-1 o Cdc42. A través de ensayos de tinción cutánea con FITC, observamos que las DCs Cav-1^{-/-} llegan en menor número al nódulo linfático en comparación a las DCs silvestres. Además, se evidenció que las DCs Cav-1^{-/-} poseen una capacidad quimiotáctica disminuída en respuesta a CCL21 en cámaras de Boyden, no así en matrices de colágeno. A nivel molecular, se observó que las DCs Cav-1^{-/-} poseen menos actividad de Rac-1, pero no de Cdc42, y un menor número de filopodios con respecto a las DCs silvestres. Este trabajo sugiere que caveolina-1 favorece la llegada de las DCs al nódulo linfático, promoviendo la actividad de Rac1 y la formación de filopodios, lo que les permite entrar o migrar a través de los vasos linfáticos.

Introducción

Las células dendríticas (DCs, *Dendritic Cells*) son células presentadoras de antígeno profesionales (APC, *Antigen Presenting Cells*) capaces de iniciar la respuesta inmune adaptativa. Las DCs son altamente eficientes en fagocitar y procesar antígenos para ser presentados en moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, *Major Histocompatibility Complex*) clase I y II, con el fin de activar linfocitos T CD8+ y CD4+ específicos, respectivamente [1]. Para activar a los linfocitos T, las DCs deben: (i) madurar y (ii) migrar hacia los nódulos linfáticos. Ambos procesos son gatillados por la presencia de señales de peligro, las DCs detectan la presencia de estas moléculas mediante receptores especializados para el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) tales como LPS (*Lipopolysaccharide*) y CpG (*Cytosine-Guanine*), a través de receptores tipo toll (TLR, *Toll-like receptors*) [2], o patrones moleculares que generan daño celular (DAMPs, *danger-associated molecular patterns*) como moléculas de ATP o chaperonas como HSPs (*Heat Shock Proteins*) [3]. La maduración de las DCs se caracteriza por el aumento de la expresión de moléculas coestimuladoras, tales como CD80, CD86 y CD40, la secreción de citoquinas, tales como IL-6, IL-12 y TNF- α [4]. Paralelamente se induce una reorganización del citoesqueleto que inhibe la fagocitosis de antígenos y la promueve la migración de la DC, aumentando la velocidad de migración y persistencia de la célula [5]. Estos cambios le permiten a las DCs llegar a los órganos linfoides secundarios para activar a linfocitos T vírgenes a los cuales les presenta el complejo formado por moléculas de MHC y los péptidos derivados de la degradación de los antígenos fagocitados provenientes del patógeno. Aquellos linfocitos T que poseen el receptor de células T (TCR, *T-cell Receptor*) específico para la combinación de MHC y péptido dado, se activan, proliferan y adquieren un programa de diferenciación efector [4] (Figura 1). Para llegar a los nódulos linfáticos, las DCs perciben señales quimioattractantes, tales como las quimioquinas CCL19 y CCL21. En el caso de esta última molécula, su expresión se encuentra presente en los tejidos periféricos y en los capilares y vasos linfáticos [6]. Adicionalmente su

expresión en los capilares linfáticos aumenta en contextos proinflamatorios inducidos por citoquinas como TNF- α [7]. Las DCs perciben dicho incremento en la expresión de CCL21 a través del receptor CCR7, que incrementan su expresión en la superficie de las DCs como consecuencia de la maduración [8] y les permiten orientar su migración a los órganos linfoides de forma independiente de integrinas en contextos no inflamatorios [9, 10]. Para percibir el ambiente por el cual transita, la célula genera estructuras especializadas llamadas filopodios, que se proyectan y retraen constantemente con el fin de obtener información del ambiente y poder seguir por ejemplo el rastro de quimioquinas [11, 12].

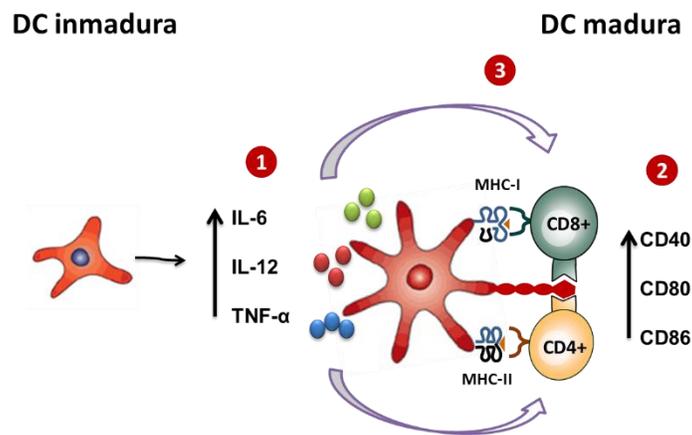


Figura 1. Rol de las Células Dendríticas en el inicio de la respuesta inmune. Las DCs poseen receptores que reconocen PAMPs (como LPS) presentes en patógenos que gatillan el inicio la maduración, para luego presentar antígenos mediante las moléculas de MHC. La maduración se relaciona con (1) el aumento en la secreción de citoquinas como IL-6, o IL-12 o TNF- α , (2) el incremento en la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40, y (3) con el incremento en la expresión de MHC-I y MHC-II. La activación de linfocitos T CD8⁺ o CD4⁺ depende de estos 3 procesos.

Los filopodios son delgadas protrusiones celulares de 0,1 a 0,3 μm de longitud, formadas por haces paralelos de F-actina. Estas estructuras están involucradas en migración celular, cicatrización de heridas, adhesión a la matriz celular, etc [12], y varían en su composición molecular dependiendo del tipo celular al que se refiera [13]. Sin embargo, Mattila P. y Lappalainen P. han planteado un modelo general sobre la arquitectura de los filopodios. Este se genera bajo una fina

orquestración de proteínas organizadoras de filamentos de actina. En un inicio un grupo de filamentos de actina desde la malla de estos filamentos generada por la proteína ramificadora de F-actina Arp2/3 es elongada hacia el exterior de la célula por la formina Dia2, la cual además permite la formación y nucleación de nuevos filamentos no ramificados en la misma orientación [12]. El extremo distal de aquellos filamentos es dirigido hacia el sitio precursor del filopodio por la acción de la proteína motora de filamentos de actina Miosina X, permitiendo el nacimiento del filopodio. Este proceso es acompañado de la proteína IRSp53 presente en el extremo del filopodio que facilita la deformación de la membrana plasmática. Finalmente proteínas que median la unión cruzada de F-actina como ENA/VASP y fascina en el eje del filopodio generan un haz compuesto de filamentos de actina estableciendo el filopodio en sí. Dia2 permanece en el extremo del filopodio controlando la elongación de los filamentos que lo componen (Figura 2) [12].

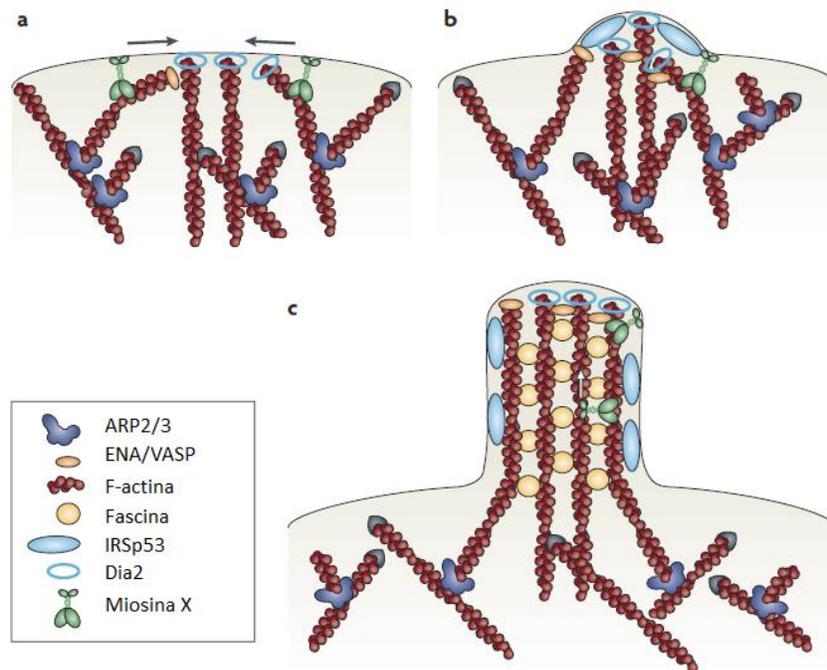


Figura 2. Modelo de la formación de filopodios. A, Un grupo de filamentos de actina desde la malla de estos filamentos generada por Arp2/3 es elongada hacia el exterior de la célula a través de Dia2. El extremo de los filamentos de actina es dirigido hacia el sitio precursor del filopodio por la acción de Miosina X, permitiendo la generación del filopodio.

B, La proteína IRSp53 presente en la punta del filopodio facilita la deformación de la membrana. **C**, Proteínas que permiten la unión cruzada de F-actina como ENA/VASP y fascin generan un haz compuesto de filamentos de actina estableciendo el filopodio. Dia2 permanece en el extremo del filopodio regulando la elongación de sus filamentos de F-actina. Editado desde *Mattila, P.K. and P. Lappalainen, 2008*.

Los filopodios participan además durante la polarización celular en la quimiotaxis, ocurriendo una constante reorganización en la gradiente de estos receptores en dichas protrusiones celulares durante la migración [11]. Durante la migración celular inducida por quimioquinas, la proteína Rac1 participa reorganizando filamentos de actina y remodelando el citoesqueleto induciendo además la formación de protrusiones celulares como lamelipodios y filopodios [14, 15]. Se sugiere que la actividad de Rac1 participa en la generación del frente de migración mientras Cdc42 ayuda en su estabilización [15]. Se ha demostrado que la inducción de la actividad de Rac1 y de Cdc42 promueve en conjunto la actividad de proteínas esenciales en la generación (Toca, N-WASP), elongación (Arp3, Toca) y retracción (cofilina) de filopodios, y que el silenciamiento de Rac1 por siRNA reduce dicho aumento [16]. La proteína formadora de filamentos de actina en filopodios Dia2, perteneciente al grupo de las forminas, es activada por Rac1 y Cdc42 [17] y participa en la en la formación de filopodios en células móviles [18]. La actividad de la proteína adaptadora IRSp53, que une a WAVE2 con Rac1 para generar lamelipodios y a Cdc42 con ENA/VASP para generar filopodios, es dependiente de Rac1 [19]. Se ha visto que la localización en filopodios de la proteína que permite la nucleación y ramificación de filamentos de actina Arp2/3 es dependiente de la actividad de Rac1, reduciendo el número de filopodios de las células al utilizar dominantes negativos de esta GTPasa [15]. Se ha sugerido que incluso la actividad de la GTPasa Cdc42, comúnmente relacionada con la generación de filopodios, puede ser dependiente de la actividad de Rac1 [20]. Esto evidencia la relevancia y alta participación de Rac1 y Cdc42 en la generación de filopodios a través de sus roles en la actividad de distintas proteínas.

