

UCH-FC
MAB-B
C 842
C.1



**Evaluación del rol del eje IRE1 α /XBP-1 en células
dendríticas en un modelo murino de
inmunoterapia antitumoral**

Tesis

**Entregada A La
Universidad de Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Cristóbal Javier Costoya Tolosa

Septiembre 2017

Director de Tesis:

Dra. María Rosa Bono

Co-Director de Tesis:

Dra. Fabiola Osorio

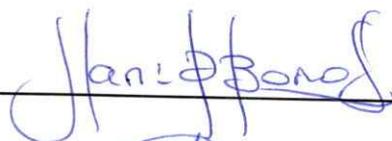
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

Cristóbal Javier Costoya Tolosa

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 4 de Septiembre del 2017.

Dra. María Rosa Bono M.
Directora de Tesis

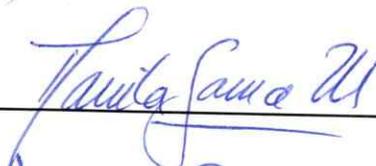


Dra. Fabiola Osorio O.
Co-directora de Tesis

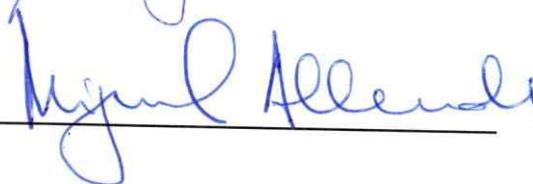


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Daniela Sauma
Presidente Comisión



Dr. Miguel Allende
Evaluador



Santiago de Chile, Septiembre de 2017.

*The world is big
and I want to have a good look at it
before it gets dark*

John Muir

BIOGRAFÍA



Cristóbal Costoya nació el 20 de febrero del año 1990.

Estudió desde 1° básico hasta 4° medio en el colegio Huelquen Montessori, comuna de Lo Barnechea.

Ingresó a la Universidad de Chile el año 2009 a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular de la Facultad de Ciencias, egresando y obteniendo el grado de licenciado el año 2014.

El año 2015 realizó su trabajo de Seminario de Título a cargo de la Dra. Fabiola Osorio como tutora y el Dr. Flavio Salazar-Onfray en calidad de co-tutor, obteniendo el grado de Ingeniero en Biotecnología Molecular en marzo del año 2016. Ese mismo año ingresó al programa de Magíster en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, realizando su tesis de grado a cargo de la Dra. Maria Rosa Bono como tutora y la Dra. Fabiola Osorio en calidad de co-tutor.

En septiembre del 2017 Cristóbal comienza su programa de Doctorado en el Cancer Institute del University College London (UCL) en Londres, Reino Unido.

AGRADECIMIENTOS

Gracias a todos los integrantes de los laboratorios de Inmunología y Estrés Celular, Inmunología Anti Tumoral y Regulación e Inmunología del Cáncer de la Universidad de Chile por la cooperatividad y la ayuda en el quehacer científico de cada día.

Gracias a la Dra. María Rosa Bono por su apoyo, opiniones y críticas constructivas.

Gracias a la Dra. Fabiola Osorio por las enseñanzas, la paciencia y la confianza depositada en mí durante este proyecto.

Gracias al personal de apoyo y estudiantes de otros grupos del Programa Disciplinario de Inmunología por hacer más ameno el día a día.

Gracias a mi familia y amigos por el apoyo firme y constante.

INDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
Reticulo endoplásmico y la respuesta a proteínas mal plegadas.	1
Sistema inmune y las células dendríticas.	8
La función de la respuesta a proteínas mal plegadas en el sistema inmune y en las células dendríticas.	13
Rol de las células dendríticas en inmunología tumoral	16
Hipótesis	19
Objetivos	19
Objetivo General	19
Objetivos Específicos	19
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Reactivos	21
Células y ratones	22
Ensayos in vitro de activación de DCs derivadas de médula ósea	25

Ensayos de presentación de antígenos endógeno por DCs de ratones CD11c.DOG27	
Manipulación de animales para experimentación	29
Citometría de flujo	29
Análisis de citometría y estadística	32
RESULTADOS	33
Lisados celulares de melanoma activan el eje IRE1 α /XBP-1s de forma preferencial en DCs convencionales de ratones ERAI mediante un factor soluble.	33
La inhibición del dominio RNAsa de IRE1 α no afecta la presentación de antígenos endógenos en MHC-I.	38
La inhibición del eje IRE1 α /XBP-1s disminuye la producción de citoquinas pro-inflamatorias en DCs estimuladas con MEL.	41
La inhibición farmacológica de la actividad RNAsa de IRE1 α mediante 4 μ 8C no permite analizar el rol de este eje en presentación de antígenos a linfocitos T CD8+ in vivo	43
La vacunación basada en DCs generadas con FLT3-L no es capaz de reducir el número de metástasis en un modelo de metástasis de melanoma B16.	51
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	55
ANEXO	76

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos de superficie utilizados para citometría de flujo

30

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la vía IRE1α/XBP-1s	8
Figura 2. Lisados celulares de melanoma inducen la activación del eje IRE1α/XBP-1s en cDCs de ratones ERAI.	35
Figura 3. MEL activa el eje IRE1α/XBP-1s en cDC1 a través de un factor soluble	37
Figura 4. El inhibidor 4μ8C no afecta la presentación de antígenos endógenos en MHC-I.	40
Figura 5. La inhibición del eje IRE1α/XBP-1s en DCs estimuladas con MEL disminuye la producción de citoquinas pro-inflamatorias.	43
Figura 6. LT pmel-1 transferidos adoptivamente no responden tras inoculación de DCs en ratones C57BL/6.	45
Figura 7. Modelo de transferencia adoptiva de LT OT-I en ratones C57BL/6 es insensible a la cantidad de DCs inoculadas.	48
Figura 8. El inhibidor 4μ8C en DCs no afecta su capacidad de realizar presentación antigénica in vivo.	50
Figura 9. La inmunización profiláctica con FLT3-L DCs no otorga protección frente a un desafío de melanoma murino metastásico.	52
Figura Suplementaria 1. Auto-fluorescencia en ensayos de activación de DCs de ratones reporteros ERAI.	76

LISTA DE ABREVIATURAS

- APC: Célula Presentadora de Antígenos.
- ATF6: Factor de Transcripción Activador 6
- B220: Variante de 220 kDa de la glicoproteína T200
- BiP: Proteína de Unión a Inmunoglobulinas
- bp: Pares de bases
- CD: Cluster de diferenciación.
- cDC: Célula Dendrítica Convencional
- cDC1: Célula Dendrítica Convencional tipo 1
- cDC2: Célula Dendrítica Convencional tipo 2
- cDNA: Ácido Desoxirribonucleico complementario.
- CHOP: Proteína Homóloga a C/EBP
- DAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Daño.
- DC: Célula Dendrítica
- DMSO: Dimetilsulfóxido
- ERAD: Degradación de proteínas Asociada al Retículo Endoplásmico
- FLT3-L: Ligando de tirosina kinasa 3 relacionada a FMS
- GM-CSF: Factor de Estimulación de Colonias Monocíticas y Granulocíticas
- HS: Shock Térmico
- IFN- γ : Interferón gamma.
- IL: Interleuquina
- IMF: Intensidad Media de Fluorescencia.

IRE1 α : Enzima requirente de inositol 1 alfa

LB: Linfocito B.

LPS: Lipopolisacárido

LT CD4+: Linfocito T Cooperador.

LT CD8+: Linfocito T Citotóxico.

LT: Linfocito T.

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

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

MHC-II: Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase II

mRNA: RNA mensajero.

NK: Células Natural Killer.

OVA: Ovoalbúmina

P/S: Penicilina + Estreptomina

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos.

PBS: Tampón Fosfato Salino.

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

pDC: Célula Dendrítica Plasmocitoide

PD-L1: Ligando de Muerte Programada 1

PERK: Kinasa de Retículo Endoplásmico tipo PRKR

PRR: Receptor de Reconocimiento de Patrones.

qRT-PCR: PCR cuantitativo en tiempo-real

RE: Retículo Endoplásmico

RIDD: *Regulated IRE1 α Dependent mRNA Decay*

RNA: Ácido Ribonucleico.

RNAsa: Endoribonucleasa

SEM: Error Standard de la Media

SFB: Suero Fetal Bovino.

SIRP α : CD172 α , Proteína reguladora de señales 1 α

TAP: Transportador asociado con presentación antigénica

TCR: Receptor de Linfocitos T.

TLR: Receptor Tipo Toll.

TM: Tunicamicina

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa.

UPR: Respuesta a Proteínas Mal Plegadas

XBP-1: Proteína de unión a caja X 1

XCR1: Receptor de Quimioquinas con motivo C 1

RESUMEN

La respuesta a proteínas mal plegadas (*Unfolded Protein Response*, UPR) es una respuesta fisiológica esencial para la supervivencia de células eucariontes ya que su función consiste en aliviar el estrés causado por la acumulación de estas especies en el retículo endoplásmico (RE) o en su defecto, gatillar procesos de muerte celular. Uno de los sensores de estrés de RE, IRE1 α y uno de sus blancos, el factor de transcripción XBP-1s, se encuentran activos de manera constitutiva en ciertos tipos de células dendríticas (DCs). IRE1 α ha emergido como un regulador importante de la función de células inmunes en diversos procesos que incluyen inmunidad innata a patógenos, diferenciación celular y cáncer. Con respecto a este último, antecedentes previos identifican a lisados celulares derivados de células de melanoma como potentes activadores de esta vía en DCs. Por otra parte, la inhibición farmacológica de IRE1 α en DCs disminuye su capacidad de realizar presentación cruzada de antígenos y de producir citoquinas en respuesta a la activación con los lisados de células cancerígenas. Debido a esto, resulta atractivo analizar el eje IRE1 α en DCs en un contexto de inmunoterapia antitumoral.

Para estudiar este fenómeno, se generaron DCs murinas de manera *in vitro* con la citoquina FLT3-L. Observamos que lisados celulares de melanoma son potentes activadores de IRE1 α en DCs convencionales, a través de un factor soluble. Adicionalmente, la inhibición farmacológica de IRE1 α con el aldehído 4 μ 8C disminuye la producción de citoquinas pro-inflamatorias, sin afectar otras funciones tales como la presentación de antígenos endógenos en moléculas de histocompatibilidad de clase I (MHC-I), sugiriendo que esta proteína controla procesos específicos relacionados con

la función de DCs. Finalmente, evaluamos el rol de IRE1 α en la presentación de antígenos tumorales *in vivo* y en el potencial antitumoral de las DCs en melanoma metastásico a través de la utilización de diversos modelos murinos. Sin embargo, no se obtuvieron resultados concluyentes respecto al rol del eje IRE1 α /XBP-1s en DCs en la presentación de antígenos tumorales *in vivo* ni su rol en la inmunidad antitumoral, lo que podría deberse a limitaciones técnicas inherentes de los modelos asociados, particularmente a la eficiencia de presentación antigénica mediada por la transferencia adoptiva de DCs y al uso de inhibidores farmacológicos.

En conclusión, nuestros resultados junto a otros antecedentes previos, indican que IRE1 α /XBP-1s tiene un rol importante en la función de DCs *in vitro*, pero debido a las limitaciones mencionadas en las estrategias utilizadas, no fue posible evaluar de manera precisa el rol de este eje en DCs en la presentación de antígenos tumorales *in vivo*, ni su rol en la inmunidad antitumoral. Pese a esto, el rol de IRE1 α en funciones de DCs *in vivo* sigue siendo un fenómeno importante de estudiar que no ha sido completamente dilucidado, por lo que se propone extender estos resultados en otros modelos en ratón que nos permitan resolver esta interrogante.

ABSTRACT

The unfolded protein response (UPR) is an essential physiological response for the survival of eukaryotic cells, since its function is to alleviate the stress caused by the accumulation of misfolded proteins in the endoplasmic reticulum (ER), and when it fails to do so, the UPR is responsible to trigger cell death. One of the ER stress sensors, IRE1 α and its target the transcription factor XBP-1s, are constitutively activated in certain subsets of dendritic cells (DCs). IRE1 α has emerged as an important regulator of the function of immune cells in diverse processes that include innate immunity against pathogens, cell development and cancer. Previous results identified cell lysates derived from melanoma cells as potent activators of the IRE1 α /XBP-1s in DCs. On the other hand, pharmacological inhibition of this pathway in DCs decreases their capacity to present antigens and produce cytokines in response to activation with cancer cell lysates. Thus, given that IRE1 α is induced during DC activation with melanoma cell lysates, this signaling pathway results attractive to analyze in the context of melanoma antitumor immunotherapy.

To study this phenomenon, mouse DCs were generated *in vitro* with the FLT3-L cytokine. We observed that melanoma cell lysates are potent activators of IRE1 α in conventional DCs, through a soluble factor. Additionally, the pharmacological inhibition of IRE1 α with the 4 μ 8C aldehyde decreases the production of proinflammatory cytokines, without affecting other functions such as the presentation of endogenous antigens in MHC-I, suggesting that this protein controls specific processes related to DC function. Finally, we evaluated the role of IRE1 α in tumor antigen presentation *in vivo* and in the antitumor potential of DCs in metastatic melanoma using diverse mouse

models. Nevertheless, no conclusive results were obtained respect to the role that this signaling axis plays in DCs in tumor antigen presentation *in vivo* nor its role in antitumor immunity, which could be due to technical limitations inherent to the models used, particularly the antigen presentation efficiency mediated through the adoptive transfer of DCs and the use of pharmacological inhibitors.

In conclusion, our results along with previous results indicate that IRE1 α /XBP-1s has an important role in DC function *in vitro*, but due to the mentioned limitations in the strategies used, it was not possible to evaluate in a precise manner the role of this axis in DCs in the presentation of tumor antigens *in vivo*, nor its role in antitumoral immunity. Despite this, the role of IRE1 α in DC function *in vivo* is still an important phenomenon to study that has not been completely elucidated, which is why we propose to extend this results in other mouse models that can allow us to answer this question.

INTRODUCCIÓN

Retículo endoplásmico y la respuesta a proteínas mal plegadas.

El retículo endoplásmico (RE) es un organelo presente en todas las células eucariontes, que tiene como función principal la biosíntesis, plegamiento y maduración de al menos un tercio de las proteínas en la célula (Hetz y col., 2015; Westrate y col., 2015). En este organelo ocurre además la síntesis lipídica y constituye un reservorio intracelular de Ca^{2+} , el cual es utilizado como segundo mensajero en diversas vías de señalización (Berridge y col., 2000). Gran parte de las proteínas que son secretadas, o destinadas a transmembrana son sintetizadas por ribosomas asociados al RE y son importadas al lumen de este organelo en donde ocurre el proceso de plegamiento y maduración post-traduccionales (Hetz y col., 2015; Walter & Ron 2011). En este lugar, los polipéptidos son plegados a su conformación nativa y son sometidos a diversas modificaciones post-traduccionales por enzimas dedicadas tales como chaperonas, glicosilasas y oxidoreductasas, las que permiten que las proteínas recién sintetizadas adquieran su conformación y maduración estructural (Frakes y col., 2017; Hetz y col., 2015; Mardones y col., 2014). Para llevar a cabo el proceso de plegamiento y maduración de proteínas, el RE está equipado con mecanismos de control de calidad altamente refinados que permiten que solo las proteínas correctamente plegadas ingresen a la ruta secretora (Hetz y col., 2015; Moore y col., 2012; Ron y col., 2007; Schröder y col., 2005), mientras que las proteínas plegadas incorrectamente permanezcan retenidas en el organelo para ser destinadas a degradación a través de mecanismos que incluyen degradación de proteínas asociada a retículo endoplásmico

(*ER-associated protein degradation*, ERAD) o autofagia (Janssens y col., 2014; Lamia y col., 2009; Schuck y col., 2014).

Sin embargo, dependiendo del programa de diferenciación celular, del microambiente o de la demanda fisiológica, la tasa de síntesis proteica puede variar rápidamente (Harding y col., 1999; Moore et al. y col., 2012; Ron & Walter 2007). De hecho, distintos tipos de estímulos inflamatorios tales como hipoxia, radiación, hipoglicemia, infecciones y alteraciones metabólicas pueden ocasionar un aumento en la cantidad de proteínas mal plegadas presentes en el lumen del RE (Kempner y col., 2009; Koumenis y col., 2007; Lazar y col., 2014; Mardones et al. y col., 2014; Palorini y col., 2013). Una proteína mal plegada se define como cualquier conformación proteica con una energía libre mayor que la conformación nativa y, en términos biológicos, corresponde a cualquier proteína capaz de interactuar con chaperonas moleculares (Schröder & Kaufman 2005). La acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE genera una respuesta denominada estrés del RE, el cual es definido como el desbalance entre la tasa de plegamiento de las proteínas en síntesis y la capacidad de este organelo de plegarlas y modificarlas eficientemente (Gardner y col., 2013; Janssens et al. y col., 2014; Schröder et al. y col., 2005). El estrés de RE gatilla una red de cascadas de señalización filogenéticamente conservadas, denominada colectivamente como la respuesta a proteínas mal plegadas (*Unfolded Protein Response*, UPR), la cual tiene como finalidad regular la homeostasis celular, reestablecer la maquinaria biosintética y mantener la fidelidad de la síntesis proteica. La activación de la respuesta a proteínas mal plegadas resulta por una parte, en un aumento en la capacidad de plegamiento de proteínas, a través de la inducción de genes blanco asociados a aumentar la capacidad biosintética del RE, tales como

genes codificantes para foldasas, chaperonas, oxidorreductasas, proteínas asociadas a degradación y proteínas involucradas en la síntesis de aminoácidos, lípidos y remodelamiento del RE, entre otros (Hetz y col., 2015; Janssens y col., 2014; Walter & Ron 2011). Sin embargo, en condiciones de estrés de RE irreversible, la respuesta a proteínas mal plegadas puede también disminuir la carga biosintética mediante la atenuación de la síntesis de proteínas a nivel transcripcional (Pakula y col., 2003), traduccional (Harding y col., 1999; Walter & Ron 2011) y finalmente, inducir muerte celular mediada por apoptosis (Han y col., 2009; Lerner y col., 2012; Maly y col., 2014). La respuesta a proteínas mal plegadas es controlada por tres sensores ubicados en el lumen del RE denominados ATF6, IRE1 α y PERK (Frakes y col., 2017; Gardner y col., 2013; Mardones y col., 2014; Moore y col., 2012). En estado basal, estos tres sensores se encuentran en estado inactivo, acoplados a una chaperona denominada BiP (además conocida como HSP70 o GRP78). Un aumento en la cantidad de proteínas mal plegadas en el lumen del RE induce la liberación de BiP de los sensores ATF6, IRE1 α y PERK por mecanismos de competición, lo que conduce a la activación de los sensores de manera coordinada. Si bien estos sensores son clásicamente activados por la liberación de BiP, existen reportes de mecanismos alternativos por los cuales estos sensores pueden ser activados, en ausencia de proteínas mal plegadas o estrés de RE. Se ha descrito que tanto IRE1 α como PERK son capaces de sensar cambios en la composición lipídica de la membrana del RE a través de sus dominios de transmembrana y son activados cuando aumenta el nivel de saturación de los ácidos grasos que la componen (Robblee y col., 2016; Volmer y col., 2015, 2013). Una vez activados, estos sensores señalizan mediante distintas maneras. ATF6 migra hacia el aparato de Golgi, en donde ocurre un procesamiento proteolítico que libera su dominio citosólico (ATF6f) el cual actúa como factor de transcripción en promotores que

contengan elementos de respuesta a estrés de RE (ERSE-I y ERSE-II), tales como chaperonas entre otros (Yamamoto y col., 2004). Por otra parte, PERK es una proteína kinasa que oligomeriza y autofosforila en respuesta a estrés de RE, la cual fosforila al factor *eukaryotic translation initiator factor 2 α* o eIF2 α que tiene la capacidad de atenuar la síntesis general de proteínas permitiendo selectivamente la traducción del factor de transcripción ATF4 (Teske y col., 2011). Además, ATF4 activa la transcripción de un gen blanco llamado CHOP (Ron & Walter 2007; Szegezdi y col., 2006). CHOP es generalmente considerado un factor transcripcional pro-apoptótico debido a que es capaz de inducir la expresión de GADD34, una fosfatasa involucrada en revertir la inhibición de la traducción mediada por eIF2 α y también inducir la expresión de ERO1 α , una oxidasa residente de RE. Mediante la inducción de estos dos genes, CHOP es capaz de sobrecargar la capacidad de síntesis del RE y aumentar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), favoreciendo procesos de daño y muerte celular (Gardner et al. y col., 2013; Marciniak y col., 2004). Adicionalmente CHOP puede reprimir la transcripción del gen *Bcl-2*, el cual codifica para una proteína anti-apoptótica que es capaz de bloquear la salida de citocromo c desde la mitocondria en un mecanismo dependiente de caspasa-8 (Häcki y col., 2000; Schröder y col., 2005). Mediante este mecanismo, CHOP es capaz de inducir la activación de caspasa-3 y la posterior fragmentación del DNA nuclear, lo cual lleva inevitablemente a apoptosis (Kitazumi y col., 2011). Por otra parte, la más conservada de estas 3 ramas de señalización es la ejecutada por IRE1 α , la cual como ATF6 y PERK, es una proteína de transmembrana del RE y, en respuesta a la liberación de BiP, es capaz de dimerizar, autofosforilar y activar sus dominios kinasa y endoribonucleasa (Joshi y col., 2015). El dominio endoribonucleasa de IRE1 α posee dos funciones: por una parte, es capaz de procesar a través de un mecanismo de *splicing* alternativo el RNA mensajero (mRNA)

codificante para el factor de transcripción XBP-1. Este procesamiento remueve una porción de 26 nucleótidos del mRNA de XBP-1, el cual es posteriormente ligado mediante una ligasa específica llamada RTCB (Jurkin y col., 2014). Este procesamiento produce un cambio en el marco de lectura que resulta en la traducción de un potente factor de transcripción denominado XBP-1 *spliced* (XBP-1s) (Sidrauski & Walter 1997). XBP-1s es esencial para la transcripción de chaperonas, foldasas, proteínas involucradas en síntesis de lípidos y proteínas asociadas a la degradación asociada al RE, ERAD (Ron & Walter, 2007). En mamíferos, la forma no procesada de XBP-1 también es traducida y funciona como un regulador negativo de la forma *spliced*, ya que puede unírsele, secuestrarlo del núcleo y aumentar su degradación a través del proteosoma (Yoshida y col., 2006). XBP-1 juega un papel crucial en funciones metabólicas, como se ha evidenciado en estudios de pérdida de función tanto en ratón como en humano. Por ejemplo, tanto IRE1 como XBP-1 son requeridos para el desarrollo embrionario en ratón, ya que el *knock out* (KO) global de alguno de estos genes resulta en letalidad embrionaria debido a hipoplasia y apoptosis hepática (Reimold y col., 2000). El rescate de la expresión de XBP-1 en hígado en ratones XBP-1 KO previene su muerte en útero, sin embargo, estos animales mueren a los pocos días post parto debido a retardo del crecimiento e hipoglicemia, y a la malformación de glándulas salivares y apoptosis de células de los acinos pancreáticos. En ausencia de XBP-1, estas células de naturaleza secretora sucumben a apoptosis debido al estrés de RE causado por un desbalance entre la capacidad de plegamiento del RE y la demanda de producción de enzimas digestivas, por ejemplo (Lee y col., 2005). Además, IRE1 α y XBP-1 tienen un rol importante también en células del sistema inmune, como se describe más adelante.

