

UCH - FC  
Biotecnología  
M 488  
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

**“REGULACIÓN DE LA PRESENTACIÓN CRUZADA DE  
ANTÍGENOS TUMORALES POR LA VIA IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 EN  
CÉLULAS DENDRÍTICAS”**

**Bernardita Medel Fernández**

Director(a) del Seminario de Título:

Dra. Fabiola Osorio Olivares

Co-Director(a): Dr. Flavio Salazar-Onfray

Director(a) Patrocinante:

Dra. Daniela Sauma Malahuf

Marzo 2017

Santiago – Chile





**INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO**

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por:

**Bernardita Medel Fernández**

**“REGULACIÓN DE LA PRESENTACIÓN CRUZADA DE ANTÍGENOS TUMORALES POR LA VIA IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 EN CÉLULAS DENDRÍTICAS”**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Dra. Fabiola Osorio Olivares  
**Directora Seminario de Título**

Firma manuscrita en azul de Fabiola Osorio Olivares sobre una línea horizontal.

Dr. Flavio Salazar Onfray  
**Co-Director Seminario de Título**

Firma manuscrita en azul de Flavio Salazar Onfray sobre una línea horizontal.

Dra. Daniela Sauma Malahuf  
**Prof. Patrocinante del Seminario**

**Comisión Revisora y Evaluadora**

Dra. María Rosa Bono Merino  
**Presidente Comisión**

Firma manuscrita en azul de María Rosa Bono Merino sobre una línea horizontal.

Dr. Álvaro Lladser Caldera  
**Evaluador**

Santiago de Chile, Marzo de 2017

## II. BIOGRAFÍA



Bernardita Medel nació el 3 de Marzo del año 1993.

Estudió desde 2° básico hasta 4° medio en el colegio Teresiano Enrique de Ossó, comuna de La Reina.

Ingresó a la Universidad de Chile el año 2011 a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias, egresando y obteniendo el grado de licenciado el año 2015.

Desde el año 2015 hasta la actualidad realizó su trabajo de Seminario de Título en el Laboratorio de Inmunología Anti Tumoral a cargo de la Dra. Fabiola Osorio como tutora y el Dr. Flavio Salazar-Onfray en calidad de co-tutor.

### III. AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los integrantes de los laboratorios de Inmunología Anti Tumoral y Regulación e Inmunología del Cáncer de la Universidad de Chile por la ayuda, disposición y simpatía de cada día, en especial a Cristóbal Costoya por la paciencia y conocimiento entregado.

Gracias especialmente mi tutora, la Dra. Fabiola Osorio, por recibirme y guiarme durante este proyecto.

Gracias a mi familia por siempre creer en mí y apoyarme en mis proyectos, es especial a mi mamá pues gracias a ella soy quien soy ahora.

Gracias a mis amigas de basquetbol del colegio por el deporte, las conversaciones inapropiadas y los tequilazos.

Gracias a mis amigos de la universidad por los momentos de dispersión, las largas noches de estudio y trabajo, y nunca dejar que me rindiera.

Gracias al grupo de plantas, en especial a Carlitos Rubilar, por todo lo entregado.

Gracias a mi novio Felipe Espinoza por siempre estar ahí y hacer el camino más ameno.

#### IV. INDICE DE CONTENIDOS

<b>V. INDICE DE TABLAS</b>	vi
<b>VI. INDICE DE FIGURAS</b>	vii
<b>VII. LISTA DE ABREVIATURAS</b>	ix
<b>RESUMEN</b>	vi
<b>ABSTRACT</b>	vi
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
Presentación cruzada en DCs y respuesta citotóxica	4
Clasificación de DCs y especialización	8
Estrés de retículo endoplásmico en inmunología	10
UPR y presentación de antígenos tumorales	14
<b>Hipótesis</b>	16
<b>Objetivo General</b>	16
<b>Objetivos Específicos</b>	16
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	17
Reactivos	17
Células y ratones	18
Co-cultivos de linfocitos T CD8+ con células dendríticas murinas derivadas de médula ósea	21
Citometría de flujo	23
Análisis de citometría y estadística	25
<b>RESULTADOS</b>	26

Caracterización fenotípica de modelos de células dendríticas murinas generadas <i>in vitro</i> a partir de medula ósea	26
Los linfocitos Pmel-1 responden y proliferan cuando se les presenta el antígeno gp100 derivado de lisados de melanoma humano	29
La inhibición de la actividad RNAsa de IRE-1 $\alpha$ en mDCs disminuye la capacidad de activar linfocitos T CD8 <sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral	32
La inhibición de la actividad RNAsa de IRE-1 $\alpha$ disminuye la capacidad de activar linfocitos T CD8 <sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral en modelos de mDCs de otros linajes	41
La activación de la respuesta a proteínas mal plegadas en DCs disminuye la capacidad de activar linfocitos T CD8 <sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral	47
<b>DISCUSIÓN</b>	50
<b>CONCLUSIONES</b>	55
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	56
<b>MATERIAL COMPLEMENTARIO</b>	61

## V. INDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Características principales de las subpoblaciones de células dendríticas murinas. 9
- Tabla 2.** Anticuerpos de superficie e intracelulares utilizados para citometría de flujo. 24

## VI. INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismos intracelulares de presentación cruzada.	7
<b>Figura 2.</b> Mecanismo de acción del eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1.	13
<b>Figura 3.</b> Caracterización de linajes de células dendríticas murinas generadas <i>in vitro</i> .	28
<b>Figura 4.</b> Activación y proliferación de linfocitos Pmel-1 en presencia del antígeno purificado.	31
<b>Figura 5.</b> Activación y proliferación de linfocitos Pmel-1 en presencia de lisados de melanoma.	34
<b>Figura 6.</b> El inhibidor 4 $\mu$ 8C disminuye la capacidad de FLT3-L mDCs de activar de manera temprana linfocitos T CD8 <sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral.	36
<b>Figura 7.</b> El inhibidor 4 $\mu$ 8C disminuye la capacidad de FLT3-L mDCs de activar e inducir la proliferación de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral.	38
<b>Figura 8.</b> El inhibidor 4 $\mu$ 8C disminuye la capacidad de FLT3-L mDCs de inducir una función efectora de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral.	40
<b>Figura 9.</b> El inhibidor 4 $\mu$ 8C disminuye la capacidad de CD103 mDCs de activar e inducir la proliferación de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral.	43
<b>Figura 10.</b> El inhibidor 4 $\mu$ 8C disminuye la capacidad de GM-CSF mDCs de activar e inducir la proliferación de linfocitos T CD8 <sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral.	45

**Figura 11.** El activador de UPR tunicamicina disminuye la capacidad de FLT3-L mDCs de activar de manera temprana linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral.

49

## VII. LISTA DE ABREVIATURAS

APC: Célula Presentadora de Antígenos.

ATF6: Factor de Transcripción Activador 6.

BiP: Proteína de Unión a Inmunoglobulinas

B220: Variante de 220 kDa de la glicoproteína T200.

CD: Cluster de diferenciación.

DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Daño.

DC: Célula Dendrítica.

cDC: Célula Dendrítica Convencional.

cDC1: Célula Dendrítica Convencional tipo 1.

cDC2: Célula Dendrítica Convencional tipo 2.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

ER: Retículo Endoplásmico.

FLT3-L: Ligando de tirosina kinasa 3 relacionada a FMS.

GM-CSF: Factor de Estimulación de Colonias Monocíticas y Granulocíticas.

IFN- $\gamma$ : Interferón gamma.

IRE-1 $\alpha$ : Enzima requirente de inositol 1 alfa.

LT CD8<sup>+</sup>: Linfocito T Citotóxico.

LT: Linfocito T.

MEL: Lisado de líneas de melanoma MEL 1 + MEL 2 + MEL 3.

MFI: Intensidad Media de Fluorescencia.

MHC-I: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I.

MHC-II: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase II.

mRNA: RNA mensajero.

OVA: Ovoalbúmina.

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.

PBS: Tampón Fosfato Salino.

pDC: Célula Dendrítica Plasmocitoide.

PERK: Kinasa de Retículo Endoplásmico tipo PRKR.

PRR: Receptor de Reconocimiento de Patrones.

RIDD: *Regulated IRE1 $\alpha$  Dependent mRNA Decay*.

RNA: Ácido Ribonucleico.

RNAse: Endoribonucleasa.

SEM: Error Standard de la Media.

SFB: Suero Fetal Bovino.

Sirp1 $\alpha$ : CD172a, Proteína reguladora de señales 1 $\alpha$ .

TAP: Transportador asociado con presentación antigénica.

TCR: Receptor de Linfocitos T.

TLR: Receptor Tipo Toll.

XBP-1: Proteína 1 de unión a la caja X.

## RESUMEN

La vía de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, Unfolded Protein Response) es esencial para la supervivencia celular, ya que su función es aliviar el estrés intracelular producido por la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico. En el área de la inmunología, un mal funcionamiento de esta vía previene la diferenciación de las células dendríticas (DCs, Dendritic Cells), células plasmáticas, y eosinófilos, afecta la funcionalidad de los macrófagos y se ha asociado a patologías relacionadas con inflamación, autoinmunidad y cáncer. Uno de los ejes de esta vía, IRE-1 $\alpha$ /XBP-1, es especialmente relevante para el funcionamiento de las DCs. La señalización de IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 se encuentra constitutivamente activada en estas células y, además, es capaz de modular la presentación cruzada de antígenos asociados a células muertas. En cáncer esto es especialmente relevante, pues la mayoría de los antígenos son derivados de células muertas y se ha descrito que el microambiente tumoral contiene señales que son capaces de activar el eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 en las DCs. Es por esto que resulta relevante estudiar si este eje es capaz de modular la presentación cruzada de antígenos específicamente derivados de un ambiente tumoral. En este trabajo de tesis se estableció como objetivo principal el determinar el papel del eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 en la presentación cruzada de un antígeno tumoral y si esta vía de señalización es relevante para la presentación cruzada de un antígeno tumoral por otras subpoblaciones de DCs.

Para estudiar lo propuesto, se generaron distintos cultivos de DCs *in vitro* a partir de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6 en presencia de la citoquina FLT3-L y/o GM-CSF. Estas DCs murinas fueron estimuladas con lisados de melanoma humano, como fuente de antígeno, en presencia o ausencia de un inhibidor

farmacológico del dominio ribonucleasa de IRE-1 $\alpha$ , que impide el *splicing* de XBP-1, para luego ser co-cultivados con linfocitos T CD8<sup>+</sup> derivados del ratón transgénico Pmel-1, que son específicos para un antígeno derivado de la proteína gp100, clásico antígeno asociado a melanoma. Nuestros resultados indican que las DCs que tienen inhibido el dominio ribonucleasa de IRE-1 $\alpha$  son menos eficientes que los controles para realizar presentación cruzada de la proteína gp100 derivada de los lisados de melanoma. Esto se traduce en una menor expresión de los marcadores de activación CD69 y CD25, una menor proliferación y una menor capacidad citotóxica (menor expresión de IFN- $\gamma$ ) de los linfocitos expuestos a DCs deficientes en IRE-1 $\alpha$ . Además, este efecto fue observado en los distintos linajes de DCs establecidos *in vitro*, lo que sugiere que el eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 es un regulador general de la presentación cruzada de antígenos tumorales.

En resumen, los estudios derivados de este seminario de título sugieren que el eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 puede convertirse en un nuevo blanco terapéutico para el desarrollo de inmunoterapias basadas en DCs.



## ABSTRACT

The unfolded protein response (UPR) is an integrated signal transduction mechanism that resolves endoplasmic reticulum stress and maintain protein homeostasis. In immunology, the UPR controls dendritic cells (DCs), plasma cells and eosinophil differentiation, macrophages functions and its absence or malfunction is associated with inflammation, autoimmunity and cancer diseases. IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 pathway, one UPR axis, is especially relevant in DCs functions. IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 signaling is constitutively activated in these cells, which in turn regulates the cross-presentation of dead-cell associated antigens. This feature is of great relevance for cancer, where most antigens are likely to be contained within dying cancer cells and also because this environment contain signals that activate the UPR in DCs. In this context, it's important to elucidate if this pathway can regulate croos-presentation of cancer associated antigens. So, the aim of this work was elucidate the contribution of the IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 pathway in the cross-presentation of a tumoral antigen and if its role was canonical for the DC lineage.

To study this, murine bone marrow DCs were generated in presence of FLT3-L and/or GM-CSF cytokines *in vitro*. Then, DCs were stimulated with human melanoma lysates, in presence or absence of a specific pharmacological inhibitor of the IRE-1 $\alpha$  ribonuclease domain, which blocks XBP-1 *splicing*, and then were co-cultivated with CD8<sup>+</sup> T cells isolated from Pmel-1 transgenic mice which are specific for a gp100 derived antigen, a classical melanoma associated antigen. Our results show that DCs treated with the IRE1 $\alpha$  inhibitor are impaired at cross-presenting the gp100 antigen contained in melanoma lysates, which is translated in lower expression of the marker CD69, CD25, decreased proliferation and cytotoxic activity (lower IFN- $\gamma$  expression) of

T cells. Furthermore, this effect was observed in several types of DCs generated in vitro, suggesting that the IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 pathway is a general regulator of tumor antigens cross-presentation.

In summary, the results derived of this work suggest that the IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 pathway can be a novel therapeutic target for tumor DC-based immunotherapies.

## INTRODUCCIÓN

### **Rol de las células dendríticas en el sistema inmune**

El sistema inmune es un conjunto de órganos, tejidos, células e interacciones celulares que permiten la protección del individuo a agentes reconocidos como extraños, capaces de causar infección, daño o algún tipo de enfermedad. Estos agentes contienen antígenos, es decir, moléculas de estructura específica que son reconocidas por receptores antígeno-específicos presentes en ciertos componentes del sistema inmunológico y que son necesarios para inducir una respuesta inmune específica. Estos agentes pueden ser de origen foráneo, como es el caso de virus, bacterias, químicos, entre otros; o de origen propio, provenientes de células tanto normales como de células dañadas o infectadas (Chaplin, 2010).

El sistema inmune se puede subdividir en dos categorías: el sistema inmune innato y el sistema inmune adaptativo. El sistema inmune innato corresponde a la primera barrera de defensa contra patógenos, generando una respuesta rápida y dirigida por el reconocimiento de moléculas expresadas solamente por microorganismos (Mogensen, 2009). Por una parte, esta respuesta es comandada por leucocitos de origen mielóide (tales como macrófagos, neutrófilos, granulocitos y mastocitos), que son capaces de eliminar rápidamente el agente infeccioso mediante fagocitosis y/o liberación de enzimas líticas (Chaplin, 2010). Por otra parte, es comandada por leucocitos de origen linfóide, conocidos como células linfoides innatas, entre las cuales se encuentran las células *natural killer*, que se especializan en la secreción de citoquinas inflamatorias y de moléculas citotóxicas (Spits & Di Santo, 2011). El sistema inmune adaptativo se activa por la exposición a un agente infeccioso o extraño y es coordinado por la activación de la inmunidad innata. En la respuesta

inmune adaptativa se genera una respuesta específica al patógeno causante de la infección, a cargo de leucocitos de origen linfoide (linfocitos T y B) (Chaplin, 2010). A diferencia de la respuesta inmune innata, la respuesta inmune adaptativa es capaz de generar memoria en el organismo, de manera que cuando la infección reaparece se produce una respuesta más eficiente.

Para que los linfocitos se diferencien desde linfocitos *naïve* o no activados a linfocitos efectoros o activados, su receptor debe encontrarse con el antígeno para el cual es específico. En el caso de los linfocitos B *naïve* el reconocimiento del antígeno se puede dar cuando este se encuentra de manera soluble o cuando se encuentra unido a la superficie de una célula presentadora de antígenos (*Antigen Presenting Cell*, APC, en inglés) en el caso de moléculas más grandes y complejas, además esta activación requiere de otras señales que pueden provenir generalmente de un linfocito T (LT) (Heesters & cols., 2016; Yuseff y cols., 2013). Sin embargo, en el caso de los LT *naïve*, estos solo pueden activarse cuando reconocen su antígeno específico presentado en proteínas de membrana especializadas denominadas complejo principal de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*, MHC, en inglés) presentes en la superficie de una APC, como lo son las células dendríticas (*Dendritic Cells*, DCs, en inglés). La presentación de antígeno en contexto MHC, en conjunto con otras señales co-estimuladoras y citoquinas producidas por APCs permiten el inicio de la respuesta inmune adaptativa (Cantrell, 2015).

Las DCs son leucocitos de origen mieloide que se caracterizan por su eficiencia en fagocitar antígenos, además de ser por excelencia las células encargadas de procesar y presentar estos antígenos a los LT (Kambayashi & Laufer, 2014; Paul, 2011). De este modo, las DCs son capaces de controlar diferentes aspectos de la

biología de los LT, regulando tanto los mecanismos de tolerancia como la inducción de una respuesta inmunogénica (Steinman, 2007). Los precursores de estas células migran desde la médula hasta los tejidos respectivos a través de la sangre donde finalmente terminan de diferenciarse (Liu & Nussenzweig, 2010). Poseen en su superficie y citoplasma distintas clases de receptores de reconocimiento de patrones (*Pattern Recognition Receptors*, PRRs, en inglés), pertenecientes a cuatro grandes familias: receptores tipo Toll, receptores de lectina tipo C, receptores tipo NOD y receptores tipo RIG-I (*Toll-like receptors*, TLRs; *C-type lectin receptors*, CLR; *RIG-I-like receptors*, RLRs; *NOD-like receptors*, NLRs, en inglés, respectivamente) (Takeuchi & Akira, 2010). Estos receptores son capaces de reconocer estructuras conservadas presentes en microorganismos y células dañadas (por ejemplo: LPS, DNA, RNA, proteínas heat shock, HMB1, entre otras) denominadas PAMPs (del inglés *Pathogen-Associated Molecular Patterns*) o DAMPs (del inglés *Damage-Associated Molecular Pattern*) con el objetivo de inducir la transcripción de genes en una respuesta inflamatoria (Takeuchi & Akira, 2010; Zitvogel y cols., 2010). La activación de estos receptores induce, entre otras cosas, la fagocitosis del agente activador para que este sea procesado y presentado en contexto de MHCs. Luego de que se activa, la DC migra hacia los linfonodos para activar un LT *naive*, que posee un receptor (*T cell receptor*, TCR, en inglés) que reconoce el complejo específico formado por el MHC y el antígeno, y es capaz de iniciar una respuesta inmune adaptativa (Shipkova & Wieland, 2012). Para que la activación del LT sea efectiva, la DC debe también expresar en su superficie moléculas co-estimuladoras tales como CD80, CD86, CD40, y secretar citoquinas como IL-12 (Cantrell, 2015). Es por esto que las DCs se consideran un nexo importante entre la inmunidad innata y la adaptativa.