Cuando las células dendríticas se encuentran en un estado inmaduro y requieren migrar a través de los tejidos, es decir, en espacios confinados, estas

células utilizan una migración de tipo ameboide, la cual permite a la célula deformarse a través de la generación de presiones internas de la célula [21]. En dicho tipo de migración las GTPasas que cumplen un rol esencial son Rho y Cdc42 [22], en conjunto con la proteína motora del citoesqueleto Miosina II [5]. Por otro lado, cuando las células dendríticas se encuentran maduras e ingresan a los capilares linfáticos, el tipo de migración difiere de uno ameboide y cambia un tipo de migración en la cual se prefieren los mecanismos de búsqueda como filopodios y lamelipodios [23]. Se ha registrado que las DCs utilizan efectivamente este tipo de protrusiones celulares, como mecanismos de arrastre celular [24, 25] y de exploración, con el fin de percibir el ambiente por el que transitan [23]. De esta forma, las DCs avanzan desde los tejidos hasta los capilares linfáticos mediante quimiotaxis en respuesta a mayores concentraciones de CCL21, de manera dependiente de estas protrusiones [6, 23]. Dicho mecanismo lleva a las DC hacia los capilares linfáticos, los cuales presentan portales que las DC utilizan para ingresar a estas estructuras [26]. Estos capilares son esenciales en el rol de las DCs, puesto que son la puerta al camino que las dirige hacia los vasos linfáticos y, en consecuencia, hacia los nódulos linfáticos. Además, se ha observado que cuando las DCs llegan al nódulo linfático desde los órganos periféricos, como la piel, y colonizan diferentes lugares del nódulo linfático de acuerdo al subtipo al que pertenezcan [27]. Esto nos sugiere que las DCs utilizan protrusiones celulares como filopodios y lamelipodios al momento de realizar quimiotaxis en respuesta CCL21 para poder llegar a los nódulos linfáticos, y que su llegada puede ser diferencial de acuerdo al subtipo de DCs que se estudie.

Caveolina-1 (Cav-1) es una proteína de localización intracelular que forma y estabiliza los microdominios de la membrana plasmática llamados caveolas, los cuales son ricos en colesterol, glicoesfingolípidos y en moléculas ancladas a la membrana por un glicosilfosfatidilinositol (GPI). Una caveola es definida como una invaginación de la membrana plasmática en forma de omega, de ~50–100 nm de diámetro [28], pero también han sido definidas con forma plana en la membrana, o formando vesículas intracelulares [29-31]. Las caveolas son particularmente abundantes en células endoteliales, adipocitos y fibroblastos [30], pero además se

han descrito en células tumorales y en células del sistema inmune [32]. Se ha demostrado que caveolina-1 regula la ubiquitinación y degradación de Rac1 [33]. Caveolina-1 promueve la migración incrementando el número de filopodios en células de adenocarcinoma de pulmón [34]. En células senescentes se ha observado que el aumento en la expresión de caveolina-1 en comparación a células jóvenes aumenta la actividad de GTPasas como Rac1 y Cdc42, aumentando con ello el número de lamelipodios y filopodios en las células [35]. Además caveolina-1 aumenta la migración e invasión en células de melanoma y cáncer de colon, secuestrando proteínas inhibitoras de la activación de Rac1 y permitiendo su actividad [36, 37]. Por lo que caveolina-1 podría regular a Rac1 y Cdc42 en la formación de filopodios, regulando río abajo proteínas que participan en la quimiotaxis y/o migración de las DCs.

En nuestro laboratorio hemos demostrado que la expresión de caveolina-1 en DCs aumenta considerablemente al estimularlas con LPS y TNF- α , tanto en DCs murinas y humanas. La ausencia de caveolina-1 en DCs disminuye su llegada a los nódulos linfáticos y la generación de linfocitos T CD8 citotóxicos específicos *in vivo*. Sin embargo, la ausencia de caveolina-1 no altera la maduración de las DCs ni la capacidad de las DCs para activar linfocitos T CD8+ en ensayos de cocultivo *in vitro*. Adicionalmente, resultados previos realizados en colaboración con la Dra. Ana Maria Lennon del Instituto Curie, Francia, han demostrado que la ausencia de caveolina-1 no influye en la velocidad de migración de las DCs, determinada en ensayos de microcanales. En base a todo lo expuesto, proponemos en base a los antecedentes expuestos que caveolina-1 promueve la llegada de las DCs a los nódulos linfáticos al orientar su movimiento en respuesta a CCL21, a través de la formación de filopodios mediada por la activación de Rac1 y Cdc42.

Hipótesis

Caveolina-1 promueve la quimiotaxis de células dendríticas hacia los nódulos linfáticos drenantes en respuesta a CCL21, aumentando la actividad de GTPasas pequeñas como Rac1 y Cdc42, e incrementando el número de filopodios.

Objetivo General

Determinar el rol de caveolina-1 en la quimiotaxis de células dendríticas hacia los nódulos linfáticos

Objetivos Específicos

- I. Evaluar *in vivo* la llegada de las células dendríticas de la piel a los nódulos linfáticos drenantes.
- II. Determinar el rol de caveolina-1 en la quimiotaxis de células dendríticas en respuesta a CCL21.
- III. Evaluar el rol de caveolina-1 en la generación de filopodios, la localización de CCR7 y la actividad de Rac-1 y Cdc42 en células dendríticas.

Materiales y Métodos

Cultivo primario de células dendríticas de ratón

Se utilizaron ratones de las cepas C57BL/6 (silvestre) o B6.Cg-Cav1tm1Mls/J (cav-1^{-/-}), que corresponden a ratones de cepa C57BL/6 que no expresan caveolina-1, provenientes de The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, USA). Para los experimentos *in vitro* se utilizaron células dendríticas diferenciadas desde progenitores de la médula ósea (BMDCs, *Bone-Marrow Derived Dendritic Cells*) de ratones según protocolos previamente descritos [29]. Luego de obtener tejido medular, las células fueron disgregadas mecánicamente utilizando una jeringa de tuberculina y los residuos de tejido fueron eliminados por filtración a través de malla de filtro de poro de 70 µm (cell strainer). Las células fueron centrifugadas a 400 x g por 5 min y resuspendidas en tampón de lisis de glóbulos rojos (ACK, *Ammonium-Chloride-Potassium buffer*, 0,15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM Na₂-EDTA) para eliminar eritrocitos. Las células fueron nuevamente centrifugadas a 400 x g por 5 min, se eliminó el sobrenadante y fueron resuspendidas en PBS para eliminar residuos de ACK. Finalmente fueron centrifugadas a 400 x g por 5 min para ser resuspendidas en una solución de RPMI suplementada con suero fetal bovino (FBS, 10%, GIBCO), 50 µM 2-mercaptoetanol, 2 mM de L-glutamina, 1 mM piruvato de sodio, 100 unidades/ml de penicilina/estreptomicina, 100 µM de aminoácidos no esenciales, 10 mM de HEPES y 20 ng/ml del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF, *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor*) recombinante murino. Para los estudios bioquímicos se utilizaron placas de 6 pocillos a una densidad de 2x10⁶ células/placa de cultivo. Para estudios de microscopía las células fueron cultivadas sobre cubreobjetos de vidrio (12 mm) a una densidad de ~2x10⁵ células/placa. Los días 2, 4 y 6 posterior a la siembra de las células el medio fue reemplazado por medio fresco con GM-CSF.

Ensayo de tinción cutánea con FITC

Ratones Silvestre o cav-1^{-/-} fueron tratados en la piel ubicada en la zona lumbar de la espalda con 20 µl de una solución de FITC 2% diluida en acetona con DBP 1:1 (zona inferior derecha de la espalda) o una solución de FITC 2% diluida en acetona (zona inferior izquierda de la espalda). 24 h después se extrajeron los ganglios linfáticos inguinales y cortes de piel no tratados de 1x2 cm para ser evaluados a través de citometría de flujo.

Ensayo de citometría de flujo para evaluar poblaciones de DCs

La piel y ganglios extraídos fueron disgregados mecánicamente y posteriormente incubados con colagenasa 5 mg/mL y DNAsa 5 µg/mL en medio RPMI completo no suplementado a 37°C por 30 min. Posteriormente la piel y los ganglios se disgregaron mecánicamente para extraer células adheridas al tejido tratado y a continuación se filtraron las células a través de malla de filtro de poro de 70 µm. Se lavaron las células 2 veces a través de una centrifugación, descartando cada vez el sobrenadante y añadiendo de medio completo dos veces. Luego las células se resuspendieron en PBS/FBS 2% y se tiñeron usando anticuerpos contra marcadores de superficie CD11c conjugado con PE/Cy7 (clon N418; BioLegend), anti-MHC-II conjugado con APC/Cy7 (clon M5/114.15.2, BioLegend) y un marcador de viabilidad celular (Zombie Aqua, Biolegend). Posteriormente las células se fijaron con 2% paraformaldehído/PBS. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo, en el centro de citometría de la Fundación Ciencia & Vida, utilizando un equipo FACSCanto II.

Ensayo de migración en cámara de Boyden

Ensayos de migración *in vitro* fueron realizados en cámaras de Boyden (Transwell Costar, 6.5 mm de diametro, 8 µm poro). El lado inferior de la membrana fue recubierto con 2 µg/ml fibronectina por 18 h a 4°C. Las BMDCs fueron tratadas con LPS (100 ng/ml) por 24 h para luego ser resuspendidas y cultivadas en el lado

superior de la cámara a 2×10^4 en 200 μ l de medio completo con FBS 0,5 %. En la parte inferior de la cámara se agregaron 500 μ l de medio completo con FBS 0,5 % y CCL21 (20 ng/ml). Luego de 1 h, las membranas fueron removidas, lavadas y las células que migraron a la parte inferior de la membrana fueron teñidas con una solución de 0.1% de cristal violeta en 2% etanol y contadas en microscopio invertido.

Migración en matrices de colágeno

Las BMDCs silvestre o cav-1-/- fueron mezcladas en una solución de 1.6% de colágeno tipo I, posteriormente se incubaron a 4°C en el fondo de una placa de 35 mm. Dicha solución con células fue cubierta con unos cubreobjetos de 12 mm. Las muestras fueron incubadas a 37°C durante 20 min permitiendo la polimerización del colágeno. Para generar el gradiente de CCL21 se añadieron 2 ml de medio completo con 200 ng/ml de CCL21 en uno de los extremos del cubreobjetos. El rastreo de las células se realizó tomando una imagen cada 2 minutos usando un objetivo 10x durante 18 horas.