Por otra parte, además de procesar el RNA mensajero codificante para XBP-1, el dominio endoribonucleasa de IRE1 α procesa RNA mensajeros de diversa naturaleza en un proceso denominado *Regulated IRE1 α -Dependent mRNA Decay* o RIDD (Hollien y col., 2009), como se esquematiza en la Figura 1. A diferencia de XBP-1s, los mRNAs procesados vía RIDD son degradados, lo que permite regular finamente la expresión de diversos genes relacionados con plegamiento de proteínas, ERAD y homeostasis de Ca²⁺ (Coelho & Domingos 2014). Los mRNAs blancos de RIDD no se restringen solamente a transcritos codificantes para proteínas residentes del RE ya que se han revelado blancos adicionales en diversos contextos metabólicos. Varios estudios demuestran que IRE1 α juega un rol importante en la regulación de la homeostasis de células β de páncreas en condiciones de hiperglicemia a través de la degradación de los mRNAs codificantes para insulina *Insulin1* e *Insulin2* cuando estas células son expuestas a altas concentraciones de glucosa (Han et al. y col., 2009; Lipson y col., 2008). Adicionalmente, en situaciones en que el estrés de RE se hace inviable con la función celular, IRE1 α puede degradar los micro RNAs (miRNAs) pro-apoptóticos miRNA – 17, 34a, 96 y 125b, los cuales normalmente reprimen la traducción de Caspasa-2, mediante RIDD y de esa manera inducir apoptosis durante condiciones de estrés prolongado (Upton y col., 2012). En el sistema inmune, se ha reportado que RIDD es requerido para la activación del receptor de reconocimiento de patrón RIG-I, NF- κ B y la vía de interferón en presencia de la toxina del cólera, proponiendo de esta manera a IRE1 α como un sensor del sistema inmune innato (Cho y col., 2013). Adicionalmente se ha reportado en ensayos de microarreglo que dentro de los mRNA que son sustratos de RIDD en DCs se encuentran varios genes involucrados en la función del sistema inmune, tales como genes involucrados en transporte de vesículas, proteínas lisosomales y proteínas de carga del péptido antigénico en MHC-I tales como

tapasina (Osorio y col., 2014). Más aun, estudios recientes reportan que RIDD es fundamental para la sobrevivencia de DCs convencionales tipo 1 (cDC1) en mucosas tales como pulmón e intestino (Tavernier y col., 2017). Estos reportes indican que RIDD tiene un papel fundamental en la sobrevivencia y homeostasis de ciertos tipos celulares, tales como cDC1. Cuáles son las condiciones que inciden en que IRE1 α realice RIDD o el *splicing* alternativo de XBP-1 es un fenómeno que no está bien dilucidado. Existe un reporte de ensayos *in vitro* en el cual se postula que IRE1 α realiza RIDD cuando este se dimeriza y el *splicing* alternativo de XBP-1 cuando se organiza de forma oligomérica (Tam y col., 2014), sin embargo existe mayor número de reportes que postulan justamente lo contrario: la dimerización de IRE1 α activa su dominio RNasa para el *splicing* de XBP-1 y en casos de estrés sostenido, IRE1 α se oligomeriza e hiperactiva su dominio RNasa, activando RIDD (Ghosh y col., 2014; Lerner et al. y col., 2012; Upton et al. y col., 2012). Por lo tanto, a la fecha, los mecanismos de activación de IRE1 α con respecto a la inducción de XBP1-s versus RIDD son materia de intensa investigación.

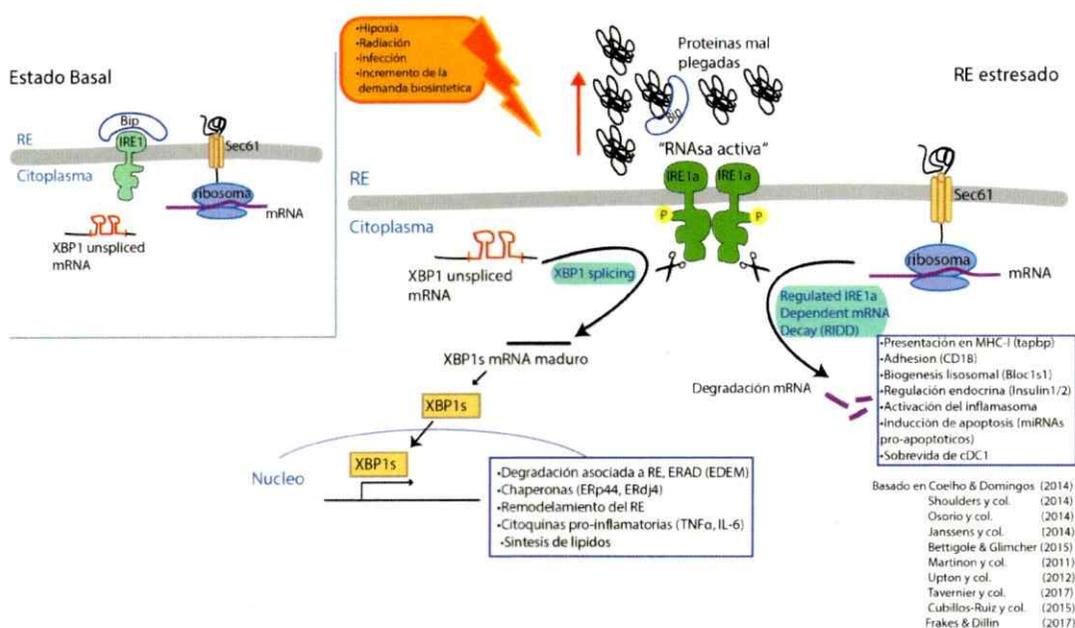


Figura 1: Esquema de la vía IRE1α/XBP-1s. En estado basal (izquierda), el RE es capaz de plegar correctamente las proteínas destinadas a la ruta secretora. Frente a estímulos que perturben el plegamiento de proteínas, tales como hipoxia, radiación, infección o incremento de la demanda biosintética, ocurre una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE (derecha), ocasionando que la chaperona BiP interaccione con estos intermediarios de plegamiento y dejando a IRE1α libre para dimerizar y activar su actividad endoribonucleasa (RNAsa). IRE1α activo es capaz de someter al mRNA de XBP-1 a un proceso de *splicing* alternativo, 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. Al mismo tiempo, esta actividad RNAsa de IRE1α puede degradar otros mRNA presentes en el RE, en un proceso denominado *Regulated IRE1α Dependent mRNA Decay* o RIDD.

Sistema inmune y las células dendríticas.

El sistema inmune está compuesto por diversas estructuras, tejidos y tipos celulares que tienen como función proteger al cuerpo contra patógenos, tales como virus, bacterias u hongos, como también controlar la aparición de células cancerígenas (Parkin & Cohen 2001). Basándose en las características de los componentes del sistema inmune, éste puede ser separado en sistema inmune innato y adaptativo. Por

una parte, el sistema inmune innato corresponde a la primera línea de defensa del organismo y comprende las barreras físicas y químicas del organismo (piel, epitelios, mucosas, entre otros) (Sperandio y col., 2015), células del sistema inmune tales como macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, células *natural killer* (NK) y también células dendríticas (DCs) (Getz 2005); además de componentes proteicos y otros mediadores de inflamación, tales como el sistema del complemento y la familia de las citoquinas, las cuales actúan como reguladores y coordinadores de muchas de las funciones del sistema inmune (Striz y col., 2014). Por otra parte, el sistema inmune adaptativo está compuesto principalmente por linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB) los cuales a diferencia de las células del sistema inmune innato son altamente específicos y poseen la capacidad de generar memoria inmunológica, es decir, de responder más vigorosamente ante exposiciones repetidas contra el mismo antígeno (Sallusto y col., 2004).

El nexo entre el sistema inmune innato y el adaptativo lo hacen las células presentadoras de antígenos o APC por su sigla en inglés *antigen-presenting cell*. Las APCs profesionales por excelencia son las DCs, las cuales tienen función dedicada a la captura y presentación antigénica en moléculas de histocompatibilidad (MHC), además de expresar moléculas coestimuladoras con lo que son capaces de activar LT vírgenes y dirigir su diferenciación hacia los diversos fenotipos efectores descritos para linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (Liwski y col., 2006).

Las DCs son capaces de identificar un sitio de infección mediante el reconocimiento de estructuras moleculares que son características de microbios, y se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) (Mogensen y col.,

2009). Por otra parte, en contextos inflamatorios gatillados en ausencia de patógenos como por ejemplo en contextos tumorales, las DCs también pueden activarse mediante el reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). En contraste con los PAMPs que corresponden a moléculas foráneas, los DAMPs son moléculas endógenas propias que permanecen secuestradas a nivel intracelular en células vivas, pero que bajo condiciones de daño o muerte celular, son expuestas para la activación de la respuesta inflamatoria (Brubaker y col., 2015; El Mezayen y col., 2007; Hernandez y col., 2016; Zitvogel y col., 2010). Las DCs poseen la capacidad de reconocer PAMPs y DAMPs a través de receptores de reconocimiento de patrón o PRRs (Thompson y col., 2011). La activación de PRRs gatilla un proceso de transducción de señales que conducen a la activación de las DCs, el cual es un proceso necesario para la generación de inmunidad. En este proceso de activación, las DCs adquieren cambios fenotípicos y funcionales, los cuales convierten un fenotipo "inmaduro", especializado en captación de antígenos a un fenotipo efector, especializado en presentación antigénica, activación de linfocitos T y expresión de moléculas como citoquinas, quimioquinas y moléculas de co-estimulación (Banchereau y col., 1998; Everts y col., 2014; O. Joffre y col., 2009; Merad y col., 2013).

Las DCs son un grupo heterogéneo de leucocitos que pueden subdividirse en 2 clases, las DCs convencionales (cDCs), las cuales tienen como función principal la captura y presentación antigénica a LT, y las DCs plasmocitoides (pDCs) las cuales tienen un rol importante en la inmunidad antiviral debido a que se especializan en la producción de interferones de tipo I, especialmente interferón α (McKenna y col., 2005). En ratón y humano, las subpoblaciones de DCs pueden ser categorizadas dependiendo de su origen, factores de transcripción y función. Recientemente, se ha

propuesto una nueva nomenclatura para el sistema de fagocitos mononucleares basado en ontogenia, con el objetivo de simplificar la creciente diversidad de células presentadoras de antígeno encontradas en tejidos (Guilliams y col., 2014). Basado en este y otros reportes, estas células en ratón pueden ser clasificadas en 3 categorías: DCs plasmocitoides (pDCs) y DCs convencionales (cDCs), las cuales pueden ser subdivididas en cDC del tipo 1 (cDC1) y cDC del tipo 2 (cDC2). Por una parte, pDCs expresan bajos niveles de MHC-II, altos niveles de TLR7 y TLR9 y expresan los marcadores B220, Siglec-H y BST-2, además de depender del factor de transcripción E2-2 (Cisse y col., 2008; Ferrero y col., 2002; Schlitzer y col., 2014). Por otra parte, las cDC1s son un linaje de células que incluye DCs CD103⁺ del tejido periférico y DCs CD8 α ⁺ residentes en el tejido linfoide, además de expresar los marcadores XCR1, DNCR1 y CD24 (Askew y col., 2008; Dorner y col., 2009; Edelson y col., 2010), y depender de los factores de transcripción BATF3, IRF8, ID2, además del receptor FLT3 para su diferenciación (Belz y col., 2012; Schlitzer et al. y col., 2014). En los últimos años, el avance de nuevas tecnologías como la citometría de masa (CyTOF), *single-cell RNA seq* y el uso de herramientas computacionales para la automatización de análisis de datos de citometría de flujo multiparamétrica, nos han permitido analizar de manera más profunda la distribución y origen de los distintos linajes de DCs a lo largo de tejidos y especies (Guilliams y col., 2016; Schlitzer y col., 2015; See y col., 2017). Funcionalmente, las cDC1s se especializan en secretar altos niveles de la citoquina inflamatoria interleuquina 12 (IL-12) y en realizar el proceso de presentación cruzada de antígenos, la cual se refiere a la presentación de antígenos derivados de fuentes extracelulares en moléculas MHC clase I, para la diferenciación y activación de LT citotóxicos CD8⁺ (Guilliams et al. y col., 2014; Henry y col., 2008; Hey y col., 2012; Segura y col., 2011). Estas células son originadas a nivel de médula ósea a partir del

progenitor de macrófagos y DCs (MDP), diferenciándose al progenitor común de DCs (CDP) y posteriormente a pre-DC, etapa en la cual ya se pueden encontrar células comprometidas con este linaje por la expresión de clusters génicos asociados y la ausencia de los marcadores de linaje Siglec-H y Ly6C (Schlitzer et al. y col., 2015). En humanos, el equivalente de estas células se caracteriza por la expresión de CD141 y depender de los mismos factores de transcripción que su contraparte murina (Schlitzer et al. y col., 2014). Si bien se pensó en un momento que en humanos este tipo de célula podría provenir de pDC, estudios recientes indican que aunque estos progenitores comparten marcadores con pDC, estos progenitores exhiben un fenotipo único y propiedades funcionales distintivas que previamente eran atribuidas a pDC. Estas células, al igual en ratón, se originan de pre-DCs en medula ósea, donde son marcadas por un programa transcriptómico global que confiere una identidad linaje-específica, sin importar el tejido final donde esta célula se encuentre (See et al. y col., 2017). Finalmente, cDC2s corresponde a un linaje de DCs que expresan los marcadores CD11b y CD172 α (SIRP α) en ratón y CD1c en humano, dependen de los factores de transcripción IRF4, RelB y Notch2 para la diferenciación celular. Tienen como función principal la presentación de antígenos mediada por MHC-II a LT CD4⁺, polarizándolos a fenotipos T_H2 o T_H17 a través de la secreción de IL-23, IL-6 y TNF- α (Diao y col., 2010; Guilliams et al. y col., 2014; Schlitzer et al. y col., 2014; Schlitzer y col., 2013). Estas células se originan, al igual que cDC1, en medula ósea pero a diferencia de estas últimas, estas pueden ser identificadas a nivel de pre-DC por la expresión de Ly6C y la ausencia de Siglec-H (Schlitzer et al. y col., 2015). En vista de la creciente diversidad fenotípica y funcional de las DCs, resulta relevante entender específicamente el papel de las distintas subpoblaciones de DCs en contextos de inmunidad y tolerancia.

La función de la respuesta a proteínas mal plegadas en el sistema inmune y en las células dendríticas.

Los sensores de la respuesta a proteínas mal plegadas, en particular la vía controlada por IRE1 α y XBP-1s ha demostrado ser altamente relevante para el correcto funcionamiento de células del sistema inmune (Bettigole y col., 2015; Janssens et al. y col., 2014; Martinon y col., 2011; Osorio et al. y col., 2014). Se ha reportado que XBP-1s es un factor de transcripción esencial para el desarrollo y diferenciación de células plasmáticas, eosinófilos y células epiteliales intestinales (Bettigole et al. y col., 2015; Kaser y col., 2008; Reimold y col., 2001). Interesantemente, esta vía no sólo regula el desarrollo de algunas células del sistema inmune, también ha emergido como un eje de señalización esencial en respuesta a infecciones (Martinon y col., 2010). La importancia de esta vía se ha revelado en ratones deficientes para XBP-1 en macrófagos, los cuales sucumben a infecciones con la bacteria intracelular *Francisella tularensis* (Martinon et al. y col., 2010). En este contexto, la cascada de señalización gatillada por la activación del PRR *toll like receptor 4* (TLR4) en respuesta a patógenos induce directamente la activación de XBP-1s, el cual es requerido para la producción de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF α . Más aún, evidencia reciente indica que la activación de IRE1 α es también necesaria para la activación del inflamasoma en respuesta a infección con *Brucella abortus* (Bronner y col., 2015), y que esta dependencia esta mediada por los receptores tipo NOD, NOD1 y NOD2 (Keestra-Gounder y col., 2016). En conjunto, esta evidencia indica que la respuesta a proteínas mal plegadas y en particular, la vía IRE1 α /XBP-1s juega un papel importante en el establecimiento de la respuesta inmune y en la generación de la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, estudiar el papel de esta vía en contextos de inmunidad y

tolerancia puede ser una estrategia relevante para el tratamiento de diversos tipos de patologías tales como enfermedades inflamatorias e infecciones, entre otros.

En DCs, el RE constituye un sitio fundamental para el inicio de la respuesta inmune. Aparte de su papel vital en la síntesis de proteínas, en este organelo ocurren procesos cruciales relacionados a la presentación antigénica tales como la carga del péptido antigénico en MHC-I. Por otra parte, proteínas y membranas asociadas al RE son componentes esenciales de la formación del fagosoma, el cual es el compartimento dedicado para el procesamiento de los antígenos destinados a ser procesados vía presentación cruzada en DCs (Joffre y col., 2012).

Adicionalmente, durante el proceso de activación celular, las DCs activan diversas rutas metabólicas que conducen a la expansión del RE, con el objetivo de adaptar este organelo a la incrementada demanda de síntesis, transporte y secreción de proteínas que subyace al proceso de maduración celular (Everts y col., 2014; Krawczyk y col., 2013; Pearce y col., 2015). Por esta razón, entender los mecanismos que mantienen la fidelidad de la síntesis proteica y la homeostasis del RE en DCs es relevante para poder comprender el control de inmunidad y tolerancia. En nuestra unidad, nos enfocamos en elucidar los mecanismos por los cuales la respuesta a proteínas mal plegadas regula la función de las DCs. Sin embargo, la contribución de la respuesta a proteínas mal plegadas en la función de DCs en contextos de inflamación no ha sido claramente elucidada. Evidencia previa indica activación de la vía IRE1 α /XBP-1s es esencial para la supervivencia y desarrollo de DCs a partir de precursores hematopoyéticos (Iwakoshi y col., 2007). Por otra parte, antecedentes de nuestra unidad indican que dentro de las células del sistema inmune, las DCs

residentes en los tejidos linfoides son la estirpe celular que activan IRE1 α de manera constitutiva, y dentro de las subpoblaciones de DCs residentes en el bazo, las cDC1s (caracterizadas por la expresión del marcador CD8 α^+ , descrito previamente) son el subtipo de DCs que activa este eje de señalización en un mayor grado (Osorio et al. y col., 2014). A nivel funcional y por mecanismos que aún se desconocen, la ausencia de XBP-1 en DCs afecta selectivamente la homeostasis de DCs del tipo cDC1 y no del tipo cDC2, indicando que esta vía contribuye a la especificación de linaje celular (Osorio et al. y col., 2014). A nivel molecular, la activación de IRE1 α regula la función de cDC1s a través de su dominio endoribonucleasa. Por una parte, a través de la activación de XBP-1s, IRE1 α regula la homeostasis y arquitectura del RE en cDC1s y por otra parte, IRE1 α a través de la degradación de mRNAs (RIDD) controla el proceso de presentación cruzada de antígenos, ya que esta enzima puede degradar directamente mRNAs asociados a este proceso, tales como tapasina y ergic 3, los cuales poseen la secuencia de corte consenso requerida para el procesamiento mediado por IRE1 α (Osorio et al. y col., 2014). Si bien la delección de XBP-1 no afecta la supervivencia de cDC1 de bazo, es esencial para cDC1 residentes de tejido periférico, especialmente para cDC1 residentes de pulmón y de manera menos pronunciada en cDC1 intestinales (Tavernier et al. y col., 2017). La pérdida adicional de RIDD en estas células resulta en muerte celular, indicando que RIDD actúa como un factor intrínseco que modula la supervivencia de cDC1 en tejidos (Tavernier et al. y col., 2017)

Estos antecedentes han permitido abrir el campo de estudio de la respuesta a proteínas mal plegadas, y especialmente el eje IRE1 α /XBP-1s en el desarrollo y función de las DCs. Entender de mejor manera como las DCs modula su metabolismo

y función durante su activación resulta interesante, ya que podría ser usado como un posible blanco de manipulación en el contexto de desarrollo de terapias basadas en DCs.