### Presentación cruzada en DCs y respuesta citotóxica

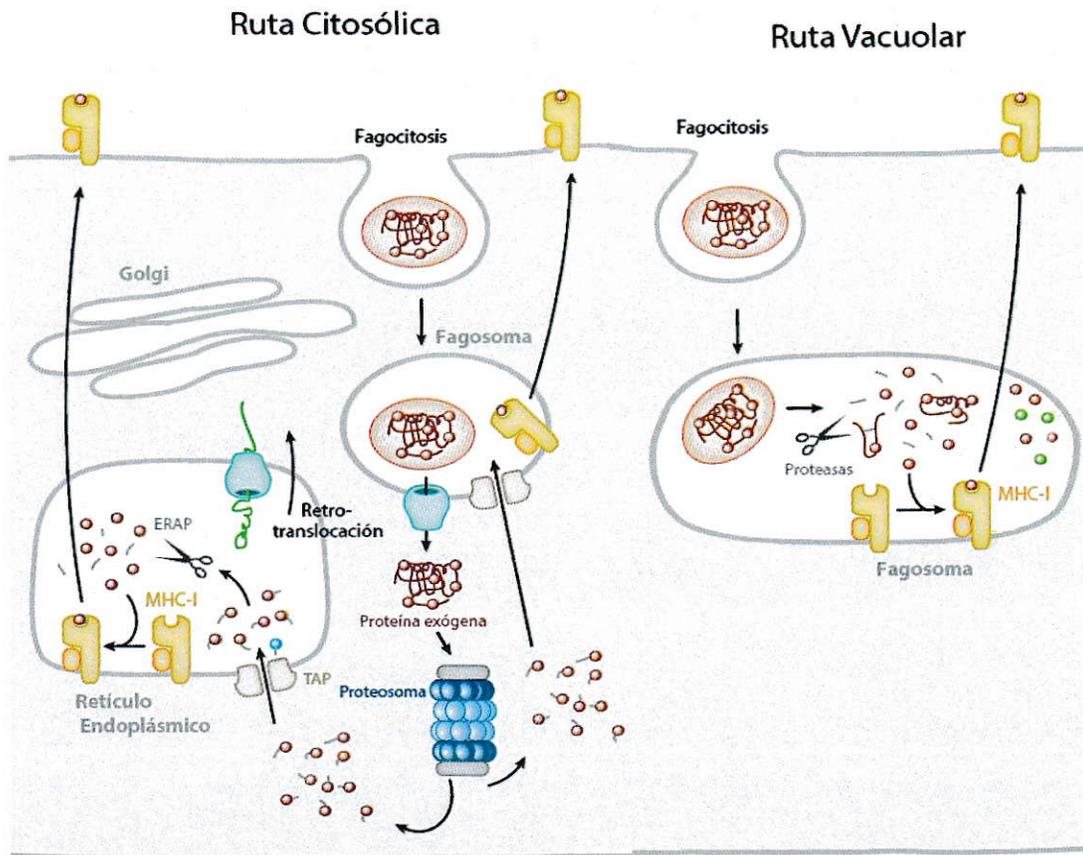
Como se mencionó anteriormente, las DCs son especialmente eficientes en procesar y presentar antígenos con el objetivo de inducir una respuesta inmune específica. Estos antígenos pueden ser de origen endógeno, es decir, de proteínas que se encuentran dentro de la célula, ya sea o porque son sintetizadas por la misma o porque proceden de un patógeno que utiliza la maquinaria de síntesis proteica celular para fabricar sus propias proteínas. El procesamiento de este tipo de antígenos ocurre en primera instancia en el citosol a cargo del proteosoma. Luego, péptidos antigénicos son translocados hacia el retículo endoplásmico (*Endoplasmic Reticulum*, ER, en inglés) por el transportador de transmembrana TAP (*Transporter associated with Antigen Processing*), donde son nuevamente proteolisados por aminopeptidasas asociadas al ER (*ER-associated amino peptidase*, ERAP, en inglés) (Blum y cols., 2013), para ser finalmente cargados en MHC de clase I (MHC-I) dentro del ER. De este modo, son exportados hacia la membrana para ser presentados a una clase particular de LTs: los LT CD8<sup>+</sup>, y generar una respuesta citotóxica (de la cual se tratará más adelante). También, los antígenos pueden ser de origen exógeno, los cuales provienen de proteínas que son obtenidas por la célula a través de mecanismos conservados de endocitosis, fagocitosis y macropinocitosis, que utilizan generalmente para la captación de elementos necesarios según sus requerimientos energéticos y nutricionales (Blum y cols., 2013). Estos antígenos entran por la ruta endocítica para ser procesados en lisosomas y endosomas, y luego ser cargados en un MHC de clase II (MHC-II). De esta manera, los antígenos son exportados hacia la membrana para ser presentados a LT CD4<sup>+</sup> o cooperadores, cuya función es establecer y/o aumentar una respuesta inmune específica (Shipkova & Wieland, 2012).

Existe, sin embargo, un mecanismo por el cual antígenos que entran por la ruta endocítica pueden ser presentados en un contexto de MHC-I, lo que se conoce como presentación cruzada (Fig. 1) (Blum et al., 2013). En este caso, los antígenos que entran por la ruta endocítica son translocados hacia el citosol desde el endosoma o fagosoma donde son degradadas por el proteosoma, y luego pueden ser nuevamente transportados de vuelta al fagosoma o endosoma por la proteína TAP para ser cargados en un MHC-I, o bien, pueden ser transportados hacia el ER y cargados a un MHC-I allí (Fig. 1, izquierda) (Joffre y cols., 2012). Alternativamente, las proteínas que entran por la ruta endocítica pueden ser degradadas dentro del mismo fagosoma o endosoma y allí mismo ser cargados en el MHC-I para su presentación (Fig. 1, derecha) (Joffre y cols., 2012). La primera ruta de presentación cruzada se conoce como ruta citosólica y la segunda como ruta vacuolar.

Puesto que la presentación cruzada constituye la presentación de antígenos extracelulares en MHC-I, esto implica que a través de este tipo de procesamiento y presentación también se activan de manera específica LT CD8<sup>+</sup>. Esto genera, además de la inducción de receptores de membrana en LTs que nos permiten detectar su activación, como CD69 (marcadora de activación temprana), CD25 (receptor de IL-2), CD95 (receptor Fas), entre otros (Shipkova & Wieland, 2012), una respuesta citotóxica antígeno-específica contra las células en las que se reconozcan complejos MHC-I-péptido para el cual son específicos. Esta respuesta consiste principalmente en inducir muerte celular en una célula objetivo a través de células citotóxicas efectoras, como lo son los LTs CD8<sup>+</sup> activados (Chávez-Galán y cols., 2009). La inducción de muerte celular puede ocurrir a través de tres mecanismos: i) por la exocitosis de granulos que contienen perforinas, granulosinas y granzimas, que van a inducir la permeabilización

de la célula objetivo, la activación de caspasas y finalmente apoptosis; ii) por la unión FasL-Fas, que también va a inducir la apoptosis en la célula blanco; y finalmente, iii) a través de la secreción de la citoquina TNF- $\alpha$  que induce apoptosis al unirse a su receptor (Chávez-Galán y cols., 2009). Además, parte de la función efectora de las células citotóxicas implica la secreción de citoquinas como IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  para regular la respuesta inflamatoria y la activación y/o diferenciación de otras células del sistema inmune (Zhang & Bevan, 2011). Debido a esta habilidad de los LT CD8<sup>+</sup>, gran parte de las inmunoterapias están focalizadas en aumentar su respuesta o impedir que esta sea inhibida, sobretodo en el área del cáncer, ya que se ha visto que esto logra controlar el crecimiento tumoral en cánceres de diversos orígenes (Melero y cols., 2014).

Aunque los LT CD8<sup>+</sup> se activan tanto por la presentación directa de un antígeno en MHC-I como por la presentación cruzada, se ha visto que dependiendo del contexto inflamatorio o infeccioso, un tipo de presentación puede ser más importante que la otra. En este sentido, se ha acumulado evidencia más bien reciente de la importancia de la presentación cruzada para activar LT CD8<sup>+</sup> y eliminar células neoplásicas o infectadas en ciertos tipos de tumor e infecciones, respectivamente (Gajewski y cols., 2013; Joffre y cols., 2012). En particular, se ha visto que en ratones deficientes para poblaciones específicas de DCs que se especializan en realizar presentación cruzada, la respuesta de LT CD8<sup>+</sup> contra ciertos virus y contra tumores de carácter inmunogénico se ve altamente comprometida (Hildner y cols., 2008; Joffre y cols., 2012). Es por esto que estudiar los mecanismos de presentación cruzada y, en particular, las poblaciones de DCs que se especializan en realizar esta función es relevante para ver como potenciar esta respuesta, en especial, hacia tumores.



**Figura 1. Mecanismos intracelulares de presentación cruzada.** Ruta citosólica: luego de la fagocitosis, los antígenos exógenos son exportados al citosol donde son procesados por el proteosoma. Los antígenos procesados son transportados hacia el ER y cargados en MHC-I o alternativamente, importados de vuelta al fagosoma, cargados en MHC-I y luego exportados hacia la membrana. Ruta vacuolar: antígenos exógenos pueden ser degradados en el fagosoma inmediatamente después de la fagocitosis (sin pasar por el citosol) y ser cargados allí en un MHC-I para su presentación. Figura modificada de (Blum y cols., 2013)

### Clasificación de DCs y especialización

Existen varias subpoblaciones de DCs, tanto en humanos como en el modelo murino *Mus musculus*, las que se especializan en una forma de presentación antigénica u otra, además de tener preferencia por la fagocitosis de ciertos antígenos (Liu & Nussenzweig, 2010). Las subpoblaciones de DCs se pueden diferenciar por los marcadores de membrana que expresan, la localización dentro del organismo y la ontogenia (Tabla 1) (Guilliams y cols., 2014). Específicamente en el modelo murino se encuentran por una parte las DCs clásicas o convencionales (cDCs) que a su vez, se pueden dividir en los grandes grupos: las cDCs del tipo 1 (cDC1), que se caracterizan por expresar los marcadores de superficie CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> o CD103<sup>+</sup>; y cDCs del tipo 2 (cDC2), las que se caracterizan por expresar CD11b, entre otros (Guilliams y cols., 2014). Las cDC1 son las células dendríticas convencionales mejor caracterizadas. Cuando se encuentran en tejidos linfoides, se identifican por presentar el marcador CD8 $\alpha$  y en tejidos no linfáticos la integrina CD103 (Mildner & Jung, 2014). También se caracterizan por expresar el receptor de quimioquina XCR1 (Mildner and Jung, 2014) y la molécula co-estimuladora CD24 (Askew & Harding, 2008). Estas DCs se especializan en realizar presentación cruzada de antígenos exógenos (Bedoui y cols., 2009; den Haan y cols., 2000), y producir grandes cantidades de IL-12 (Durai & Murphy, 2016). Las cDC2 es una subpoblación más abundante y heterogénea de células dendríticas que está menos caracterizada, pero al compararlas con las cDC1, poseen una mayor eficiencia en activar LT CD4<sup>+</sup> por tener una alta expresión de MHC-II (Mildner & Jung, 2014). Por otra parte, existen células dendríticas no convencionales, entre las cuales es importante destacar las que son derivadas de monocitos (moDCs), que tienen un rol más importante en respuestas inflamatorias, contextos en los cuales

también se pueden caracterizar por realizar presentación cruzada (Heath y Carbone, 2009; Joffre y cols., 2012; Mildner y cols, 2014), y las células dendríticas plasmacitoides (pDCs) que se caracterizan por producir grandes cantidades de interferón tipo I en infecciones virales (Mildner & Jung, 2014). Un resumen de las características de cada subpoblación de DCs se puede encontrar en la Tabla 1.

**Tabla 1. Características principales de las subpoblaciones de células dendríticas murinas (Durai y Murphy, 2016; Mildner y Jung, 2014).**

Subpoblaciones	Marcadores principales	Especialización
cDC1	CD11c <sup>+</sup> , MHC-II <sup>+</sup> , CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> , CD24 <sup>+</sup> , XCR1 <sup>+</sup> , CD103 <sup>+</sup> (periféricas)	Presentación cruzada, presentación a LT CD8 <sup>+</sup>
cDC2	CD11c <sup>+</sup> , MHC-II <sup>+</sup> , CD11b <sup>+</sup> , CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , Sirp1 $\alpha$ <sup>+</sup>	Presentación a LT CD4 <sup>+</sup>
pDC	CD11c <sup>+</sup> , MHC-II bajo, B220 <sup>+</sup>	Infecciones virales (producción de IFN-I)
moDC	CD11c <sup>+</sup> , MHC-II <sup>+</sup> , CD64 <sup>+</sup> , F4/80 <sup>+</sup>	Respuestas inflamatorias, presentación cruzada

En particular, las cDCs tipo 1, además de tener una gran capacidad de realizar presentación cruzada, son especialmente eficientes en la captura y procesamiento de células muertas (Villadangos & Schnorrer, 2007). Esto se debe a la presencia de receptores de membrana específicos para células necróticas o apoptóticas, como el receptor Clec9A o DNGR-1, que es una lectina de tipo C que se expresa específicamente en DCs del tipo cDC1 (Ahrens y cols., 2012; Poulin y cols., 2012). Por esta razón, estas células son un objetivo de estudio interesante en el campo de la inmunología tumoral, ya que la gran mayoría de antígenos provenientes del ambiente tumoral son de esta naturaleza. Una particularidad de estas DCs es que tienen activado de manera constitutiva una de las vías que modulan el estrés generado en el ER, a cargo del sensor IRE-1 $\alpha$  y el factor de transcripción XBP-1s, el cual es un proceso relevante para su función (Osorio y cols., 2014).

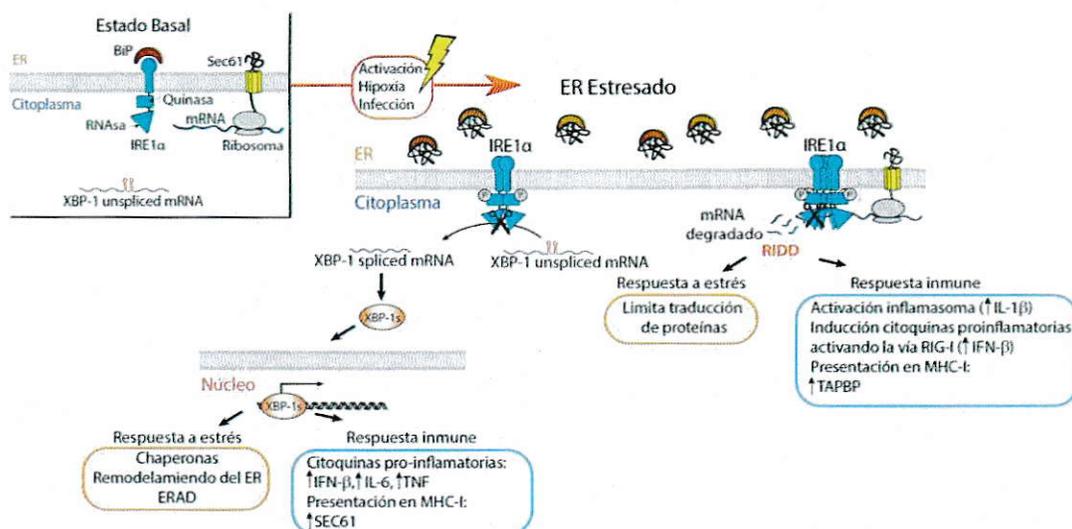
### **Estrés de retículo endoplásmico en inmunología**

El ER tiene un rol central en la biosíntesis proteica, proteínas de transmembrana o destinadas a la ruta secretora son enviadas a este organelo para ser plegadas. Si este plegamiento no ocurre de manera correcta, esto será reconocido por el estricto control de calidad del ER y la proteína mal plegada será destinada a degradación. Sin embargo, existen contextos fisiológicos y patológicos que interfieren con este control de calidad, teniendo como consecuencia una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del ER, condición conocida como estrés de ER. Para aliviar este estrés y mantener la homeostasis del ER existe una respuesta conocida como respuesta a proteínas mal plegadas (*Unfolded Protein Response*, UPR, en inglés) que se encarga de balancear la capacidad de plegamiento del ER con la carga secretora que recibe el organelo (Gardner y cols., 2013).