Microscopía confocal e inmunofluorescencia

Las BMDCs fueron estimuladas con LPS por 18 h. Posteriormente, las células fueron lavadas con PBS 3 veces y luego fijadas con paraformaldehído al 4% por 10 min a 4°C, luego nuevamente se lavaron con PBS. A continuación fueron permeabilizadas utilizando una solución de Triton X-100 0.2% en PBS durante 10 min, y luego fueron bloqueadas con una solución PBS/BSA 3% por 1 h a temperatura ambiente. Las células fueron incubadas con un anticuerpo primario dirigido contra caveolina-1 (1:200), y otro contra CCR7 (1:200), durante toda la noche a 4°C, para luego ser lavadas 3 veces con PBS. Se incubaron 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad con un anticuerpo secundario específico conjugado al fluorocromo 488, 568 o 633 (Línea Alexa, Molecular Probes, Invitrogen, Gaithersburg, MD, USA) en una dilución 1:500 en conjunto con faloidina-rodamina (500 nM) o DAPI (100 nM). Los cubreobjetos fueron montados con medio

DAKO (Glostrup, Denmark) para retardar la pérdida de la fluorescencia. Las imágenes se adquirieron en un microscopio confocal C2 plus espectral, modelo eclipse-TI y los datos se analizaron con los programas ImageJ J (NIH-Bethesda) y LSM 5 (Carl Zeiss, Alemania).

Precipitación de Rac1-GTP y Cdc42-GTP (activo)

Las BMDCs fueron o no tratadas con LPS (100 ng/ml), TNF- α (20 ng/ml) y CCL21 (20 ng/ml) a 37°C por 30 min para luego ser lisadas con un tampón que contiene 25 mM HEPES (pH 7.4), 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1% NP40, 10% glicerol, 1 mM ditioneitol e inhibidores de proteasas. Los extractos fueron incubados en hielo por 5 min y clarificados por centrifugación (10,000 \times g, 1 min, 4°C). El sobrenadante es utilizado para precipitar Rac1-GTP y CDC42-GTP, al agregar 30 μ g de la proteína de fusión GST-PBD unida a perlas conjugadas con GSH. Estas perlas fueron incubadas con el sobrenadante por 15 min a 4°C en un agitador rotatorio. Luego las perlas fueron obtenidas por centrifugación, lavadas con tampón de lisis y luego tratadas con solución tampón de carga y utilizada para evaluar la cantidad total de Rac1 mediante Western blot.

Western blot

Los extractos proteicos totales fueron denaturados a 95 °C en una solución tampón (tampón de carga) conteniendo 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8), 10% glicerol, 2% dodecil sulfato de sodio (SDS), 100 mM DTT y 0,01% azul de bromofenol. Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 12% utilizando un equipo de electroforesis Mini-Protean III (Bio-Rad, Hercules, CA). Las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa usando un sistema de transferencia húmeda Mini-Trans Blots (Bio Rad, Hercules, CA) a 400 mA durante 90 min a 4 °C. Luego las membranas fueron lavadas tres veces con solución TBS-T (20 mM Tris-HCl [pH 7,6], 150 mM NaCl, 0,1% Tween) y posteriormente incubadas con solución de bloqueo (5% de leche en polvo descremada en TBS-T) a

temperatura ambiente por 1 h. Posteriormente fueron incubadas toda la noche a 4 °C con anticuerpos primarios diluidos en solución de bloqueo. Anti-GAPDH (1:5000, Cell Signaling), anti-Rac1 (1:4000, Cell Signaling) o anti-Cdc42 (1:250, Cytoskeleton). Luego, las membranas fueron lavadas tres veces, para anti-GAPDH y anti-Rac1, con TBS-T por 5 min a temperatura ambiente, y una vez por 30 seg para las anti-Cdc42, e incubadas con anticuerpos secundarios específicos Anti-IgG de conejo o de ratón conjugados a peroxidasa (Cell Signaling), por 1 h a temperatura ambiente a razón de 1:4000 en solución de bloqueo. Luego se realizaron tres lavados de 5 min con TBS-T para las que tenían anti-GAPDH o anti-Rac1, y se realizaron cinco lavados de 10 min para la que tenía anti-Cdc42. La visualización de la marca quimioluminiscente se realizó con un kit Supersignal West Pico o Supersignal West Femto (Pierce Biotechnology, Piscataway, NJ) y la detección se realizó con películas fotográficas (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ). Las imágenes digitalizadas de los Western Blot fueron utilizadas para los análisis densitométricos con el software ImageJ (NIH, Bethesda, USA).

Ensayo de tinción cutánea con FITC

Ratones silvestres o Cav-1^{-/-} fueron tratados en la piel ubicada en la zona baja de la espalda con 20 µl de una solución de FITC 2% diluida en acetona con DBP 1:1 (zona lumbar derecha) o una solución de FITC 2% diluida en acetona (zona lumbar izquierda). Después de 24 h, se extrajeron los ganglios linfáticos inguinales para ser evaluados a través de citometría de flujo.

Ensayo de citometría de flujo para evaluar expresión de CCR7 en DCs

BMDCs fueron estimuladas o no con LPS (100 ng/ml), TNF-α (20 ng/ml) y CCL21 (20 ng/ml) a 37°C por 30 min. Posteriormente las células se resuspendieron en PBS/FBS 2% y se tiñeron usando anticuerpos contra marcadores de superficie CD11c conjugado con PE/Cy7 (clon N418; BioLegend), anti-MHC-II conjugado con APC/Cy7 (clon M5/114.15.2, BioLegend), anti-CCR7 conjugado con Pacific Blue

(clon 4B12, BioLegend) y un marcador de viabilidad celular (Zombie Aqua, Biolegend). Paralelamente se realizó una tinción intracelular de CCR7 utilizando un anti-CCR7 conjugado a Pacific Blue (clon 4B12, BioLegend). Finalmente, las células se fijaron con 2% paraformaldehído/PBS. Las células fueron analizadas mediante citometría de flujo, en el centro de citometría de la Fundación Ciencia & Vida, utilizando un equipo FACSCanto II.

Análisis estadístico

Los datos fueron sometidos a un análisis de varianza y las comparaciones entre los grupos se llevaron a cabo a través de t-student mediante el uso del programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA). Un valor $P < 0,05$ fue considerado como una diferencia estadísticamente significativa.

Bioética y Bioseguridad

Este proyecto de tesis ha sido revisado por este comité de Bioética y Bioseguridad y se ha determinado que cumple con todas las normas para el manejo de especies vivas para la experimentación. Se ha analizado la sección “III. Metodología” del mencionado proyecto comprobando que los modelos animales que propone usar son adecuados para llevar a cabo los experimentos descritos en cada uno de los objetivos planteados en el proyecto. Los animales serán mantenidos en el Bioterio de la Fundación Ciencia & Vida, cuyas instalaciones y personal aseguran el buen cumplimiento de las normas.

Resultados

Evaluar *in vivo* la llegada de las células dendríticas de la piel a los nódulos linfáticos drenantes.

Considerando que nuestro laboratorio ha demostrado previamente que las DCs diferenciadas *in vitro* a partir de precursores de la médula ósea (BMDC) *knock-out* para *cav-1* (*cav-1^{-/-}*), presentan una menor llegada a los nódulos linfáticos en comparación a las DCs Silvestre, evaluamos si este fenómeno se replica en DCs endógenas del ratón. Para ello ratones silvestres o *cav-1^{-/-}* fueron tratados en dos lugares de la piel ubicada en la zona baja de la espalda, con una solución de FITC diluida en acetona con un irritante de la piel llamado DBP para la zona inferior derecha de la espalda, y con una solución de FITC diluida sólo en acetona para la zona inferior izquierda de la espalda. Luego de 24 h de tratamiento los ratones fueron sacrificados y los nódulos linfáticos drenantes de la piel extraídos con el fin de evaluar las poblaciones de células dendríticas migratorias (mDC) presentes mediante citometría de flujo (Figura 1A). La población de mDC CD11c⁺, MHC-II^{hi} fue seleccionada para cuantificar la población de mDC FITC⁺ que lograron llegar a los nódulos linfáticos (Figura 1B), La población mDC FITC⁺ que llegó al nódulo linfático drenante de la piel fue de 3% en promedio en los ratones silvestres, mientras que el porcentaje de estas células en ratones *cav-1^{-/-}* fue cercano a un 1%. Un fenómeno similar fue observado en los nódulos linfáticos de la piel irritada, en las cuales el porcentaje de mDC FITC⁺ que llegó al nódulo drenante fue de 25% en promedio, mientras que en los nódulos de los ratones *cav-1^{-/-}* fue sólo de un 10% (Figura 1, C). Esto sugiere que Cav-1 promueve la llegada de mDC hacia el nódulo linfático.