Células dendríticas en inmunología tumoral

Las DCs juegan un papel importante en el establecimiento de inmunidad antitumoral debido a que pueden realizar de manera eficiente la presentación cruzada de antígenos tumorales en moléculas MHC-I a LT CD8⁺ y mediar de esta manera la activación y proliferación de LT antitumorales (Engblom y col., 2016). En concordancia con lo anterior, un alto número de DCs infiltrantes de tumor, especialmente cDCs, se correlaciona positivamente con una mayor supervivencia y mayor tiempo sin recidiva de pacientes con cáncer de pulmón (Dieu-Nosjean y col., 2008; Goc y col., 2014), además de asociarse con una mayor activación de LT (Ladányi y col., 2007). Sin embargo, ambos tipos de cDC no contribuyen de la misma manera al control tumoral. En estudios en modelos murinos de cáncer de mama y melanoma, dentro de la población de origen mieloide que infiltra el tumor se encuentra una población muy escasa de cDC1 CD103⁺, pero notablemente eficientes en estimular LT citotóxicos (CTL) (Broz y col., 2014). Las cDC1 CD103⁺ son el único tipo de DC capaz de migrar desde el tumor hasta el linfonodo drenante de tumor y presentar antígenos captados en el nicho tumoral a LT CD8⁺, además de revertir la resistencia a bloqueo de checkpoints con anti-PD-L1 en tumores de melanoma (Idoyaga y col., 2016). Adicionalmente, cDC1 CD103⁺ son las principales productoras de la quimioquina CXCL10 en el tumor, la cual es necesaria para la migración de LT efectores hacia el sitio tumoral (Spranger y col., 2017). En biopsias de pacientes una razón mayor en la expresión de

CD103^{high}/CD103^{low} en el estroma tumoral se correlaciona con una mayor supervivencia en pacientes con cáncer de mama, pulmón o de cabeza y cuello (Broz et al. y col., 2014) y además la expresión de genes correspondientes a este tipo de cDC como BATF3, IRF8, XCR1, CLEC9A y THBD (codificante para CD141) tiene una alta correlación con la presencia de CTL en el tumor (Spranger et al. y col., 2017), indicando que tanto en humano como en ratón las cDC1 residentes de tumor son un componente crucial en el reclutamiento de LT efectores hacia el microambiente tumoral.

En cuanto al rol de cDC2, este subtipo celular ha sido menos estudiado. Interesantemente, uno de los pocos reportes disponibles en la literatura indican que este tipo de cDC es el que principalmente infiltra tumores y ascitas de cáncer ovárico en ratón, donde el microambiente tumoral es capaz de inducir estrés de RE en estas DC y una fuerte activación del eje IRE1 α /XBP-1s a través de subproductos de la peroxidación de lípidos (Cubillos-Ruiz y col., 2015). En este contexto XBP-1s induce un programa biosintético de triglicéridos que lleva a una anormal acumulación de lípidos en DCs, lo cual obstruye la capacidad de estas células de realizar presentación de antígenos a LT (Cao y col., 2014; Cubillos-Ruiz y col., 2015; Herber y col., 2010). Más aun, la delección o silenciamiento de XBP-1 en estas células permite la inducción de inmunidad antitumoral y un aumento en la supervivencia de ratones con cáncer ovárico (Cubillos-Ruiz y col., 2015), indicando que XBP-1 tiene un rol negativo en la inducción de inmunidad antitumoral en cáncer ovárico. Por lo tanto, dependiendo del tipo de tumor y del subtipo de DC a estudiar, los subtipos cDC1 y cDC2 desempeñan funciones opuestas ya sea previniendo o promoviendo el crecimiento tumoral respectivamente y, por otra parte, la activación del eje IRE1 α /XBP-1s en DCs del tipo cDC1 o cDC2 tiene diferentes consecuencias en la funcionalidad de estas células.

En nuestra unidad, tenemos evidencia de que lisados celulares de melanoma humano son potentes activadores de XBP-1s en cultivos heterogéneos de células dendríticas, aunque todavía no hemos identificado aún si algún subtipo de DC es preferencialmente activado por estos lisados (Costoya 2016). Hemos observado que la activación de XBP-1s es necesaria para la óptima funcionalidad de DCs. La inhibición farmacológica del dominio RNAsa de IRE1 α con el inhibidor descrito 4 μ 8C (Cross y col., 2012) resulta en una disminución de la producción de IL-6, IL-12 y TNF- α en DCs estimuladas con lisados celulares de melanoma humano, además de una disminución en la presentación cruzada de antígenos a LT OT-I y pme1-1 (Costoya 2016; Medel 2017). La evidencia reportada tanto en la literatura como en nuestra unidad indica que el eje IRE1 α /XBP-1s de la respuesta a proteínas mal plegadas puede ser considerado como un modulador de la respuesta inmune mediada por DCs, aunque su relevancia en distintos linajes de DCs y en distintos tipos de tumores todavía no ha sido dilucidada.

Hipótesis

La inhibición de la vía de señalización controlada por IRE1 α y el factor de transcripción XBP-1s en células dendríticas activadas con lisados tumorales, resultará en una capacidad reducida de diferenciación de linfocitos T citotóxicos específicos contra un antígeno tumoral *in vivo* y en una menor protección en un modelo murino de melanoma metastásico.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la contribución del eje IRE1 α /XBP-1 en células dendríticas en la generación de la respuesta inmune adaptativa antitumoral en un modelo de melanoma metastásico murino.

Objetivos Específicos

1. Analizar mediante citometría de flujo la activación de la vía de señalización IRE1 α /XBP-1s en distintos subtipos de DCs estimuladas con lisados celulares de melanoma en el ratón reportero ERAI.
2. Evaluar la contribución del eje IRE1 α /XBP-1s en DCs en la ruta de presentación clásica de antígenos en MHC-I y en la secreción de citoquinas pro-inflamatorias mediante citometría de flujo.
3. Evaluar la contribución del eje IRE1 α /XBP-1s en DCs estimuladas con lisados de melanoma en la capacidad de realizar presentación de antígenos a linfocitos T *in vivo*.

4. Evaluar la contribución del eje IRE1 α /XBP-1s en DCs estimuladas con lisados de melanoma en la capacidad de generar protección contra un desafío tumoral de las líneas B16-F10 y B16-OVA en un modelo de metástasis pulmonar.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Reactivos

1.1 Medio de cultivo, buffers y soluciones

Medio RPMI 1640 GlutaMAX™: Gibco, Thermofisher Scientific

R10: Medio RPMI 1640 GlutaMAX™ suplementado con 10% SFB (Hyclone, Thermo Scientific), 100 U/mL Penicilina (Hyclone, Thermo Scientific), 100 µg/mL Streptomina (Hyclone, Thermo Scientific) y 50 µM de β-mercaptoetanol (Gibco, Thermofisher Scientific)

Buffer de lisis RBC: Biolegend

PBS 1X pH 7.4: Gibco, Thermofisher Scientific

FACS/MACS Buffer: PBS 1X pH 7.4 suplementado con 1% SFB (Hyclone, Thermo Scientific) y 2 mM de EDTA (Ambion, Thermo Scientific)

Solución de Fekete: 100 mL de solución fueron preparados con 58 mL de Etanol absoluto (Merck) + 30 mL de H₂O bidestilada (Fresenius-Kabis) + 8 mL de formaldehido 37% (Merck) + 4 mL de ácido acético glacial (Merck).

1.2 Proteínas, citoquinas e inhibidores

Ovoalbúmina Low Endo™: Worthington Biochemical Corporation.

FLT3-L: Recombinante humana. Producida en el servicio de purificación de proteínas en VIB, Bélgica.

Inhibidor de IRE1, 4µ8C: Calbiochem

DMSO: Tocris Bioscience

1.3 Estímulos

Lisados de líneas celulares de melanoma (MEL): Producida en el Laboratorio de Inmunología Antitumoral 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 4×10^6 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. Los lisados condicionados con *heat shock* se denominaron "MEL + HS" para propósitos de este trabajo de tesis. En el caso de MEL no condicionado, las células fueron expuestas a 37°C por 3 horas. Posteriormente las células fueron lisadas mediante múltiples ciclos de descongelación y congelación en nitrógeno líquido. Posteriormente se cuantificó la concentración de proteínas mediante el método de Bradford.

Otros lisados: Lisados de leucocitos y melanoma B16-F10 se obtuvieron siguiendo el mismo protocolo que MEL.

Medio Condicionado de MEL (MC MEL): Para obtener el medio condicionado de MEL, luego de la exposición durante 3 horas a 37°C, las células fueron centrifugadas a 500 x g por 10 minutos y se recolectó el sobrenadante

Poly(I:C) HMW: Invivogen

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 y del bioterio del Instituto de Ciencias Odontológicas (ICOD) de la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

Ratones ERAI de entre 7 y 18 semanas de edad fueron obtenidos mantenidos por el laboratorio en el bioterio del Dr. Arturo Ferreira, del Programa Disciplinario de Inmunología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Ratones CD11c.DOG fueron otorgados por el Dr. Rodrigo Pacheco de la Fundación Ciencia & Vida y fueron utilizados de entre 2 y 6 meses.

Ratones OT-I fueron otorgados por el Dr. Álvaro Lladser de la Fundación Ciencia & Vida y fueron utilizados de entre 7 y 18 semanas.

El trabajo con animales presentado en este trabajo de tesis se realizó de acuerdo a los protocolos de bioética correspondientes tanto a la Facultad de Medicina como a la Facultad de Odontología de la Universidad de Chile.

2.2 Generación de células dendríticas murinas en presencia de FLT3-L

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 μ 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 por 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 se resuspendieron las células 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 1×10^6 de células/mL y se suplementaron con 150 ng/mL de citoquina recombinante FLT3-

L para después agregarlas a placas de 6 pocillos para cultivo celular (4 mL/pocillo) (Falcon®, BD). Los cultivos se mantuvieron por 7-8 días en incubadoras a 37°C, 5% CO₂ antes de ser utilizadas.

2.3 Purificación de linfocitos T CD8⁺ de ratones pmel-1 o y OT-I

Se aisló el bazo de los animales 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 fueron contadas y centrifugadas nuevamente para resuspenderlas en 400 µL de FACS Buffer por cada 1x10⁸ células + 70 µL por cada 1x10⁸ células de cocktail de anticuerpos biotinilados de selección negativa para LT CD8⁺ (MACS, Miltenyi Biotec) e incubadas por 10 minutos en hielo. Una vez finalizada la incubación, se les agregó 300 µL de FACS Buffer + 140 µL *microbeads* α-biotina (MACS, Miltenyi Biotec) por cada 1x10⁸ 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 LT CD8⁺ fueron seleccionados negativamente mediante una columna LS (MACS, Miltenyi Biotec), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3 Ensayos in vitro de activación de DCs derivadas de médula ósea

3.1 Estimulación para análisis de ratones ERAI

5×10^5 DCs fueron estimuladas al día 7-8 por 16 horas con los siguientes estímulos: MEL, MEL + *heat shock*, lisado de leucocitos o lisado de B16-F10 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) en R10. En el caso del tratamiento con MC MEL, se agregó el mismo volumen que el utilizado en el tratamiento MEL. Luego fueron recolectadas y lavadas con PBS 1X, para luego ser teñidas con anticuerpos acoplados a fluoróforos indicados en el experimento, a excepción del canal FITC, el cual es utilizado para detectar la fluorescencia emitida por VenusFP.

3.2 Estimulación para análisis de citoquinas en sobrenadante por CBA

2×10^6 DCs generadas a partir de médula ósea de ratones C57BL/6 fueron pretratadas al día 7-8 por una hora con 20 μM del inhibidor 4 μ 8C (o DMSO como control de vehículo) para luego ser incubadas con 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de MEL por 16 horas en una placa de 96 pocillos fondo U en R10. Luego de la incubación, la placa fue centrifugada y el sobrenadante fue transferido a una nueva placa y mantenido a -20°C hasta su utilización.

3.3 Estimulación para ensayos de presentación *in vivo* con linfocitos pmel-1

DCs fueron pretratadas al día 7-8 con el inhibidor 4 μ 8C (50 μM) o DMSO como control de vehículo por 1 hora para luego ser estimuladas con MEL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 5 horas en R10. Luego de la incubación, las DCs fueron lavadas con PBS 1X y resuspendidas en PBS 1X a una concentración de 1×10^6 DC/ mL .

3.4 Estimulación para ensayos de presentación *in vivo* con linfocitos OT-I

DCs fueron pretratadas al día 7-8 con el inhibidor 4 μ 8C (50 μ M) o DMSO como control de vehículo por 1 hora para luego ser estimuladas con MEL (100 μ g/mL) + OVA (200 μ g/mL) por 5 horas en R10. Luego de la incubación, las DCs fueron lavadas con PBS 1X y resuspendidas en PBS 1X a una concentración de 2.5×10^6 DC/mL, 1.25×10^6 DC/mL o 6.25×10^5 DC/mL.

3.5 Estimulación para ensayos de presentación *in vivo* utilizando tetramero H-2K^b/OVA

DCs fueron pretratadas al día 7-8 con el inhibidor 4 μ 8C (50 μ M) o DMSO como control de vehículo por 1 hora para luego ser estimuladas con MEL (100 μ g/mL) + OVA (200 μ g/mL) por 5 horas en R10. Luego de la incubación, las DCs fueron lavadas con PBS 1X y resuspendidas en PBS 1X a una concentración de 2.5×10^6 DC/mL.

3.6 Estimulación para ensayos de protección contra desafío tumoral de melanoma metastásico

DCs fueron pretratadas al día 7-8 con el inhibidor 4 μ 8C (50 μ M) o DMSO como control de vehículo por 1 hora para luego ser estimuladas con MEL (50 μ g/mL) + Lisado de B16-F10 o B16-OVA (50 μ g/mL) por 5 horas en R10. Luego de la incubación, las DCs fueron lavadas con PBS 1X y resuspendidas en PBS 1X a una concentración de 5×10^6 DC/mL.

4 Ensayos de presentación de antígenos endógeno por DCs de ratones CD11c.DOG

4.1 Disociación del complejo MHC-I/péptido mediante lavado con ácido

DCs generadas a partir de ratones CD11c.DOG fueron tratadas con una solución de ácido cítrico pH 3 1% BSA por 2 minutos a 4°C. Pasado ese tiempo, las células fueron lavadas 3 veces con 15 mL de R10 y plaqueadas a 5×10^4 DCs por pocillo en una placa de 96 pocillos fondo U.

4.2 Incubación con inhibidor 4μ8C, fijación y co-cultivo con linfocitos OT-I

Luego del lavado con ácido cítrico, las DCs fueron incubadas con 4μ8C 50 μM o DMSO como control de vehículo por 5 horas en R10. Después de la incubación, las células fueron lavadas con PBS y luego fijadas. Para esto, las células fueron resuspendidas en 200 μL de paraformaldehído (PFA) 1X e incubadas por 10 min a 4°C, luego fueron lavadas 2 veces con glicina 0.2 M en PBS, 1 vez con R10 y finalmente resuspendidas R10 para ser contadas. Una vez contadas se plaquearon 5×10^4 de células/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo. Cada condición se realizó en duplicado. Paralelamente, linfocitos T CD8⁺ OT-I fueron obtenidos como se indica en 2.3 y plaqueados con las mDCs a 5×10^4 de células/pocillo en R10. Los co-cultivos con mDCs fijadas se mantuvieron por 16 h en incubadoras a 37°C, 5% CO₂ y fueron analizados posteriormente por citometría de flujo.

4.3 Inducción y análisis de metástasis de melanoma murino B16

Células de líneas B16-F10 o B16-OVA fueron mantenidas en cultivo por 2 semanas previo a su utilización, sin sobrepasar el décimo pasaje. El día de su utilización, se

les removió el medio de la botella y se les agregó una solución de PBS 1X + 5 mM EDTA (3 mL para botella de cultivo de 75 mm²) y se mantuvieron en el incubador por 5 minutos. Pasado el tiempo de incubación, las botellas fueron suavemente golpeadas con la mano por el lado y se observó al microscopio que no hubiese células adheridas. Se recolectaron en un tubo Falcón de 50 mL y se centrifugaron a 500 g x 5 mins a 4°C. Luego fueron resuspendidas en PBS y la concentración células B16-F10 y B16-OVA fue ajustada a 1×10^6 células/mL y 2.5×10^6 células/mL, respectivamente. Las células fueron administradas por vía intravenosa a ratones C57BL/6, previo a filtración por *cell strainer* en el caso de B16-OVA. 15 días después de la administración de las células B16, los animales fueron sacrificados para análisis de metástasis en pulmón. Los pulmones fueron removidos y lavados en H₂O bidestilada para ser finalmente depositados individualmente, bajo campana de extracción química, en frascos de vidrio que contienen 3 mL de solución de Fekete, los cuales fueron luego sellados con film de laboratorio (Parafilm M). Luego de un plazo de 2 a 4 días, los pulmones fueron removidos de esta solución bajo campana de extracción química y lavados en H₂O bidestilada para posteriormente contar el número de metástasis presentes.

5 Manipulación de animales para experimentación.

Para realizar las inyecciones intravenosas en ratones, las jaulas destapadas fueron expuestas a luz infrarroja de manera de incrementar la temperatura de los animales y dilatar sus venas. Las células a inyectar fueron cargadas en jeringas de insulina de 1 mL 29G (BD). Una vez dilatadas las venas, los animales fueron introducidos en un *restrainer* (Stoelting) para restringir su movimiento. Posteriormente la cola fue rociada con etanol 70% y se administraron dosis de 200 μ L en la vena lateral de la cola izquierda o derecha. Una vez realizada la inyección, el punto de inyección fue presionado por alrededor de 30 segundos para detener el sangrado. La identificación de animales fue realizada mediante perforaciones en las orejas de los ratones con un sacabocados (Stoelting). Los animales en tratamiento fueron monitoreados todos los días, pesados y evaluados según el protocolo de Morton y Griffiths. Al finalizar el experimento, los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical

6 Citometría de flujo

6.1 Tinción de superficie

Una vez finalizado el tratamiento, las células fueron lavadas con PBS 1X y teñidas en FACS buffer por 20 minutos 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).

Tabla 1. Anticuerpos utilizados para citometría de flujo

Anticuerpo	Fluoróforo	Clon	Dilución	Marca
CD11c	APC	N418	1/800	Biolegend
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
SIRP α (CD172a)	PerCP-Cy5.5	P84	1/400	Biolegend
XCR1	PE	ZET	1/400	Biolegend
CD3 ϵ	PE-Cy5	145-2C11	1/400	Biolegend
CD8 α	PE	53-6.7	1/1500	Biolegend
CD69	APC	H1.2F3	1/400	Biolegend
CD16/32 (Fc Block)	-	93	1/400	Biolegend
IFN- γ	PE	XMG1.2	1/400	eBioscience
Tetrámero H-2k ^b /OVA	PE	TB-5001-1	1/40	MBL
LiveDead	V500	Aqua	1/800	Invitrogen

6.2 Tinción con colorante de proliferación.

Para los experimentos de presentación antigénica *in vivo* mediante la transferencia de linfocitos pmel-1, los linfocitos fueron teñidos previo a su inyección con el colorante de proliferación CFSE (eBioscience). Brevemente, los linfocitos una vez purificados fueron lavados en un tubo conico de 15 mL (Falcon) con 2 mL de medio RPMI sin suplementar. Luego de centrifugar, fueron resuspendidos nuevamente en 2 mL de medio RPMI sin suplementar, se agregó 1 μ L de CFSE 10 mM, se mezcló bien y se incubó por 8 minutos a 37°C en oscuridad. Finalizado el tiempo de

incubación, se agregaron 10 mL de R10, se centrifugaron, se lavaron con otros 10 mL R10 y finalmente se resuspendieron en R10 para su conteo y uso.

Para los experimentos de presentación antigénica *in vivo* mediante la transferencia de linfocitos OT-I, los linfocitos fueron teñidos previo a su inyección con el colorante de proliferación Cell Trace Violet (Invitrogen). Para esto los linfocitos una vez purificados fueron lavados con PBS 1X y resuspendidos en PBS a una concentración de 1×10^6 /mL. Se agregaron 1 μ L de Cell Trace Violet 5 mM por mL de suspensión de linfocitos, se mezcló bien y se incubaron por 20 minutos a 37°C en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, la suspensión se diluyó 1:4 con R10 y se incubó por otros 5 minutos. Posteriormente las células fueron centrifugadas y resuspendidas en R10 para su conteo y uso.