El UPR es una vía esencial para la supervivencia celular, ya que es una respuesta que genera adaptación a distintos tipos de estrés celular. Es por esto que la activación de esta respuesta se ha estudiado en gran medida desde la perspectiva tumoral y se ha visto que esta respuesta es fundamental para la adaptación, crecimiento y agresividad del tumor (Rodvold y cols., 2016; Urra y cols al., 2016). Sin embargo, desde una perspectiva inmunológica también se ha observado que esta respuesta es importante para un adecuado funcionamiento del sistema inmune. Una deficiencia en la respuesta a proteína mal plegadas previene la diferenciación de DCs, células plasmáticas, y eosinófilos, afecta la funcionalidad de macrófagos y se ha asociado a patologías relacionadas con inflamación, autoinmunidad, entre otras (Bettigole & Glimcher, 2015; Janssens y cols., 2014; Todd y cols., 2008).

La respuesta a proteínas mal plegadas está compuesta por tres sensores que se encuentran en la membrana del ER: IRE-1 $\alpha$ , PERK y ATF6, los cuales regulan la expresión de genes involucrados en el plegamiento y degradación de proteínas, en la síntesis lipídica, entre otros, con el objetivo de restablecer la homeostasis celular (Gardner et al., 2013). Este proceso es mantenido mediante tres mecanismos: reduciendo la traducción de proteínas, incrementando la capacidad de plegamiento de proteínas y el tamaño del ER e induciendo, en última instancia, apoptosis cuando el estrés no puede ser resuelto. Si bien los tres sensores y sus respectivas vías han demostrado tener un rol importante dentro de la inmunología (Bettigole & Glimcher, 2015), el sensor IRE-1 $\alpha$  es particularmente interesante de estudiar pues es el sensor más conservado de los tres desde microorganismos hasta eucariontes superiores y además, porque se ha visto que la vía se encuentra constitutivamente activada en DCs murinas (Iwakoshi y cols., 2007; Osorio y cols., 2014). IRE-1 $\alpha$  es una proteína de transmembrana que posee un dominio de serina/treonina quinasa y otro dominio de actividad endoribonucleasa (Fig. 2). La actividad endoribonucleasa de IRE-1 $\alpha$  es la más estudiada y posee dos funciones relevantes: 1) realizar un proceso de *splicing* alternativo del mRNA codificante para la proteína XBP-1 (Fig. 2 izquierda) el cual, al ser procesado por IRE-1 $\alpha$ , es convertido en un potente factor de transcripción que induce la expresión de genes moduladores de la síntesis y secreción proteica (Gardner y cols., 2013); y 2) la degradación regulada de mRNAs codificantes para otras proteínas denominada RIDD por su sigla en inglés *Regulated IRE-1 $\alpha$  Dependent mRNA Decay* (Fig. 2, derecha), mecanismo que consiste en la degradación de ciertos mRNAs próximos a ser sintetizados y que, por lo tanto, tiene un efecto más pleiotrópico sobre la biología celular (Coelho & Domingos, 2014).

Se ha descrito para el eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 distintos roles fundamentales en el sistema inmune. Entre ellos es importante mencionar, por ejemplo, que XBP-1 es un regulador directo de la expresión de MHC-II y así fue como se identificó por primera vez (Liou y cols., 1990); también que este factor regula la producción de IL-6 a través de la estimulación de TLR4 en macrófagos, por lo que afecta la funcionalidad de este tipo celular (Martinon y cols., 2010); en ausencia de este factor, células plasmáticas y eosinófilos son incapaces de diferenciarse (Bettigole y cols., 2015; Reimold y cols., 2001); también este eje tiene un rol en inmunidad innata ya que IRE-1 $\alpha$  se ha propuesto como un posible sensor de la toxina del cólera (Cho y cols., 2013; Martinon & van der Goot, 2013).



**Figura 2. Mecanismo de acción del eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1.** En estado basal (izquierda), el ER es capaz de plegar correctamente las proteínas destinadas a la ruta secretora. Frente a estímulos que perturben el plegamiento de proteínas o aumenten la carga de plegamiento del ER, tales como activación de las DCs, hipoxia o infección, se produce un desbalance entre la capacidad de plegamiento del ER y la carga de plegamiento, lo que produce acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del ER (derecha). Esto ocasiona que la chaperona BiP interaccione con estos intermediarios de plegamiento, dejando a IRE-1 $\alpha$  libre para dimerizar y activar su actividad endorribonucleasa. IRE-1 $\alpha$  activo es capaz de realizar el splicing alternativo del mRNA de XBP-1, el cual produce un mRNA maduro que codifica para el factor de transcripción XBP-1s, el cual migra al núcleo y promueve la expresión de genes relacionados con la homeostasis del RE. Además, esta señalización de IRE1 $\alpha$  converge con vías de la respuesta inmune relacionadas con la producción de citoquinas pro-inflamatorias y también regula proteínas esenciales para la presentación en MHC-I. Si existe una hiperactivación de IRE1 $\alpha$ , este forma oligómeros y va a inducir la degradación de otros mRNAs presentes en el ER (RIDD), aliviando de esta manera la carga de plegamiento del ER. Esta señalización también está relacionada con la respuesta inmune pues es capaz de inducir la activación del inflammasoma, se activa en presencia de la toxina del cólera y en respuesta activa la vía RIG-I y además modula la presentación en MHC-I, siendo el mRNA de Tabp un blanco directo de RIDD. Figura modificada de (Bettigole y Glimcher, 2015).

### UPR y presentación de antígenos tumorales

Como se ha mencionado anteriormente, se ha visto un papel importante del eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 en la biología y funcionalidad de las DCs. Por un lado se ha visto que el factor XBP-1 es necesario para la supervivencia de estas células y el desarrollo de ciertos linajes (Iwakoshi y cols., 2007; Osorio y cols., 2014). Por otro lado se ha visto que las DCs, en comparación a otras células del sistema inmune, tienen este eje activado de manera constitutiva en estado basal y, particularmente, las cDCs 1 lo tienen activado en mayor medida, lo que sugiere que esta vía es relevante para el correcto funcionamiento de DCs del tipo cDC1 (Osorio y cols., 2014).

En un trabajo realizado por Osorio F., et al, se observó que en ratones *knock out* para XBP-1 en DCs ocurría un fenómeno de hiperactivación del sensor IRE-1 $\alpha$  en cDC1, lo que disminuyó la capacidad de estas células de realizar presentación cruzada de antígenos, específicamente cuando la fuente de los mismos eran células muertas (Osorio y cols., 2014). En ese mismo trabajo se comprobó que el responsable de dichos efectos en cDC1 era IRE-1 $\alpha$ , el cual a través de RIDD, es capaz de degradar mRNAs codificantes para procesos relacionados a la presentación antigénica. Estos procesos incluyen maduración del fagolisosoma, procesamiento de antígeno, carga del péptido en MHC-I y tráfico vesicular. Entre los mRNA codificantes blancos de RIDD e involucrados en los procesos mencionados, es importante mencionar: *Lamp1*, que codifica para una glicoproteína responsable de mantener la integridad lisosomal; *Tapbp*, que codifica para tapasina, la proteína encargada de reclutar el MHC-I hacia el translocón TAP dentro del RE y permitir que ocurra la carga del péptido; y *Ergic3*, que codifica para una proteína que regula el tráfico de ER hacia el Golgi, regulando el tráfico del complejo MHC-I-péptido hacia la membrana (Blum y cols., 2013; Osorio y

cols., 2014; Subramanian & Tabas, 2014). Por lo tanto, IRE-1 $\alpha$  es capaz de regular directamente distintos aspectos de la presentación cruzada en DCs.

Interesantemente, se ha visto que moléculas presentes en tumores activan eficientemente el eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1, lo que hace altamente interesante estudiar esta vía en el campo de la inmunoterapia del cáncer. En nuestro laboratorio se ha visto que al estimular las DCs con lisados tumorales de melanoma humano se induce la vía IRE-1 $\alpha$ /XBP-1, induciendo el *splicing* alternativo de XBP-1 (Costoya, 2015) y que estos lisados poseen un efecto adyuvante sobre la presentación cruzada de la proteína ovoalbúmina (OVA) (Anexo 1, resultados derivados de mi unidad de investigación). Además, se observó que la activación de IRE-1 $\alpha$  era necesaria para una eficiente presentación cruzada de la proteína OVA, usando los lisados tumorales como adyuvantes (Anexo 1), y también para que las DCs fueran capaces de activar e inducir la proliferación de LT CD8<sup>+</sup> específicos para un epítipo derivado de la proteína OVA (Costoya, 2015). En otros estudios se demostró también que DCs infiltrantes de tumores ováricos presentan una aumentada activación de la vía IRE-1 $\alpha$ /XBP-1, la cual previene la activación linfocitaria anti-tumoral (Cubillos-Ruiz y cols., 2015).

Estos antecedentes indican que en el microambiente tumoral existen señales que activan esta la vía IRE-1 $\alpha$ /XBP-1, el cual es capaz de regular la presentación de antígenos derivados de células muertas. En el cáncer, la mayoría de los antígenos provienen de la muerte de una célula tumoral y, ya que la vía regula la presentación cruzada de esta clase de antígenos, resulta interesante preguntarse si este eje participa directamente en la presentación cruzada de antígenos derivados de un ambiente tumoral. Por lo tanto, el propósito de este trabajo es determinar si el eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 influye negativa o positivamente sobre la presentación de un antígeno

tumoral definido. Esto con el objetivo de determinar si la vía IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 puede convertirse en un blanco terapéutico para el desarrollo de inmunoterapias contra el cáncer.

### **Hipótesis**

La activación de la vía de señalización IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 en DCs es necesaria para la presentación cruzada de antígenos tumorales por estas células.

### **Objetivo General**

Determinar el papel de la vía IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 en la presentación cruzada del antígeno tumoral derivado de la proteína gp100, a linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos.

### **Objetivos Específicos**

1. Establecer y caracterizar fenotípicamente modelos de distintas subpoblaciones de células dendríticas generadas *in vitro* a partir de medula ósea murina.
2. Validar la cepa de ratones transgénicos Pmel-1, y determinar las condiciones óptimas para la proliferación y activación linfocitaria en presencia del antígeno purificado.
3. Determinar la relevancia de la vía IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 en mDCs para la presentación cruzada del antígeno tumoral gp100 en presencia de un inhibidor específico para el dominio RNAsa de IRE-1 $\alpha$ .
4. Determinar si la activación canónica del UPR modula la presentación cruzada del antígeno tumoral gp100 en mDCs.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Reactivos

#### 1.1 Medio de cultivo, buffers y soluciones

El medio de cultivo utilizado fue RPMI 1640 GlutaMAX™ (Gibco, ThermoFisher Scientific), suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Hyclone GE Healthcare o Corning) descomplementado, 100 U/mL Penicilina (Hyclone, GE Healthcare), 100 µg/mL Estreptomina (Hyclone, GE Healthcare) y 50 µM de β-mercaptoetanol (Gibco, ThermoFisher Scientific). El medio suplementado se denominó R10, mientras que el no suplementado R0. Para lisar glóbulos se utilizó el buffer de lisis *Red Blood Cell* (RBC) (Biolegend). Para otras soluciones y lavados se utilizó el buffer salino PBS 1X pH 7.4 (Gibco, ThermoFisher Scientific). Para tinciones y selección de linfocitos por columna se utilizó *Flow-cytometry activated cell sorting* buffer (FACS buffer), que consistía en PBS 1X pH 7.4 suplementado con 1% SFB y 2 mM de EDTA (Ambion, Thermo Scientific).

#### 1.2 Proteínas, péptidos y citoquinas

El péptido de la proteína gp100 humana (hgp100<sub>25-33</sub>), fue gentilmente facilitado por el Dr. Flavio Salazar, Laboratorio de Inmunología Anti-tumoral, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. La citoquina FLT3-L recombinante humana, fue producida en el servicio de purificación de proteínas en VIB, Bélgica. La citoquina GM-CSF recombinantes murina, fue obtenida de Biolegend.

#### 1.3 Estímulos

Se utilizaron lisados de líneas celulares de melanoma producidos en el Laboratorio de Inmunología Antitumoral de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile a partir de 3 líneas celulares de melanoma establecidas en el

laboratorio, Mel 1, Mel 2 y Mel 3, mezcladas en partes iguales en medio AIM-V (Thermofisher Scientific), a una concentración de  $4 \times 10^6$  células/mL. Para condicionarlas con *heat shock*, las células fueron expuestas a 42°C durante 1 hora y luego a 37°C durante 2 horas. Posteriormente las células fueron lisadas mediante múltiples ciclos de descongelación y congelación en nitrógeno líquido. Finalmente, se cuantificó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford. Los lisados condicionados con *heat shock* se denominaron “MEL” para propósitos de esta tesis. Además se utilizaron lisados de la línea de melanoma murino B16F10 con el mismo tratamiento de *heat shock* (lisado B16F10), facilitado por el Dr. Flavio Salazar, Laboratorio de Inmunología Anti-tumoral, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. El inhibidor del dominio de RNasa de IRE-1 $\alpha$ , 4 $\mu$ 8C (Cross y cols., 2012), fue obtenido de EMD Milipore. La tunicamicina utilizada (de *Streptomyces sp*) fue obtenida de Sigma-Aldrich. Para el control de vehículo del inhibidor y tunicamicina se utilizó DMSO (Tocris Bioscience).

## **2. Células y ratones**

### **2.1 Ratones**

Ratones C57BL/6 *wild type* de entre 5-18 semanas de edad fueron obtenidos del bioterio central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Ratones Pmel-1 (Overwijk y cols., 2003) de entre 12-20 semanas de edad, fueron obtenidos en colaboración con el Dr. Flavio Salazar, Laboratorio de Inmunología Anti-tumoral, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. El manejo con animales presentado en este seminario de título se realizó de acuerdo a los protocolos de bioética correspondientes a la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

## 2.2 Generación *in vitro* de células dendríticas murinas en presencia de FLT3-L y/o GM-CSF

Se aislaron huesos largos (fémures y tibias) de ratones C57BL/6 y se esterilizaron durante 1 minuto en etanol. Luego fueron lavados y perfundidos con R10 utilizando una jeringa de insulina de 1 mL (BD). La suspensión celular obtenida a partir de la medula se filtró a través de un *cell strainer* de 70  $\mu$ M (Falcon®, BD) y se centrifugó en un tubo de 15 mL (Falcon®, BD) a 400x g por 7 minutos a 4°C. Posteriormente se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 1 mL de buffer de lisis RBC y se incubó el tubo en hielo durante 1 minuto, agitando brevemente cada 20 segundos. Luego, se diluyó 1:9 con PBS 1X y se centrifugó utilizando las mismas condiciones mencionadas anteriormente. El sobrenadante fue descartado y las células fueron resuspendidas en 10 mL de medio R10. Posteriormente, las células fueron contadas mediante tinción de viabilidad con azul de tripán en una cámara de Neubauer, se ajustaron a una concentración de  $1 \times 10^6$  de células/mL y se suplementaron con diferentes citoquinas dependiendo del tipo de células dendríticas a generar.

En el caso de generar FLT3-L mDCs (Naik y cols., 2005), las células se suplementaron con 150 ng/mL de citoquina recombinante FLT3-L para después agregarlas a placas de cultivo de 6 pocillos (Falcon®, BD), a 4 mL/pocillo. El cultivo se mantuvo por 7-8 días en incubadoras a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> antes de ser utilizadas.

En el caso de generar GM-CSF mDCs (Lutz y cols., 1999), las células fueron suplementadas con 20 ng/mL de citoquina recombinante GM-CSF para después agregarlas a una placa de cultivo de 100 x 15 mm (Falcon®, BD), en 10 mL. Al día 3 del cultivo, estas células se alimentaron con 10 mL de R10 suplementado con 20 ng/mL de la citoquina GM-CSF y al día 6 se realizó un cambio de medio, que

consiste en sacar 10 mL del cultivo, centrifugar a las mismas condiciones mencionadas, resuspender el pellet en 10 mL fresco de R10 suplementado con 20 ng/mL de la citoquina GM-CSF y devolver a la placa de cultivo. El cultivo se mantuvo por 8-9 días en incubadoras a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> antes de ser utilizadas.

En el caso de generar iCD103 mDCs (Mayer y cols., 2014), las células fueron suplementadas con 150 ng/mL de FLT3-L y 5 ng/mL de GM-CSF para después agregarlas a una placa de cultivo de 35 x 10 mm (Falcon®, BD), en 3 mL. Al día 6 del cultivo estas células se alimentaron con 1 mL de R10. Al día 9, las células se sacaron de cultivo y se replaquearon en medio fresco con citoquinas como al día 0, agregando 1-2x10<sup>6</sup> de células cada 3 mL. El cultivo se mantuvo por un total de a 15-16 días en incubadoras a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> antes de ser utilizadas.

### **2.3 Purificación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> de ratones Pmel-1**

Se aisló el bazo de un ratón Pmel-1 en condiciones estériles y fue perfundido con R10 utilizando una jeringa de insulina de 1 mL (BD). Posteriormente la suspensión celular recolectada fue filtrada por un *cell strainer* de 70 µm (Falcon®, BD) y adicionalmente el bazo fue machacado contra el filtro utilizando el embolo de la jeringa, en caso de ser necesario. La suspensión celular fue centrifugada en un tubo de 15 mL (Falcon®, BD) a 400x g por 7 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 2 mL de buffer de lisis RBC 1X, puesto en hielo y agitado brevemente cada 30 segundos, por 3 minutos. Una vez finalizada la lisis, se llevó el volumen a 15 mL con PBS 1X y se centrifugó a las mismas condiciones descritas anteriormente. Luego las células fueron contadas y centrifugadas nuevamente para resuspenderlas en 400 µL de FACS Buffer por cada 1x10<sup>8</sup> células + 70 µL de cocktail de anticuerpos biotinilados de selección negativa para LT CD8<sup>+</sup> (MACS, Miltenyi Biotec) por cada 1x10<sup>8</sup> células, e

incubadas por 10 minutos en hielo. Una vez finalizada la incubación, se agregaron 300  $\mu\text{L}$  de FACS Buffer + 140  $\mu\text{L}$  *microbeads*  $\alpha$ -biotina (MACS, Miltenyi Biotec) por cada  $1 \times 10^8$  células e incubadas por 15 minutos en hielo. Después fueron lavadas con FACS buffer, centrifugadas y resuspendidas en 1 mL de FACS buffer. Finalmente los LTs CD8<sup>+</sup> fueron seleccionados negativamente mediante una columna LS (MACS, Miltenyi Biotec), siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, parte de estos linfocitos fueron teñidos con 5  $\mu\text{M}$  de CFSE (eBioscience), para realizar ensayos de proliferación.