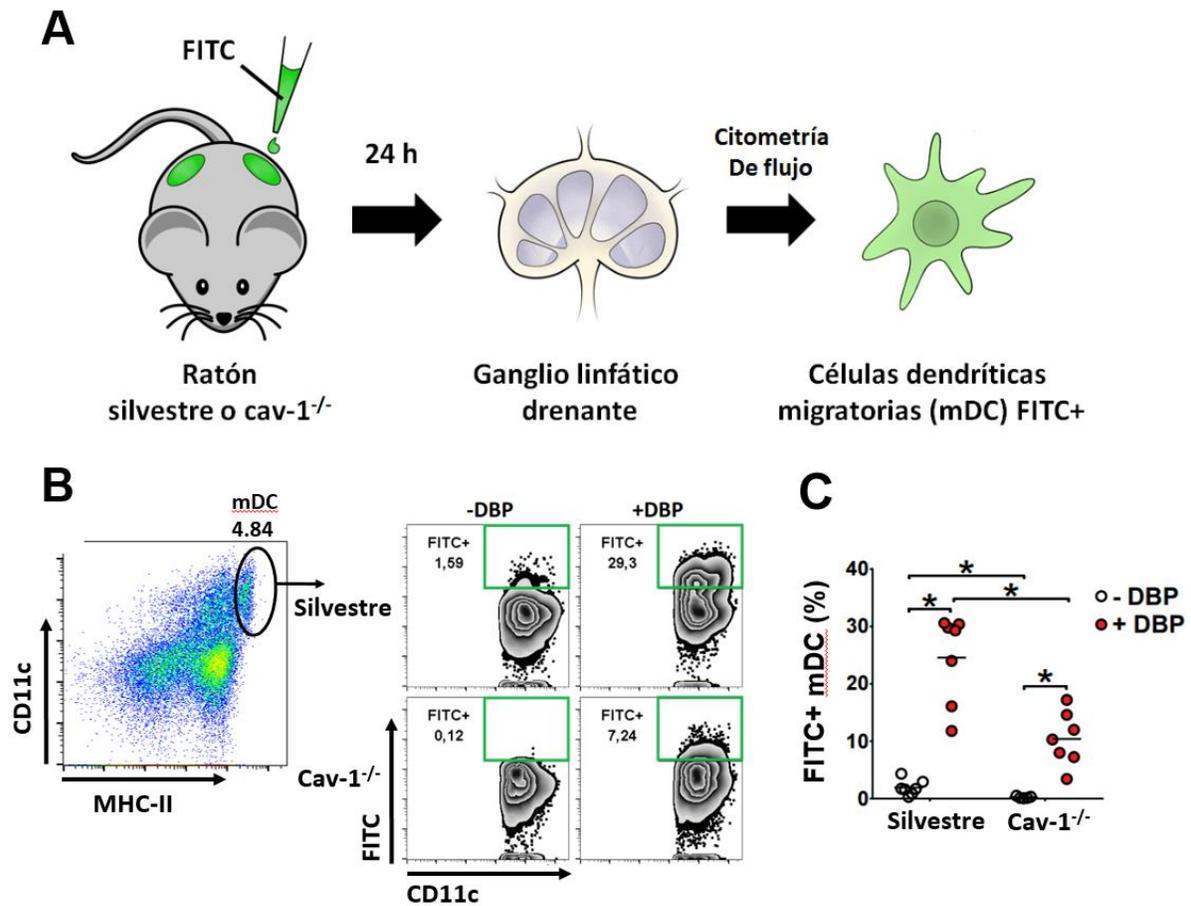


Figura 1. Caveolina-1 promueve la llegada de células dendríticas migratorias al nódulo linfático. Ratones C57BL/6 (silvestre) o B6.Cg-Cav1tm1Mls/J (*cav-1*^{-/-}) fueron tratados en la piel ubicada en la zona lumbar de la espalda con una solución de FITC 2% diluido en acetona con o sin DBP, y 24 h después del tratamiento los nódulos linfáticos fueron extraídos, y las poblaciones de mDC fueron analizadas mediante citometría de flujo. En **A**, se presenta el esquema del procedimiento realizado durante el experimento. En **B**, se observa la estrategia de análisis realizada en las poblaciones del nódulo linfático para evaluar la población de mDC FITC⁺. En **C**, se muestra el porcentaje de mDC FITC⁺ detectadas en el nódulo linfático drenante en los tratamientos con o sin DBP. Los datos muestran el promedio \pm SEM. $n = 7$, $*p < 0.05$, t -test.

II. Determinar el rol de caveolina-1 en la quimiotaxis de células dendríticas en respuesta a CCL21.

Las DC *cav-1^{-/-}* mostraron una menor llegada a los nódulos linfáticos, sin embargo, este proceso implica que las DC debe realizar un proceso de quimiotaxis que involucra varios pasos para su realización. Entre ellos se destaca la capacidad de las DCs para migrar a través de la matriz extracelular, así como ingresar y migrar a través de los vasos linfáticos, usando protrusiones celulares. Por ello, se evaluó cuáles de estos procesos es afectado por la ausencia caveolina-1. Para esto se realizó un ensayo de cámaras de Boyden, el cual permite colocar células en una cámara superior que posee una membrana porosa en su base, la cual está recubierta por algún componente de matriz, como fibronectina, para que luego dichas células sean atraídas hacia un estímulo, por ejemplo CCL21, dispuesto en la cámara inferior. De esta manera las células quedan adheridas en el recubrimiento de fibronectina al ser atraídas hacia la cámara inferior por CCL21, y entonces pueden ser contadas. Este ensayo nos permite evaluar la capacidad de las DCs para ingresar y migrar dentro de los capilares linfáticos siguiendo el rastro de quimioquinas. Se usaron cámaras de Boyden de 8 μm de diámetro con poros recubiertos con una solución de fibronectina en su superficie inferior. Las BMDC silvestres o *cav-1^{-/-}* maduras con LPS se sembraron en la cámara superior, mientras que la cámara inferior contenía medio con CCL21. Las BMDC inmaduras migraron durante 1 h, mientras que las BMDC maduras, durante 30 min. Se evaluó el número de BMDC que llegaron a la matriz de fibronectina en la superficie inferior de la cámara de Boyden y los valores fueron relativizados al índice de la migración basal de BMDC silvestres sin estimular y sin CCL21. La migración de BMDC silvestres basal fue similar a la migración basal de las *cav-1^{-/-}*, sin embargo, al migrar hacia CCL21 las BMDC Silvestre aumentaron su índice de migración a 1,8 mientras que el índice de migración de las BMDC *cav-1^{-/-}* se mantuvo cercano a 1 (Figura 2A). Por otra parte, el grupo que fue estimulado con LPS presentó un índice de migración 1,7 en las BMDC Silvestre, mientras que este valor descendió a 1,2 para las BMDC *cav-1^{-/-}*. Estos valores aumentan a 2,5 y 1,7, respectivamente, cuando las

células migran hacia CCL21 (Figura 2B). Los resultados sugieren que caveolina-1 promueve la capacidad de las BMDC de entrar o migrar a través de superficies bidimensionales siguiendo el rastro de CCL21, tal cual ocurre en los capilares linfáticos. .

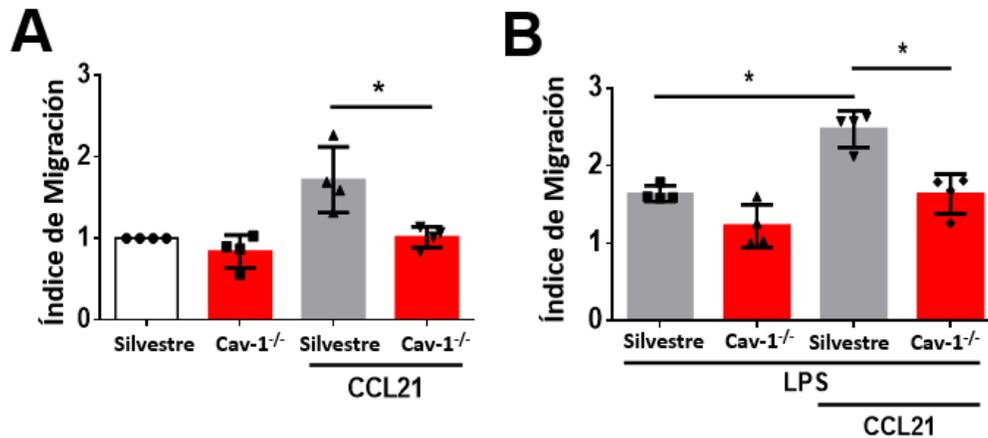


Figura 2. Caveolina-1 favorece la capacidad de células dendríticas de ingresar o migrar a través de superficies bidimensionales, siguiendo el rastro de CCL21. Las Cámaras de Boyden fueron recubiertas con fibronectina (2 ug/ml) por 18 h a 4°C. En **A**, Un total de 200.000 BMDC silvestre o cav-1^{-/-} inmaduras fueron dispuestas en medio con 0,5% de suero y colocadas en cámaras de Boyden, se les dejó migrar por 1 h a 37°C. En **B**, 200.000 BMDC silvestre o cav-1^{-/-} maduras con LPS (100ng/ml) durante 30 min a 37°C fueron dispuestas en medio con 0,5% de suero y colocadas en cámaras de Boyden, en las cuales se les dejó migrar por 30 min a 37°C. Los datos muestran el promedio \pm SD. n = 4, *p<0.05, t-test.

El experimento de cámaras de Boyden apunta a la idea de que caveolina-1 promueve la migración por capilares linfáticos, sin embargo, no permite estudiar la migración intersticial de las DCs antes de ingresar a los capilares linfáticos, ni otros parámetros relevantes como trayectoria, persistencia y velocidad de las DC. Para evaluar estos puntos se realizó un ensayo de quimiotaxis de DCs embebidas en

matrices de colágeno, realizado en colaboración por el Dr. Pablo Vargas del Institute Curie, Francia. Para ambas DCs se evaluó la rectitud y la velocidad en la quimiotaxis de éstas células, analizando tres campos distintos de la matriz de colágeno por videomicroscopía, dígase campos 1 (C1), 2 (C2) y 3 (C3). Al evaluar la persistencia de las DCs durante su quimiotaxis, la cual indica la capacidad de la célula para seguir el gradiente de quimioquinas, no se encontraron diferencias entre las BMDC Silvestres y las *cav-1^{-/-}* (Figura 3A). Además, tampoco se observó diferencias en su velocidad de desplazamiento (Figura 3B). El resultado de velocidad concuerda con resultados previos del laboratorio, donde hemos visto que la velocidad de migración no es afectada por la ausencia de caveolina-1. Los resultados sugieren que caveolina-1 no favorece la capacidad de las BMDC de migrar a través de matrices de colágeno siguiendo el rastro de CCL21, como sucede al migrar a través de los tejidos, antes de llegar a los capilares linfáticos.

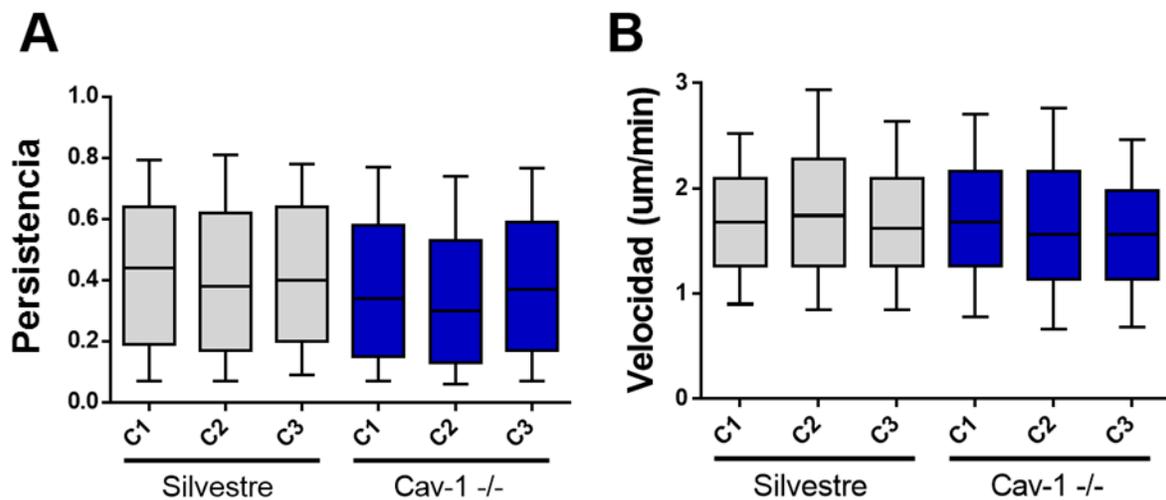


Figura 3. Caveolina-1 no favorece la capacidad de las células dendríticas de migrar a través de matrices de colágeno, siguiendo gradientes de CCL21. Las BMDC silvestres o *cav-1^{-/-}* fueron mezcladas con una solución de colágeno tipo I al 1.6% y depositadas en un cubreobjetos de 35 mm, las BMDC fueron recubiertas con un cubreobjetos de 12 mm. Las muestras fueron incubadas a 37°C para permitir la polimerización del colágeno. Para

generar la gradiente se depositó 2 ml de medio con 200 ng/ml de CCL21 en la placa y se les dejó migrar por 18 h a 37°C. La quimiotaxis de las BMDC fue evaluada por videomicroscopía tomando imágenes cada 2 minutos utilizando un objetivo 10x. Se analizaron tres campos por cada tipo de DC. En **A**, se observa la rectitud de las DC durante su quimiotaxis. En **B**, cuantificación de la velocidad ($\mu\text{m}/\text{min}$) de BMDC. Los datos son el promedio $\pm P_{10}\text{-}P_{90}$. $n = 667\text{-}1163$ células (A) y $599\text{-}1669$ células (B). Gráficos mostrados son representativos de dos experimentos independientes.