6.3 Tinción con tetrámero H-2k^b/OVA.

Se obtuvieron esplenocitos y se lisaron eritrocitos como se indica en la sección 2.3. Posteriormente los esplenocitos fueron resuspendidos en R10, se contaron y se tomaron 4×10^6 esplenocitos por muestra. Estos esplenocitos fueron teñidos por 30 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad en FACS buffer con los anticuerpos de superficie indicados en el experimento, además de la adición del tetrámero H-2k^b/OVA. Posteriormente se lavaron con FACS buffer y fueron teñidos por 10 minutos a temperatura ambiente y oscuridad con LiveDead Aqua diluido en PBS. Finalizada la incubación, las células fueron lavadas con FACS buffer y resuspendidas en FACS buffer para su adquisición en un citómetro de flujo.

7 Análisis de citometría y estadística

Para datos de citometría, los datos fueron analizados usando el software FlowJo X 10.0.7 (Trestar). Para análisis de gráficos y estadísticas se utilizó el software Prism 6 (GraphPad) utilizando la prueba t de student pareada. En todos los casos, se fijó el nivel de significancia mínimo en P menor a 0,05.

RESULTADOS

Lisados celulares de melanoma activan el eje IRE1 α /XBP-1s de forma preferencial en DCs convencionales de ratones ERAI a través de un factor soluble.

Para analizar la activación del eje IRE1 α /XBP-1s en células dendríticas (DCs), utilizamos el modelo reportero de ratones ERAI (*ER stress-activated indicator*), el cual expresa en sus células una secuencia parcial de XBP-1 que incluye los sitios donde IRE1 α realiza su *splicing* alternativo y que además esta fusionada a la proteína fluorescente Venus (*VenusFP*), lo cual permite detectar la activación de este eje por la emisión de fluorescencia (Iwawaki y col., 2004). IRE1 α , tras autofosforilarse y dimerizarse, activa un dominio RNAsa que es capaz de remover un intron de este mensajero, cambiando el marco de lectura y permitiendo la traducción de una proteína fusión fluorescente (Figura 2A). DCs de estos ratones fueron generadas mediante el cultivo de células obtenidas de medula ósea murina a partir de un protocolo especificado en la sección Materiales y Métodos, el cual consiste en el cultivo de precursores hematopoyéticos en presencia de la citoquina FLT3-L por 7-8 días, previamente descrito (Naik y col., 2005). La racional detrás del uso de estos cultivos por sobre otros protocolos ampliamente descritos tales como los que incluyen los factores GM-CSF o GM-CSF + IL-4, se debe a que la citoquina FLT3-L permite la diferenciación de DCs que son fenotípicas y funcionalmente equivalentes a las encontradas en los tejidos linfoides (Naik et al. y col., 2005). Estos antecedentes son altamente relevantes para este proyecto dado que evidencia previa indica que en estado estacionario el eje IRE1 α /XBP-1s opera preferencialmente en DCs del tipo

convencional (cDCs) (Osorio et al. y col., 2014). En este contexto, en estos cultivos primarios es posible generar células equivalentes a DCs convencionales del tipo CD8 α ⁺ o del tipo 1 (cDC1), DCs equivalentes a la población CD8 α ⁻ o del tipo 2 (cDC2) y una subpoblación equivalente a la población de DCs plasmocitoides (pDC) encontradas en el bazo (Naik et al. y col., 2005, Hey & O' Neill, 2012). Estas subpoblaciones pueden ser caracterizadas mediante citometría de flujo, donde las cDC1 pueden ser clasificadas por ser CD11c⁺, MHC-II^{high}, CD11b⁺, B220⁻, SIRP α ⁻, XCR1⁺; cDC2 clasificadas como CD11c⁺, MHC-II^{high}, CD11b⁺, B220⁻, SIRP α ⁺, XCR1⁻ y finalmente pDC como CD11c⁺, MHC-II^{int}, CD11b⁻, B220⁺.

Para analizar la activación de este eje en DCs en un contexto de reconocimiento tumoral, realizamos una estimulación de 16 horas con un lisado obtenido a partir de tres líneas celulares de melanoma humano: Mel 1, Mel 2 y Mel 3, que colectivamente se denomina "MEL". Posteriormente a la estimulación de 16 horas con MEL, las DCs fueron teñidas con los marcadores mencionados anteriormente y fueron analizadas por citometría de flujo (Figura 2b).

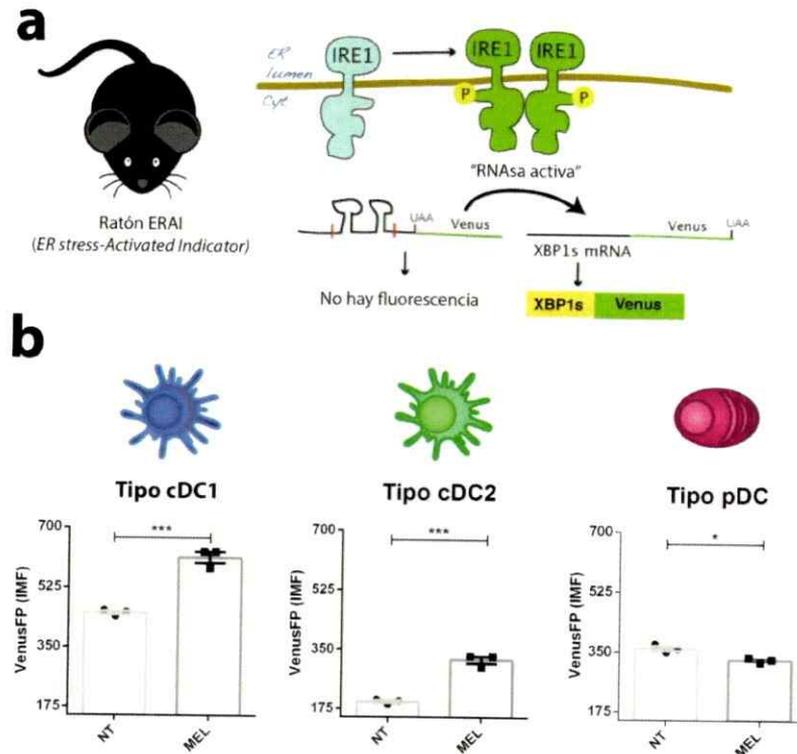


Figura 2. Lisados celulares de melanoma inducen la activación del eje IRE1 α /XBP-1s en cDCs de ratones ERAI. 5×10^5 DCs obtenidas a partir de precursores de médula ósea de ratones ERAI fueron estimuladas con MEL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 16 horas para luego ser analizadas por citometría de flujo. A) Esquema explicativo del ratón reportero de XBP-1s ERAI. B) Análisis de la intensidad de fluorescencia de VenusFP mediante citometría de flujo acotado a las distintas subpoblaciones de DCs. Los gráficos de barras muestran la media \pm S.E.M. de la intensidad media de fluorescencia (IMF) de VenusFP. Se muestran los resultados de tres experimentos independientes; * = $p \leq 0,05$, *** = $p \leq 0,001$ (t de student no pareado). NT = no tratado

En congruencia con lo reportado en la literatura en estado estacionario (Osorio et al. y col., 2014), estos resultados muestran que las DCs tienen activado este eje de manera constitutiva y preferencialmente en las células del tipo cDC1 (Figura 2b). Trabajo previo del laboratorio (Costoya, 2015) demostró que MEL es un potente activador del eje IRE1 α /XBP-1s a nivel de RNA en cultivos mixtos de DCs, pero sin

poder analizar si este fenómeno ocurre de forma preferencial en algún subtipo de DC más que en otro. Para extender estos resultados, analizamos de forma cuantitativa por citometría de flujo la inducción de XBP-1s en DCs tipo cDC1, cDC2 y pDC. Como se observa en la Figura 2b, MEL activa forma potente el eje IRE1 α /XBP-1s en DCs del tipo cDC1 ($451,0 \pm 5,132$ IMF NT vs. $613,0 \pm 16,0$ IMF MEL) y en cDC2 ($195,7 \pm 3,93$ IMF NT vs. $319,7 \pm 10,84$ IMF MEL) mientras que DCs del tipo pDC no activan este eje frente a estimulación con MEL ($361,0 \pm 7,0$ IMF NT vs. $329,0 \pm 4,359$ IMF MEL).

Para entender cuál es el mecanismo por el cual MEL es capaz de activar el eje IRE1 α /XBP-1s en cDCs, analizamos la capacidad de lisados celulares provenientes de otras fuentes, de activar el eje IRE1 α /XBP-1s en cDC1, ya que este subtipo de DC es el que posee los niveles de activación más potente de este eje en comparación con los otros subtipos. En primera instancia, evaluamos si la activación de esta vía era resultado de una reacción xenogénica, ya que las DCs murinas están siendo estimuladas con lisados celulares provenientes de células tumorales humanas (MEL). Para estudiar este fenómeno, las DCs generadas de ratones ERAI fueron estimuladas en presencia de MEL o en presencia de un lisado celular de la línea de melanoma murino B16-F10 o en presencia de un lisado celular de origen humano no tumoral, correspondiente a un lisado de leucocitos extraídos de sangre periférica (Figura 3a).

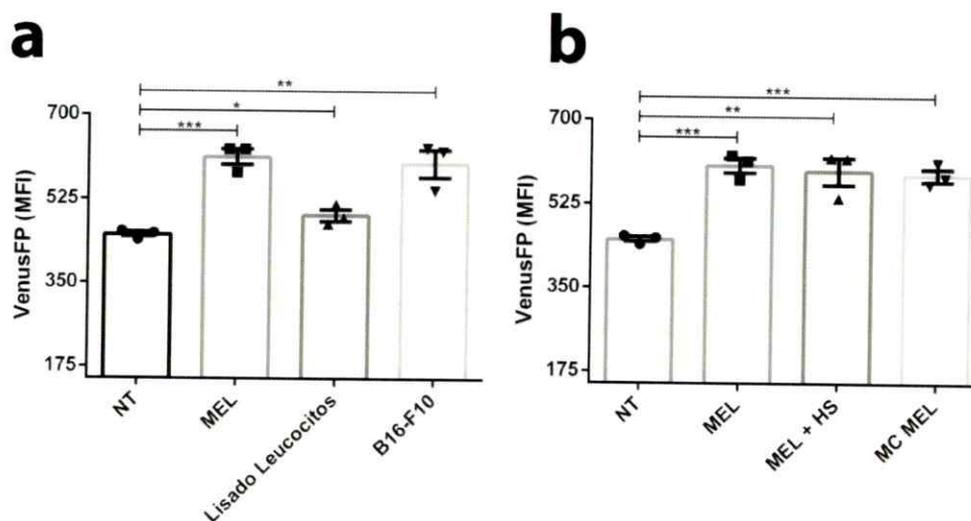


Figura 3. MEL activa el eje IRE1 α /XBP-1s en cDC1 a través de un factor soluble. 5×10^5 DCs obtenidas a partir de precursores de médula ósea de ratones ERAI fueron estimuladas con distintos lisados celulares o medios condicionados por 16 horas para luego ser analizadas por citometría de flujo. a) Análisis de la intensidad de fluorescencia de VenusFP en cDC1 tras estimulación con MEL, lisado de leucocitos humanos o lisado de B16-F10 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). b) Análisis de la intensidad de fluorescencia de VenusFP en cDC1 tras estimulación con MEL, MEL + HS o MC MEL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o volumen respectivo). Los gráficos de barras muestran la media \pm S.E.M. de la intensidad de fluorescencia media (IMF) de VenusFP. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes; * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$; *** = $p \leq 0,001$ (t de student no pareado). NT = no tratado

Encontramos que ambos lisados celulares provenientes de células tumorales, B16-F10 y MEL, activan de manera similar el eje IRE1 α /XBP-1s en cDC1 ($613,0 \pm 16,00$ IMF MEL vs. $600,3 \pm 28,24$ IMF B16-F10) y no así el lisado de leucocitos humanos ($491,7 \pm 12,17$ IMF Lisado Leucocitos), indicando que el gatillante de la vía IRE1 α /XBP-1s es un factor contenido específicamente en células tumorales y que no está asociado a una reacción xenogénica.

Profundizando aún más en decodificar la naturaleza del gatillante de IRE1 α /XBP-1s contenido en MEL, evaluamos si este puede ser inducido por shock térmico, el cual es un estímulo que ha sido demostrado ser capaz de inducir señales de

peligro en estas células (Aguilera y col., 2011). Además, para determinar si el gatillante es un factor soluble secretado por las células de melanoma, las DCs fueron tratadas con el medio condicionado de células MEL previo a su lisado por congelación (MC MEL). Como se observa en la Figura 3b, encontramos que el shock térmico (MEL + HS) no induce un mayor nivel de activación de XBP-1 en comparación a MEL sin tratar ($605,0 \pm 15,39$ IMF MEL vs. $593,3 \pm 27,67$ IMF MEL + HS). Por otro lado, el medio condicionado de MEL (MC MEL) es capaz de activar XBP-1s de manera similar que los lisados MEL, que contienen el debris celular y el medio condicionado ($585,7 \pm 13,30$ IMF MC MEL). Estos resultados indican que el compuesto que activa eje IRE1 α /XBP-1s en DCs es un factor soluble secretado por las células de melanoma humano MEL y no inducible por shock térmico.

La inhibición del dominio RNAsa de IRE1 α no afecta la presentación de antígenos endógenos en MHC-I

Una de las funciones principales de las DC, es la de presentar antígenos en moléculas de histocompatibilidad (MHC) a linfocitos T (LT) (Liwski et al. y col., 2006). Resultados previos demuestran que la inhibición del dominio RNAsa de IRE1 α mediante el fármaco 4 μ 8C, utilizado a dosis optimas evaluadas previamente en el laboratorio, en DCs disminuye su capacidad de realizar presentación cruzada del antígeno modelo ovoalbúmina (OVA) a LT antígeno específico (Costoya. 2016). La presentación cruzada de antígenos en MHC-I comparte una gran parte de la maquinaria necesaria para realizar presentación de antígenos producidos de manera endógena (Rock y col., 2016), por lo que desconocemos si el efecto observado con el inhibidor 4 μ 8C en la presentación de antígenos a LT antígeno específico afecta

específicamente la presentación cruzada o afecta la presentación global de antígenos en MHC-I. Para responder esta interrogante utilizamos el modelo murino CD11c.DOG, el cual es un ratón que bajo el promotor CD11c (molécula expresada por DCs) expresa el receptor para la toxina diftérica (DTR), la proteína ovoalbúmina (OVA) y la proteína fluorescente eGFP (Figura 4a, obtenido en colaboración con el Dr. Rodrigo Pacheco de la Fundación Ciencia & Vida). Este animal expresa OVA de manera constitutiva en DCs, lo que implica que estas células están constantemente presentando OVA como un antígeno endógeno en MHC-I y MHC-II (Hochweller y col., 2008). Para determinar si la inhibición farmacológica del dominio RNAsa de IRE1 α afecta la presentación de antígenos endógenos en moléculas de MHC-I, realizamos un ensayo descrito en la literatura (Cebrian y col., 2011; Sugawara y col., 1987), en el cual DCs generadas a partir de medula ósea de ratones CD11c.DOG en presencia de la citoquina FLT3-L, fueron incubadas brevemente con una solución de ácido cítrico pH 3 para eliminar todos los péptidos presentados en las moléculas MHC-I en la superficie célula y luego incubadas por 5 horas en presencia del inhibidor 4 μ 8C o control de vehículo. Luego de la incubación, las DCs son fijadas con PFA y co-cultivadas con LT CD8⁺ OT-I, donde la activación temprana de los linfocitos permite analizar si el inhibidor 4 μ 8C disminuye la formación de nuevos complejos MHC/péptido en la superficie de las DC (Figura 4b). Como se muestra en la Figura 4c las DCs CD11c.DOG son capaces de activar de manera constitutiva un 57% de LT OT-I CD8⁺, lo cual disminuye a un 22.8% luego del lavado con ácido cítrico. Al analizar la recuperación de los péptidos en MHC-I tras 5 horas de incubación con el inhibidor 4 μ 8C, encontramos que estas DCs son capaces de activar LT de modo similar que la condición control (4 μ 8C DC 66.4% vs. DMSO DC 77.8%). Estos resultados indican que el inhibidor del dominio RNAsa de IRE1 α 4 μ 8C, si bien reduce de forma leve los niveles de activación de LT OT-I CD8⁺ co-cultivados

con DCs incubadas previamente con $4\mu 8C$ en comparación con las incubadas con el control de vehículo DMSO, esta disminución no explica los niveles de inhibición de presentación cruzada de antígeno observados anteriormente en el laboratorio (Costoya 2016, Medel 2017) y por lo tanto sugeriría que IRE1 α controla procesos adicionales que son necesarios para realizar presentación cruzada de antígenos de manera eficiente.

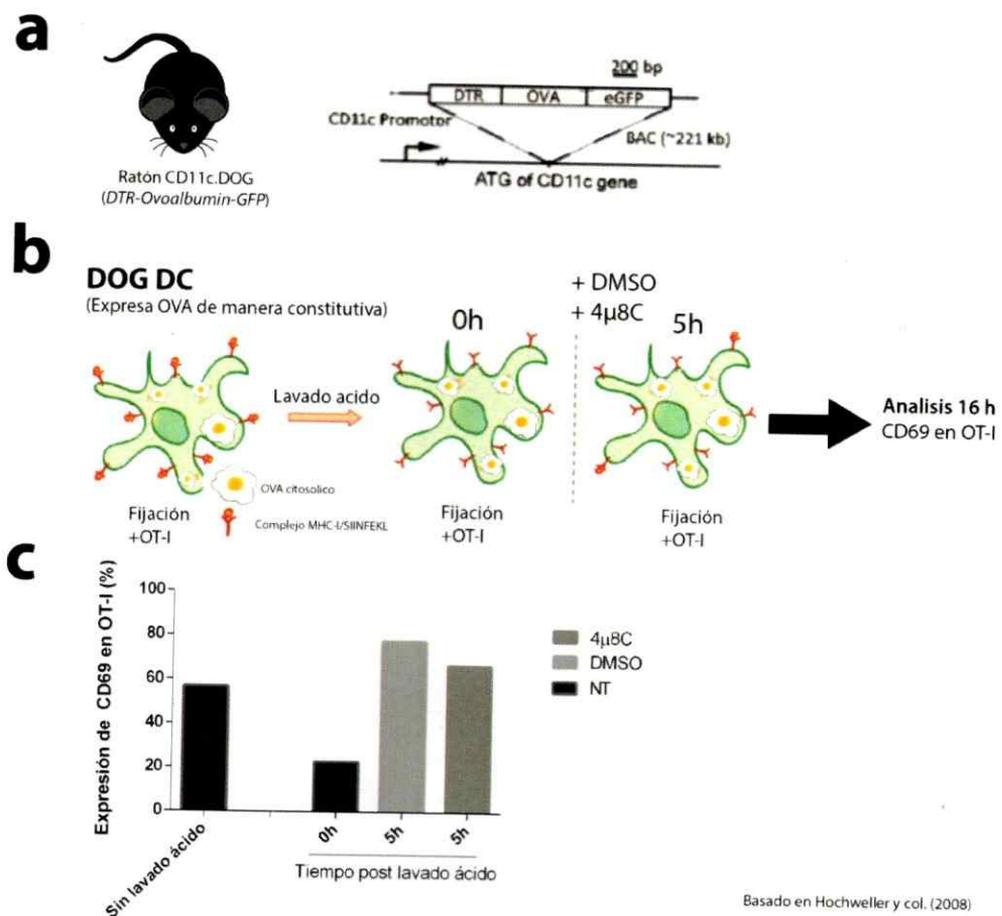


Figura 4. El inhibidor $4\mu 8C$ no afecta la presentación de antígenos endógenos en MHC-I. a) Esquema explicativo del constructo génico del ratón CD11c.DOG. b) Esquema explicativo del protocolo usado para evaluar presentación de antígenos endógenos.

Brevemente, 5×10^5 DCs murinas generadas a partir de medula ósea de ratones CD11c.DOG fueron lavadas con ácido cítrico (pH 3), incubadas con el inhibidor 4 μ 8C o DMSO como control de vehículo y finalmente fijadas con PFA previo a su co-cultivo con LT OT-I. c) Grafico de barras representativo que muestra la media del número de LT CD8⁺ CD69⁺ tras ser cocultivados por 16 h con DCs CD11c.DOG incubadas previamente en presencia del inhibidor 4 μ 8C o DMSO. Se realizaron 2 experimentos independientes. NT= no tratado.

La inhibición del eje IRE1 α /XBP-1s disminuye la producción de citoquinas pro-inflamatorias en DCs estimuladas con MEL.