### **3. Co-cultivos de linfocitos T CD8<sup>+</sup> con células dendríticas murinas derivadas de médula ósea**

#### **3.1 Titulación de péptido hgp10025-33 y lisado de melanoma humano y murino**

Células dendríticas generadas *in vitro* con la citoquina FLT3-L fueron colectadas, lavadas, contadas y plaqueadas a  $2 \times 10^4$  de células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo (Falcon®, BD) en medio R10. Paralelamente, linfocitos T CD8<sup>+</sup> Pmel-1 fueron obtenidos como se indica en 2.3 y plaqueados con las DCs a  $5 \times 10^4$  de células/pocillo en R10. Adicionalmente se agregó a los pocillos correspondientes concentraciones crecientes de MEL o lisado de B16F10 (25, 50, 100 y 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) como fuente de antígeno. Para los tratamientos con hgp100<sub>25-33</sub>, las mDCs fueron previamente incubadas con el péptido a concentraciones crecientes (0.15, 0.62, 2.5 y 10  $\mu\text{M}$ ) a 37°C por 20 min, para luego ser lavadas con R10 y plaqueadas a  $2 \times 10^4$  de células/pocillo en los pocillos correspondientes. Cada condición se hizo en duplicado. Los co-cultivos se mantuvieron por 3 días en incubadoras a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y fueron analizados posteriormente por citometría de flujo.

### 3.2 Efecto del inhibidor 4 $\mu$ 8C sobre los co-cultivos

Los diferentes tipos de mDCs generadas *in vitro* fueron colectadas, contadas y replaqueadas a  $1 \times 10^6$  de células/mL en placas de plástico de 24 pocillos (Falcon®, BD), 1 mL por pocillo. Una vez plaqueadas, las células fueron tratadas con el inhibidor 4 $\mu$ 8C (50  $\mu$ M) o DMSO como control de vehículo por 6 horas. Una hora después, se agregó a los pocillos correspondientes MEL a una concentración final de 100  $\mu$ g/mL, para luego dejarlas en incubación por 5 horas más. Para los tratamientos con hgp100<sub>25-33</sub>, luego de las 6 horas, las mDCs fueron incubadas con el péptido (2.5  $\mu$ M) a 37°C por 20 min. Posteriormente, todas las condiciones fueron colectadas, lavadas, contadas con el contador automático LUNA™ (Logos Biosystems) y plaqueadas a  $2 \times 10^4$  de células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo en medio R10. Cada condición se realizó en duplicado. Específicamente, para tinción intracelular se hizo en una placa aparte con estas mDCs en triplicado cada condición.

Luego, las células dendríticas que sobraron en cada condición fueron fijadas. El resto de las células fueron fijadas por cada condición. Para esto, las células fueron resuspendidas en 200  $\mu$ L de paraformaldehído (PFA) 1X e incubadas por 10 min a 4°C, luego fueron lavadas 2 veces con glicina 0.2 M, 1 vez con R10 y finalmente fueron resuspendidas en 100  $\mu$ L de R10 para ser contadas a través del contador LUNA™. Una vez contadas se plaquearon  $5 \times 10^4$  de células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Cada condición se realizó en duplicado igualmente.

Paralelamente, linfocitos T CD8<sup>+</sup> Pmel-1 fueron obtenidos como se indica en 2.3 y plaqueados con las mDCs a  $5 \times 10^4$  de células/pocillo en R10. Los co-cultivos con mDCs fijadas se mantuvieron por 16 h en incubadoras a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y fueron analizados posteriormente por citometría de flujo. Así mismo, los co-cultivos con

mDCs no fijadas se mantuvieron por 3 o 4 días y fueron analizados posteriormente por citometría de flujo

#### **4. Citometría de flujo**

##### **4.1 Tinción extracelular**

Para la tinción de células murinas (mDCs o LTs), las células fueron lavados con FACS Buffer y teñidos en el mismo buffer por 20 min a 4°C en oscuridad donde, dependiendo del experimento, se utilizaron los anticuerpos indicados en la Tabla I. Posterior a la tinción, las células fueron lavadas con FACS buffer y teñidas con el marcador de viabilidad LIVE/DEAD® Fixable Aqua (Dilución 1/800 en PBS 1X; Molecular Probes, Thermofisher Scientific) durante 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad. Finalmente fueron lavadas con FACS buffer y resuspendidas en el mismo buffer para luego ser adquiridas por un citómetro FACSverse (BD). Para contar las células al día 3 de los co-cultivos, las células fueron resuspendidas en FACS buffer con una concentración conocida de *beads* (BD), de manera de poder hacer una relación directa de esto con el volumen de muestra que paso realmente por el citómetro y luego relacionar este volumen con la cantidad de LTs presentes en los pocillos.

**Tabla 2. Anticuerpos de superficie utilizados para citometría de flujo.**

Anticuerpo	Fluoróforo	Clon	Dilución	Marca
CD11c	APC	N418	1/800	eBiosciences
MHC-II(IA/IE)	APC-Cy7	M5/114.15.2	1/1500	Biolegend
CD11b	FITC	M170	1/400	Biolegend
B220	PE-Cy7	RA3-6B2	1/400	Biolegend
Sirp1 $\alpha$ (CD172a)	PerCP-Cy5.5	P84	1/400	Biolegend
XCR1	PE	ZET	1/400	Biolegend
CD24	eFluor® 450	M1/69	1/400	eBiosciences
CD103	PE-Cy7	2E7	1/200	Biolegend
CD115	APC-eFluor® 780	AFS98	1/400	eBiosciences
CD25	APC	PC61	1/1500	eBiosciences
CD69	APC	IM7	1/400	Biolegend
CD3 $\epsilon$	PE-Cy5	145-2C11	1/400	Biolegend
CD8 $\alpha$	PE	Leu-2	1/100	Miltenyi Biotec
CD8 $\alpha$	eFluor® 450	53-6.7	1/400	eBiosciences
IFN $\gamma$	PE	XMG1.2	1/100	eBiosciences
CD16/32 (Fc Block)	-	93	1/400	Biolegend

#### 4.2 Tinción intracelular

Linfocitos T CD8<sup>+</sup> una vez terminado el día 3 del co-cultivo, fueron incubados a 37°C con 0.25  $\mu$ M de PMA y 1  $\mu$ g/mL Ionomicina por 1 h. Luego se adicionó BFA 1X (eBioscience) y se dejó incubando por 3 h más a 37°C. Finalizada la incubación, las células fueron lavadas con FACS Buffer y teñidas extracelularmente como se indica en 4.1. Posteriormente, fueron fijadas y permeabilizadas por 30 min a 4°C en

oscuridad con el kit de Fijación/Permeabilización Foxp3 (eBioscience) para luego ser teñidas intracelularmente en buffer de permeabilización 1X (eBioscience) por 30 min a 4°C en oscuridad. Luego las células fueron lavadas y resuspendidas en FACS Buffer para ser adquiridas en el citómetro.

##### **5. Análisis de citometría y estadística**

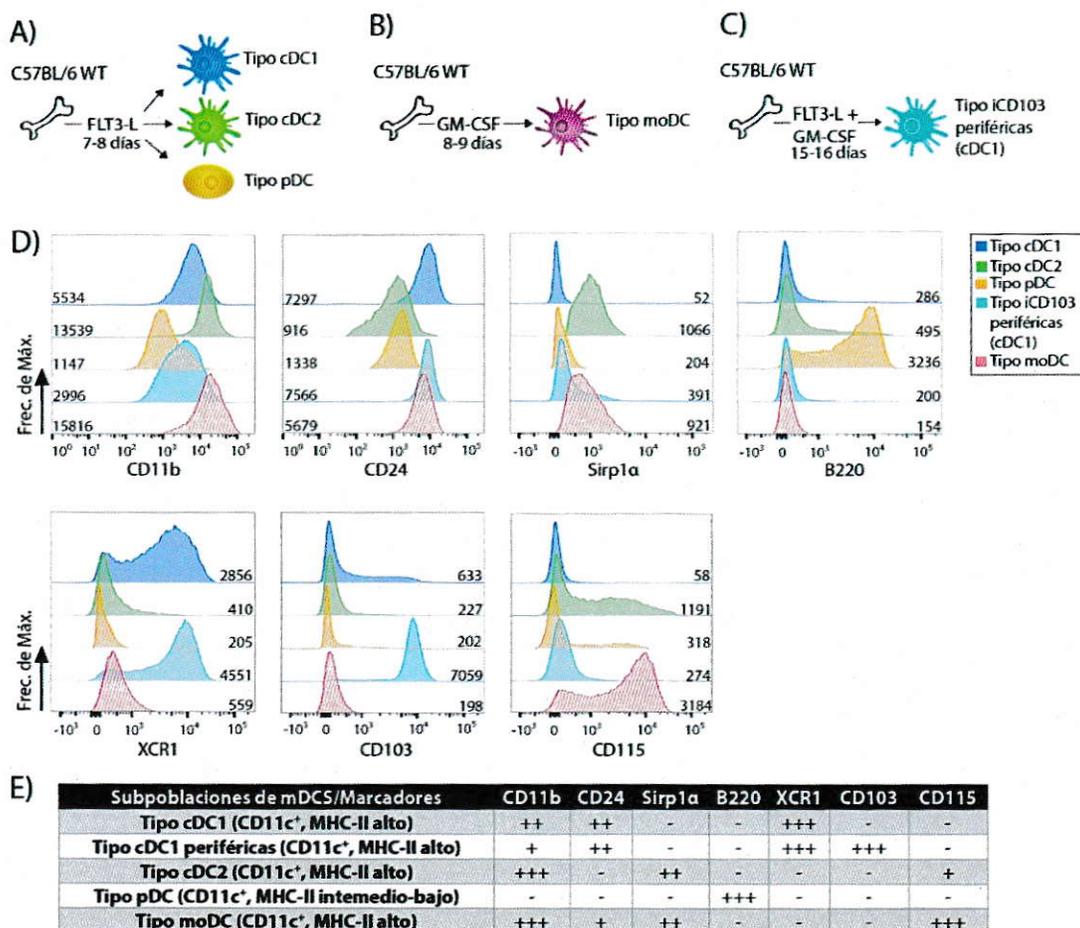
Datos de citometría fueron analizados usando el software FlowJo 7.6.1. (Treestar). Para análisis de gráficos, promedio, SEM y estadística se utilizó el software Prism 6 (GraphPad). Las diferencias entre los grupos fueron analizados usando la prueba t de *student* de dos colas, no pareada. Resultados con un valor de P igual o menos 0.05 fueron considerados significantes. \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001.

## RESULTADOS

### **Caracterización fenotípica de modelos de células dendríticas murinas generadas *in vitro* a partir de médula ósea**

Se ha descrito que el eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 es necesario para el desarrollo y la supervivencia de células dendríticas de distintos linajes (Iwakoshi y cols., 2007; Osorio y cols., 2014). Más aun, se ha reportado que esta vía modula directamente algunos procesos intracelulares responsables de la presentación cruzada de antígenos derivados de células muertas en cDCs de tipo 1, específicamente relacionados con el procesamiento antigénico, la carga del péptido y presentación del mismo (Osorio y cols., 2014). Para analizar la relevancia del eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 en la presentación cruzada de antígenos tumorales, trabajamos con 3 subpoblaciones de mDCs generadas *in vitro* mediante distintas estrategias que son equivalentes a subpoblaciones observadas *in vivo*, con el objetivo de determinar si la importancia de esta vía puede llegar a ser canónica en todas las subpoblaciones de células dendríticas. Estas subpoblaciones se obtienen mediante el cultivo de precursores hematopoyéticos de médula ósea murina, en presencia de las citoquinas FLT3-L y/o GM-CSF. El cultivo en presencia de FLT3-L (FLT3-L mDCs) (Fig. 3A) permite la diferenciación a una población heterogénea de DCs que son fenotípicas y funcionalmente equivalentes a las encontradas en los tejidos linfoides, ya que en estos cultivos primarios es posible generar células equivalentes a cDCs del tipo CD8 $\alpha^+$  o del tipo 1, cDCs equivalentes a la población CD8 $\alpha^-$  o del tipo 2 y una subpoblación equivalente a la población de DCs plasmacitoides (Naik et al., 2005). Por otra parte, el cultivo en presencia de GM-CSF (GM-CSF mDCs) (Fig. 3B) permite la diferenciación de precursores hematopoyéticos a células equivalentes a DCs generadas en contextos inflamatorios (moDCs), las que se caracterizan por expresar altos niveles de MHC-II y

de CD11c (Lutz y cols., 1999; Mildner & Jung, 2014). Finalmente, el cultivo en presencia de ambas citoquinas (Fig. 3C), permite la diferenciación a una única población de células dendríticas equivalentes a cDC del tipo 1 periféricas al ser positivas para la integrina CD103 (denominadas iCD103 mDCs por *immature* CD103 mDCs) (Mayer et al., 2014).



**Figura 3. Caracterización de células dendríticas murinas generadas *in vitro*.** A partir de precursores de médula ósea de un ratón C57BL/6 *wild type* se generaron 3 cultivos de mDCs. Cultivando los precursores en presencia de la citoquina hFLT3-L por 7-8 días se genera una población heterogénea de DCs equivalentes a células dendríticas convencionales y plasmacitoides (A), presencia de la citoquina mGM-CSF por 8-9 días se genera una población de moDCs (B) y en presencia de ambas citoquinas por 14-15 días se genera una población de iCD103 mDC o equivalentes a cDC tipo 1 periféricas (C). (D) Al término de cada cultivo se analizó por FACS la expresión en superficie marcadores para cada linaje. Se muestran histogramas representativos de 3 experimentos independientes junto con los MFI (*Mean Fluorescence Intensity*) correspondientes para cada marcador analizado. (E) Cuadro resumen de marcadores expresados en cada subpoblación de mDCs. +++: expresión alta, ++: expresión media, +: expresión baja, -: no expresa o es despreciable.

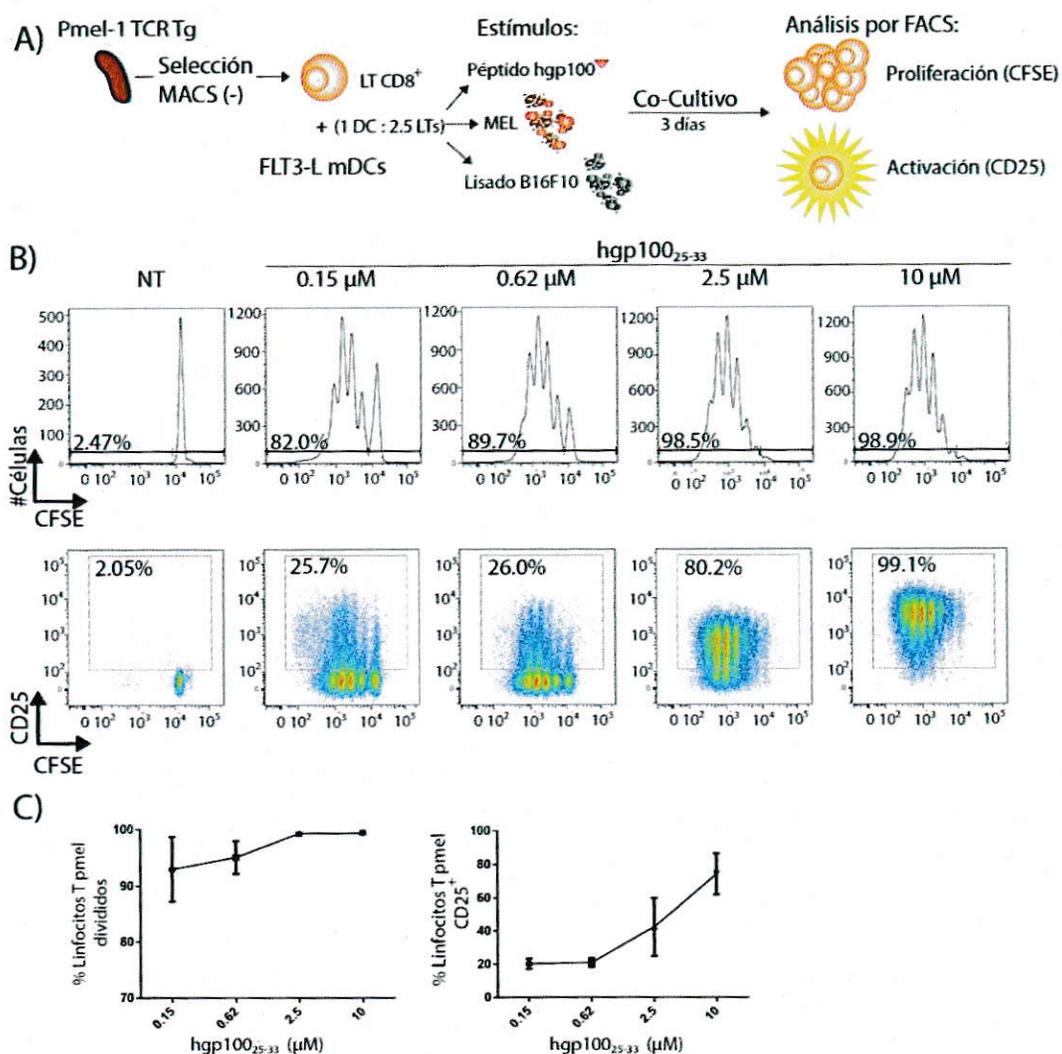
Según lo descrito al respecto de estos cultivos primarios, la generación de los 3 cultivos de mDCs *in vitro* fueron exitosamente establecidos, generando poblaciones CD11c<sup>+</sup> que son fenotípicamente distintas y que expresan los marcadores asociados a los linajes al cual representan (Fig. 3D). Por ejemplo, se ha reportado que las células equivalentes a cDC tipo 1 se caracterizan por altos niveles de expresión de los marcadores CD24 y XCR1, al igual que los cultivos de DCs equivalentes a CD103<sup>+</sup> periféricas, mientras que las células equivalentes a cDC tipo 2 se caracterizan por la expresión de la glicoproteína Sirp1 $\alpha$  (Naik et al., 2005). Por otra parte, las células equivalentes a la población de pDC, se caracterizan por ser CD11b<sup>-</sup> y tener altos niveles de expresión de B220. Finalmente, las células equivalentes a moDC, presentan altos niveles de CD11c y MHC-II (datos no mostrados), pero el marcador CD115, que es el receptor de la citoquina M-CSF (Pixley & Stanley, 2004), muestra que se genera una población heterogénea compuesta por DCs y macrófagos, lo cual ha sido reportado anteriormente en este tipo de cultivo (Helft y cols., 2015). Los marcadores expresados por cada subpoblación de DCs se encuentran resumidos en la Figura 3E. Por lo tanto, es posible afirmar que trabajamos con DCs equivalentes a distintos linajes bien definidos entre sí por los marcadores que expresan.