III. Evaluar el rol de caveolina-1 en la generación de filopodios, la localización de CCR7 y la actividad de Rac-1 y Cdc42 en células dendríticas.

Ya que caveolina-1 promueve la quimiotaxis de DCs hacia CCL21 en ensayos de cámaras de Boyden, pero no en matrices de colágeno, se estudió qué mecanismo utilizado en este proceso podría estar afectado por cav-1. Un receptor clásico en la llegada de DCs hacia el nódulo linfático es CCR7, receptor de quimioquinas CCL21 y CCL19, de las cuales CCL21 es quien dirige principalmente esta llegada. Por esta razón se evaluó la expresión de CCR7 mediante citometría de flujo. BMDC Silvestre o cav-1^{-/-} fueron estimuladas con LPS, TNF- α o CCL21. Luego, las BMDC fueron teñidas con un anticuerpo anti-CCR7 (clon 4B12) sin un tratamiento previo de permeabilización, con el fin de detectar sólo el receptor disponible en la superficie de la célula, finalmente las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. Se seleccionó la población de BMDC CD11c⁺, MHC-II^{hi} y en ella se cuantificó los niveles de expresión de CCR7, mediante un histograma de fluorescencia media o MFI (Figura 4A). La expresión de CCR7 muestra una tendencia a disminuir en su expresión en cada tratamiento. A pesar de ello, estas diferencias no son estadísticamente significativas entre BMDC Silvestre o cav-1^{-/-} en ninguno de los tratamientos (Figura 4B). Esto sugiere que caveolina-1 no afecta a la expresión de CCR7 en DCs.

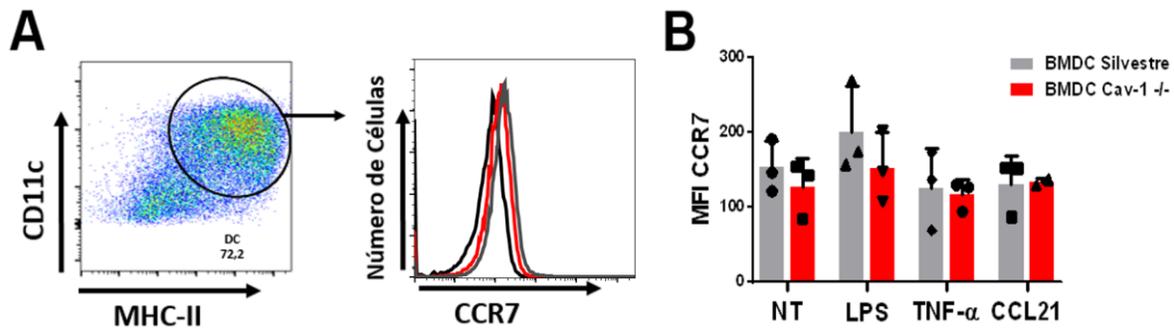


Figura 4. Caveolina-1 no afecta la expresión de CCR7. BMDC silvestre o *cav-1^{-/-}* fueron tratadas con LPS (100 ng/ml), TNF- α (20 ng/ml) o CCL21 (20 ng/ml) durante 30 min a 37°C. Luego, las BMDC fueron teñidas con un anticuerpo anti-CCR7 (clon 4B12) durante 30 min a 4°C, finalmente fueron analizadas por citometría de flujo. En **A**, se detalla la estrategia de análisis de CCR7 en las poblaciones de BMDC, se inició con la elección de la población de BMDC definida como CD11c⁺ MHC-II⁺ y dentro de ella se realizó el histograma de la expresión de CCR7. En **B**, cuantificación de las intensidades de fluorescencia media (MFI) de la expresión de CCR7 en BMDC. n = 3.

En nuestro laboratorio, hemos descrito que existe una relación entre caveolina-1 y GTPasas pequeñas como Rac1, en la cual el aumento de caveolina-1 promueve la actividad de esta proteína en modelos de células metastásicas, que se caracterizan por ser altamente migratorias. Las DCs son también células altamente migratorias que deben llegar hasta los nódulos linfáticos con el fin de activar linfocitos T. Por lo tanto, se evaluó la actividad de las GTPasas Rac1 y Cdc42 en BMDC mediante ensayos de precipitación de la fracción activa y Western blot. BMDC Silvestre o *cav-1^{-/-}* fueron estimuladas con LPS, TNF- α o CCL21. Posteriormente las muestras fueron lisadas y los extractos proteicos obtenidos se incubaron con proteínas de fusión GST-PBD unidas a perlas conjugadas con GSH, con el fin de obtener la fracción activa de Rac1 o de Cdc42 (Rac1-GTP o Cdc42-GTP) y aislarla mediante centrifugación. La actividad de Rac1 y Cdc42 fue evaluada mediante Western Blot utilizando un anticuerpo contra Rac1 (clon 0.T.127) y uno contra Cdc42 (clon 4B3). La actividad de cada GTPasa fue relativizada en cada banda de GTPasa-GTP con

respecto a la banda de la proteína total del tratamiento correspondiente (Figura 5). En las BMDC *cav-1*^{-/-} la actividad de Rac1 disminuyó entre un 49 y 57 % al ser comparadas con las BMDC silvestres en cada tratamiento (Figura 5A y 5B). Por otro lado, la actividad de Cdc42 no presentó diferencias en promedio entre las BMDCs en cada tratamiento, luego de dos experimentos independientes (Figura 5C y 5D). Esto sugiere que la ausencia de caveolina-1 reduce la actividad de Rac1 en DCs, pero aparentemente no afecta a la de Cdc42.

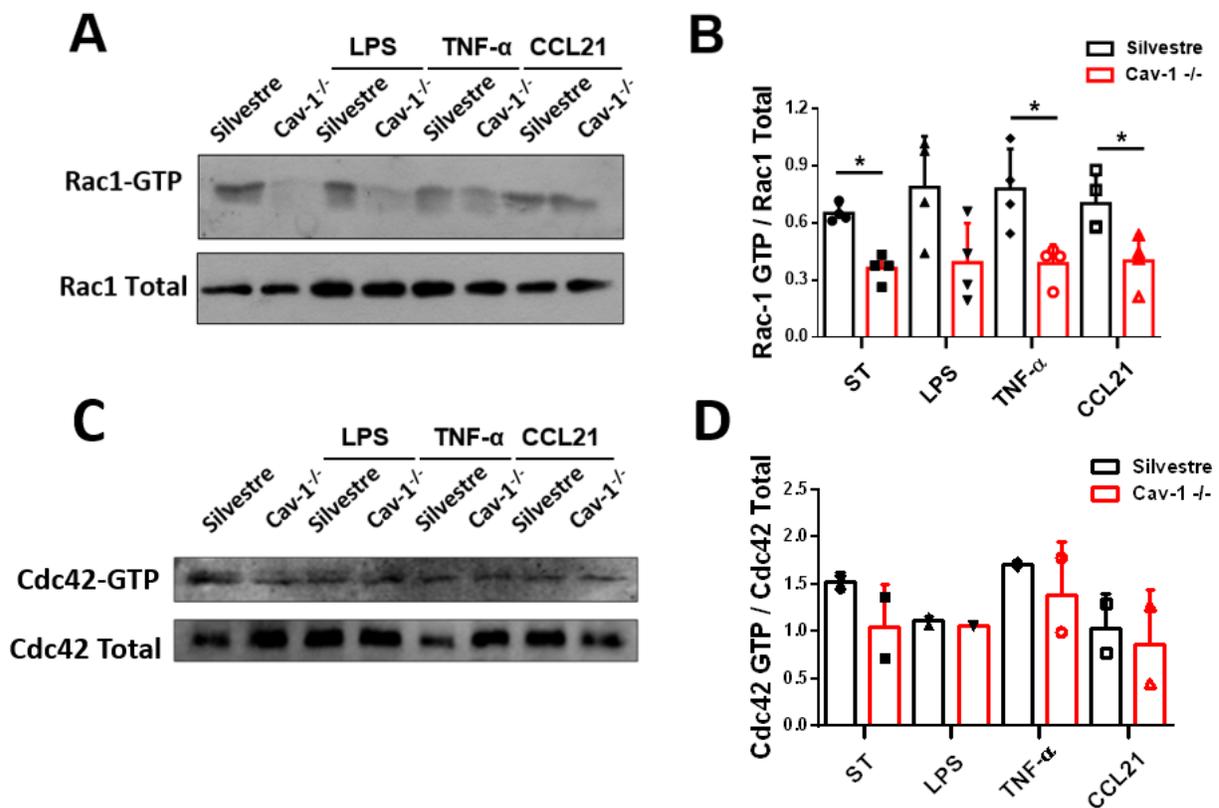
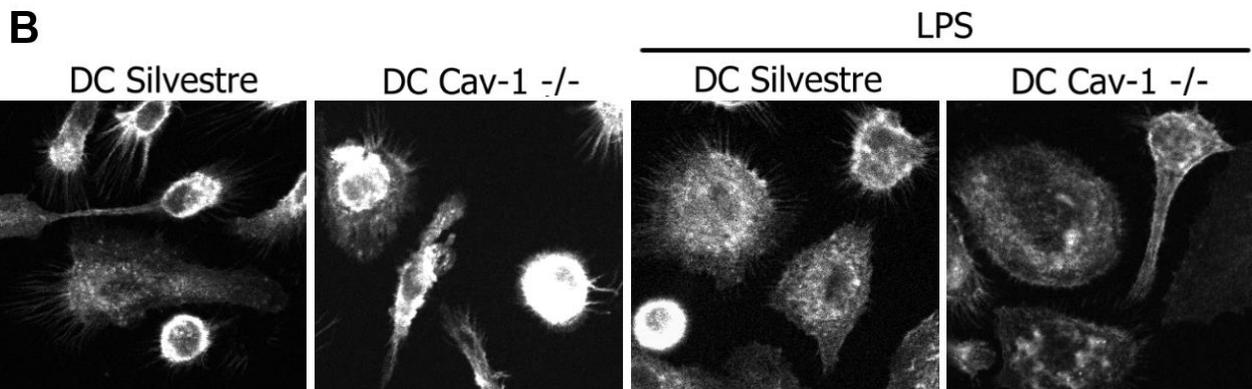
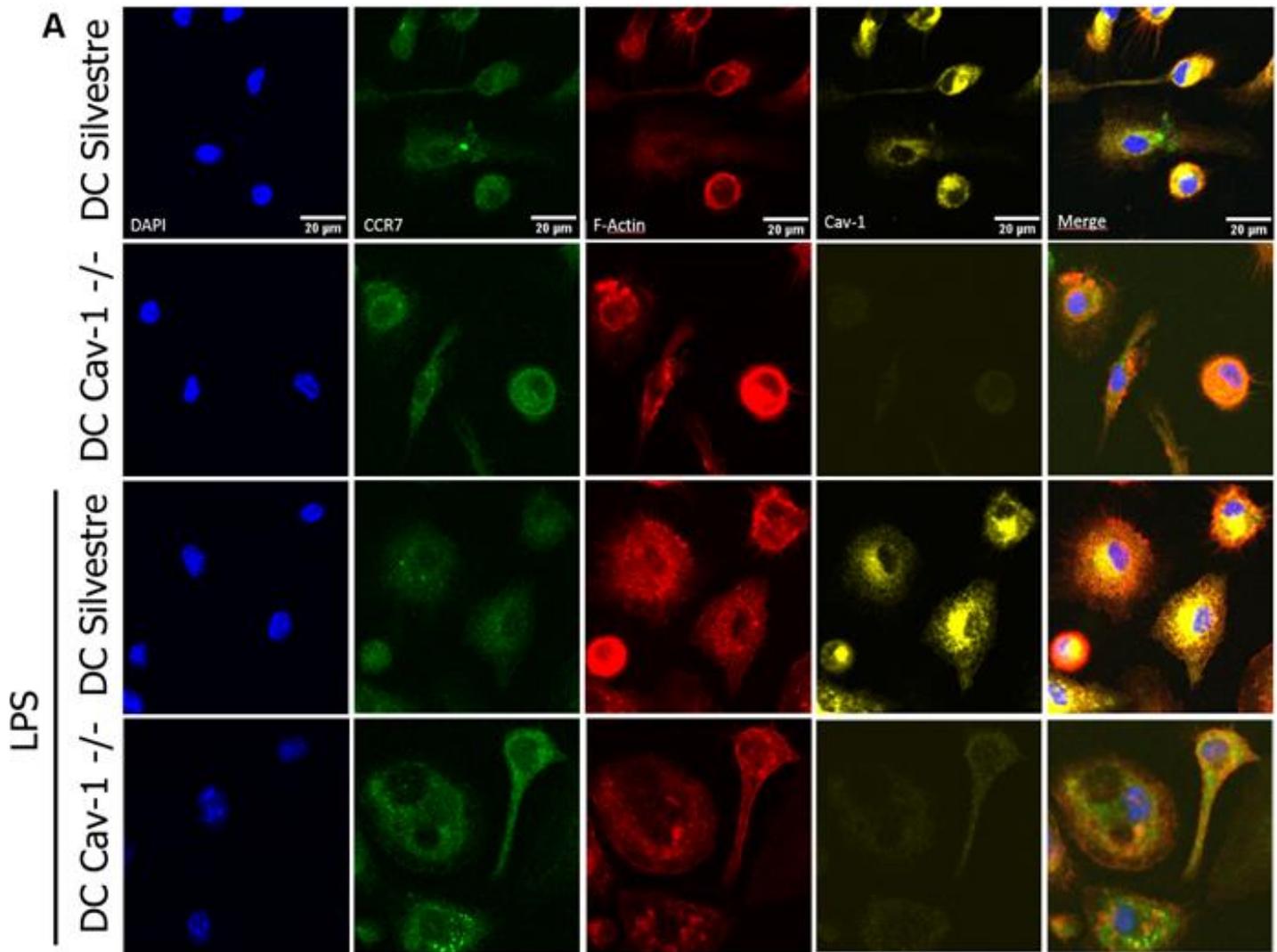