Una característica de las DCs activadas es su capacidad de producir cantidades elevadas de citoquinas inflamatorias en respuesta a activación con compuestos microbianos, tumorales, alérgenos y toxinas entre otros (Bellinghausen y col., 2003; Dixon y col., 2001; Jensen & Gad, 2010; Lavelle y col., 2003; Mattei y col., 2001; Zitvogel & Kroemer, 2014). Dentro del panel de citoquinas capaces de ser secretadas por DCs tras su activación, las citoquinas pro-inflamatorias juegan un papel crucial en la inmunidad antitumoral. Dentro de las citoquinas pro-inflamatorias secretadas por DCs se encuentra TNF- α , una citoquina capaz de activar DCs de forma autocrina o paracrina, además de tener una marcada actividad citotóxica en células tumorales (Blanco y col., 2008; Pfeffer y col., 2003) e IL-6, una citoquina que de manera sinérgica con TNF- α , es capaz de promover el crecimiento y activación de LT (Fisher y col., 2015). Por último, las DCs son capaces también de secretar IL-10, una citoquina que si bien se ha reportado como una citoquina inmunosupresora (Oft y col., 2014), existen reportes que demuestran su papel en el rechazo de tumores en ratones (Berman y col., 1996; Gérard y col., 1996) y su rol en la expansión de LT CD8⁺ infiltrantes de tumor (Emmerich y col., 2012). Reportes en la literatura demuestran que macrófagos provenientes de ratones KO para XBP-1 producen menores cantidades de citoquinas pro-inflamatorias que su contraparte *wild type* tras ser incubados con un

estímulo clásico como LPS o ser infectados con *Francisella tularensis* (Martinon et al. y col., 2010). Por esta razón, resulta interesante evaluar el papel de esta vía en la producción de citoquinas en DCs estimuladas con lisados tumorales. Para evaluar esto, DCs generadas de medula ósea de ratones *wild type* fueron incubadas por 16 horas con MEL, en presencia o ausencia del inhibidor 4 μ 8C, para luego analizar citoquinas en el sobrenadante por *Cytokine Bead Array* (CBA), lo cual nos permite analizar por citometría de flujo 6 citoquinas inflamatorias simultáneamente (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α e IL-12p70). Dentro del panel de 6 citoquinas pro-inflamatorias, solamente TNF- α , IL-6 e IL-10 fueron detectadas en estos sobrenadantes (Figura 5). Observamos que la inhibición de IRE1 α en DCs estimuladas con MEL disminuye de forma significativa la producción de TNF- α (237,2 \pm 31,88 pg/mL 4 μ 8C MEL vs. 387,5 \pm 49,41 pg/mL DMSO MEL) e IL-6 (728,5 \pm 99,32 pg/mL 4 μ 8C MEL vs. 387,5 \pm 49,41 pg/mL vs. 1113 \pm 137,6 pg/mL DMSO MEL). Por otro lado, la citoquina IL-10, aunque no presenta significancia estadística, existe una tendencia a la disminución en su producción cuando las DCs estimuladas con MEL son incubadas con el inhibidor 4 μ 8C (45,50 \pm 9,822 pg/mL DMSO MEL vs. 29,62 \pm 5,036 pg/mL 4 μ 8C MEL). Resultados anteriores muestran que la disminución en la producción de citoquinas en DCs no se debe a muerte celular inducida por el inhibidor 4 μ 8C (Costoya, 2016), por lo que en conjunto con los resultados actuales indicaría que el eje IRE1 α /XBP-1s es esencial para la óptima producción de citoquinas pro-inflamatorias por DCs estimuladas con lisados tumorales.

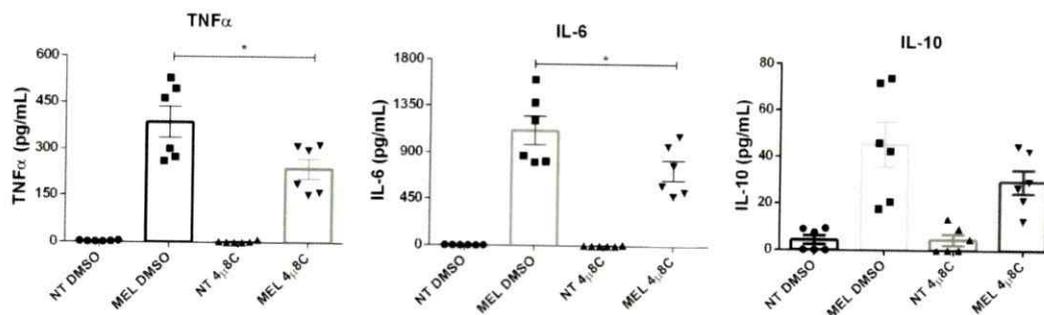


Figura 5. La inhibición del eje IRE1 α /XBP-1s en DCs estimuladas con MEL disminuye la producción de citoquinas pro-inflamatorias. 2×10^6 DCs generadas a partir de medula ósea de ratones C57BL/6 fueron pretratadas por una hora con $20 \mu\text{M}$ del inhibidor $4\mu\text{8C}$ (o DMSO como control de vehículo) para luego ser incubadas con $100 \mu\text{g/mL}$ de MEL por 16 horas y posteriormente analizar la presencia de las citoquinas TNF- α , IL-6 e IL-10 en el sobrenadante por CBA. Los gráficos de barras muestran la media \pm S.E.M. de 6 experimentos independientes. * = $p \leq 0,05$ (t de student no pareado). NT = no tratado

La inhibición farmacológica de la actividad RNAsa de IRE1 α mediante $4\mu\text{8C}$ no permite analizar el rol de este eje en presentación de antígenos a linfocitos T CD8 $^+$ *in vivo*

Si bien tenemos evidencia del rol del eje IRE1 α /XBP-1s en presentación antigénica y activación de LT *in vitro* (Costoya, 2016; Medel, 2017), no tenemos información de su relevancia *in vivo*. Para evaluar el rol de este eje dentro de un organismo desarrollamos un modelo *in vivo* a partir de la transferencia adoptiva de LT CD8 $^+$ antígeno específicos obtenidos a partir de ratones transgénicos pmel-1, los cuales poseen un receptor de LT (TCR) específico contra gp100, un antígeno expresado por melanoma (Hwang y col., 2006; Palmer y col., 2008) y que nuestra unidad ha demostrado de que pueden reconocer péptidos derivados de MEL (Medel

2017). Brevemente, estos LT fueron marcados con el colorante de proliferación CFSE e inoculados de forma intravenosa a ratones C57BL/6. Al día siguiente a estos animales se les administran DCs estimuladas con MEL en presencia inhibidor 4 μ 8C, denominadas "4 μ 8C DC" o bien, estimuladas con MEL en presencia del control de vehículo DMSO, denominadas "DMSO DC" por vía intravenosa. Luego de 6 días los animales fueron sacrificados y se evaluó la proliferación de LT pmel-1 en bazo (Figura 6a).

Al analizar la proliferación de LT pmel-1 luego de su transferencia, encontramos que sorprendentemente estos no fueron capaces de proliferar de manera robusta en ninguno de los tratamientos, incluyendo la administración de MEL de modo intravenoso como control positivo (Figura 6b y c). En este experimento observamos que solo un $16,8 \pm 2\%$ de LT pmel-1 proliferaron cuando los animales son inoculados con DMSO DC y un $12,5 \pm 0,8\%$ cuando son inoculados con 4 μ 8C DC, mientras que en los controles, un 25.9% proliferan en un animal inoculado con MEL y 10.6% en uno inoculado con PBS. En vista de los bajos niveles de proliferación observados, parecería que los linfocitos pmel-1 parecen tener restricciones adicionales que los impide proliferar y activarse de manera robusta *in vivo*. Estos resultados indican que la inoculación de DCs en ratones que fueron transferidos previamente con LT CD8⁺ pmel-1 es un modelo que no permite evaluar presentación de antígenos *in vivo*, y por lo tanto no nos permite analizar el rol del eje IRE1 α /XBP-1s en este contexto.

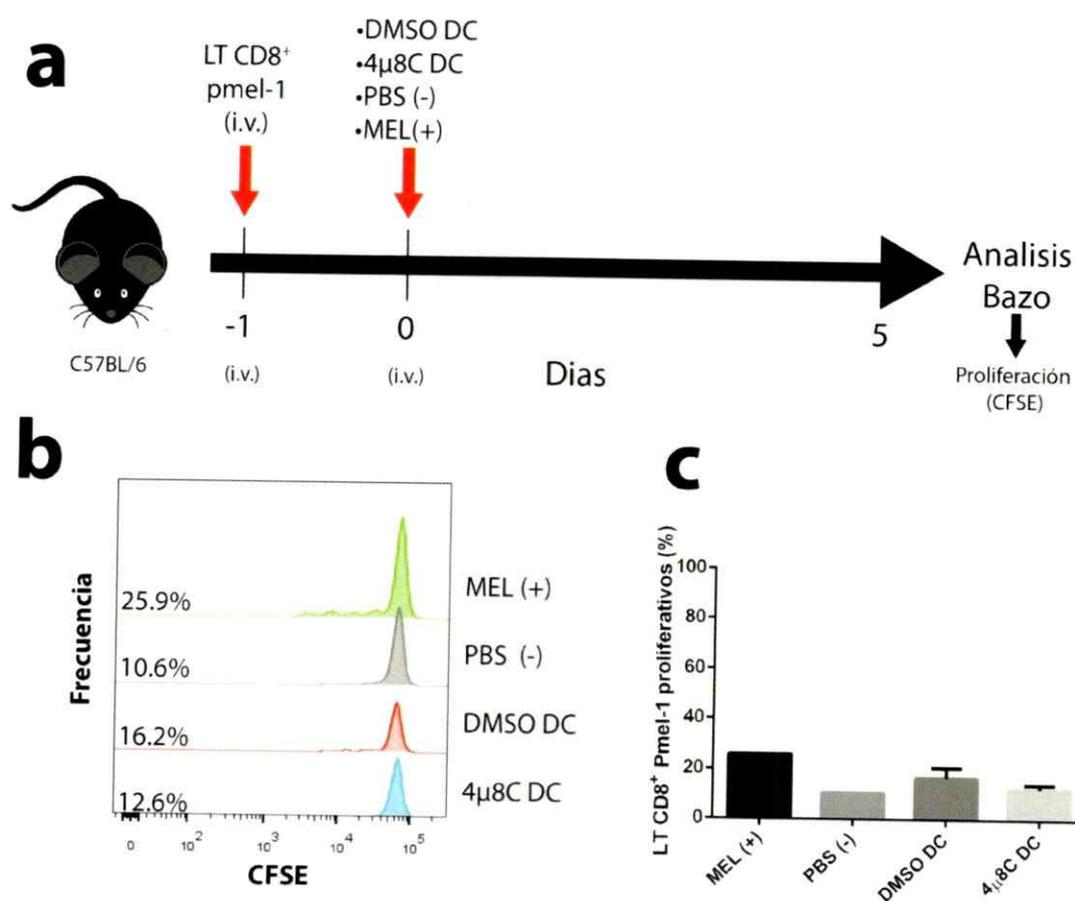


Figura 6. LT pmel-1 transferidos adoptivamente no responden tras inoculación de DCs en ratones C57BL/6. a) Diseño experimental. Al día -1, 1×10^6 LT CD8⁺ pmel-1 son transferidos adoptivamente mediante inyección intravenosa a ratones C57BL/6. Al día siguiente (Día 0) DCs pretratadas con 4μ8C 50 μM o DMSO como control de vehículo y luego incubadas por 5 horas con MEL fueron administradas mediante inyección intravenosa. Inyección intravenosa de PBS y 100 μg de MEL fueron utilizados como controles negativo y positivo, respectivamente. Después de 5 días, los animales fueron sacrificados y se analizó la proliferación de los LT pmel-1 en bazo mediante citometría de flujo. b) Histogramas representativos de la proliferación de LT pmel-1 en bazo. Los histogramas muestran los niveles de CFSE en células vivas, CD3⁺CD8⁺ y positivas para CFSE e indican el porcentaje de LT proliferativos a la izquierda. c) Grafico de barras que muestra media ± S.D. del porcentaje de LT pmel-1 proliferativos de 4 animales por tratamiento, excepto en el caso de PBS y MEL, en los cuales se muestra la media de 1 animal por tratamiento.

En vista de que LT pmel-1 no proliferan *in vivo* en nuestras manos, decidimos cambiar al modelo más usado de LT antígeno-específico que es el ratón OT-I, el cual es un modelo extensamente utilizado en ensayos de presentación de antígenos y que puede ser usado *in vivo* (Drutman y col., 2010). Para esto realizamos un protocolo de inmunización similar al utilizado con los LT pmel-1, pero además de analizar la proliferación de los LT transferidos de manera adoptiva, analizamos también su capacidad de producir IFN- γ , la principal citoquina producida por LT CD8⁺ tras ser activados y orquestador maestro del sistema inmune innato y adaptativo (Schoenborn y col., 2007). Al analizar la proliferación de LT OT-I transferidos encontramos que DMSO DC inducen una proliferación del $99,43 \pm 0,12\%$ de LT OT-I, mientras que $4\mu\text{8C}$ DC induce $99,08 \pm 0,17\%$ de LT OT-I (Figura 7a y 7b). En cuanto a la expresión de IFN- γ tras re-estimulación de esplenocitos con el péptido derivado de OVA SIINFEKL, observamos que DMSO DC induce la expresión de IFN- γ en un $98,17 \pm 0,81\%$ de LT OT-I vs. un $96,13 \pm 1,5\%$ de LT OT-I cuando los animales fueron inmunizados con $4\mu\text{8C}$ DC (Figura 7c y 7d). Debido a que la proliferación y activación observada en LT OT-I transferidos de forma adoptiva alcanzó un nivel de saturación cercano al 100%, la dosis de DCs utilizada debió ser re-formulada, de forma de obtener una ventana de activación no saturante para evaluar el rol de IRE1 α /XBP-1s en presentación de antígenos *in vivo*. Para determinar la dosis óptima de DCs a administrar para obtener una respuesta óptima, transfirieron adoptivamente LT CD8⁺ OT-I de manera intravenosa a ratones C57BL/6 y al siguiente día se administraron $1,25 \times 10^5$, $2,5 \times 10^5$ o 5×10^5 DCs por la misma ruta a estos ratones (Figura 7e). Como se observa en la Figura 7a, el animal inmunizado con el control negativo de PBS, presenta una proliferación del 8,33% de los LT OT-I. Al analizar la proliferación de LT OT-I en animales inmunizados con DCs encontramos que todos los LT OT-I proliferan sin

importar el número de DCs inyectadas ($99,15 \pm 0,1\%$ $1,25 \times 10^6$ DC vs. $99,10 \pm 0,4\%$ $2,5 \times 10^6$ DC vs. $99,25 \pm 0,2\%$ 5×10^6 DC) (Figura 7a y 7b). Al analizar la activación de estos LT mediante expresión intracelular de IFN- γ tras ser re-estimulados con el péptido específico SIINFEKL, encontramos un 39% de LT positivos para IFN- γ en los animales tratados con el control negativo PBS, aunque estos LT corresponden a la población parental no proliferante y debido a la baja cantidad de puntos en el gráfico es artificioso compararlo con el resto de los tratamientos (Figura 7e). Al analizar los animales tratados con las distintas dosis de DCs, encontramos que nuevamente todos los LT OT-I expresan IFN- γ tras ser re-estimulados con el péptido SIINFEKL sin importar la dosis de DCs administradas ($99,25 \pm 0,1\%$ $1,25 \times 10^6$ DC vs. $99,75 \pm 0,1\%$ $2,5 \times 10^6$ DC vs. $93,5 \pm 5\%$ 5×10^6 DC) (Figura 7e). Estos resultados indican que, en contraste con el modelo pmel-1, el modelo OT-I prolifera vigorosamente *in vivo* ante dosis bajas de DCs y sin mostrar un efecto dosis-dependiente. Debido a que la respuesta se satura ante cualquier dosis de DCs, no nos entrega una ventana de oportunidad que pueda ser usada para analizar el rol del eje IRE1 α /XBP-1s en presentación antigénica *in vivo*.

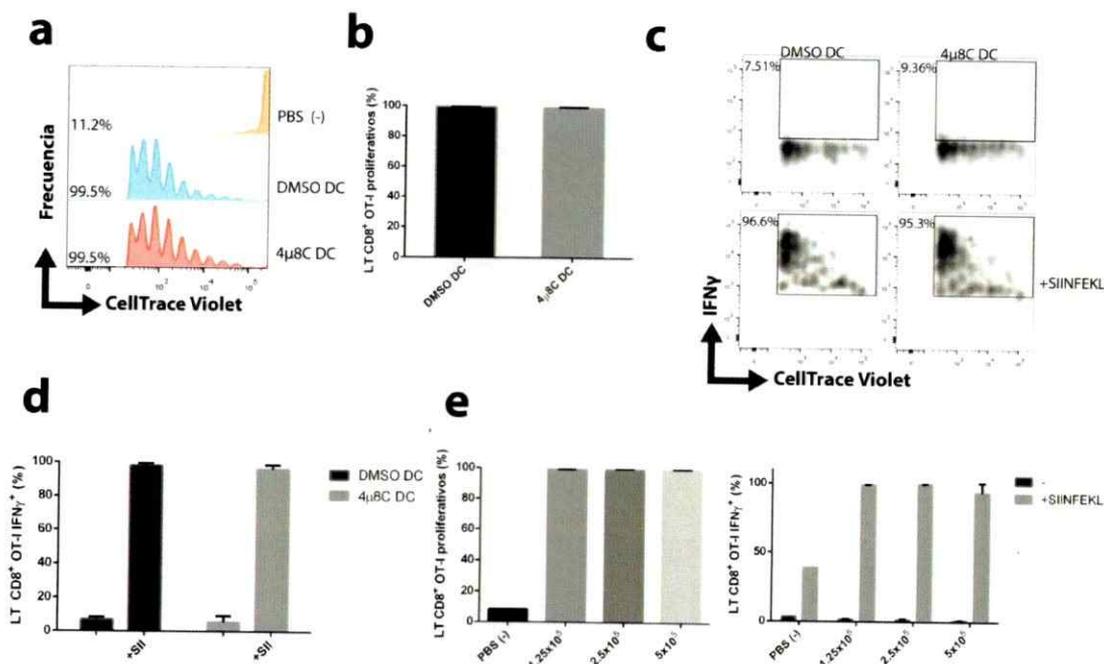


Figura 7. Modelo de transferencia adoptiva de LT OT-I en ratones C57BL/6 es insensible a la cantidad de DCs inoculadas. a-c) Ratones C57BL/6 fueron inmunizados como en la Figura 6, en donde se inocularon por vía intravenosa 1×10^6 LT CD8⁺ OT-I teñidos con Cell Trace Violet y luego al día siguiente se administraron por la misma ruta 2×10^5 DCs previamente pre-tratadas con el inhibidor 4μ8C a una concentración de 50 μM o DMSO como control de vehículo. Posteriormente las DCs fueron estimuladas con 100 μg/mL MEL + 200 μg/mL OVA. PBS administrado de forma intravenosa fue utilizado como control negativo. Luego de 5 días post administración de DCs, los animales fueron sacrificados y la proliferación de LT OT-I fue analizado en bazo mediante citometría de flujo. a) Histogramas representativos de la proliferación de LT OT-I en bazo. Los histogramas muestran los niveles de proliferación medidos por Cell Trace Violet en células vivas, CD3⁺CD8⁺, positivas para Cell Trace Violet e indican el porcentaje de LT proliferativos a la izquierda. b) Grafico de barras que muestra a modo de resumen de lo indicado en a), la media ± S.D. del porcentaje de LT OT-I proliferativos de 3 animales por tratamiento, excepto en el caso de PBS en el cual se muestra la media de 1 animal con tratamiento. c) Dot Plots representativos que muestran la proliferación y la producción de IFN-γ de LT OT-I en ausencia o presencia de re-estimulación con el péptido específico SIINFEKL. d) Grafico de barras que muestra a modo de resumen lo indicado en c). El grafico muestra la media ± S.D. del porcentaje de LT OT-I IFN-γ⁺ medido por citometría de flujo intracelular. e) Titulación de dosis de DC. Ratones C57BL/6 recibieron mediante transferencia adoptiva por vía intravenosa 1×10^6 LT CD8⁺ OT-I teñidos con Cell Trace Violet y luego al día siguiente se administraron por la misma ruta $1,25 \times 10^5$, $2,5 \times 10^5$ o 5×10^5 DCs previamente estimuladas con 100 μg/mL MEL + 200 μg/mL OVA. PBS administrado de forma intravenosa en vez de DCs fue utilizado como control negativo. d) Histogramas representativos de la proliferación de LT OT-I en bazo bajo las mismas condiciones como se indica en a). e) Grafico de barras que muestra la media ± S.D. del porcentaje

de LT OT-I proliferantes (izquierda) o productores de IFN- γ ⁺ en ausencia o presencia de re-estimulación con el péptido específico SIINFEKL (derecha) de 2 animales por tratamiento, excepto en el caso de PBS en el cual se muestra la media de 1 animal con tratamiento.

Ya que ninguno de los 2 modelos de transferencia adoptiva de LT antígeno específico fue capaz de darnos una ventana de activación en la cual pudiéramos intervenir el eje IRE1 α /XBP-1s en DCs para analizar su rol en la presentación de antígenos *in vivo*, se analizó el rol de esta vía en el repertorio endógeno en ratón. Para esto utilizamos un tetrámero de complejos MHC/péptido acoplado a un fluoróforo, lo cual lo convierte en una herramienta capaz de detectar TCR específicos (y por lo tanto clones de LT específicos) por citometría de flujo (Wooldridge y col., 2009). El tetrámero utilizado (H-2k^b/OVA) posee el alelo H-2K^b del MHC-I murino acoplado al péptido SIINFEKL, un péptido inmunodominante restringido a MHC-I derivado de OVA (OVA₂₅₇₋₂₆₄). Los animales fueron inmunizados de forma intravenosa con DCs incubadas previamente por 5 horas con MEL + OVA en ausencia o presencia del inhibidor 4 μ 8C. Como control negativo se utilizó PBS de forma intravenosa y como control positivo se administró una solución de forma intraperitoneal OVA + Poly I:C, un análogo sintético de RNA doble hebra (una estructura común en algunas clases de virus) que es capaz de actuar como un PAMP a través del receptor tipo toll 3 (TLR3) activando la respuesta inmune (Alexopoulou y col., 2001). Luego de la inmunización, los animales fueron sacrificados al día 7 y se analizó el bazo por citometría de flujo utilizando el tetrámero mencionado anteriormente además del marcador CD44, la cual es una molécula sobreexpresada en LT que han reconocido antígeno anteriormente (Baaten y col., 2012) (Figura 8a).