#### **Los linfocitos Pmel-1 responden y proliferan cuando se les presenta el antígeno gp100 derivado de lisados de melanoma humano**

Para simular y analizar la presentación cruzada de un antígeno tumoral trabajamos con linfocitos T CD8<sup>+</sup> obtenidos del ratón transgénico Pmel-1, los cuales poseen un TCR específico para el péptido 25-33 derivado de la proteína humana gp100, la cual se expresa en altos niveles en melanoma (Overwijk y cols., 2003). Además preparamos lisados celulares hechos a partir de líneas de melanoma humano

(MEL) o murino (lisado B16F10) como fuente de antígeno. Esto porque el receptor de los linfocitos Pmel-1 es capaz de reconocer el antígeno derivado de la proteína gp100 humana y murina, aunque se activan con mayor eficiencia cuando el antígeno es de origen humano (Overwijk y cols., 2003).

Para probar el modelo de estudio, se realizaron co-cultivos entre mDCs generadas en presencia de FLT3-L y LT CD8<sup>+</sup> purificados del bazo del ratón Pmel-1, en presencia de MEL o de lisado B16F10 (Fig. 4A) con el objetivo de comparar y corroborar que estos linfocitos son más afines al epítipo derivado de la proteína gp100 humana. Para poder determinar la sensibilidad del ensayo de proliferación, los linfocitos se co-cultivaron con mDCs que previamente fueron pulsadas con dosis crecientes del péptido hgp100<sub>25-33</sub> y se evaluó la proliferación y activación de los mismos al día 3 (Fig. 4B). Este diseño experimental permite solamente medir la capacidad de los LT CD8 específicos de reconocer el antígeno asociado al MHC clase I y no refleja el efecto de la presentación cruzada. El tamaño del péptido utilizado equivale a un antígeno ya procesado y el tiempo de incubación permite que el péptido se una de manera exógena a la molécula MHC-I ya presente en la membrana de las DCs. De esta forma se evita el paso del antígeno por la maquinaria de procesamiento celular. En nuestros resultados, se puede observar que a medida que aumenta la dosis de péptido, aumenta tanto la activación como la proliferación de los linfocitos (Fig. 4C), es decir, los linfocitos son capaces de activarse y proliferar en presencia de su antígeno específico. En base a esta titulación, definimos la concentración 2.5  $\mu$ M como óptima para ser utilizada como control positivo en futuros experimentos.



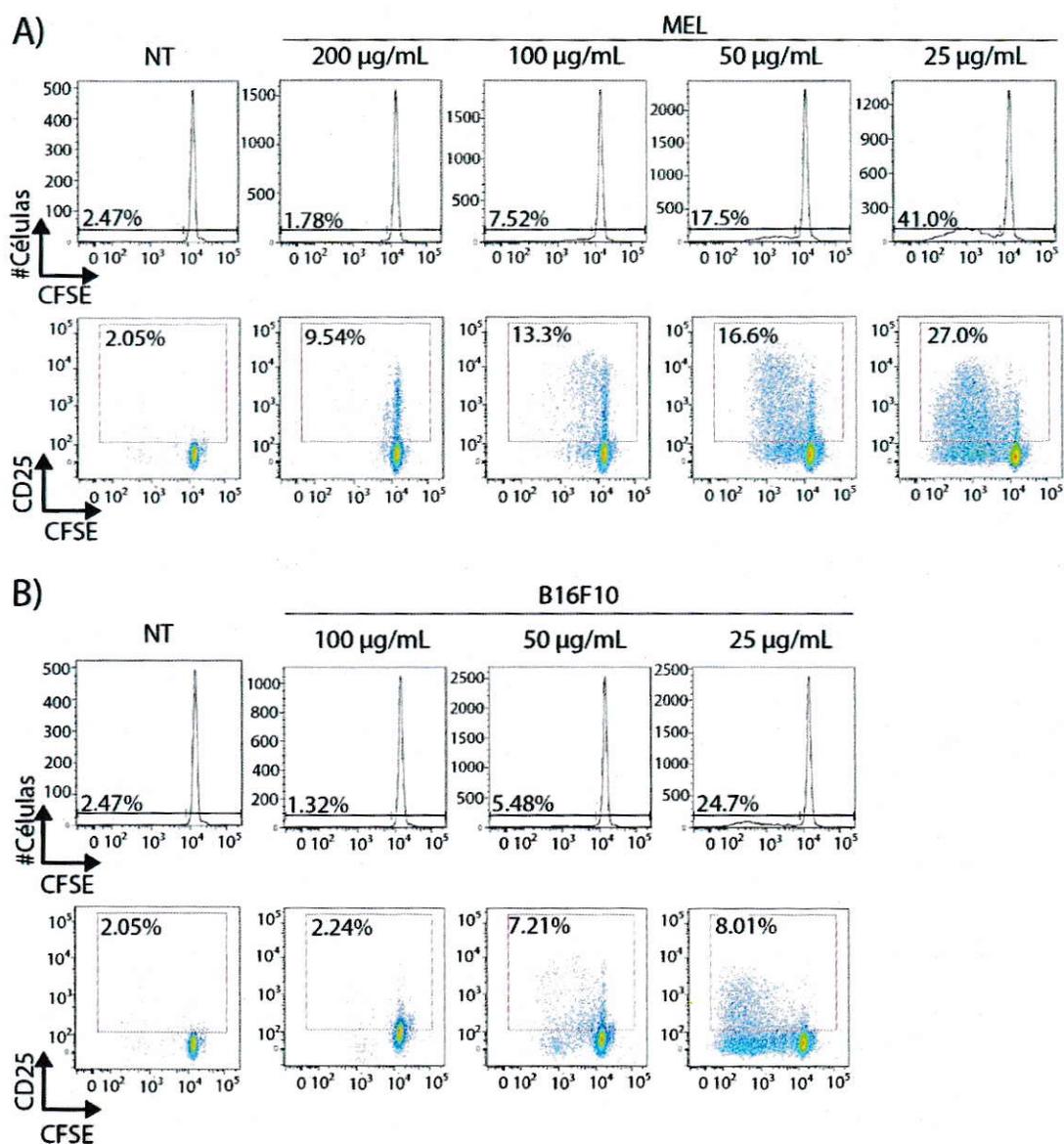
**Figura 4. Activación y proliferación de linfocitos Pmel-1 en presencia del antígeno purificado.** (A)  $5 \times 10^4$  Linfocitos T CD8<sup>+</sup> obtenidos del bazo de un ratón transgénico Pmel-1 por selección negativa de MACS fueron co-cultivados con  $2 \times 10^4$  FLT3-L mDCs pulsadas con distintas concentraciones de hgp100<sub>25-33</sub>, o en presencia de MEL o lisado B16F10 para evaluar activación y proliferación de los linfocitos al día 3 por FACS. (B) Histogramas (arriba) y dotplots (abajo) representativos de la proliferación y activación, respectivamente, de los LT CD8<sup>+</sup> cultivados con mDCs pulsadas con hgp100<sub>25-33</sub>. (C) Gráficos de medias conectadas que muestran la media  $\pm$  S.E.M. del porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> divididos (arriba) y del porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> tras ser cultivados con mDCs pulsadas con hgp100<sub>25-33</sub>. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes; \* =  $p \leq 0.05$  (t de student no pareado). NT: No Tratado.

Luego, se evaluó la proliferación y activación de los linfocitos en presencia de DCs y lisados celulares de melanoma utilizados como fuente de antígenos. En este caso podemos ver que tanto MEL (Fig. 5A) como lisados de B16F10 (Fig. 5B), son capaces de inducir activación y proliferación linfocitaria, fenómeno que no se observa cuando los linfocitos son estimulados con los lisados en ausencia de DCs (datos no mostrados), demostrando que el antígeno que está presente en los lisados debe ser adquirido, procesado y presentado por una DC para conducir a la activación linfocitaria. Además, se observó que la activación es mayor cuando se usa MEL (origen humano) como fuente de antígeno en comparación con lisado de B16F10 (origen murino), lo cual era esperable según lo reportado (Overwijk y cols., 2003). En todos los experimentos la condición control no tratada no muestra activación ni proliferación, por lo que se descarta una autoreactividad de los LTs contra antígenos propios.

#### **La inhibición de la actividad RNasa de IRE-1 $\alpha$ en mDCs disminuye la capacidad de activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral**

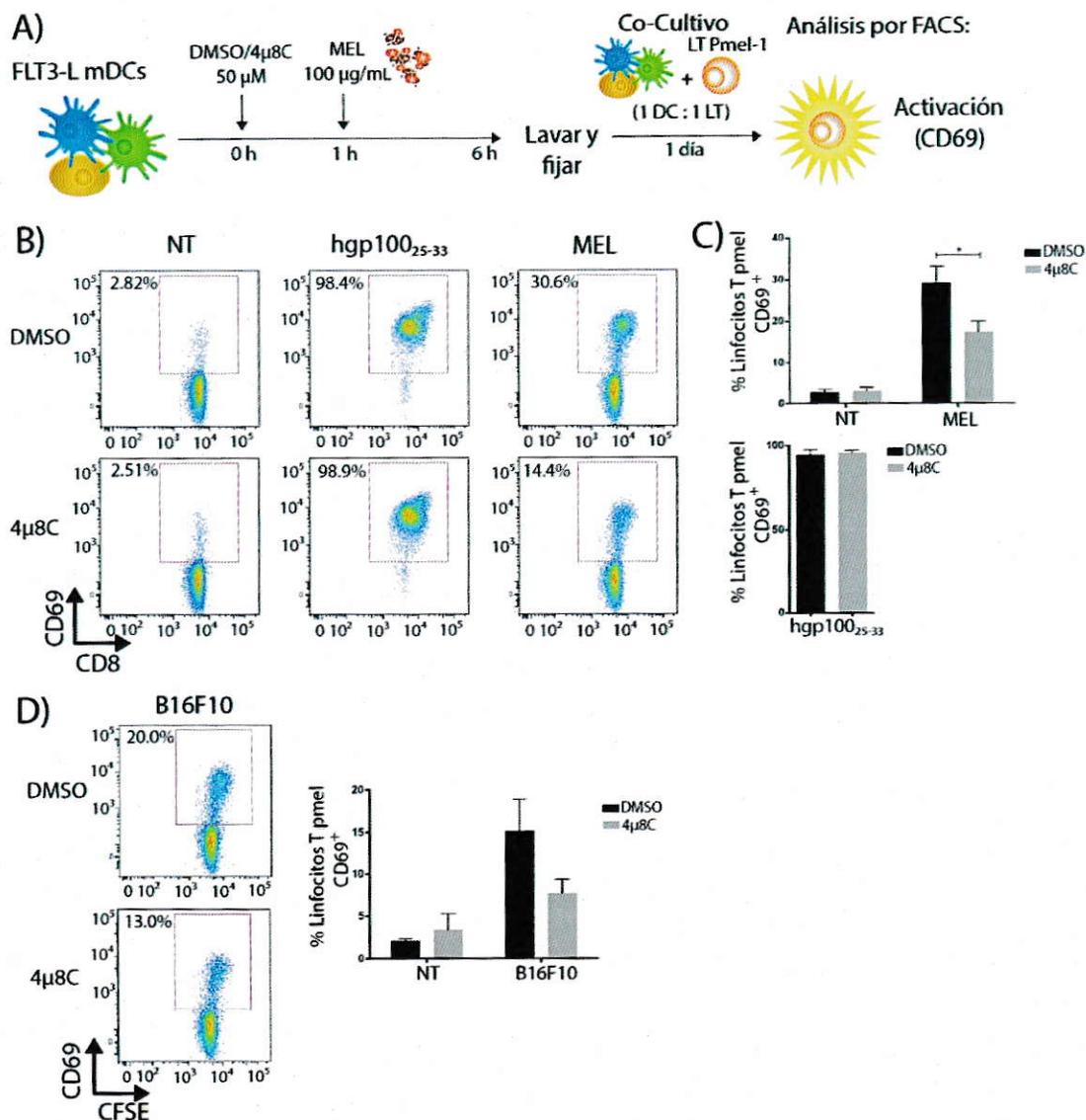
Para evaluar de manera específica la importancia del eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 sobre el procesamiento y la presentación cruzada de un antígeno tumoral, se utilizó un inhibidor generado recientemente llamado 4 $\mu$ 8C, el cual es un aldehído que inhibe específicamente y de manera reversible el dominio RNasa de la proteína IRE-1 $\alpha$ , evitando el *splicing* de XBP-1 y la subsecuente activación de la vía, inhibiendo también la inducción de RIDD (Cross et al., 2012). Trabajo previo del laboratorio demostró que 4 $\mu$ 8C no afecta la viabilidad de DCs generadas *in vitro*, ni tampoco influye en la capacidad de maduración de las mismas (Costoya, 2015). Las mDCs generadas *in vitro* fueron estimuladas con MEL en presencia o ausencia de 4 $\mu$ 8C para luego ser co-cultivadas con los LT CD8<sup>+</sup> específicos, para de esta forma asegurar un efecto del

inhibidor sobre el procesamiento y presentación de los antígenos asociados a MEL y no afectar la capacidad del linfocito T de reconocer el complejo MHC-I-péptido específico.



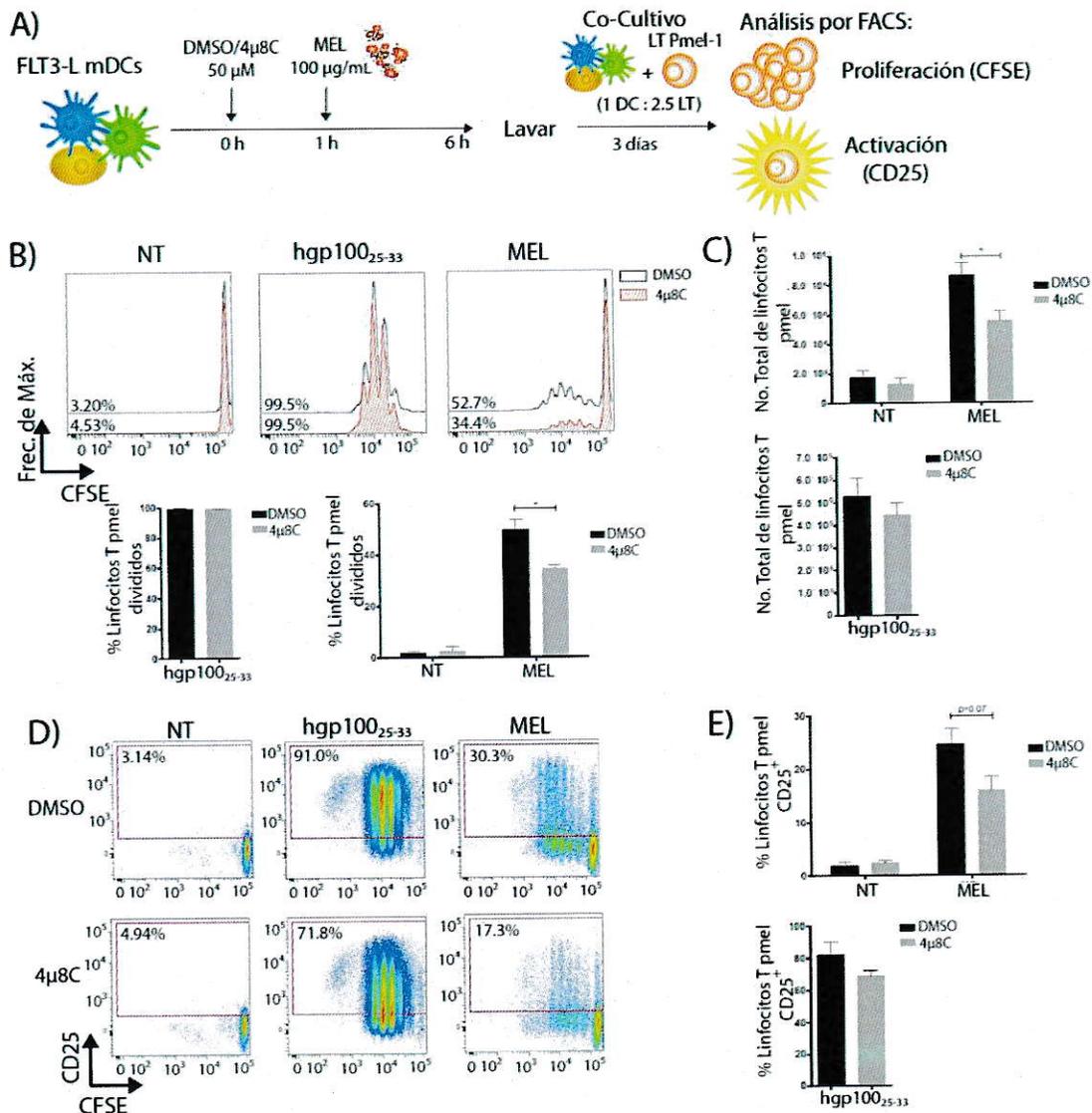
**Figura 5. Activación y proliferación de linfocitos Pmel-1 en presencia de lisados de melanoma.** (A) Histogramas (arriba) y dotplots (abajo) representativos de la proliferación y activación, respectivamente, de los LT CD8<sup>+</sup> cultivados con mDCs en presencia de MEL. (B) Histogramas (arriba) y dotplots (abajo) representativos de la proliferación y activación, respectivamente, de los LT CD8<sup>+</sup> cultivados con mDCs en presencia de lisados de B16F10. NT: No Tratado.