Figura 5. Caveolina-1 promueve la actividad de Rac1, pero no la actividad de Cdc42. BMDC Silvestre o *cav-1*^{-/-} fueron tratadas con LPS (100 ng/ml), TNF-α (20 ng/ml) o CCL21 (20 ng/ml) durante 30 min a 37°C. Posteriormente las muestras fueron lisadas y los extractos proteicos obtenidos se incubaron con 30 μg de proteínas de fusión GST-PBD unidas a perlas conjugadas con GSH durante 15 min a 4°C, de esta forma sólo la fracción activa de Rac1 o Ccd42 se unió a las perlas que luego se aislaron precipitándolas y luego

cargadas en gel de poliacrilamida al 12%. En **A**, blots representativos de los tratamientos realizados a las BMDC, se destaca la fracción Rac1-GTP (activa) y la fracción de Rac1 total. En **B**, la cuantificación de la actividad de Rac1 con respecto a la fracción total. En **C**, blots representativos de los tratamientos realizados a las BMDC, se destaca la fracción Cdc42-GTP (activa) y la fracción de Cdc42 total. En **D**, la cuantificación de la actividad de Cdc42 con respecto a la fracción total. Los datos muestran el promedio \pm SD. $n = 4$ para Rac1 y $n = 2$ para Cdc42, $*p < 0.05$, t -test.

Rac1 y Cdc42 se han ligado a la capacidad de las células a producir protrusiones celulares de actina como lamelipodios y filopodios. Durante la quimiotaxis los filopodios son estructuras relevantes puesto que perciben el ambiente extracelular, dirigen a los lamelipodios, y con ello la migración. Por lo tanto, se evaluó la formación de filopodios en BMDC mediante microscopía confocal. BMDC silvestre o *cav-1^{-/-}* fueron sembradas sobre cubreobjetos, luego de 2 h de incubación a 37°C para permitir su adhesión, un grupo fue estimulado con LPS. A continuación, las células en los cubreobjetos fueron teñidas con DAPI para la visualización de núcleos, un anticuerpo específico contra CCR7 (clon 4B12, isotipo IgG2a, k, rata) acoplado a Alexa Fluor 488, rodamina faloidina para detectar F-actina, y otro anticuerpo específico contra caveolina-1 (policlonal, conejo) que fue detectado con otro anticuerpo específico contra IgG de conejo, acoplado a Dylight 649. Las muestras fueron analizadas por microscopía confocal. CCR7 se expresa en toda la célula sin una distribución localizada en alguna estructura, además no presenta diferencias de localización entre BMDC silvestre y *cav-1^{-/-}* (Figura 6A, Columna 2). La localización de Cav-1 está concentrada en la cercanía y periferia del núcleo, pero no colocaliza con CCR7, la membrana celular ni los filopodios en BMDC Silvestre (Figura 6A, Columna 3 y 5). En la tinción de F-actina se observa que las BMDC silvestre inmaduras tienen un promedio de 35 filopodios por célula, mientras las *cav-1^{-/-}* poseen una media de 26 de estas estructuras por célula, por otro lado, las BMDC maduras presentan un promedio de 50 y 39 filopodios por célula en las células silvestre y *cav-1^{-/-}*, respectivamente (Figura 6A, Columna 4; Figura 6B y 6C). Estos resultados sugieren que caveolina-1 no altera la localización de CCR7, si no que

está promoviendo la formación de filopodios en las DCs, lo que puede estar relacionado la mayor actividad de Rac1 en presencia de caveolina-1, aun cuando la actividad de Cdc42 no es afectada según el resultado anterior.



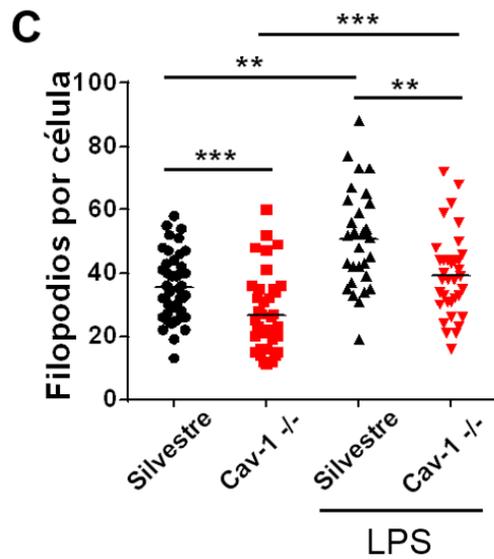


Figura 6. Caveolina-1 promueve la generación de filopodios. Las BMDC silvestre o cav-1^{-/-} fueron incubadas sobre cubreobjetos de 12mm durante 2 h a 37°C, posteriormente un grupo fue estimulado con LPS (100 ng/ml) durante 18 h a 37°C. Luego, los cubreobjetos con células fueron fijadas y permeabilizadas para después ser teñidas durante 1 h a 37°C con DAPI para teñir núcleo, un anticuerpo específico contra CCR7 acoplado a Alexa Fluor 488, rodamina faloidina para detectar F-actina, y otro anticuerpo específico contra caveolina-1 que fue detectado con un anticuerpo específico contra IgG de conejo, acoplado a Dylight 649. Las muestras fueron lavadas y posteriormente montadas portaobjetos utilizando medio de montaje DAKO. Las BMDC fueron analizadas por microscopía confocal utilizando un aumento de 60x. Las figuras mostradas corresponden a secciones representativas de las fotografías tomadas. En **A**, se observa la tinción de núcleo con DAPI (azul, columna 1), CCR7 (verde, columna 2), caveolina-1 (amarillo, columna 3), F-actina (rojo, columna 4) y el merge de todas las imágenes correspondientes (columna 5), la barra de escala se indica en la esquina inferior derecha. En **B**, Las fotografías de la tinción de F-actina de la figura anterior ahora en blanco y negro para realzar con contraste y detalle los filopodios presentes en las BMDC. En **C**, cuantificación de los filopodios encontrados en la tinción de F-actina. * $p < 0.05$, **= $p < 0,001$ y ***= $p < 0,0005$. $n = 44$ silvestre, 41 cav-1^{-/-}, 29 silvestre + LPS y 34 cav-1^{-/-} + LPS. *t*-test.

Discusión

En este trabajo se estudió el rol de caveolina-1 en la quimiotaxis de células dendríticas hacia los nódulos linfáticos. Los resultados presentados muestran que la ausencia de caveolina-1 disminuye la llegada de DCs al nódulo linfático drenante. Al observar el fenómeno de quimiotaxis *in vitro*, evidenciamos que caveolina-1 reduce la migración por superficies bidimensionales en respuesta a CCL21, pero no en matrices de colágeno con gradientes de CCL21. Además, caveolina-1 reduce la formación de filopodios y disminuye actividad de Rac-1, pero no de Cdc42 en las DCs. El resultado de la llegada de DCs endógenas del ratón a los nódulos linfáticos se muestra complementario a otros resultados previos del laboratorio, en los cuales se ha visto un efecto similar al utilizar BMDCs *in vivo*. Sin embargo, hay que considerar que en los ratones *cav-1^{-/-}* podría existir deficiencia en la linfoangiogénesis, esto se ha registrado en modelos de cáncer en los cuales se sugiere que caveolina-1 podría promover este proceso [38]. Además, el ratón knock-out de caveolina-1 podría incluso tener diferencias con respecto al ratón silvestre en algunas matrices presentes en la piel y en la arquitectura del tejido, tales como aumento colágeno tipo I [39] y/o desorganización de las fibras de fibronectina [40], lo que podría contribuir a la eventual reducción en la llegada de DC desde la piel hasta el nódulo linfático.