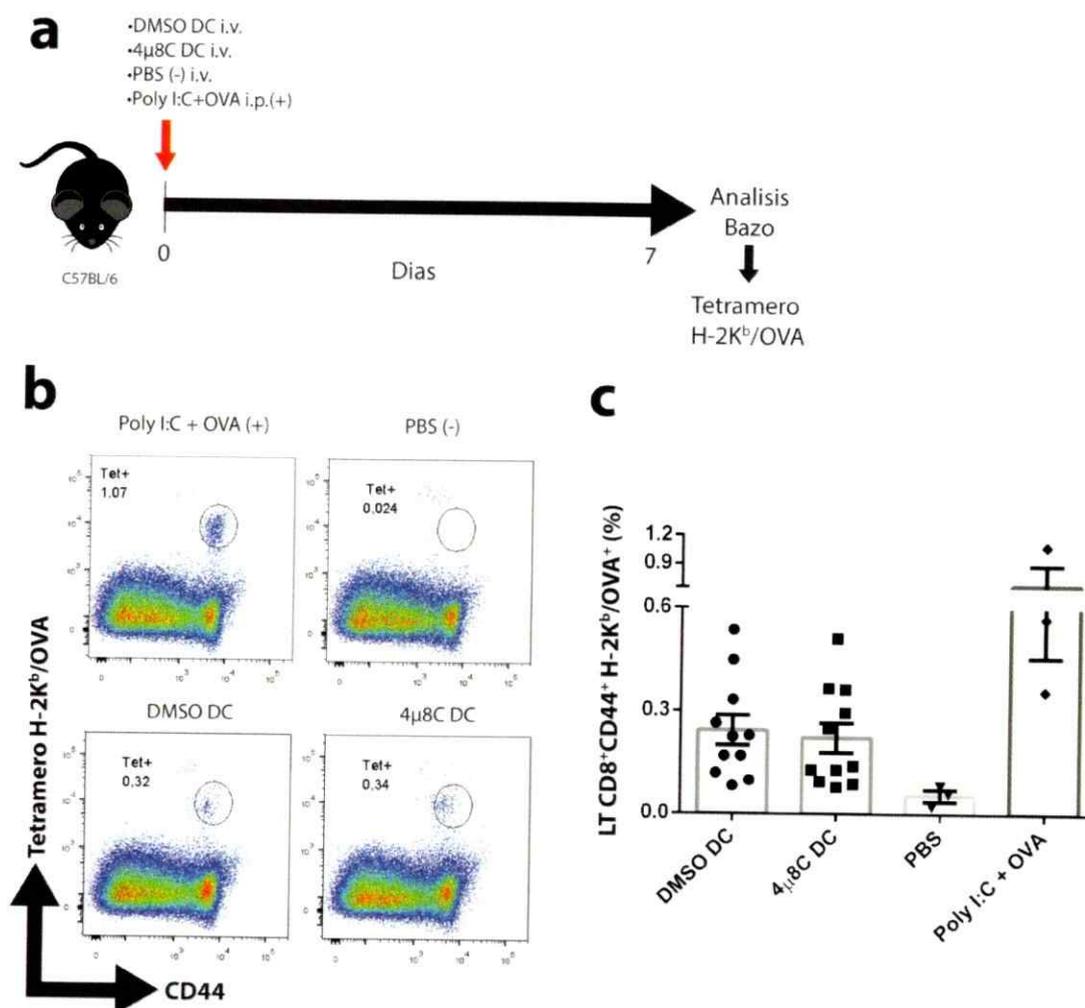


Figura 8. El inhibidor 4 μ 8C en DCs no afecta su capacidad de realizar presentación antigénica *in vivo*. DCs generadas a partir de medula ósea de ratones C57BL/6 fueron pre-tratadas por 1 hora con el inhibidor 4 μ 8C 50 μ M o DMSO como control de vehiculo. Luego, las DCs fueron incubadas por 5 horas con 100 μ g/mL MEL + 200 μ g/mL OVA para luego ser administradas de forma intravenosa a ratones de la misma cepa, 5×10^5 DCs/animal. 7 después de la inmunización, los animales fueron sacrificados y células obtenidas de bazo fueron teñidas para citometría de flujo con el tetrámero H-2k^b/OVA. a) Diseño experimental. 40 μ g OVA + 10 μ g Poly I:C administrados de forma intraperitoneal fueron utilizados como control positivo y PBS intravenoso como control negativo. b) Dot Plots representativos del marcaje con el tetrámero H-2k^b/OVA. Los Dot Plots muestran el porcentaje de LT antígeno-especifico y CD44⁺ en células vivas, CD3⁺CD8⁺. c) Grafico de barras que muestra la media \pm S.E.M. del porcentaje de LT CD44⁺ detectados por el tetrámero H-2k^b/OVA según la

estrategia de gating mencionada en c). Se muestran los resultados de 11 animales por tratamiento de DCs y 3 animales por tratamiento control (PBS y Poly I:C+OVA).

Como podemos observar en estos resultados (Figura 8b y 8c), el control positivo (inyección intraperitoneal de OVA + Poly I:C) es capaz de expandir esta población clonal hasta un $0,67 \pm 0,22\%$ de los LT CD8⁺ en bazo, mientras que el control negativo (PBS intravenoso) muestra el nivel basal de $0,06 \pm 0,02\%$. Los tratamientos con DCs logran por su parte inducir niveles similares de clones capaces de reconocer este complejo ($0,24 \pm 0,04\%$ DMSO DC vs. $0,22 \pm 0,04\%$ 4 μ 8C DC). Estos resultados muestran que no existen diferencias significativas en la capacidad de inducir la expansión de una población clonal de LT cuando las DCs son tratadas con el inhibidor 4 μ 8C.

La vacunación basada en DCs generadas con FLT3-L no es capaz de reducir el número de metástasis en un modelo de metástasis de melanoma B16.

La gran capacidad que tienen las DCs de presentar antígenos, expresar moléculas de co-estimulación y secreción de citoquinas inmunomodulatorias, las han vuelto un blanco interesante en el campo de la inmunoterapia (Cohn y col., 2014; Palucka y col., 2013). Por esta razón, analizamos el rol del eje IRE1 α /XBP-1s en DCs en un modelo de metástasis pulmonar del melanoma B16-F10 y B16-OVA. Para evaluar este aspecto, se empleó un protocolo de inmunización profiláctico, donde los animales son inmunizados de manera intravenosa con DCs previamente incubadas con MEL o MEL + OVA y posteriormente a los animales se les administra B16-F10 o B16-OVA por la misma ruta y luego de 15 días, los animales fueron sacrificados y se evaluó la presencia de metástasis en pulmones (Figura 9).

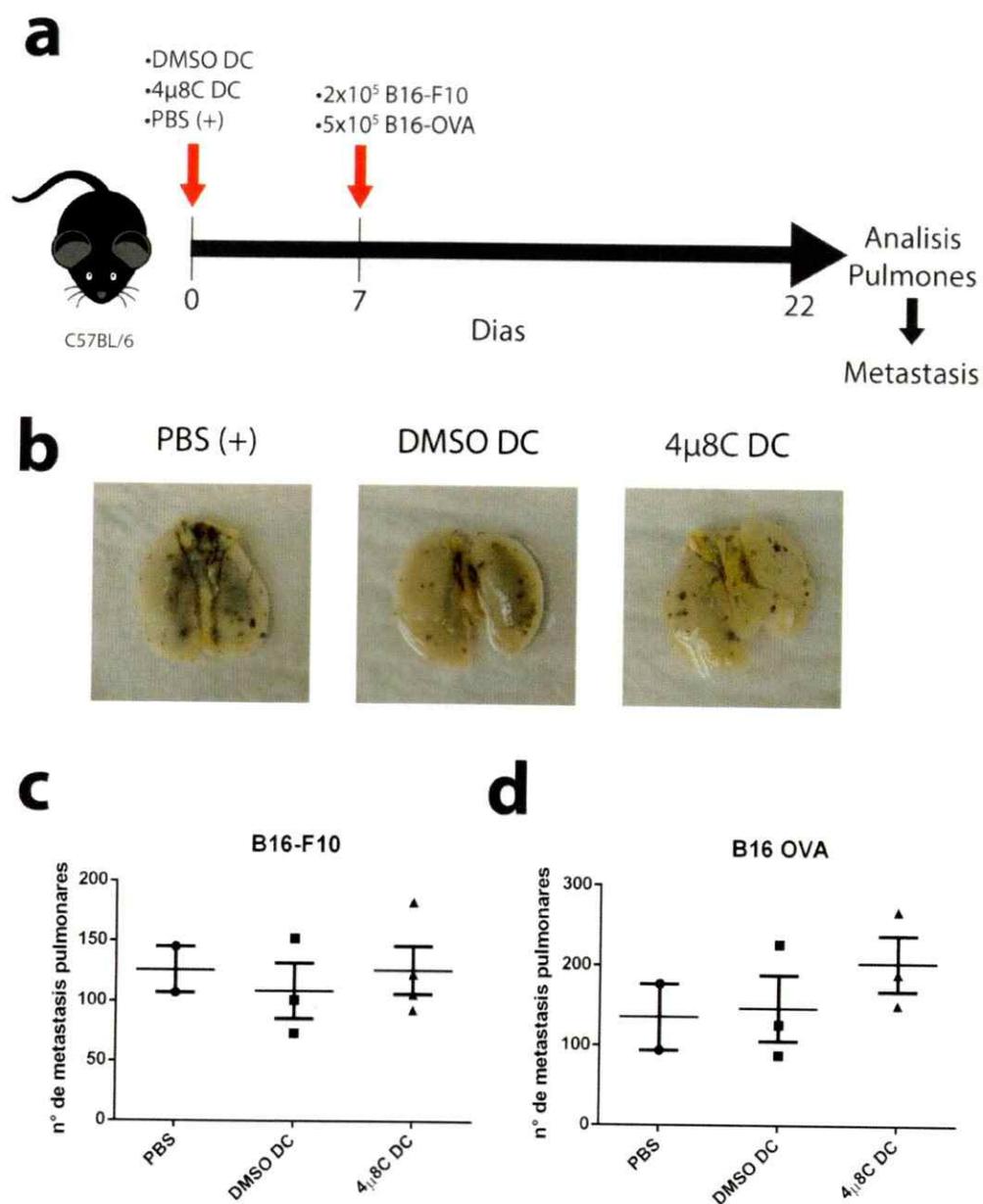


Figura 9. La inmunización profiláctica con FLT3-L DCs no otorga protección frente a un desafío de melanoma murino metastásico. a) Diseño experimental. DCs generadas a partir de medula ósea de ratones C57BL/6 fueron pre-tratadas por 1 hora con el inhibidor 4µ8C 50 µM o DMSO como control de vehículo. Luego, las DCs fueron incubadas por 5 horas con 50 µg/mL MEL + 50 µg/mL B16-F10 o 50 µg/mL MEL + 50 µg/mL B16-OVA, dependiendo de la línea de melanoma utilizada para desafiar al ratón en el experimento. 1×10^6 DCs fueron administradas de forma intravenosa a ratones de

la misma cepa y 7 días más tarde se administraron 2×10^5 células B16-F10 o 5×10^5 células B16-OVA de forma intravenosa. PBS intravenoso fue utilizado como control positivo de metástasis. Luego de 15 días desde la administración de células de melanoma, los animales fueron sacrificados y se recolectaron sus pulmones para dejarlos en solución de Fekete por 2 a 4 días y posteriormente contar el número de metástasis. b) Imágenes representativas de animales con metástasis de B16-OVA luego del protocolo indicado en a). c) Grafico de barras que muestra la media \pm S.E.M. del número de metástasis pulmonares en animales desafiados con B16-F10 con el protocolo indicado en a). Se utilizaron 3 animales por tratamiento, a excepción del tratamiento PBS, donde se utilizaron 2 animales. d) Grafico de barras que muestra la media \pm S.E.M. del número de metástasis pulmonares en animales desafiados con B16-OVA con el protocolo indicado en a). Se utilizaron 3 animales por tratamiento, a excepción del tratamiento PBS, donde se utilizaron 2 animales.

Como se muestra en la Figura 9, las metástasis de melanoma murino se observan como nódulos negros que contrastan con los pulmones de color blanco, lo que facilita su conteo (Figura 9b). Al analizar el número de metástasis provocadas por el desafío con B16-F10, observamos en animales tratados con el control positivo de PBS la aparición de $126,0 \pm 19,0$ metástasis pulmonares. Al comparar estos resultados con los animales inmunizados de forma profiláctica con DCs, no encontramos fuertes diferencias con el control positivo, tomando en cuenta que los animales inmunizados con DMSO DC y $4\mu\text{8C}$ DC obtuvieron $108,7 \pm 23,1$ y $126,3 \pm 19,9$ metástasis pulmonares, respectivamente. Ya que en resultados anteriores pudimos observar que la inmunización con DCs es capaz de expandir una población clonal de LT capaces de reconocer OVA (Figura 8), desafiarnos a ratones previamente inmunizados con DCs con la línea tumoral B16-OVA, una variante de la línea de melanoma murino B16-F10 que expresa OVA de manera constitutiva (Figura 9d). De forma similar a lo observado en ratones desafiados con B16-F10, el desafío con B16-OVA es capaz de inducir $135,5 \pm 41,5$ metástasis pulmonares en animales tratados con el control positivo PBS, $146,7 \pm 41,2$ metástasis en animales inmunizados con DMSO DC y $203,0 \pm 34,4$ metástasis en animales inmunizados con $4\mu\text{8C}$ DC. Ya que el número de metástasis entre animales inmunizados con DMSO DC o $4\mu\text{8C}$ DC es igual o mayor al número de

metástasis de animales tratados con el control PBS, estos resultados indican que la inmunización profiláctica con DCs generadas con FLT3-L no es capaz de otorgar protección en un modelo de metástasis tumoral.

DISCUSIÓN

La evidencia del papel regulatorio de la respuesta a proteínas mal plegadas en el funcionamiento del sistema inmune ha incrementado enormemente en los últimos años. Dentro de las células que componen el sistema inmune, células presentadoras de antígenos tales como linfocitos B y macrófagos han mostrado ser altamente dependientes de estas vías de señalización, para ejecutar diversos procesos asociados a función y supervivencia (Todd y col. 2008, Bettigole & Glimcher 2014). Además, se ha reportado que el factor de transcripción XBP-1s es esencial para el desarrollo y diferenciación de DCs (Iwakoshi y col. 2007). A nivel funcional, se ha descrito que la vía IRE1 α /XBP-1s controla directamente el proceso de presentación cruzada en DCs, a través de la regulación de diversos genes asociados a este proceso tales como Tapasina y Ergic3, entre otros genes (Osorio y col. 2014). Si bien esta evidencia da cuenta del papel de la vía IRE1 α /XBP-1s en el desarrollo y función de DCs en ausencia de inflamación, existe información limitada respecto a su rol en contextos inflamatorios tales como cáncer, infección bacteriana o alergias.

En resultados previos, observamos que MEL es un potente activador del eje IRE1 α /XBP-1s en DCs generadas en presencia de FLT3-L (Costoya, 2015). Dado que los efectos observados fueron a nivel de RNA proveniente de cultivos heterogéneos, una de las interrogantes que surgieron fue si algunos subtipos de DCs son activados más fuertemente que otros, ya que existen antecedentes de que este eje se encuentra activo de manera constitutiva en cDCs y preferencialmente en cDC1 (Osorio y col., 2014). Gracias al ratón reportero ERAI se determinó por citometría de flujo que, en congruencia con lo reportado en la literatura, las cDC poseen un nivel basal de

activación de IRE1 α /XBP-1s elevado, y preferencialmente activo en cDC1. Al estimular las DC con MEL, ambos tipos de cDC incrementan la expresión de XBP-1s, aunque nuevamente las cDC1 poseen niveles mayores de activación. En base a estos resultados y los reportes en la literatura sobre la dependencia de cDC1 por este eje para su correcta función y supervivencia (Osorio y col., 2014; Tavernier y col., 2017), el resto de los análisis fueron realizados en este subtipo celular.

Al tratar de descifrar el origen de esta señal en MEL y el mecanismo por el cual activa este eje en DCs, encontramos a que este no se debe a una reacción xenogénica por el uso de lisados celulares humanos en DCs murinas, ya que las DCs son capaces de activarse a niveles similares con lisados de melanoma murino B16-F10 y no así con lisados de leucocitos humanos. Sorprendentemente, el condicionamiento con shock térmico en MEL, un probado método para aumentar la expresión de señales de peligro inmunológicas en estas células, no afecta los niveles de activación de XBP-1s en DCs, sugiriendo que el gatillante de esta respuesta es un compuesto inherente a la naturaleza de MEL y no la exposición de una señal de peligro como calreticulina o HMGB1 (Aguilera et al. y col., 2011). Por otra parte, el medio condicionado de melanoma, es decir el sobrenadante de células de melanoma vivas y sin condicionar con shock térmico, es capaz de inducir niveles de activación de XBP-1s muy cercanos a MEL. Esto indicaría que el activador de IRE1 α /XBP-1s en DCs es un factor inherente a las células de melanoma, y sería secretado por estas de forma constitutiva. Un trabajo publicado hace un par de años demuestra que ascitas derivadas de cáncer ovárico inducen la activación del eje IRE1 α /XBP-1s en DCs mediante la generación de subproductos de la peroxidación de lípidos y ROS, los cuales pueden formar aductos estables con chaperonas residentes de RE y así causar estrés de RE (Cubillos-Ruiz y

col. 2015). En conjunto, estos y nuestros resultados sugieren que la respuesta a proteínas mal plegadas constituye un mecanismo celular relevante asociado a la detección de células tumorales, lo que puede tener un impacto en el desarrollo de potenciales inmunoterapias del cáncer.

Importantemente, en este trabajo de tesis también obtuvimos evidencia, a nivel funcional, del papel de la vía IRE1 α /XBP-1s en la activación de DCs con lisados de células tumorales. En este contexto, observamos que la inhibición farmacológica de IRE1 α /XBP-1s disminuye la producción de las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α e IL-6 en DCs. Nuestros resultados van en línea con lo publicado en la literatura, donde macrófagos deficientes para XBP-1 tienen una producción disminuida de estas citoquinas en respuesta a activación de TLRs (Martinon y col. 2010), reafirmando la teoría que postula que XBP-1s bajo contextos inflamatorios posee una acción sinérgica con NF- κ B, aumentando la expresión de citoquinas pro-inflamatorias. Si bien la inhibición de IRE1 α con 4 μ 8C no disminuyó significativamente los niveles de IL-10 secretados en respuesta a la estimulación con lisados tumorales, si existe una tendencia que podría convertirse en significativa aumentando el tamaño muestral. De ser efectivo, no podemos descartar que el efecto observado en la producción de citoquinas se deba a un fenómeno global que afecta la producción de cualquier molécula secretada, ya que debemos recordar que dentro de las funciones de XBP-1s está la de activar genes blancos involucrados con la remodelación y expansión del retículo endoplásmico, de forma de aumentar la capacidad biosintética de este (Hetz y col., 2015; Janssens y col., 2014; Walter & Ron 2011), por lo que la inhibición de esta vía podría hacer al retículo endoplásmico menos competente y por lo tanto, producir

niveles menores de citoquinas. Debido a la naturaleza de este fenómeno, es relevante continuar estos estudios y sus perspectivas en inmunología tumoral e inmunoterapia.

Resultados previos de nuestro laboratorio indican que la inhibición de IRE1 α mediante 4 μ 8C disminuye la presentación cruzada de antígenos derivados de OVA en co-cultivos con LT OT-I (Costoya 2016). A pesar de que DCs incubadas con el péptido específico SIINFEKL en presencia del inhibidor 4 μ 8C no presentaban diferencias en la activación de DCs, indicando que el efecto observado no se debía a una disminución de MHC-I, todavía faltaba una demostración formal de que el inhibidor 4 μ 8C no afectara los niveles de MHC-I e indagar si la inhibición de esta ruta afecta específicamente la presentación cruzada de antígenos o si afectaba algún evento general en el procesamiento de antígenos en MHC-I. Estas preguntas fueron respondidas gracias al modelo de ratón CD11c.DOG, en donde observamos que el inhibidor no afecta la presentación de antígenos endógenos en MHC-I, lo que en conjunto con los resultados anteriores de nuestra unidad demuestran que la inhibición de este eje en DCs afecta específicamente la presentación cruzada de antígenos y no afecta la presentación de péptidos endógenos en MHC-I. En línea con lo anterior, existe evidencia de que el eje IRE-1 α /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 col., 2013; O. P. Joffre et al. y col., 2012) y cuyo mRNA es blanco de RIDD. Sin embargo, en nuestro sistema de estudio no hemos sido capaces de detectar inducción de RIDD, por lo tanto, es posible que la vía IRE-1 α /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-1s es el responsable de traslocar 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 traslocar polipéptidos desde el citoplasma hacia el ER (Shoulders y col., 2014; Zehner y col., 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.