Primero evaluamos el efecto producido en la población heterogénea de mDCs generadas con la citoquina FLT3-L. Como se dijo anteriormente, las mDCs fueron estimuladas con MEL o péptido gp100<sub>25-33</sub> (como control positivo) en presencia o ausencia de 50  $\mu$ M del inhibidor 4 $\mu$ 8C por 6h, utilizando DMSO como control de vehículo. Luego las mDCs fueron lavadas y fijadas para poder evaluar el efecto sobre la presentación cruzada de un antígeno tumoral en un momento determinado (Fig. 6A). Esto se hizo además para evitar la recuperación de las mDCs del efecto de 4 $\mu$ 8C, ya que, como se dijo anteriormente, este es un inhibidor reversible y la DC demora menos de 4h en recuperar el *splicing* de XBP-1 una vez que el inhibidor es removido (Costoya, 2015). Estas mDCs fijadas fueron co-cultivadas con LTs Pmel-1 y se determinó la activación temprana de los mismos a través del marcador CD69 al día 1 del cultivo (Fig. 6B). Como resultado se obtuvo que LTs co-cultivados con mDCs tratadas con 4 $\mu$ 8C se activan significativamente menos en comparación con la condición control (Fig. 6C, arriba), mientras que las mDCs pulsadas con péptido no presentan diferencia entre tratamientos (Fig. 6C, abajo), demostrando un efecto específico del inhibidor sobre el procesamiento y presentación antigénica por parte de la mDCs. Una tendencia similar, aunque a escala menor, se observa cuando la fuente de antígenos son los lisados murinos (Fig. 6D).



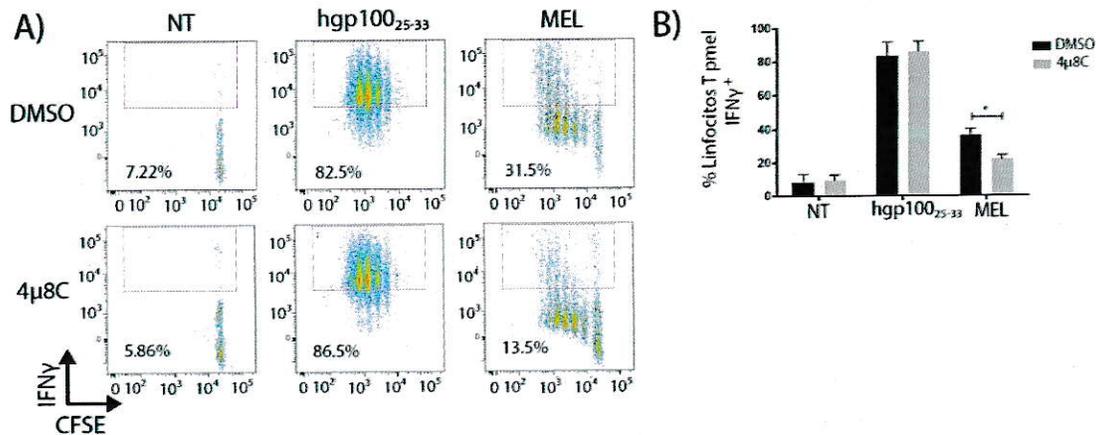
**Figura 6. El inhibidor 4μ8C disminuye la capacidad de FLT3-L mDCs de activar de manera temprana linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral.** (A) FLT3-L mDCs fueron incubadas con MEL (100 μg/mL) o con hgp100<sub>25-33</sub> (2.5 μM) en presencia del inhibidor 4μ8C (50 μM) o de DMSO como control de vehículo por 6h para luego ser lavadas y fijadas. 5x10<sup>4</sup> de estas mDCs fueron co-cultivadas con 5x10<sup>4</sup> LT CD8<sup>+</sup> Pmel-1 para evaluar activación temprana de estos último al día 1 por FACS. (B) Dotplots representativos de LT CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> (porcentaje al interior de cada gráfico). (C) Gráficos de barra del porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> tras ser co-cultivados con mDCs incubadas con MEL (arriba) o pulsadas con hgp100<sub>25-33</sub> (abajo). (D) Dotplots representativos (derecha) y Gráficos de barra (izquierda) del porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> tras ser co-cultivados con mDCs incubadas con lisados B16F10 (100 μg/mL) en presencia o ausencia de 4μ8C. Se muestran resultados de 6 (C) o 4 (D) experimentos independientes, media ± S.E.M, \* = p ≤ 0.05 (t de student no pareado). NT: No Tratado.

Luego de observar que, efectivamente, 4 $\mu$ 8C tiene un efecto en la presentación cruzada de antígenos tumorales, la cual se interpreta de manera indirecta a través de la cuantificación de la activación temprana de los linfocitos, se procedió a realizar los mismos experimentos pero ahora evaluando la proliferación y activación tardía de los LTs Pmel-1 (Fig. 7A). A diferencia de los anteriores, en estos experimentos se utilizaron mDCs vivas, ya que el proceso de activación a largo plazo de los LT es un proceso más dinámico que requiere co-estimulación y señales de retroalimentación por parte de la DCs, por lo que se necesita que la célula este biológicamente activa para que haya una activación completa del linfocito (Shipkova & Wieland, 2012). Para evaluar la proliferación, los linfocitos fueron marcados con CFSE previamente al co-cultivo con mDCs, una tinción fluorescente permeable a la membrana celular que se une covalentemente a componentes intracelulares (Parish, 1999), de manera que la proliferación se evalúa por la pérdida de esta tinción en cada división (*peaks*). Al evaluar la proliferación de los LTs por este método, se puede observar que LTs co-cultivados con mDCs con la vía IRE-1 $\alpha$  inhibida, proliferan menos que los estimulados con DCs normales (Fig. 7B), habiendo una menor cantidad de linfocitos final cuando se realiza el conteo de ellos (Fig. 7C). Al ver la activación tardía de los LTs Pmel-1 por la adquisición del marcador CD25 (Fig. 7D y E), vemos además que estos linfocitos tienden a activarse menos cuando son co-cultivados con FLT3-L mDCs cuyo eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 estuvo inhibido en presencia de MEL. En ambos casos, de proliferación (Fig. 7B, abajo; 7C, abajo) y activación (7E, abajo), el control positivo del experimento no se ve afectado de manera significativa por la aplicación del inhibidor sobre las mDCs, por lo que los resultados obtenidas también reflejan un defecto en el procesamiento y presentación de antígenos derivados de MEL.



**Figura 7. El inhibidor 4 $\mu$ 8C disminuye la capacidad de FLT3-L mDCs de activar e inducir la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral.** (A)  $2 \times 10^4$  FLT3-L mDCs fueron incubadas con MEL (100  $\mu$ g/mL) o con hgp100<sub>25-33</sub> (2.5  $\mu$ M) en presencia del inhibidor 4 $\mu$ 8C (50  $\mu$ M) o de DMSO como control de vehículo por 6h para luego ser lavadas y co-cultivadas con  $5 \times 10^4$  LT CD8<sup>+</sup> Pmel-1 para evaluar activación y proliferación de estos últimos al día 3 por FACS, luego lavadas y co-cultivadas). (B) Histogramas representativos (arriba) y gráficos de barra (abajo) del porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> divididos. (C) Gráficos de barra que muestran el número total de LT CD8<sup>+</sup> finales por condición. (D) Dotplots representativos y (E) gráficos de barra del porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>. Se muestran resultados de 3 (B), 7 (C), o 3 (E) experimentos independientes, media  $\pm$  S.E.M, \* =  $p \leq 0.05$  (t de student no pareado). NT: No Tratado.

Después de analizar la capacidad de estos linfocitos de activarse y proliferar cuando son co-cultivados con mDCs tratadas con 4 $\mu$ 8C, se quiso estudiar si esto también era capaz de modular la función efectora de LTs específicos para un antígeno tumoral, por lo que se evaluó la capacidad de los mismos para producir la citoquina inflamatoria IFN- $\gamma$  al día 3 de co-cultivo. Cuando se evaluó la producción de IFN $\gamma$  de LTs provenientes del co-cultivo luego de ser re-activados con PMA e Ionomicina, se pudo ver que aquellos que venían de co-cultivos con mDCs tratadas con el inhibidor producen una menor cantidad de citoquina que los controles (Fig. 8A y B) cuando la fuente de antígeno es MEL, lo cual no se observa cuando se co-cultivan con mDCs de ambas condiciones pulsadas con hgp100<sub>25-33</sub>, indicando nuevamente que esto es un efecto del procesamiento antigénico. Lo obtenido en todo lo analizado al día 3 del co-cultivo se condicen con lo obtenido para el día 1 del co-cultivo, lo que fortalece los resultados obtenidos.



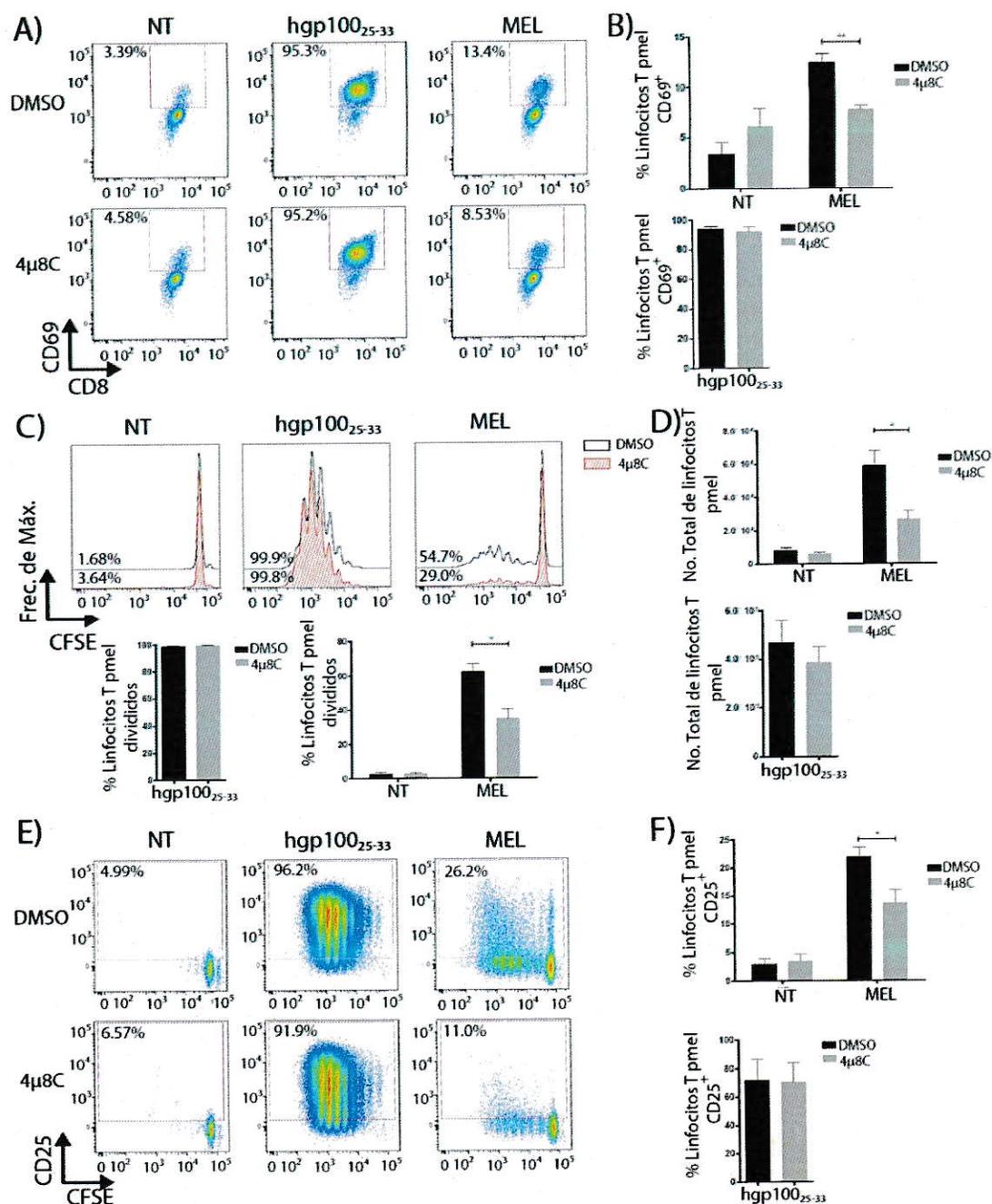
**Figura 8. El inhibidor 4μ8C disminuye la capacidad de FLT3-L mDCs de inducir una función efectora de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral.** LT CD8<sup>+</sup> Pmel-1 obtenidos del co-cultivo con FLT3-L mDCs en presencia o ausencia del inhibidor 4μ8C (50 μM), fueron re-estimulados para medir IFN-γ por citometría intracelular. (A) Dotplots representativos y (B) gráficos de barra del porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> IFN-γ<sup>+</sup>. Se muestran resultados de 4 experimentos independientes, media ± S.E.M., \* =  $p \leq 0.05$  (t de student no pareado). NT: No Tratado.

### **La inhibición de la actividad RNAsa de IRE-1 $\alpha$ disminuye la capacidad de activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral en modelos de mDCs de otros linajes**

Una vez determinado que la inhibición de IRE-1 $\alpha$  tenía un efecto sobre la presentación cruzada de antígenos tumorales por parte de las FLT3-L mDCs, reflejado en una menor activación, proliferación y función efectora de LTs específicos, se procedió a evaluar si se obtenía un efecto similar con los otros cultivos de DCs *in vitro* equivalentes a otros linajes o subpoblaciones con el objetivo de evaluar si esta función del eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 podría ser canónica entre varios linajes de DCs. Utilizando los mismos protocolos experimentales, se evaluaron los mismos parámetros de activación y proliferación de LTs para ver el efecto del inhibidor sobre la presentación cruzada de antígenos tumorales de iCD103 mDCs y GM-CSF mDCs.