Cuando estudiamos la quimiotaxis de las DCs *in vitro* evidenciamos que caveolina-1 promueve la capacidad de las BMDC de entrar o migrar a través de superficies bidimensionales siguiendo el rastro de CCL21, asemejado al fenómeno de migración dentro de los capilares linfáticos. Sin embargo, no favorece la capacidad de las BMDC de migrar a través de matrices de colágeno siguiendo el rastro de CCL21, como sucede al migrar a través de los tejidos, antes de llegar a los capilares linfáticos. Se ha reportado que en ensayos en cámaras de Boyden la migración es dependiente de integrinas en las DC en estado basal [10]. Se sabe que la presencia de integrinas $\beta 2$ disfuncionales aumenta la migración de DC [41]. Por otra parte, la pérdida de la integrina $\beta 2$ se ha relacionado con un cambio en el

fenotipo de las DCs hacia uno más maduro, comprobado por el aumento de marcadores como CD86, CD40 e IL-12 [42]. Hay evidencia de que Cav-1 puede aumentar la disponibilidad de integrinas, como $\beta 1$, en superficie [43]. Sin embargo, todavía no se ha visto que la ausencia de Cav-1 pueda alterar la actividad de integrinas $\beta 2$. Por otro lado, la migración en matrices de colágeno, la cual se ha reportado de tipo tridimensional, podemos encontrar la participación de diferentes mecanismos por parte de las BMDC con respecto a la migración bidimensional. Se ha reportado que las células pueden compensar sus deficiencias en migración utilizando otros tipos de migración, dígase entre el tipo mesenquimal y el ameboides [44]. De hecho, el mismo grupo de investigación que descubrió la independencia de integrinas para la migración *in vivo* de las DC, ha evidenciado la existencia de mecanismos de compensación y una alta plasticidad en la forma en que las DC realizan quimiotaxis, pudiendo utilizar o no dichas integrinas durante este proceso [45].

Por otro lado, la utilización de LPS en estos ensayos para inducir maduración en las DCs podría verse afectada con respecto a la funcionalidad o expresión del receptor TLR4 por la ausencia de caveolina-1, aun cuando en nuestros resultados de tinción cutánea con FITC vimos diferencias tanto en DCs inmaduras como maduras. Si bien aún no se ha estudiado la relación de TLR4 con caveolas en DCs, si se han realizado investigaciones en otros tipos celulares. En células cancerígenas de mama humanas donde la expresión de caveolina-1 ha sido silenciada se ha visto un aumento en MAPkinasas, como JNK al ser inducidas con LPS [46]. Siendo esta MAPkinasa relevante en procesos de maduración y migración de las DCs [47]. En modelos de astrocytos caveolina-1 participa en la señalización de MyD88 para TLR4, mientras que su internalización o fagocitosis es mediada por clatrina [48], sin embargo hay que señalar que existe una vía para la activación de la vía de TLR4 que es independiente de MyD88 [49]. Además, en contextos de neuropatía diabética se ha evidenciado que monocitos humanos presentan una relación inversa entre la expresión de caveolina-1 y TLR4, sugiriendo que la disminución de caveolina-1 puede incrementar la inflamación por una mayor activación de estas células en respuesta a LPS [50]. Bajo estos puntos se vuelve interesante pensar que la

ausencia de caveolina-1 podría inducir una maduración alterada de las DCs con efectos perjudiciales para su migración, si bien resultados previos del laboratorio no han mostrado diferencias en liberación de citoquinas o marcadores durante la maduración entre DCs inmaduras y maduras silvestres o *cav-1^{-/-}* se sugiere evaluar expresión y activación de TLR4 en dichas células.

Al evaluar si la ausencia de caveolina-1 afectaba a la expresión de CCR7, no se observaron diferencias entre las BMDCs silvestres y las *cav-1^{-/-}*. CCR7 es un receptor acoplado a proteína G, en el cual se ha observado que tanto la subunidad $G_{\alpha i}$, como las subunidades $G_{\beta\gamma}$ activan a MAPK Erk1/2 y a la vía PI3K, generando la movilización de calcio y promoviendo la quimiotaxis [9]. CCR7 puede activar GTPasas pequeñas como Rac1 y Cdc42 contribuyendo a la movilidad del citoesqueleto de la DC durante la quimiotaxis [51]. CCR7 es el receptor de CCL21 y CCL19, siendo CCL21 la quimioquina principal que dirige a las DC al nódulo linfático. La unión de CCL19 al receptor induce su fosforilación y posterior degradación, mientras que la unión de CCL21 induce su reciclaje [52]. Con respecto a estos procesos se ha observado que caveolina-1 no tiene impacto sobre la incorporación de CCL19 por CCR7 [53]. Actualmente se desconoce si caveolina-1 participa en la incorporación de CCL21 o si podría afectar la vía de reciclaje o degradación del receptor, probablemente porque la internalización es dependiente de la endocitosis por clatrina y no por caveolina-1 [54].

Los ensayos de pulldown nos revelaron que caveolina-1 reduce la actividad de Rac-1, pero no de Cdc42 en DCs. Este efecto puede atribuirse a que la ausencia de caveolina-1 puede reducir el transporte de colesterol a la membrana celular [55]. Se ha demostrado que Rac1-GTP (activo) permanece en zonas ricas en colesterol, mientras que Rac1-GDP (inactivo) no se encuentra en estas estructuras [56]. Si las DC presentan menores niveles de colesterol en su membrana, entonces podría explicar por qué observamos menos Rac1-GTP en nuestros resultados. Además, se ha reportado que caveolina-1 puede interactuar directamente con Cdc42, reduciendo la actividad de esta GTPasa [57]. La actividad de Cdc42 puede ser promovida por Rac1 en algunos modelos celulares [20]. No observamos una

tendencia al aumento de la actividad en Cdc42 por la ausencia de caveolina-1 o una reducción dicha actividad por la menor actividad de Rac1. Por otro lado, caveolina-1 puede regular la producción de eNOS, lo cual juega un rol central en la migración celular [58], sin embargo resultados previos del laboratorio no detectaron diferencias en la producción de esta molécula en las DCs cav-1^{-/-} con respecto al modelo silvestre. Caveolina-1 ha sido reportada en las DCs [59, 60], pero no se había estudiado su efecto sobre las GTPasas en DCs, su rol en la quimiotaxis o en la llegada de las DCs a los nódulos linfáticos. Es relevante considerar que el experimento de precipitación de la fracción activa de Cdc42 se realizó sólo en dos ensayos independientes, a diferencia del de Rac1 que fue de 4 experimentos. Por esta razón se considera en primera instancia que próximos ensayos de Cdc42 no presentarán diferencias en su actividad, tal como aquí se presentaron. Pero, se toman con precaución ya que el alcance de tales experimentos puede no ser tan fuerte, a diferencia de los presentados para Rac1.

Las protrusiones celulares de actina son necesarias para que las DC realicen una correcta quimiotaxis [23]. La deficiencia en el número de filopodios presentada por las DC cav-1^{-/-} puede contribuir a generar el efecto visto *in vivo* e *in vitro*. Se desconoce si las DCs requieren de un número mínimo de filopodios para realizar quimiotaxis de forma efectiva. Se debe tomar en cuenta el estudiar la contribución de estructuras como lamelipodios a la quimiotaxis de las DCs, puesto que éstas también son utilizadas durante la quimiotaxis en los capilares linfáticos [24]. Se considera que este efecto puede ser mediado por caveolina-1, puesto que se ha visto que caveolina-1 promueve la generación de protrusiones de actina, como filopodios, en células de cáncer.

La microscopía confocal realizada nos reveló que la ausencia de caveolina-1 no afecta la localización de CCR7 en BMDC, concordante con la discusión del resultado anterior de la expresión de CCR7, caveolina-1 no debería afectar a este receptor. La ubicación de caveolina-1 en cambio nos reveló que esta proteína se dispone en una zona perinuclear principalmente, lo que podría corresponder los pools descritos de cav-1 ubicados en el aparato de Golgi, en el cual se encuentra

exportando colesterol hacia la membrana plasmática, y en el retículo endoplasmático. Se discute el rol de la ubicación de caveolina-1 en las DCs y su participación en la quimiotaxis, puesto que caveolina-1 se ubica también de manera perinuclear en fibroblastos [61] y en melanomas [43], pero difiere de la tendencia a disponerse en la membrana plasmática como lo hace en células de cáncer de glándula mamaria [62].

Con el fin de complementar los resultados presentados y entender con mayor precisión qué efecto o proceso se ve afectado por caveolina-1 en la quimiotaxis de DCs hacia los nódulos linfáticos se podrían realizar experimentos de migración “crawl-in”, llevadas a cabo en orejas de ratones silvestres utilizando BMDC silvestres y *cav-1^{-/-}*. Investigaciones previas ya han realizado este tipo de experimentos marcando diferencialmente a las BMDC con fluoróforos como CFSE o CTV y a la vez marcando específicamente a los capilares linfáticos con el marcador Lyve-1, pudiendo observar por videomicroscopía la deficiencia de migración *ex vivo* de las DCs [10, 23]. Además, se pueden realizar experimentos de “crawl-out” de DCs desde la oreja de ratones silvestres y *cav-1^{-/-}*, evaluando la capacidad de las DCs de la piel para emigrar desde la oreja hacia el medio, este tipo de ensayo revelaría si las DCs *cav-1^{-/-}* presentan problemas en su salida desde los tejidos [63, 64]. Ambos experimentos contribuirían a entender con mayor detalle los mecanismos o procesos afectados por la ausencia de caveolina-1. No se descarta que el efecto que reduce la llegada de DCs *cav-1^{-/-}* al nódulo linfático pueda ser una contribución de varios efectos sumados, los cuales estarían actuando sobre las DC debido a la ausencia de la proteína de estudio.

Conclusiones

- Caveolina-1 promueve la llegada de DC de la piel al nódulo linfático.
- Caveolina-1 promueve la migración bidimensional (cámaras de Boyden) de BMDC, pero no su migración tridimensional (matrices de colágeno).
- La actividad de Rac1 disminuye en las BMDC cuando caveolina-1 no está expresada, pero no reduce la actividad de Cdc42.
- Caveolina-1 no afecta la expresión o localización de CCR7 en BMDC.
- El número de filopodios en BMDC, pero no su largo, se ve reducido en ausencia de caveolina-1.