Para extender nuestros resultados de presentación antigénica obtenidos previamente en nuestra unidad, evaluamos el rol del eje IRE1 α /XBP-1s en presentación de antígeno *in vivo*. Nuestra primera aproximación para analizar este objetivo, fue la transferencia adoptiva de LT pmel-1, los cuales poseen un TCR transgénico capaz de reconocer antígenos de melanoma por lo que son una herramienta atractiva para evaluar respuestas antitumorales. Luego de inmunizar con DCs animales que habían recibido previamente estos LT, sorprendentemente observamos una pobre o nula proliferación de estos, incluso en el control positivo. Si bien este modelo de LT antígeno-específico ha funcionado previamente en ensayos *in vitro* (Medel 2017), en la literatura se ha reportado que estos LT necesitan señales adicionales para expandirse y diferenciarse *in vivo*, lo que consiste usualmente en inmunizaciones con virus que expresan la proteína hgp100 y la administración de grandes dosis de IL-2 de forma periódica (Hwang et al. y col., 2006; Overwijk y col., 2003; Palmer et al. y col., 2008), lo cual proporciona grandes cantidades del antígeno

específico que estos LT reconocen y señales de sobrevida, lo cual explica por qué en nuestros ensayos no fueron capaces de proliferar eficientemente. Al contrario a lo observado al utilizar LT pmel-1, al cambiar al modelo OT-I para el mismo tipo de ensayo observamos que estos LT proliferan y se activan a niveles saturantes en animales inmunizados con DCs en una manera no concordante a dosis-efecto. Debido a que en este modelo, 100% de los linfocitos proliferan y se activan vigorosamente, no existe una ventana en la cual podamos evaluar el rol de IRE1 α /XBP-1s en DCs en la presentación de antígenos a LT *in vivo*.

Las vacunas basadas en DC buscan activar LT dentro del repertorio endógeno del paciente, por lo que realizamos el mismo tipo de aproximación en DCs. Para poder analizar el efecto del inhibidor 4 μ 8C en DCs, utilizamos un tetrámero de complejos MHC/péptido que permite detectar una población clonal de LT específicos contra un antígeno específico, como es OVA en este caso. Observamos que el inhibidor no afecta la capacidad de DCs de presentar antígenos y expandir una población de LT *in vivo*. Si bien este resultado no va en la misma línea que los resultados de presentación antigénica obtenidos *in vitro* obtenidos previamente (Costoya 2016, Medel 2017), esto puede deberse a una limitación técnica en el uso de este tipo de inhibidores, los cuales no modifican de forma irreversible su blanco. De hecho, según evidencia reportada, el inhibidor de IRE1 α 4 μ 8C usado en este trabajo posee una estabilidad relativa de 1,6h y el mecanismo de inhibición es reversible al remover el medio (Cross et al. y col., 2012). Para superar esta limitancia, la mayoría de los resultados obtenidos anteriormente en nuestra unidad se obtuvieron utilizando DCs fijadas, las cuales tienen un fenotipo representativo de un punto específico en el tiempo tras la incubación con el inhibidor 4 μ 8C. En experimentos *in vivo* se necesitan a DCs totalmente funcionales, que sean

capaces de migrar a linfonodos y por lo tanto no pueden ser fijadas para su uso. Por lo tanto, es posible que el efecto del inhibidor desaparezca al poco tiempo de ser inyectada al ratón y así recuperar esta vía de señalización. Debido a estas limitantes, no podemos concluir de momento si efectivamente XBP-1s juega un rol en la presentación de antígenos tumorales *in vivo* o si el efecto observado es producto de la reversibilidad del inhibidor 4 μ 8C.

La vacunación con DCs en un contexto tumoral tienen como objetivo clínico la regresión o desaparición del tumor en un paciente (Cohn et al. y col., 2014; Gilboa y col., 2007). Para lograr esto, las DCs inoculadas en el paciente deben ser capaces de migrar hacia el linfonodo y realizar presentación de antígenos a LT CD8⁺ y CD4⁺ (Melero y col., 2014). En nuestro modelo de inmunoterapia antitumoral, los animales son vacunados de manera profiláctica con DCs previamente incubadas con lisados tumorales en presencia o ausencia de el inhibidor 4 μ 8C y luego son desafiados con 2 variantes de la línea tumoral de melanoma murino B16. Encontramos que, sorprendentemente, la vacunación con DCs es incapaz de disminuir el número de metástasis en ratones desafiados con B16-F10 o B16-OVA, en comparación con animales no inmunizados. Estos resultados, en conjunto con los resultados de ensayos con el tetrámero de MHC/péptido, indican que si bien las DCs generadas con FLT3-L son capaces de inducir la expansión de LT antígeno específico, estos no son capaces de restringir la aparición de metástasis. Si bien estos resultados no fueron esperados, al revisar la literatura no existen reportes de ensayos de inmunidad antitumoral utilizando con DCs generadas *in vitro* con la citoquina FLT3-L. Esto puede deberse a que estas células, si bien poseen los marcadores de linaje y son capaces de expandir

LT *in vivo*, no son capaces de polarizar los LT hacia un perfil competente para eliminar el tumor.

En resumen, en este trabajo hemos descubierto las células de melanoma son capaces de activar este el eje IRE1 α /XBP-1s en DCs, y preferencialmente cDC1, mediante un factor soluble. Adicionalmente, la inhibición de IRE1 α en DCs mediante el inhibidor 4 μ 8C disminuye específicamente la presentación cruzada de antígenos en MHC-I y no la presentación de antígenos endógenos, pero si disminuye la producción de TNF- α e IL-6 en DCs estimuladas con MEL. Además, la inhibición de este eje mediante el uso del inhibidor 4 μ 8C no afecta la capacidad de DCs de expandir LT antígeno-específico en el repertorio endógeno de los ratones inmunizados. Finalmente, la inmunización con DCs generadas *in vitro* con FLT3-L no es capaz de disminuir el número de metástasis en un modelo de melanoma murino.

Dentro de las perspectivas de este trabajo de tesis está el identificar la naturaleza del componente activador de XBP-1s presente en células tumorales, mediante el tratamiento con nucleasas no específicas (de manera de probar si el gatillante es un ácido nucleico) o denaturación por temperatura (de forma de determinar si el gatillante es de naturaleza proteica). Experimentos futuros de nuestra unidad contemplan realizar experimentos de presentación antigénica *in vivo* en modelos murinos *knock-out* para IRE1 α en DCs, los cuales tienen un fenotipo no reversible. Finalmente se pretende inmunizar ratones con DCs generadas *in vitro* con GM-CSF, las cuales si han sido reportadas como eficientes para rechazar metástasis pulmonares (Helft y col., 2015).

CONCLUSIONES

A partir del estudio realizado en este trabajo de tesis, observamos que los lisados de líneas celulares de melanoma actúan como activadores de IRE1 α /XBP-1s en DCs, preferencialmente en cDC1. Observamos que esta activación no se debe a una reacción xenogénica, es inherente a melanoma y es mediada a través de un factor soluble secretado por MEL. Adicionalmente, observamos que la inhibición del eje IRE1 α /XBP-1s no afecta la presentación de antígenos endógenos en MHC-I, por lo que el efecto observado en trabajo previo en nuestra unidad se debe a un efecto específico en presentación cruzada. Además, se observó que existe una disminución en la producción de TNF- α e IL-6 en DCs incubadas con melanoma cuando son tratadas con el inhibidor descrito. Finalmente, no observamos diferencias en expansión de LT antígeno-específico en repertorio endógeno de ratones inmunizados con DCs previamente tratadas con el inhibidor 4 μ 8C y también que DCs generadas *in vitro* con la citoquina FLT3-L no son capaces de disminuir la carga tumoral en un modelo de melanoma metastásico murino. Estos resultados no permiten afirmar la hipótesis propuesta ya que debido a limitaciones biológicas no permiten obtener la información necesaria para identificar al eje IRE1 α /XBP-1s como una cascada de señalización relevante en la capacidad antitumoral de DCs *in vivo*.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, R., Saffie, C., Tittarelli, A., González, E. E., Ramírez, M., Reyes, D., Pereda, C., Hevia, D., García, T., Salazar, L., Ferreira, A., Hermoso, M., Mendoza-Naranjo, A., Ferrada, C., Garrido, P., López, M. N., & Salazar-Onfray, F. (2011). Heat-shock induction of tumor-derived danger signals mediates rapid monocyte differentiation into clinically effective dendritic cells. *Clinical Cancer Research*, *17*: 2474–2483.
- Alexopoulou, L., Czopik Holt, A., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappa B by Toll-like receptor 3. *Nature*, *413*: 732–738.
- Askew, D., & Harding, C. V. (2008). Antigen processing and CD24 expression determine antigen presentation by splenic CD4+ and CD8+ dendritic cells. *Immunology*, *123*: 447–455.
- Baaten, B. J. G., Tinoco, R., Chen, A. T., & Bradley, L. M. (2012). Regulation of antigen-experienced T cells: Lessons from the quintessential memory marker CD44. *Frontiers in Immunology*, *3*: 1–12.
- Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, *392*: 245–52.
- Bellinghausen, I., Brand, P., Böttcher, I., Klostermann, B., Knop, J., & Saloga, J. (2003). Production of interleukin-13 by human dendritic cells after stimulation with protein allergens is a key factor for induction of T helper 2 cytokines and is associated with activation of signal transducer and activator of transcription-6. *Immunology*, *108*: 167–76.
- Belz, G. T., & Nutt, S. L. (2012). Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nature Reviews. Immunology*, *12*: 101–13.
- Berman, R. M., Suzuki, T., Tahara, H., Robbins, P. D., Narula, S. K., & Lotze, M. T. (1996). Systemic administration of cellular IL-10 induces an effective, specific, and long-lived immune response against established tumors in mice. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md. : 1950), *157*: 231–8.
- Berridge, M. J., Lipp, P., & Bootman, M. D. (2000). The versatility and universality of calcium signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *1*: 11–21.
- Bettigole, S. E., Lis, R., Adoro, S., Lee, A.-H., Spencer, L. a, Weller, P. F., & Glimcher, L. H. (2015). The transcription factor XBP1 is selectively required for eosinophil differentiation. *Nature Immunology*, *16*: 1–11.
- Blanco, P., Palucka, A. K., Pascual, V., & Banchereau, J. (2008). Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, *19*: 41–52.
- Blum, J. S., Wearsch, P. A., & Cresswell, P. (2013). *Pathways of Antigen Processing*. *Annu. Rev. Immunol* (Vol. 31).

- Bronner, D. N., Abuaita, B. H., Chen, X., Fitzgerald, K. A., Nuñez, G., He, Y., Yin, X.-M., & O'Riordan, M. X. D. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress Activates the Inflammasome via NLRP3- and Caspase-2-Driven Mitochondrial Damage. *Immunity*. **43**: 451–62.
- Broz, M. L., Binnewies, M., Boldajipour, B., Nelson, A. E., Pollack, J. L., Erle, D. J., Barczak, A., Rosenblum, M. D., Daud, A., Barber, D. L., Amigorena, S., van'tVeer, L. J., Sperling, A. I., Wolf, D. M., & Krummel, M. F. (2014). Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell*. **26**: 638–652.
- Brubaker, S. W., Bonham, K. S., Zanoni, I., & Kagan, J. C. (2015). *Innate immune pattern recognition: a cell biological perspective. Annual review of immunology* (Vol. 33).
- Cao, W., Ramakrishnan, R., Tuyrin, V. A., Veglia, F., Condamine, T., Amoscato, A., Mohammadyani, D., Johnson, J. J., Zhang, L. M., Klein-Seetharaman, J., Celis, E., Kagan, V. E., & Gabrilovich, D. I. (2014). Oxidized Lipids Block Antigen Cross-Presentation by Dendritic Cells in Cancer. *The Journal of Immunology*. **192**: 2920–2931.
- Cebrian, I., Visentin, G., Blanchard, N., Jouve, M., Bobard, A., Moita, C., Enninga, J., Moita, L. F., Amigorena, S., & Savina, A. (2011). Sec22b Regulates Phagosomal Maturation and Antigen Crosspresentation by Dendritic Cells. *Cell*. **147**: 1355–1368.
- 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., Fiebigler, E., Ron, D., Kagan, J. C., & Lencer, W. I. (2013). The unfolded protein response element IRE1 α senses bacterial proteins invading the ER to activate RIG-I and innate immune signaling. *Cell Host and Microbe*. **13**: 558–569.
- Cisse, B., Caton, M. L., Lehner, M., Maeda, T., Scheu, S., Locksley, R., Holmberg, D., Zweier, C., den Hollander, N. S., Kant, S. G., Holter, W., Rauch, A., Zhuang, Y., & Reizis, B. (2008). Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell*. **135**: 37–48.
- Coelho, D. S., & Domingos, P. M. (2014). Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay. *Frontiers in Genetics*. **5**: 76.
- Cohn, L., & Delamarre, L. (2014). Dendritic cell-targeted vaccines. *Frontiers in Immunology*. **5**: 1–11.
- Costoya, C. (2016). Identificación de activadores inmunológicos de la vía asociada a la respuesta a proteínas mal plegadas IRE1 α /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., & Harding, H. P. (2012). The molecular basis for selective inhibition of unconventional mRNA splicing by an IRE1-binding small molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **109**: E869-78.

- 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., Ellenson, L. H., Caputo, T., Lee, A.-H., Conejo-Garcia, J. R., & Glimcher, L. H. (2015). ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis. *Cell*. **161**: 1527–1538.
- Diao, J., Zhao, J., Winter, E., & Catral, M. S. (2010). Recruitment and differentiation of conventional dendritic cell precursors in tumors. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). **184**: 1261–7.
- Dieu-Nosjean, M.-C., Antoine, M., Danel, C., Heudes, D., Wislez, M., Poulot, V., Rabbe, N., Laurans, L., Tartour, E., de Chaisemartin, L., Lebecque, S., Fridman, W.-H., & Cadranel, J. (2008). Long-term survival for patients with non-small-cell lung cancer with intratumoral lymphoid structures. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*. **26**: 4410–7.
- Dixon, G. L., Newton, P. J., Chain, B. M., Katz, D., Andersen, S. R., Wong, S., van der Ley, P., Klein, N., & Callard, R. E. (2001). Dendritic cell activation and cytokine production induced by group B *Neisseria meningitidis*: interleukin-12 production depends on lipopolysaccharide expression in intact bacteria. *Infection and Immunity*. **69**: 4351–7.
- Dorner, B. G., Dorner, M. B., Zhou, X., Opitz, C., Mora, A., Güttler, S., Hutloff, A., Mages, H. W., Ranke, K., Schaefer, M., Jack, R. S., Henn, V., & Kroczek, R. A. (2009). Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8⁺ T cells. *Immunity*. **31**: 823–33.
- Drutman, S. B., & Trombetta, E. S. (2010). Dendritic cells continue to capture and present antigens after maturation in vivo. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950). **185**: 2140–6.
- Edelson, B. T., Kc, W., Juang, R., Kohyama, M., Benoit, L. a., Klekotka, P. a., Moon, C., Albring, J. C., Ise, W., Michael, D. G., Bhattacharya, D., Stappenbeck, T. S., Holtzman, M. J., Sung, S.-S. J., Murphy, T. L., Hildner, K., & Murphy, K. M. (2010). Peripheral CD103⁺ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8⁺ conventional dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*. **207**: 823–836.
- El Mezayen, R., El Gazzar, M., Seeds, M. C., McCall, C. E., Dreskin, S. C., & Nicolls, M. R. (2007). Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunology Letters*. **111**: 36–44.
- Emmerich, J., Mumm, J. B., Chan, I. H., LaFace, D., Truong, H., McClanahan, T., Gorman, D. M., & Oft, M. (2012). IL-10 directly activates and expands tumor-resident CD8⁺ T cells without De Novo infiltration from secondary lymphoid organs. *Cancer Research*. **72**: 3570–3581.
- Engblom, C., Pfirschke, C., & Pittet, M. J. (2016). The role of myeloid cells in cancer therapies. *Nature Reviews. Cancer*. **16**: 447–62.

- Everts, B., Amiel, E., Huang, S. C.-C., Smith, A. M., Chang, C.-H., Lam, W. Y., Redmann, V., Freitas, T. C., Blagih, J., van der Windt, G. J. W., Artyomov, M. N., Jones, R. G., Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2014). TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKK ϵ supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nature Immunology*, *15*: 323–32.
- Everts, B., & Pearce, E. J. (2014). Metabolic control of dendritic cell activation and function: recent advances and clinical implications. *Frontiers in Immunology*, *5*: 203.
- Ferrero, I., Held, W., Wilson, A., Tacchini-Cottier, F., Radtke, F., & Robson MacDonald, H. (2002). Mouse CD11C⁺ B220⁺ Gr1⁺ plasmacytoid dendritic cells develop independently of the T-cell lineage. *Blood*, *100*: 2852–2857.
- Fisher, D. T., Appenheimer, M. M., & Evans, S. S. (2015). The Two Faces of IL-6 in the Tumor Microenvironment. *Seminars in Immunology*, *26*: 38–47.
- Frakes, A. E., & Dillin, A. (2017). The UPR ER: Sensor and Coordinator of Organismal Homeostasis. *Molecular Cell*, *66*: 761–771.
- Gardner, B. M., Pincus, D., Gotthardt, K., Gallagher, C. M., & Walter, P. (2013). Endoplasmic Reticulum Stress Sensing in the Unfolded Protein Response. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*: a013169–a013169.
- Gérard, C. M., Bruyns, C., Delvaux, A., Baudson, N., Dargent, J. L., Goldman, M., & Velu, T. (1996). Loss of tumorigenicity and increased immunogenicity induced by interleukin-10 gene transfer in B16 melanoma cells. *Human Gene Therapy*, *7*: 23–31.
- Getz, G. S. (2005). Thematic review series: the immune system and atherogenesis. Bridging the innate and adaptive immune systems. *Journal of Lipid Research*, *46*: 619–22.
- Ghosh, R., Wang, L., Wang, E. S., Perera, B. G. K., Igarria, A., Morita, S., Prado, K., Thamsen, M., Caswell, D., Macias, H., Weiberth, K. F., Gliedt, M. J., Alavi, M. V., Hari, S. B., Mitra, A. K., Bhatarai, B., Schürer, S. C., Snapp, E. L., Gould, D. B., German, M. S., Backes, B. J., Maly, D. J., Oakes, S. A., & Papa, F. R. (2014). Allosteric inhibition of the IRE1 α RNase preserves cell viability and function during endoplasmic reticulum stress. *Cell*, *158*: 534–548.
- Gilboa, E. (2007). DC-based cancer vaccines. *The Journal of Clinical Investigation*, *117*: 1195–1203.
- Goc, J., Germain, C., Vo-Bourgais, T. K. D., Lupo, A., Klein, C., Knockaert, S., De Chaisemartin, L., Ouakrim, H., Becht, E., Alifano, M., Validire, P., Remark, R., Hammond, S. A., Cremer, I., Damotte, D., Fridman, W. H., Sautes-Fridman, C., & Dieu-Nosjean, M. C. (2014). Dendritic cells in tumor-associated tertiary lymphoid structures signal a th1 cytotoxic immune contexture and license the positive prognostic value of infiltrating CD8⁺ t cells. *Cancer Research*, *74*: 705–715.

Guilliams, M., Dutertre, C. A., Scott, C. L., McGovern, N., Sichien, D., Chakarov, S., Van Gassen, S., Chen, J., Poidinger, M., De Pijck, S., Tavernier, S. J., Low, I., Irac, S. E., Mattar, C. N., Sumatoh, H. R., Low, G. H. L., Chung, T. J. K., Chan, D. K. H., Tan, K. K., Hon, T. L. K., Fossum, E., Bogen, B., Choolani, M., Chan, J. K. Y., Larbi, A., Luche, H., Henri, S., Saeys, Y., Newell, E. W., Lambrecht, B. N., Malissen, B., & Ginhoux, F. (2016). Unsupervised High-Dimensional Analysis Aligns Dendritic Cells across Tissues and Species. *Immunity*. **45**: 669–684.

Guilliams, M., Ginhoux, F., Jakubzick, C., Naik, S. H., Onai, N., Schraml, B. U., Segura, E., Tussiwand, R., & Yona, S. (2014). Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny. *Nature Reviews. Immunology*. **14**: 571–578.

Häcki, J., Egger, L., Monney, L., Conus, S., Rossé, T., Fellay, I., & Borner, C. (2000). Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene*. **19**: 2286–2295.

Han, D., Lerner, A. G., Vande Walle, L., Upton, J.-P., Xu, W., Hagen, A., Backes, B. J., Oakes, S. a, & Papa, F. R. (2009). IRE1 α kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell*. **138**: 562–75.

Harding, H. P., Zhang, Y., & Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. **397**: 271–274.

Helft, J., Böttcher, J., Chakravarty, P., Zelenay, S., Huotari, J., Schraml, B. U., Goubau, D., & Reis e Sousa, C. (2015). GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population of CD11c⁺MHCII⁺ Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity*. **42**: 1197–1211.

Henry, C. J., Ornelles, D. a, Mitchell, L. M., Brzoza-Lewis, K. L., & Hiltbold, E. M. (2008). IL-12 produced by dendritic cells augments CD8⁺ T cell activation through the production of the chemokines CCL1 and CCL17. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. **181**: 8576–8584.

Herber, D. L., Cao, W., Nefedova, Y., Novitskiy, S. V, Nagaraj, S., Tyurin, V. A., Corzo, A., Cho, H.-I., Celis, E., Lennox, B., Knight, S. C., Padhya, T., McCaffrey, T. V, McCaffrey, J. C., Antonia, S., Fishman, M., Ferris, R. L., Kagan, V. E., & Gabrilovich, D. I. (2010). Lipid accumulation and dendritic cell dysfunction in cancer. *Nature Medicine*. **16**: 880–6.