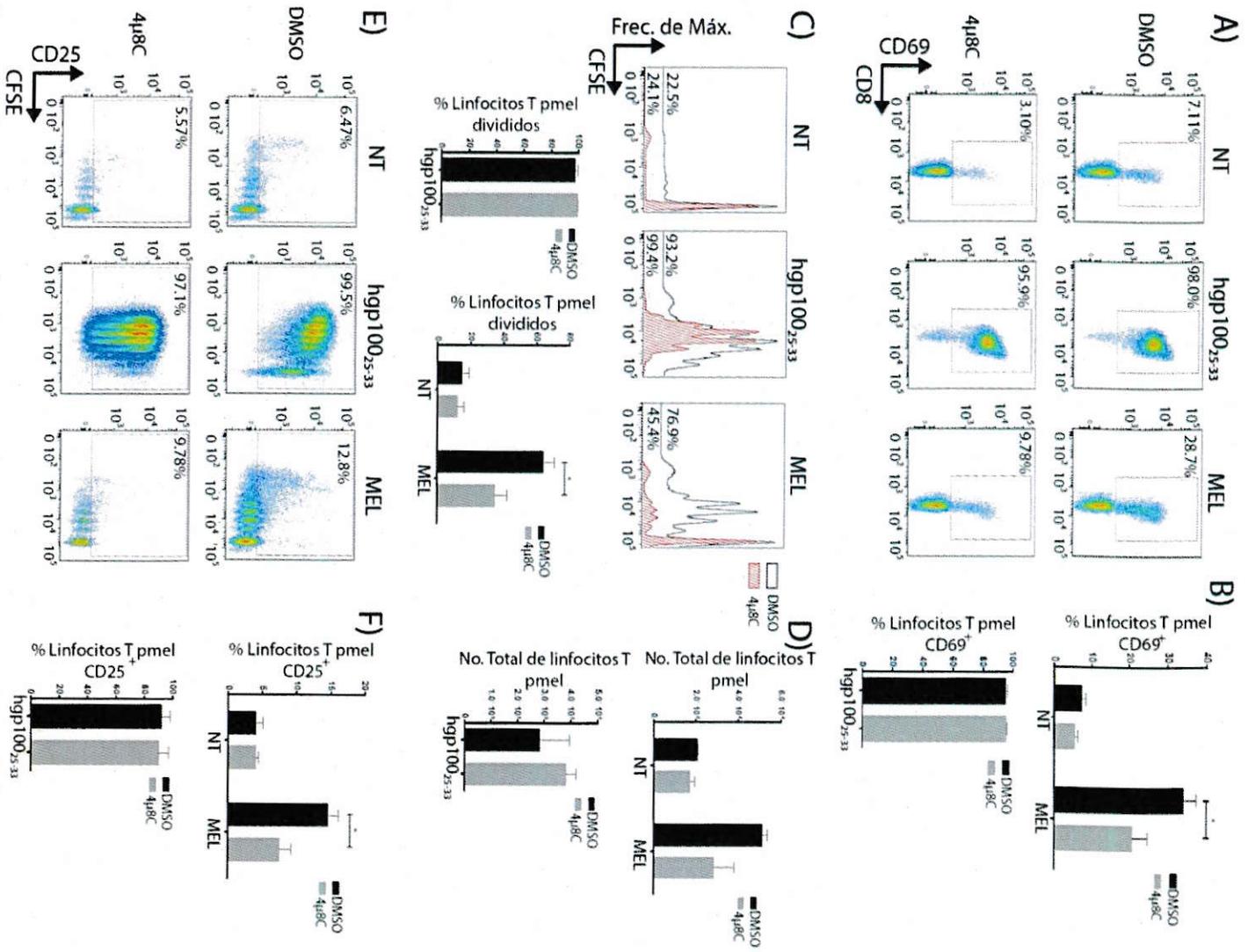
En el caso de los co-cultivos realizados con iCD103 mDCs (Fig. 9), se puede ver que los efectos son similares a los obtenidos anteriormente cuando las CD103 mDCs son tratadas con el inhibidor de IRE-1 $\alpha$  en presencia de MEL. Es decir, se observa que existe una disminución significativa en la activación (Fig. 9 A, B, E, F), en la proliferación (Fig. 9C) y el número total de linfocitos (Fig. 9D) al día 1 y al día 3 del co-cultivo, con mDCs fijadas y no fijadas, respectivamente. También se observa que el control positivo del experimento no se ve afectado por el inhibidor, pudiendo atribuir nuevamente el efecto a una deficiencia en el procesamiento y presentación antigénica por parte de esta población homogénea de mDCs. Esto mismo se repite cuando se observan los resultados obtenidos para los co-cultivos realizados con GM-CSF mDCs (Fig. 10), tanto para la proliferación (Fig. 10 A, B, E, F) como para la activación (Fig. 10 C, D) de los LTs Pmel-1. Esto indica que es posible que el eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1s tenga un

rol conservado a lo largo de distintos linajes de DCs en la regulación del procesamiento y presentación cruzada de antígenos derivados de un ambiente tumoral.



**Figura 9.** El inhibidor 4μ8C disminuye la capacidad de CD103 mDCs de activar e inducir la proliferación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral. iCD103 mDCs fueron incubadas con MEL (100 μg/mL) o hgp100<sub>25-33</sub> (2.5 μM), en presencia del inhibidor 4μ8C (50 μM) o de DMSO como control de vehículo por 6h para luego ser lavadas y fijadas o co-cultivadas sin fijar. 5x10<sup>4</sup> de mDCs fijadas o 2x10<sup>4</sup> de mDCs sin fijar fueron co-cultivadas con 5x10<sup>4</sup> LT CD8<sup>+</sup> Pmel-1 para evaluar activación

temprana o activación y proliferación de estos últimos al día 1 o al día 3 por FACS, respectivamente. (A) Dotplots representativos de LT CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>. (B) Gráficos de barra del porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> tras ser co-cultivados con mDCs incubadas con MEL (arriba) o pulsadas con hgp100<sub>25-33</sub> (abajo). (C) Histogramas representativos (arriba) y gráficos de barra (abajo) del porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> divididos. (D) Gráficos de barra que muestran el número total de LT CD8<sup>+</sup> finales por condición. (E) Dotplots representativos y (F) gráficos de barra del porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>. Se muestran resultados de 3 (B, C, D y E) experimentos independientes, media  $\pm$  S.E.M, \* =  $p \leq 0.05$  (t de student no pareado). NT: No Tratado.



**Figura 10. El inhibidor 4μ8C disminuye la capacidad de GM-CSF mDCs de activar e inducir la proliferacion de linfocitos T CD8+ específicos para un antígeno tumoral. GM-CSF mDCs fueron incubadas con MEL (100 μg/mL) o hgp100.25-33 (2.5 μM) en presencia del inhibidor 4μ8C (50 μM) o de DMSO como control de vehículo por**

6h para luego ser lavadas y fijadas o co-cultivadas sin fijar.  $5 \times 10^4$  de mDCs fijadas o  $2 \times 10^4$  de mDCs sin fijar fueron co-cultivadas con  $5 \times 10^4$  LT CD8<sup>+</sup> Pmel-1 para evaluar activación temprana o activación y proliferación de estos últimos al día 1 o al día 3 por FACS, respectivamente. (A) Dotplots representativos de LT CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup>. (B) Gráficos de barra del porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> tras ser co-cultivados con mDCs incubadas con MEL (arriba) o pulsadas con hgp100<sub>25-33</sub> (abajo). (C) Histogramas representativos (arriba) y gráficos de barra (abajo) del porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> divididos. (D) Gráficos de barra que muestran el número total de LT CD8<sup>+</sup> finales por condición. (E) Dotplots representativos y (F) gráficos de barra del porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>. Se muestran resultados de 6 (B), 4 (C), 3 (D y E) experimentos independientes, media  $\pm$  S.E.M, \* =  $p \leq 0.05$  (t de student no pareado). NT: No Tratado.

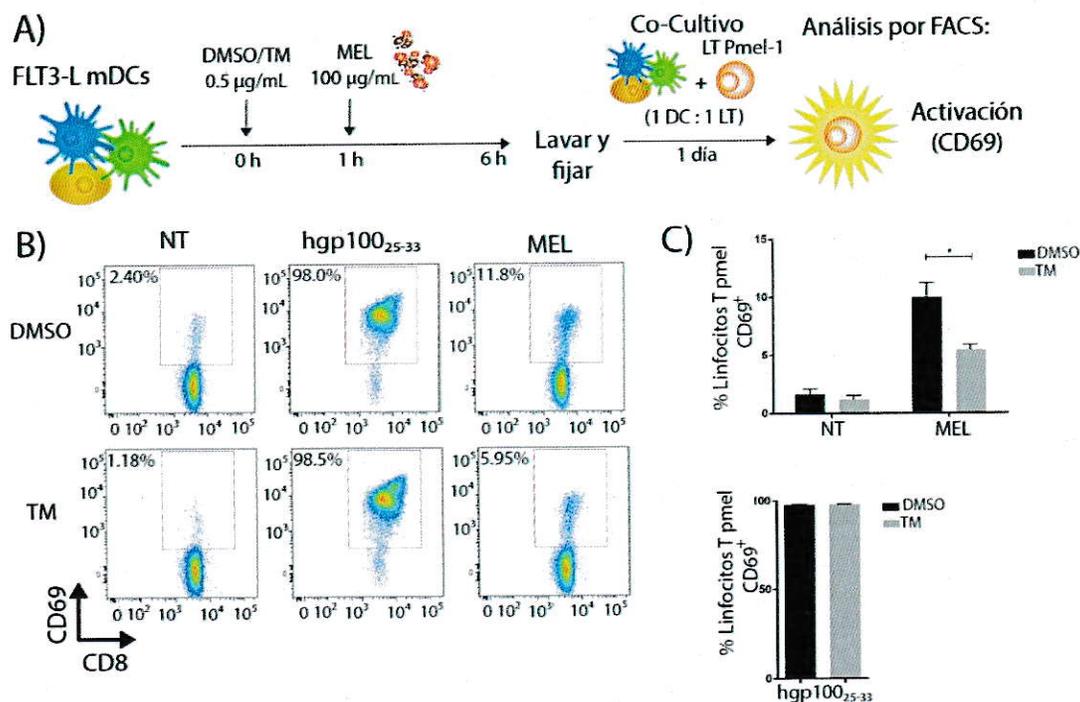
Sin embargo, resulta interesante observar diferencias entre los 3 cultivos de mDCs en cuanto a los umbrales de proliferación y activación obtenidos en los co-cultivos. Al observar los resultados obtenidos con los co-cultivos realizados con CD103 mDCs podemos notar que en general presentan valores similares de activación y proliferación de LTs a los co-cultivos realizados con las otras mDCs, excepto en el caso de la activación temprana (Fig.5 A, B), donde el porcentaje de LTs CD69<sup>+</sup> llega alrededor de un 13%, siendo que en los co-cultivos realizados con FLT3-L mDCs y GM-CSF mDCs llegan alrededor de 30% en ambos casos (Fig. 3 B, C; Fig. 6 A, B). De manera similar, los co-cultivos realizados con GM-CSF mDCs presentan valores similares de activación y proliferación de LTs, pero en este caso la excepción ocurre en la activación tardía de los LTs, donde el porcentaje de LTs CD25<sup>+</sup> llega alrededor de un 15% en comparación donde llega alrededor de un 30% tanto para los co-cultivos con FLT3-L mDCs (Fig. D, E) como para los con CD103 mDCs (Fig. 5 C, D). Además, los co-cultivos realizados con GM-CSF mDCs llegan a tener un umbral de proliferación ligeramente mayor, llegando alrededor de un 70% (Fig. 6 A, B). Estas diferencias entre los porcentajes de activación y proliferación de los LTs en los co-cultivos con distintas mDCs generadas *in vitro*, podrían ser un reflejo de las funciones especializadas propias de los linajes a los cuales son equivalentes estas DCs.

#### **La activación de la respuesta a proteínas mal plegadas en DCs disminuye la capacidad de activar linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral**

Con el objetivo de indagar más y tener antecedentes sobre un posible efecto del UPR y/o ver si el efecto observado sobre la presentación cruzada de antígenos tumorales era específico para la inhibición de IRE-1 $\alpha$ , se realizaron co-cultivos de linfocitos T CD8<sup>+</sup> Pmel-1 con FLT3-L mDCs previamente estimuladas con MEL en

presencia o ausencia del activador de UPR tunicamicina (TM), un inhibidor general de la glicosilación de proteínas que induce la acumulación de glicoproteínas mal plegadas en el RE y, consecutivamente, la activación de las tres ramas del UPR (Brandish y cols., 1996). En el protocolo utilizado (Fig. 11A), la TM es capaz de inducir el *splicing* de XBP-1 y, durante el tiempo utilizado, no afecta la viabilidad celular (datos no mostrados).

En este caso solamente se estudió el efecto producido en la activación temprana de linfocitos usando mDCs fijadas (Fig. 11B), observando sorprendentemente que también ocurre una disminución significativa de la capacidad de estos LTs de activarse (Fig. 11C), aunque no se puede atribuir este efecto solamente a la activación o sobreactivación del eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1s, ya que, por una parte, TM afecta la glicosilación proteica de manera general, regulando otros procesos biológicos; y, por otra parte, la adición de esta droga activa no solo IRE-1 $\alpha$ , sino que también los otros ejes del UPR, por lo que la respuesta inducida por ellos influye en el resultado.



**Figura 11. El activador de UPR tunicamicina disminuye la capacidad de FLT3-L mDCs de activar de manera temprana linfocitos T CD8<sup>+</sup> específicos para un antígeno tumoral.** (A) FLT3-L mDCs fueron incubadas con MEL (100 µg/mL) o hgp100<sub>25-33</sub> (2.5 µM), en presencia de TM (0.5 µg/mL) o de DMSO como control de vehículo por 6h para luego ser lavadas y fijadas. 5x10<sup>4</sup> de estas mDCs fueron co-cultivadas con 5x10<sup>4</sup> LT CD8<sup>+</sup> Pmel-1 para evaluar activación temprana de estos último al día 1 por FACS. (B) Dotplots representativos de LT CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> (porcentaje al interior de cada gráfico). (C) Gráficos de barra del porcentaje de LT CD8<sup>+</sup> CD69<sup>+</sup> tras ser co-cultivados con mDCs incubadas con MEL (arriba) o pulsadas con hgp100<sub>25-33</sub> (abajo). Se muestran resultados de 3 experimentos independientes, media ± S.E.M, \* = p ≤ 0.05 (t de student no pareado). NT: No Tratado.

## DISCUSIÓN

Las DCs cumplen un rol esencial en el sistema inmune, siendo por excelencia las células encargadas de activar y modular la respuesta inmune dependiente de linfocitos T contra un antígeno específico. Por esta razón, estudiar diferentes aspectos de la biología y funcionalidad de las DCs es de gran importancia para entender cómo estas células son capaces realizar estos procesos. Entre otros aspectos, es relevante estudiar el posible rol de la respuesta a proteínas mal plegadas, en particular la vía IRE-1 $\alpha$ /XBP-1, en procesos distintos al de mantener la fidelidad del proteoma celular, especialmente porque en los últimos años se ha acumulado bastante evidencia de que esta vía influye directamente en la funcionalidad de células que componen el sistema inmunológico, entre ellas, las DCs (Grootjans y cols., 2016).

Considerando la evidencia que existe sobre el rol del eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 sobre el desarrollo y la funcionalidad de DCs, es decir, que la activación de esta vía es necesaria para la diferenciación de DCs de ciertos linajes (Iwakoshi y cols., 2007; Osorio y cols., 2014) y que es capaz de modular directamente proteínas que participan en la presentación de antígenos derivados de células muertas (Osorio y cols., 2014; Subramanian & Tabas, 2014), en este trabajo se quiso indagar sobre la importancia de esta vía en la presentación cruzada de antígenos derivados de células tumorales. Esto porque el ambiente tumoral representa un contexto inflamatorio que contiene señales capaces de activar la vía dependiente de IRE-1 $\alpha$  (Costoya, 2015; Cubillos-Ruiz y cols., 2015).

Realizando co-cultivos con linfocitos T CD8<sup>+</sup> derivados de un ratón Pmel-1, obtuvimos que tanto la activación como la proliferación de estos linfocitos se ve disminuida cuando estos son activados con mDCs equivalentes a distintos linajes que

tienen inhibido el dominio RNAsa de la proteína IRE-1 $\alpha$  y, por lo tanto, tienen inhibido cualquier regulación dependiente de este dominio y de la activación del factor de transcripción XBP-1 (Fig. 6-10). Este efecto sobre la activación y proliferación de los linfocitos refleja un defecto en el procesamiento y/o posterior presentación cruzada del antígeno derivado de los lisados de melanoma, resultando en una menor frecuencia de complejos de MHC-I cargados con el péptido de la proteína gp100 (procesado intracelularmente) en la membrana extracelular. El control positivo de los experimentos, es decir, la incubación de las distintas DCs con el péptido hgp100, muestra que no hay diferencias significativas entre aquellas que fueron estimuladas con 4 $\mu$ 8C versus el control de vehículo DMSO en los distintos parámetros estudiados para ver el efecto sobre los LTs específicos (Fig. 6-10). Esto indica que la reducción de la proliferación linfocitaria observada en respuesta al procesamiento del antígeno derivado MEL no puede ser atribuida a una reducción en la presencia de moléculas MHC-I de superficie y por lo tanto, es atribuible al proceso de presentación cruzada. Además, para verificar que el inhibidor 4 $\mu$ 8C afecta específicamente el procesamiento antigénico y no el reconocimiento y fagocitosis del mismo, en el laboratorio se realizaron ensayos de fagocitosis de MEL en presencia y ausencia del inhibidor, en los cuales se obtuvo que no había un efecto del inhibidor en la captación de MEL (Barrios, Unidad de Investigación, 2016). Por lo tanto, en su conjunto estos resultados nos permiten afirmar que la disminución de la presentación cruzada de antígenos tumorales se debe a que IRE-1 $\alpha$  regula directamente el proceso de presentación cruzada de antígenos tumorales (y no afecta la frecuencia de expresión de MHC-I en la superficie celular), y que la activación de esta vía es necesaria para que este proceso ocurra de manera eficiente.

Estos resultados se condicen con trabajo previo del laboratorio, donde se había visto que el uso del inhibidor sobre las FLT3-L mDCs disminuía la capacidad de estas células de realizar presentación cruzada de la proteína Ovoalbúmina (OVA) cuando se usaba MEL como adyuvante (Costoya, 2015), especialmente en el linaje equivalente a las cDC tipo 1 (Anexo 1). Sin embargo, en este trabajo resulta interesante notar que la inhibición de IRE-1 $\alpha$  afecta la presentación cruzada de antígenos tumorales de DCs equivalentes a distintos linajes u ontogenia, ya que por un lado están las FLT3-L mDCs, en donde se genera una población heterogénea de DCs equivalentes a DCs convencionales y plasmacitoides (Fig. 6-8), y por otro lado las GM-CSF mDCs y iCD103 mDCs, que generan una única población de DCs equivalentes a moDCs y cDC tipo 1 periféricas, respectivamente (Fig. 9 y 10), sugiriendo un posible rol canónico del eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 en la presentación cruzada de antígenos tumorales.