Bibliografía

1. Joffre, O.P., et al., *Cross-presentation by dendritic cells*. Nat Rev Immunol, 2012. **12**(8): p. 557-69.
2. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
3. Tang, D., et al., *PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity*. Immunol Rev, 2012. **249**(1): p. 158-75.
4. Reis e Sousa, C., *Dendritic cells in a mature age*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(6): p. 476-83.
5. Chabaud, M., et al., *Cell migration and antigen capture are antagonistic processes coupled by myosin II in dendritic cells*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7526.
6. Weber, M., et al., *Interstitial dendritic cell guidance by haptotactic chemokine gradients*. Science, 2013. **339**(6117): p. 328-32.
7. Johnson, L.A. and D.G. Jackson, *Inflammation-induced secretion of CCL21 in lymphatic endothelium is a key regulator of integrin-mediated dendritic cell transmigration*. Int Immunol, 2010. **22**(10): p. 839-49.

8. Forster, R., A.C. Davalos-Misslitz, and A. Rot, *CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(5): p. 362-71.
9. Rioli-Blanco, L., et al., *The chemokine receptor CCR7 activates in dendritic cells two signaling modules that independently regulate chemotaxis and migratory speed*. J Immunol, 2005. **174**(7): p. 4070-80.
10. Lammermann, T., et al., *Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing*. Nature, 2008. **453**(7191): p. 51-5.
11. Meyen, D., et al., *Dynamic filopodia are required for chemokine-dependent intracellular polarization during guided cell migration in vivo*. Elife, 2015. **4**.
12. Mattila, P.K. and P. Lappalainen, *Filopodia: molecular architecture and cellular functions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. **9**(6): p. 446-54.
13. Yang, C. and T. Svitkina, *Filopodia initiation: focus on the Arp2/3 complex and formins*. Cell Adh Migr, 2011. **5**(5): p. 402-8.
14. Srinivasan, S., et al., *Rac and Cdc42 play distinct roles in regulating PI(3,4,5)P3 and polarity during neutrophil chemotaxis*. J Cell Biol, 2003. **160**(3): p. 375-85.
15. Johnston, S.A., et al., *Arp2/3 complex activity in filopodia of spreading cells*. BMC Cell Biol, 2008. **9**: p. 65.
16. Kim, M.O., et al., *cAMP Promotes Cell Migration Through Cell Junctional Complex Dynamics and Actin Cytoskeleton Remodeling: Implications in Skin Wound Healing*. Stem Cells Dev, 2015. **24**(21): p. 2513-24.
17. Lammers, M., et al., *Specificity of interactions between mDia isoforms and Rho proteins*. J Biol Chem, 2008. **283**(50): p. 35236-46.
18. Yang, C., et al., *Novel roles of formin mDia2 in lamellipodia and filopodia formation in motile cells*. PLoS Biol, 2007. **5**(11): p. e317.
19. Yamagishi, A., et al., *A novel actin bundling/filopodium-forming domain conserved in insulin receptor tyrosine kinase substrate p53 and missing in metastasis protein*. J Biol Chem, 2004. **279**(15): p. 14929-36.
20. Abraham, S., et al., *A Rac/Cdc42 exchange factor complex promotes formation of lateral filopodia and blood vessel lumen morphogenesis*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 7286.

21. Heuze, M.L., et al., *Migration of dendritic cells: physical principles, molecular mechanisms, and functional implications*. Immunol Rev, 2013. **256**(1): p. 240-54.
22. Ridley, A.J., *Rho GTPase signalling in cell migration*. Curr Opin Cell Biol, 2015. **36**: p. 103-12.
23. Leithner, A., et al., *Diversified actin protrusions promote environmental exploration but are dispensable for locomotion of leukocytes*. Nat Cell Biol, 2016. **18**(11): p. 1253-1259.
24. Tal, O., et al., *DC mobilization from the skin requires docking to immobilized CCL21 on lymphatic endothelium and intralymphatic crawling*. J Exp Med, 2011. **208**(10): p. 2141-53.
25. Teixeira, A., E. Russo, and C. Halin, *Taking the lymphatic route: dendritic cell migration to draining lymph nodes*. Semin Immunopathol, 2014. **36**(2): p. 261-74.
26. Pflücke, H. and M. Sixt, *Preformed portals facilitate dendritic cell entry into afferent lymphatic vessels*. J Exp Med, 2009. **206**(13): p. 2925-35.
27. Kissenpfennig, A., et al., *Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells*. Immunity, 2005. **22**(5): p. 643-54.
28. Yamada, E., *The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse*. J Biophys Biochem Cytol, 1955. **1**(5): p. 445-58.
29. Shin, J.S., Z. Gao, and S.N. Abraham, *Involvement of cellular caveolae in bacterial entry into mast cells*. Science, 2000. **289**(5480): p. 785-8.
30. Smart, E.J., et al., *Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(11): p. 7289-304.
31. Pelkmans, L., J. Kartenbeck, and A. Helenius, *Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(5): p. 473-83.
32. Harris, J., et al., *Caveolae and caveolin in immune cells: distribution and functions*. Trends Immunol, 2002. **23**(3): p. 158-64.

33. Nethé, M., et al., *Focal-adhesion targeting links caveolin-1 to a Rac1-degradation pathway*. J Cell Sci, 2010. **123**(Pt 11): p. 1948-58.
34. Ho, C.C., et al., *Up-regulated caveolin-1 accentuates the metastasis capability of lung adenocarcinoma by inducing filopodia formation*. Am J Pathol, 2002. **161**(5): p. 1647-56.
35. Cho, K.A., et al., *Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status*. J Biol Chem, 2004. **279**(40): p. 42270-8.
36. Díaz, J., et al., *Rab5 is required in metastatic cancer cells for Caveolin-1-enhanced Rac1 activation, migration and invasion*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 11): p. 2401-6.
37. Díaz, J., et al., *A novel caveolin-1/p85 α /Rab5/Tiam1/Rac1 signaling axis in tumor cell migration and invasion*. Communicative & Integrative Biology, 2014. **7**(5): p. e972850.
38. Luan, T.Y., et al., *Expression of caveolin-1 is correlated with lung adenocarcinoma proliferation, migration, and invasion*. Med Oncol, 2015. **32**(7): p. 207.
39. Lee, J.A., et al., *Methyl-beta-cyclodextrin up-regulates collagen I expression in chronologically-aged skin via its anti-caveolin-1 activity*. Oncotarget, 2015. **6**(4): p. 1942-53.
40. Goetz, J.G., et al., *Biomechanical remodeling of the microenvironment by stromal caveolin-1 favors tumor invasion and metastasis*. Cell, 2011. **146**(1): p. 148-63.
41. Savinko, T.S., et al., *Functional Beta2-Integrins Restrict Skin Inflammation In Vivo*. J Invest Dermatol, 2015. **135**(9): p. 2249-57.
42. Morrison, V.L., et al., *Loss of beta2-integrin-mediated cytoskeletal linkage reprogrammes dendritic cells to a mature migratory phenotype*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 5359.
43. Ortiz, R., et al., *Extracellular matrix-specific Caveolin-1 phosphorylation on tyrosine 14 is linked to augmented melanoma metastasis but not tumorigenesis*. Oncotarget, 2016. **7**(26): p. 40571-40593.

44. Wolf, K., et al., *Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis*. J Cell Biol, 2003. **160**(2): p. 267-77.
45. Renkawitz, J., et al., *Adaptive force transmission in amoeboid cell migration*. Nat Cell Biol, 2009. **11**(12): p. 1438-43.
46. Wang, X.X., et al., *Caveolin-1, through its ability to negatively regulate TLR4, is a crucial determinant of MAPK activation in LPS-challenged mammary epithelial cells*. Asian Pac J Cancer Prev, 2013. **14**(4): p. 2295-9.
47. Nakahara, T., et al., *Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement*. J Dermatol Sci, 2006. **42**(1): p. 1-11.
48. Pascual-Lucas, M., et al., *LPS or ethanol triggers clathrin- and rafts/caveolae-dependent endocytosis of TLR4 in cortical astrocytes*. J Neurochem, 2014. **129**(3): p. 448-62.
49. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
50. Zhu, T., et al., *TLR4 and Caveolin-1 in Monocytes Are Associated With Inflammatory Conditions in Diabetic Neuropathy*. Clin Transl Sci, 2016.
51. Hauser, M.A. and D.F. Legler, *Common and biased signaling pathways of the chemokine receptor CCR7 elicited by its ligands CCL19 and CCL21 in leukocytes*. J Leukoc Biol, 2016. **99**(6): p. 869-82.
52. Haessler, U., et al., *Dendritic cell chemotaxis in 3D under defined chemokine gradients reveals differential response to ligands CCL21 and CCL19*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(14): p. 5614-9.
53. Comerford, I., et al., *The chemokine receptor CCX-CKR mediates effective scavenging of CCL19 in vitro*. Eur J Immunol, 2006. **36**(7): p. 1904-16.
54. Otero, C., M. Groettrup, and D.F. Legler, *Opposite fate of endocytosed CCR7 and its ligands: recycling versus degradation*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2314-23.

55. Smart, E.J., et al., *A role for caveolin in transport of cholesterol from endoplasmic reticulum to plasma membrane*. J Biol Chem, 1996. **271**(46): p. 29427-35.
56. Moissoglu, K., et al., *Regulation of Rac1 translocation and activation by membrane domains and their boundaries*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 11): p. 2565-76.
57. Nevins, A.K. and D.C. Thurmond, *Caveolin-1 functions as a novel Cdc42 guanine nucleotide dissociation inhibitor in pancreatic beta-cells*. J Biol Chem, 2006. **281**(28): p. 18961-72.
58. Lu, A., L. Wang, and L. Qian, *The role of eNOS in the migration and proliferation of bone-marrow derived endothelial progenitor cells and in vitro angiogenesis*. Cell Biol Int, 2015. **39**(4): p. 484-90.
59. Li, J., et al., *Caveolin-1-mediated negative signaling plays a critical role in the induction of regulatory dendritic cells by DNA and protein coimmunization*. J Immunol, 2012. **189**(6): p. 2852-9.
60. Wu, B., et al., *Herpes Simplex Virus 1 Suppresses the Function of Lung Dendritic Cells via Caveolin-1*. Clin Vaccine Immunol, 2015. **22**(8): p. 883-95.
61. Cohen, A.W., et al., *Role of caveolae and caveolins in health and disease*. Physiol Rev, 2004. **84**(4): p. 1341-79.
62. Sloan, E.K., K.L. Stanley, and R.L. Anderson, *Caveolin-1 inhibits breast cancer growth and metastasis*. Oncogene, 2004. **23**(47): p. 7893-7.
63. Stoitzner, P., et al., *Langerhans cells cross-present antigen derived from skin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(20): p. 7783-8.
64. Kellersch, B. and T. Brocker, *Langerhans cell homeostasis in mice is dependent on mTORC1 but not mTORC2 function*. Blood, 2013. **121**(2): p. 298-307.