En línea con lo anterior, existe evidencia de que el eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 modula proteínas involucradas en el procesamiento y transporte de antígenos al interior celular. Entre estas es importante mencionar la proteína tapasina, que se encarga de unir la proteína transportadora TAP con el MHC-I en el ER con el objetivo de facilitar la carga del péptido en el complejo (Blum y cols., 2013; Joffre y cols., 2012) y cuyo mRNA es blanco de RIDD. Sin embargo, en nuestro sistema de estudio RIDD esta inhibido, por lo tanto, es posible que la vía IRE-1 $\alpha$ /XBP-1, a través del *splicing* de XBP-1, sea necesaria para la inducción de ciertas proteínas que participan en los mecanismos de la presentación cruzada. Recientemente, se ha identificado que un blanco molecular de XBP-1 es el responsable de translocar péptidos desde el fagosoma hacia el citosol, paso esencial en la ruta citósolica de presentación cruzada, este blanco corresponde a la proteína Sec61 que clásicamente se conoce por translocar polipéptidos desde el

citoplasma hacia el ER (Shoulders y cols., 2013; Zehner y cols., 2015). Por lo tanto, la disminución de la presentación cruzada de antígenos tumorales en nuestro sistema podría explicarse por la falta de inducción de la proteína de la proteína Sec61 que modula un paso fundamental en la ruta citosólica de presentación cruzada. También explicaría porque la disminución es parcial y no total pues se puede seguir realizando presentación cruzada por la ruta vacuolar.

En contraste con nuestros datos, existe evidencia de que cDCs tipo 2 deficientes para XBP-1 controlan más eficientemente el crecimiento tumoral (Cubillos-Ruiz y cols., 2015), y en ese mismo trabajo, GM-CSF mDCs deficientes para XBP-1 pulsadas con OVA en presencia de medio condicionado de tumor ovárico, resultaban más eficientes al momento de activar linfocitos OT-I. En este sentido, no solo es importante considerar el linaje de la DC, sino también el momento en que se modula el eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1, pues la biología de una DC en desarrollo y una diferenciada e incluso una activada son muy distintas (Pearce & Everts, 2015), y también influye de manera importante si la inhibición del eje IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 es permanente o transitoria, pues de eso depende si la célula es capaz de recuperarse o debe sufrir una adaptación compensatoria permanente para volver a la homeostasis.

Con el objetivo de contrastar la situación en que IRE-1 $\alpha$  se encuentra inhibido, utilizamos un activador canónico y ampliamente usado del UPR, la TM, para realizar los mismos co-cultivos y estudiar la activación de los linfocitos. En este caso, obtuvimos que la activación de los linfocitos es menor cuando se co-cultivan con DCs que son pre-tratadas con TM, reflejando también un defecto en la presentación cruzada de antígenos tumorales. Sin embargo, en este caso es difícil atribuirle este efecto a la activación de IRE-1 $\alpha$ , pues con la TM se activan las tres ramas del UPR (IRE-1 $\alpha$ ,

PERK, ATF-6) por lo que el efecto observado podría deberse a cualquiera de las tres vías por su acción en conjunto o por separado, o simplemente a que el ER se encuentra estresado y, por lo tanto, no es capaz de desempeñar sus funciones correctamente.

En resumen en este trabajo hemos determinado que la vía IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 tiene un rol importante en la presentación cruzada de antígenos tumorales, siendo necesaria su activación para que esta ocurra de manera eficiente. Como este efecto se produce en DCs de distintos tipos generadas *in vitro*, estos resultados sugieren que la vía podría ser un regulador general de la presentación cruzada de antígenos tumorales.

Dentro de las perspectivas de este trabajo de tesis está el avanzar hacia un modelo *in vivo*, inyectando linfocitos Pmel-1 y DCs tratadas con el inhibidor 4 $\mu$ 8C para y también realizar ensayos de vacunas basadas en DCs para tratamiento de melanoma murino para determinar si la vía IRE-1 $\alpha$ /XBP-1 puede convertirse en una alternativa terapéutica en el desarrollo de inmunoterapias contra el cáncer.

## CONCLUSIONES

A partir del estudio realizado en este trabajo de tesis, observamos que cuando las DCs de distintos linajes generadas *in vitro* son tratadas con un inhibidor específico para la actividad RNAsa de IRE1 $\alpha$ , disminuyen su capacidad de hacer presentación cruzada de un antígeno tumoral modelo, lo que se ve reflejado en una disminución en su capacidad de activar linfocitos antígeno-específicos. Estos resultados permiten afirmar la hipótesis propuesta ya que la señalización del eje IRE1 $\alpha$ /XBP-1s en DCs demuestra ser necesaria para una eficiente presentación cruzada de antígenos tumorales, siendo además este un efecto extrapolable a otros tipos de DCs.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahrens, S., Zelenay, S., Sancho, D., Hanč, P., Kjær, S., Feest, C., Fletcher, G., Durkin, C., Postigo, A., Skehel, M., et al. (2012). F-actin is an evolutionarily conserved damage-associated molecular pattern recognized by DNGR-1, a receptor for dead cells. *Immunity* 36, 635–645.
- Askew, D., and Harding, C.V. (2008). Antigen processing and CD24 expression determine antigen presentation by splenic CD4+ and CD8+ dendritic cells. *Immunology* 123, 447–455.
- Bedoui, S., Whitney, P.G., Waithman, J., Eidsmo, L., Wakim, L., Caminschi, I., Allan, R.S., Wojtasiak, M., Shortman, K., Carbone, F.R., et al. (2009). Cross-presentation of viral and self antigens by skin-derived CD103+ dendritic cells. *Nat. Immunol.* 10, 488–495.
- Bettigole, S.E., and Glimcher, L.H. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress in Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 107–138.
- Bettigole, S.E., Lis, R., Adoro, S., Lee, A.-H., Spencer, L.A., Weller, P.F., and Glimcher, L.H. (2015). The transcription factor XBP1 is selectively required for eosinophil differentiation. *Nat. Immunol.* 16, 829–837.
- Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of Antigen Processing. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 443–473.
- Brandish, P.E., Kimura, K.I., Inukai, M., Southgate, R., Lonsdale, J.T., and Bugg, T.D. (1996). Modes of action of tunicamycin, liposidomycin B, and mureidomycin A: inhibition of phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide translocase from *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40, 1640–1644.
- Cantrell, D. (2015). Signaling in Lymphocyte Activation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 7, a018788.
- Chaplin, D.D. (2010). Overview of the immune response. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S3–S23.
- Chávez-Galán, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chávez, R., and Lascurain, R. (2009). Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.* 6, 15–25.
- Cho, J.A., Lee, A.-H., Platzer, B., Cross, B.C.S., Gardner, B.M., De Luca, H., Luong, P., Harding, H.P., Glimcher, L.H., Walter, P., et al. (2013). The Unfolded Protein Response Element IRE1 $\alpha$  Senses Bacterial Proteins Invading the ER to Activate RIG-I and Innate Immune Signaling. *Cell Host Microbe* 13, 558–569.
- Coelho, D.S., and Domingos, P.M. (2014). Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay. *Front. Genet.* 5, 76.

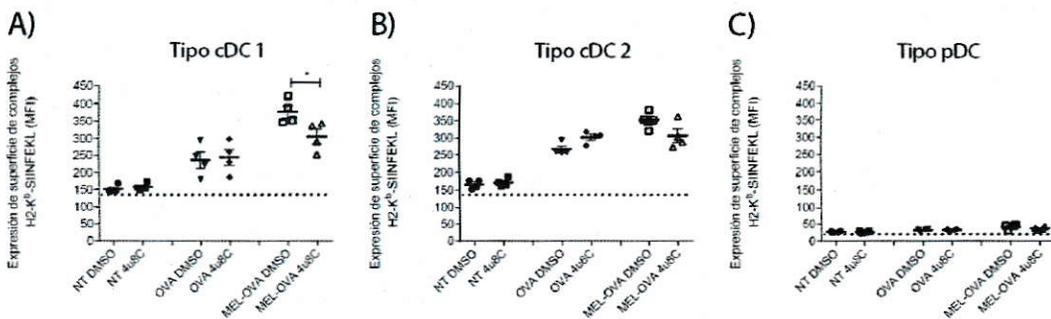
- Costoya, C. Identificación de activadores inmunológicos de la vía asociada a la respuesta a proteínas mal plegadas IRE1 $\alpha$ /XBP-1s en células dendríticas. Santiago, Chile. 2015. Presentado en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.
- Cross, B.C.S., Bond, P.J., Sadowski, P.G., Jha, B.K., Zak, J., Goodman, J.M., Silverman, R.H., Neubert, T.A., Baxendale, I.R., Ron, D., et al. (2012). The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *109*, E869–E878.
- Cubillos-Ruiz, J.R., Silberman, P.C., Rutkowski, M.R., Chopra, S., Perales-Puchalt, A., Song, M., Zhang, S., Bettigole, S.E., Gupta, D., Holcomb, K., et al. (2015). ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis. *Cell* *161*, 1527–1538.
- Durai, V., and Murphy, K.M. (2016). Functions of Murine Dendritic Cells. *Immunity* *45*, 719–736.
- Gajewski, T.F., Schreiber, H., and Fu, Y.-X. (2013). Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat. Immunol.* *14*, 1014–1022.
- Gardner, B.M., Pincus, D., Gotthardt, K., Gallagher, C.M., and Walter, P. (2013). Endoplasmic reticulum stress sensing in the unfolded protein response. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a013169.
- Grootjans, J., Kaser, A., Kaufman, R.J., and Blumberg, R.S. (2016). The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* *16*, 469–484.
- Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S.H., Onai, N., Schraml, B.U., Segura, E., Tussiwand, R., and Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 571–578.
- Den Haan, J.M., Lehar, S.M., and Bevan, M.J. (2000). CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. *J. Exp. Med.* *192*, 1685–1696.
- Heath, W.R., and Carbone, F.R. (2009). Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces. *Nat. Immunol.* *10*, 1237–1244.
- Heesters, B.A., Poel, C.E. van der, Das, A., and Carroll, M.C. (2016). Antigen Presentation to B Cells. *Trends Immunol.* *0*.
- Helft, J., Böttcher, J., Chakravarty, P., Zelenay, S., Huotari, J., Schraml, B.U., Goubau, D., and Reis e Sousa, C. (2015). GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c<sup>+</sup>MHCII<sup>+</sup> Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* *42*, 1197–1211.
- Hildner, K., Edelson, B.T., Purtha, W.E., Diamond, M., Matsushita, H., Kohyama, M., Calderon, B., Schraml, B.U., Unanue, E.R., Diamond, M.S., et al. (2008). Batf3 Deficiency Reveals a Critical Role for CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> Dendritic Cells in Cytotoxic T Cell Immunity. *Science* *322*, 1097–1100.

- Iwakoshi, N.N., Pypaert, M., and Glimcher, L.H. (2007). The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J. Exp. Med.* *204*, 2267–2275.
- Janssens, S., Pulendran, B., and Lambrecht, B.N. (2014). Emerging functions of the unfolded protein response in immunity. *Nat. Immunol.* *15*, 910–919.
- Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nat. Rev. Immunol.* *12*, 557–569.
- Kambayashi, T., and Laufer, T.M. (2014). Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell? *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 719–730.
- Liou, H.C., Boothby, M.R., Finn, P.W., Davidon, R., Nabavi, N., Zeleznik-Le, N.J., Ting, J.P., and Glimcher, L.H. (1990). A new member of the leucine zipper class of proteins that binds to the HLA DR alpha promoter. *Science* *247*, 1581–1584.
- Liu, K., and Nussenzweig, M.C. (2010). Origin and development of dendritic cells. *Immunol. Rev.* *234*, 45–54.
- Lutz, M.B., Kukutsch, N., Ogilvie, A.L.J., Rößner, S., Koch, F., Romani, N., and Schuler, G. (1999). An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J. Immunol. Methods* *223*, 77–92.
- Martinon, F., and van der Goot, F.G. (2013). Did Cholera Toxin Finally Get Caught? *Cell Host Microbe* *13*, 501–503.
- Martinon, F., Chen, X., Lee, A.-H., and Glimcher, L.H. (2010). TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat. Immunol.* *11*, 411–418.
- Mayer, C.T., Ghorbani, P., Nandan, A., Dudek, M., Arnold-Schrauf, C., Hesse, C., Berod, L., Stüve, P., Puttur, F., Merad, M., et al. (2014). Selective and efficient generation of functional Batf3-dependent CD103<sup>+</sup> dendritic cells from mouse bone marrow. *Blood* *124*, 3081–3091.
- Melero, I., Gaudernack, G., Gerritsen, W., Huber, C., Parmiani, G., Scholl, S., Thatcher, N., Wagstaff, J., Zielinski, C., Faulkner, I., et al. (2014). Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* *11*, 509–524.
- Mildner, A., and Jung, S. (2014). Development and function of dendritic cell subsets. *Immunity* *40*, 642–656.
- Mogensen, T.H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* *22*, 240–273, Table of Contents.
- Naik, S.H., Proietto, A.I., Wilson, N.S., Dakic, A., Schnorrer, P., Fuchsberger, M., Lahoud, M.H., O’Keeffe, M., Shao, Q., Chen, W., et al. (2005). Cutting edge: generation of splenic CD8<sup>+</sup> and CD8<sup>-</sup> dendritic cell equivalents in Fms-like tyrosine kinase 3 ligand bone marrow cultures. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *174*, 6592–6597.

- Osorio, F., Tavernier, S.J., Hoffmann, E., Saeys, Y., Martens, L., Vettters, J., Delrue, I., De Rycke, R., Parthoens, E., Pouliot, P., et al. (2014). The unfolded-protein-response sensor IRE-1 $\alpha$  regulates the function of CD8 $\alpha$ <sup>+</sup> dendritic cells. *Nat. Immunol.* *15*, 248–257.
- Overwijk, W.W., Theoret, M.R., Finkelstein, S.E., Surman, D.R., de Jong, L.A., Vyth-Dreese, F.A., DelleMijn, T.A., Antony, P.A., Spiess, P.J., Palmer, D.C., et al. (2003). Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8<sup>+</sup> T cells. *J. Exp. Med.* *198*, 569–580.
- Parish, C.R. (1999). Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunol. Cell Biol.* *77*, 499–508.
- Paul, W.E. (2011). Bridging Innate and Adaptive Immunity. *Cell* *147*, 1212–1215.
- Pearce, E.J., and Everts, B. (2015). Dendritic cell metabolism. *Nat. Rev. Immunol.* *15*, 18–29.
- Pixley, F.J., and Stanley, E.R. (2004). CSF-1 regulation of the wandering macrophage: complexity in action. *Trends Cell Biol.* *14*, 628–638.
- Poulin, L.F., Reyat, Y., Uronen-Hansson, H., Schraml, B.U., Sancho, D., Murphy, K.M., Håkansson, U.K., Moita, L.F., Agace, W.W., Bonnet, D., et al. (2012). DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues. *Blood* *119*, 6052–6062.
- Reimold, A.M., Iwakoshi, N.N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, E.M., Friend, D., Grusby, M.J., Alt, F., and Glimcher, L.H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* *412*, 300–307.
- Rodvold, J.J., Mahadevan, N.R., and Zanetti, M. (2016). Immune modulation by ER stress and inflammation in the tumor microenvironment. *Cancer Lett.* *380*, 227–236.
- Shipkova, M., and Wieland, E. (2012). Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.* *413*, 1338–1349.
- Shoulders, M.D., Ryno, L.M., Genereux, J.C., Moresco, J.J., Tu, P.G., Wu, C., Yates, J.R., Su, A.I., Kelly, J.W., and Wiseman, R.L. (2013). Stress-independent activation of XBP1s and/or ATF6 reveals three functionally diverse ER proteostasis environments. *Cell Rep.* *3*, 1279–1292.
- Spits, H., and Di Santo, J.P. (2011). The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat. Immunol.* *12*, 21–27.
- Steinman, R.M. (2007). Dendritic cells: versatile controllers of the immune system. *Nat. Med.* *13*, 1155–1159.
- Subramanian, M., and Tabas, I. (2014). A new RIDDle in DC-mediated cross-presentation. *Nat. Immunol.* *15*, 213–215.

- Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 140, 805–820.
- Todd, D.J., Lee, A.-H., and Glimcher, L.H. (2008). The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 663–674.
- Urrea, H., Dufey, E., Avril, T., Chevet, E., and Hetz, C. (2016). Endoplasmic Reticulum Stress and the Hallmarks of Cancer. *Trends Cancer* 2, 252–262.
- Villadangos, J.A., and Schnorrer, P. (2007). Intrinsic and cooperative antigen-presenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 543–555.
- Yuseff, M.-I., Pierobon, P., Reversat, A., and Lennon-Duménil, A.-M. (2013). How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity. *Nat. Rev. Immunol.* 13, 475–486.
- Zehner, M., Marschall, A.L., Bos, E., Schloetel, J.-G., Kreer, C., Fehrenschild, D., Limmer, A., Ossendorp, F., Lang, T., Koster, A.J., et al. (2015). The Translocon Protein Sec61 Mediates Antigen Transport from Endosomes in the Cytosol for Cross-Presentation to CD8+ T Cells. *Immunity* 42, 850–863.
- Zhang, N., and Bevan, M.J. (2011). CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 35, 161–168.
- Zitvogel, L., Kepp, O., and Kroemer, G. (2010). Decoding Cell Death Signals in Inflammation and Immunity. *Cell* 140, 798–804.

## MATERIAL COMPLEMENTARIO



**Anexo 1. El inhibidor 4μ8C disminuye la adjuvanticidad de lisados de melanoma en la capacidad de células dendríticas equivalentes a cDC tipo 1 de realizar presentación cruzada de la proteína OVA.** (A) FLT3-L mDCs fueron incubadas con el inhibidor 4μ8C (20 μM) o DMSO como control de vehículo por 5h y luego fueron estimuladas con 0.25 mg/mL de OVA o 0.25 mg/mL de OVA más 100 μg/mL de MEL por 16h. La presencia de complejos formados por MHC-I/SIINFEKL fue determinada por la tinción con el anticuerpo 25.D1-16. Gráficos de dispersión muestran el MFI del anticuerpo 25.D1-16 en mDCs equivalentes a cDC 1 (A), cDC 2 (B) y pDC (C). Se muestran resultados de 4 experimentos independientes, media ± S.E.M, \* =  $p \leq 0.05$  (t de student no pareado).