Hernandez, C., Huebener, P., & Schwabe, R. F. (2016). Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene*. **35**: 5931–5941.

Hetz, C., Chevet, E., & Oakes, S. A. (2015). Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nature Cell Biology*. **17**: 829–38.

Hey, Y. Y., & O'Neill, H. C. (2012). Murine spleen contains a diversity of myeloid and dendritic cells distinct in antigen presenting function. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. **16**: 2611–2619.

Hochweller, K., Striegler, J., H??mmerling, G. J., & Garbi, N. (2008). A novel CD11c.DTR transgenic mouse for depletion of dendritic cells reveals their requirement for homeostatic proliferation of natural killer cells. *European Journal of Immunology*. **38**: 2776–2783.

- Hollien, J., Lin, J. H., Li, H., Stevens, N., Walter, P., & Weissman, J. S. (2009). Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology*. **186**: 323–31.
- Hwang, L. N., Yu, Z., Palmer, D. C., & Restifo, N. P. (2006). The in vivo expansion rate of properly stimulated transferred CD8 + T cells exceeds that of an aggressively growing mouse tumor. *Cancer Research*. **66**: 1132–1138.
- Idoyaga, J., Rahman, A., Brody, J., Ginhoux, F., & Merad, M. (2016). Expansion and Activation of CD103 + Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition Article Expansion and Activation of CD103 + Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Resp. 924–938.
- Iwakoshi, N. N., Pypaert, M., & Glimcher, L. H. (2007). The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. **204**: 2267–75.
- Iwawaki, T., Akai, R., Kohno, K., & Miura, M. (2004). A transgenic mouse model for monitoring endoplasmic reticulum stress. *Nature Medicine*. **10**: 98–102.
- Janssens, S., Pulendran, B., & Lambrecht, B. N. (2014). Emerging functions of the unfolded protein response in immunity. *Nature Immunology*. **15**: 910–919.
- Jensen, S. S., & Gad, M. (2010). Differential induction of inflammatory cytokines by dendritic cells treated with novel TLR-agonist and cytokine based cocktails: targeting dendritic cells in autoimmunity. *Journal of Inflammation (London, England)*. **7**: 37.
- Joffre, O., Nolte, M. a, Spörri, R., & Reis e Sousa, C. (2009). Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunological Reviews*. **227**: 234–47.
- Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews. Immunology*. **12**: 557–69.
- Joshi, A., Newbatt, Y., McAndrew, P. C., Stubbs, M., Burke, R., Richards, M. W., Bhatia, C., Caldwell, J. J., McHardy, T., Collins, I., & Bayliss, R. (2015). Molecular mechanisms of human IRE1 activation through dimerization and ligand binding. *Oncotarget*. **6**: 13019–35.
- Jurkin, J., Henkel, T., Nielsen, A. F., Minnich, M., Popow, J., Kaufmann, T., Heindl, K., Hoffmann, T., Busslinger, M., & Martinez, J. (2014). The mammalian tRNA ligase complex mediates splicing of XBP1 mRNA and controls antibody secretion in plasma cells. *The EMBO Journal*. **33**: 2922–36.
- Kaser, A., Lee, A.-H., Franke, A., Glickman, J. N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E. S., Higgins, D. E., Schreiber, S., Glimcher, L. H., & Blumberg, R. S. (2008). XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease. *Cell*. **134**: 743–56.

- Keestra-Gounder, A. M., Byndloss, M. X., Seyffert, N., Young, B. M., Chávez-Arroyo, A., Tsai, A. Y., Cevallos, S. A., Winter, M. G., Pham, O. H., Tiffany, C. R., de Jong, M. F., Kerrinnes, T., Ravindran, R., Luciw, P. A., McSorley, S. J., Bäumlner, A. J., & Tsolis, R. M. (2016). NOD1 and NOD2 signalling links ER stress with inflammation. *Nature*. **532**: 1–15.
- Kempner, E. S. (2009). Damage to proteins due to the direct action of ionizing radiation. *Quarterly Reviews of Biophysics*. **26**: 27.
- Kitazumi, I., & Tsukahara, M. (2011). Regulation of DNA fragmentation: The role of caspases and phosphorylation. *FEBS Journal*. **278**: 427–441.
- Koumenis, C., Bi, M., Ye, J., Feldman, D., & Koong, A. C. (2007). Hypoxia and the unfolded protein response. *Methods in Enzymology*. **435**: 275–93.
- Krawczyk, C. M., Holowka, T., Sun, J., Blagih, J., Amiel, E., Deberardinis, R. J., Cross, J. R., Jung, E., Thompson, C. B., Jones, R. G., Pearce, E. J., & De, W. (2013). dendritic cell activation Toll-like receptor – induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Cell Metabolism*. **115**: 4742–4749.
- Ladányi, A., Kiss, J., Somlai, B., Gilde, K., Fejos, Z., Mohos, A., Gaudi, I., & Tímár, J. (2007). Density of DC-LAMP+ mature dendritic cells in combination with activated T lymphocytes infiltrating primary cutaneous melanoma is a strong independent prognostic factor. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. **56**: 1459–1469.
- Lamia, K. A., Sachdeva, U. M., Ditacchio, L., Williams, E. C., Alvarez, J. G., Egan, D. F., Vasquez, D. S., Juguilon, H., Panda, S., Shaw, R. J., Thompson, C. B., & Ronald, M. (2009). AMPK Regulates the Circadian Clock by Cryptochrome Phosphorylation and Degradation. *Science*. **326**: 437–440.
- Lavelle, E. C., McNeela, E., Armstrong, M. E., Leavy, O., Higgins, S. C., & Mills, K. H. G. (2003). Cholera Toxin Promotes the Induction of Regulatory T Cells Specific for Bystander Antigens by Modulating Dendritic Cell Activation. *The Journal of Immunology*. **171**: 2384–2392.
- Lazar, C., Uta, M., & Branza-Nichita, N. (2014). Modulation of the unfolded protein response by the human hepatitis B virus. *Frontiers in Microbiology*. **5**: 433.
- Lee, A.-H., Chu, G. C., Iwakoshi, N. N., & Glimcher, L. H. (2005). XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *The EMBO Journal*. **24**: 4368–80.
- Lerner, A. G., Upton, J. P., Praveen, P. V. K., Ghosh, R., Nakagawa, Y., Igarria, A., Shen, S., Nguyen, V., Backes, B. J., Heiman, M., Heintz, N., Greengard, P., Hui, S., Tang, Q., Trusina, A., Oakes, S. A., & Papa, F. R. (2012). IRE1 α induces thioredoxin-interacting protein to activate the NLRP3 inflammasome and promote programmed cell death under irremediable ER stress. *Cell Metabolism*. **16**: 250–264.
- Lipson, K. L., Ghosh, R., & Urano, F. (2008). The role of IRE1 α in the degradation of insulin mRNA in pancreatic β -cells. *PLoS ONE*. **3**: 1–7.

- Liwski, R. S., Chase, J. C., Baldrige, W. H., Sadek, I., Rowden, G., & West, K. A. (2006). Prolonged costimulation is required for naive T cell activation. *Immunology Letters*. **106**: 135–43.
- Maly, D. J., & Papa, F. R. (2014). Druggable sensors of the unfolded protein response. *Nature Chemical Biology*. **10**: 892–901.
- Marciniak, S. J., Yun, C. Y., Oyadomari, S., Novoa, I., Zhang, Y., Jungreis, R., Nagata, K., Harding, H. P., & Ron, D. (2004). CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum. *Genes and Development*. **18**: 3066–3077.
- Mardones, P., Dillin, A., & Hetz, C. (2014). Cell-nonautonomous control of the UPR: mastering energy homeostasis. *Cell Metabolism*. **20**: 385–7.
- Martinon, F., Chen, X., Lee, A.-H., & Glimcher, L. H. (2010). TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nature Immunology*. **11**: 411–8.
- Martinon, F., & Glimcher, L. H. (2011). Regulation of innate immunity by signaling pathways emerging from the endoplasmic reticulum. *Current Opinion in Immunology*. **23**: 35–40.
- Mattei, F., Schiavoni, G., Belardelli, F., & Tough, D. F. (2001). IL-15 Is Expressed by Dendritic Cells in Response to Type I IFN, Double-Stranded RNA, or Lipopolysaccharide and Promotes Dendritic Cell Activation. *The Journal of Immunology*. **167**: 1179–1187.
- McKenna, K., Beignon, A.-S., & Bhardwaj, N. (2005). Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *Journal of Virology*. **79**: 17–27.
- Medel, B. (2017). Regulación de la presentación cruzada de antígenos tumorales por la vía IRE-1 α /XBP-1 en células dendríticas. Santiago, Chile. 2017. Presentado en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile para la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.
- Melero, I., Gaudernack, G., Gerritsen, W., Huber, C., Parmiani, G., Scholl, S., Thatcher, N., Wagstaff, J., Zielinski, C., Faulkner, I., & Mellstedt, H. (2014). Therapeutic vaccines for cancer: an overview of clinical trials. *Nature Reviews. Clinical Oncology*. **11**: 509–24.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., & Mortha, A. (2013). The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual Review of Immunology*. **31**: 563–604.
- Mogensen, T. H. (2009). Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses. *Clinical Microbiology Reviews*. **22**: 240–73, Table of Contents.
- Moore, K. A., & Hollien, J. (2012). The unfolded protein response in secretory cell function. *Annual Review of Genetics*. **46**: 165–83.

- Naik, S. H., Proietto, A. I., Wilson, N. S., Dakic, A., Schnorrer, P., Fuchsberger, M., Lahoud, M. H., O'Keeffe, M., Shao, Q. -x., Chen, W. -f., Villadangos, J. A., Shortman, K., & Wu, L. (2005). Cutting Edge: Generation of Splenic CD8⁺ and CD8⁻ Dendritic Cell Equivalents in Fms-Like Tyrosine Kinase 3 Ligand Bone Marrow Cultures. *The Journal of Immunology*. **174**: 6592–6597.
- Oft, M. (2014). IL-10: master switch from tumor-promoting inflammation to antitumor immunity. *Cancer Immunology Research*. **2**: 194–9.
- Osorio, F., Tavernier, S. J., Hoffmann, E., Saeys, Y., Martens, L., Veters, J., Delrue, J., De Rycke, R., Parthoens, E., Pouliot, P., Iwawaki, T., Janssens, S., & Lambrecht, B. N. (2014). The unfolded-protein-response sensor IRE-1 α regulates the function of CD8 α ⁺ dendritic cells. *Nature Immunology*. **15**: 248–57.
- 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., Heimann, D. M., Klebanoff, C. A., Yu, Z., Hwang, L. N., Feigenbaum, L., Kruisbeek, A. M., Rosenberg, S. A., & Restifo, N. P. (2003). Tumor Regression and Autoimmunity after Reversal of a Functionally Tolerant State of Self-reactive CD8 α T Cells. *The Journal of Experimental Medicine* *The Journal of Experimental Medicine* @BULLET. **198**: 569–580.
- Pakula, T. M., Laxell, M., Huuskonen, A., Uusitalo, J., Saloheimo, M., & Penttilä, M. (2003). The effects of drugs inhibiting protein secretion in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Evidence for down-regulation of genes that encode secreted proteins in the stressed cells. *Journal of Biological Chemistry*. **278**: 45011–45020.
- Palmer, D. C., Balasubramaniam, S., Hanada, K., Yu, Z., Farid, S., Theoret, M. R., Hwang, L. N., Christopher, A., Gattinoni, L., Goldstein, A. L., Yang, J. C., & Restifo, N. P. (2008). Vaccine-Stimulated, Adoptively Transferred CD8⁺ T Cells Traffic Indiscriminately and Ubiquitously while Mediating Specific Tumor Destruction. *Cancer*. **173**: 7209–7216.
- Palorini, R., Cammarata, F., Balestrieri, C., Monestiroli, a, Vasso, M., Gelfi, C., Alberghina, L., & Chiaradonna, F. (2013). Glucose starvation induces cell death in K-ras-transformed cells by interfering with the hexosamine biosynthesis pathway and activating the unfolded protein response. *Cell Death and Disease*. **4**: e732.
- Palucka, K., & Banchereau, J. (2013). Dendritic-Cell-Based Therapeutic Cancer Vaccines. *Immunity*. **39**: 38–48.
- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet*. **357**: 1777–89.
- Pearce, E. J., & Everts, B. (2015). Dendritic cell metabolism. *Nat Rev Immunol*. **15**: 18–29.
- Pfeffer, K. (2003). Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. **14**: 185–191.

- Reimold, A. M., Etkin, A., Clauss, I., Perkins, A., Friend, D. S., Zhang, J., Horton, H. F., Scott, A., Orkin, S. H., Byrne, M. C., Grusby, M. J., & Glimcher, L. H. (2000). An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Genes & Development*. **14**: 152–7.
- Reimold, A. M., Iwakoshi, N. N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravallesse, E. M., Friend, D., Grusby, M. J., Alt, F., & Glimcher, L. H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*. **412**: 300–7.
- Robblee, M. M., Kim, C. C., Abate, J. P., Valdearcos, M., Sandlund, K. L. M., Shenoy, M. K., Volmer, R., Iwawaki, T., & Koliwad, S. K. (2016). Saturated Fatty Acids Engage an IRE1 α -Dependent Pathway to Activate the NLRP3 Inflammasome in Myeloid Cells. *Cell Reports*. **14**: 2611–2623.
- Rock, K. L., Reits, E., & Neefjes, J. (2016). Present Yourself! By MHC Class I and MHC Class II Molecules. *Trends in Immunology*. **0**: 1–14.
- Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. **8**: 519–29.
- Sallusto, F., Geginat, J., & Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annual Review of Immunology*. **22**: 745–63.
- Schlitzer, A., & Ginhoux, F. (2014). Organization of the mouse and human DC network. *Current Opinion in Immunology*. **26**: 90–99.
- Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A. W. S., See, P., Shin, A., Wasan, P. S., Hoeffel, G., Malleret, B., Heiseke, A., Chew, S., Jardine, L., Purvis, H. A., Hilkens, C. M. U., Tam, J., Poidinger, M., Stanley, E. R., Krug, A. B., Renia, L., Sivasankar, B., Ng, L. G., Collin, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Honda, K., Haniffa, M., & Ginhoux, F. (2013). IRF4 Transcription Factor-Dependent CD11b⁺ Dendritic Cells in Human and Mouse Control Mucosal IL-17 Cytokine Responses. *Immunity*. **38**: 970–983.
- Schlitzer, A., Sivakamasundari, V., Chen, J., Sumatoh, H. R. Bin, Schreuder, J., Lum, J., Malleret, B., Zhang, S., Larbi, A., Zolezzi, F., Renia, L., Poidinger, M., Naik, S., Newell, E. W., Robson, P., & Ginhoux, F. (2015). Identification of cDC1- and cDC2-committed DC progenitors reveals early lineage priming at the common DC progenitor stage in the bone marrow. *Nat Immunol*. **16**: 718–728.
- Schoenborn, J. R., & Wilson, C. B. (2007). Regulation of Interferon- γ During Innate and Adaptive Immune Responses. *Advances in Immunology*. **96**: 41–101.
- Schröder, M., & Kaufman, R. J. (2005). ER stress and the unfolded protein response. *Mutation Research*. **569**: 29–63.
- Schuck, S., Gallagher, C. M., & Walter, P. (2014). ER-phagy mediates selective degradation of endoplasmic reticulum independently of the core autophagy machinery. *Journal of Cell Science*. **127**: 4078–88.

- See, P., Dutertre, C.-A., Chen, J., Günther, P., McGovern, N., Irac, S. E., Gunawan, M., Beyer, M., Händler, K., Duan, K., Sumatoh, H. R. Bin, Ruffin, N., Jouve, M., Gea-Mallorquí, E., Hennekam, R. C. M., Lim, T., Yip, C. C., Wen, M., Malleret, B., Low, I., Shadan, N. B., Fen, C. F. S., Tay, A., Lum, J., Zolezzi, F., Larbi, A., Poidinger, M., Chan, J. K. Y., Chen, Q., Renia, L., Haniffa, M., Benaroch, P., Schlitzer, A., Schultze, J. L., Newell, E. W., & Ginhoux, F. (2017). Mapping the human DC lineage through the integration of high-dimensional techniques. *Science*. **3009**.
- Segura, E., & Villadangos, J. A. (2011). A modular and combinatorial view of the antigen cross-presentation pathway in dendritic cells. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*. **12**: 1677–85.
- Shoulders, M. D., Ryno, L. M., Genereux, J. C., Moresco, J. J., Tu, G., Wu, C., Iij, J. R. Y., Su, A. I., Kelly, J. W., & Luke, R. (2014). Stress-Independent Activation of XBP1s and/or ATF6 Reveals Three Functionally Diverse ER Proteostasis Environments. **3**: 1279–1292.
- Shunji Sugawara, Toru Abo, & Katsuo Kumagai. (1987). A simple method to eliminate the antigenicity of surface class I MHC molecules from the membrane of viable cells by acid treatment at pH 3. *Journal of Immunological Methods*. **100**: 83–90.
- Sidrauski, C., & Walter, P. (1997). The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*. **90**: 1031–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9323131>
- Sperandio, B., Fischer, N., & Sansonetti, P. J. (2015). Mucosal physical and chemical innate barriers: Lessons from microbial evasion strategies. *Seminars in Immunology*. **27**: 111–8.
- Spranger, S., Dai, D., Horton, B., & Gajewski, T. F. (2017). Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. *Cancer Cell*. **31**: 711–723.e4.
- Striz, I., Brabcova, E., Kolesar, L., & Sekerkova, A. (2014). Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clinical Science (London, England : 1979)*. **126**: 593–612.
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., & Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Reports*. **7**: 880–5.
- Tam, A. B., Koong, A. C., & Niwa, M. (2014). Ire1 has distinct catalytic mechanisms for XBP1/HAC1 splicing and RIDD. *Cell Reports*. **9**: 850–8.
- Tavernier, S. J., Osorio, F., Vandersarren, L., Velters, J., Vanlangenakker, N., Van Isterdael, G., Vergote, K., De Rycke, R., Parthoens, E., van de Laar, L., Iwawaki, T., Del Valle, J. R., Hu, C.-C. A., Lambrecht, B. N., & Janssens, S. (2017). Regulated IRE1-dependent mRNA decay sets the threshold for dendritic cell survival. *Nature Cell Biology*.

- Teske, B. F., Wek, S. A., Bunpo, P., Cundiff, J. K., McClintick, J. N., Anthony, T. G., & Wek, R. C. (2011). The eIF2 kinase PERK and the integrated stress response facilitate activation of ATF6 during endoplasmic reticulum stress. *Molecular Biology of the Cell*. **22**: 4390–405.
- Thompson, M. R., Kaminski, J. J., Kurt-Jones, E. A., & Fitzgerald, K. A. (2011). Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses*. **3**: 920–40.
- Upton, J.-P., Wang, L., Han, D., Wang, E. S., Huskey, N. E., Lim, L., Truitt, M., McManus, M. T., Ruggero, D., Goga, A., Papa, F. R., & Oakes, S. A. (2012). IRE1 α cleaves select microRNAs during ER stress to derepress translation of proapoptotic Caspase-2. *Science (New York, N.Y.)*. **338**: 818–22.
- Volmer, R., & Ron, D. (2015). Lipid-dependent regulation of the unfolded protein response. *Current Opinion in Cell Biology*. **33**: 67–73.
- Volmer, R., van der Ploeg, K., & Ron, D. (2013). Membrane lipid saturation activates endoplasmic reticulum unfolded protein response transducers through their transmembrane domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **110**: 4628–4633.
- Walter, P., & Ron, D. (2011). The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science*. **334**: 1081–1086.
- Westrate, L. M., Lee, J. E., Prinz, W. A., & Voeltz, G. K. (2015). Form Follows Function: The Importance of Endoplasmic Reticulum Shape. *Annual Review of Biochemistry*. **84**: 791–811.
- Wooldridge, L., Lissina, A., Cole, D. K., Van Den Berg, H. A., Price, D. A., & Sewell, A. K. (2009). Tricks with tetramers: how to get the most from multimeric peptide-MHC. *Immunology*. **126**: 147–164.
- Yamamoto, K., Yoshida, H., Kokame, K., Kaufman, R. J., & Mori, K. (2004). Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *Journal of Biochemistry*. **136**: 343–50.
- Yoshida, H., Oku, M., Suzuki, M., & Mori, K. (2006). pXBP1(U) encoded in XBP1 pre-mRNA negatively regulates unfolded protein response activator pXBP1(S) in mammalian ER stress response. *Journal of Cell Biology*. **172**: 565–575.
- Zehner, M., Marschall, A. L., Bos, E., Schloetel, J. G., Kreer, C., Fehrenschild, D., Limmer, A., Ossendorp, F., Lang, T., Koster, A. J., D??bel, S., & Burgdorf, S. (2015). The Translocon Protein Sec61 Mediates Antigen Transport from Endosomes in the Cytosol for Cross-Presentation to CD8⁺ T Cells. *Immunity*. **42**: 850–863.
- Zitvogel, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2010). Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell*. **140**: 798–804.
- Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2014). CD103⁺ dendritic cells producing interleukin-12 in anticancer immunosurveillance. *Cancer Cell*. **26**: 591–3.

ANEXO

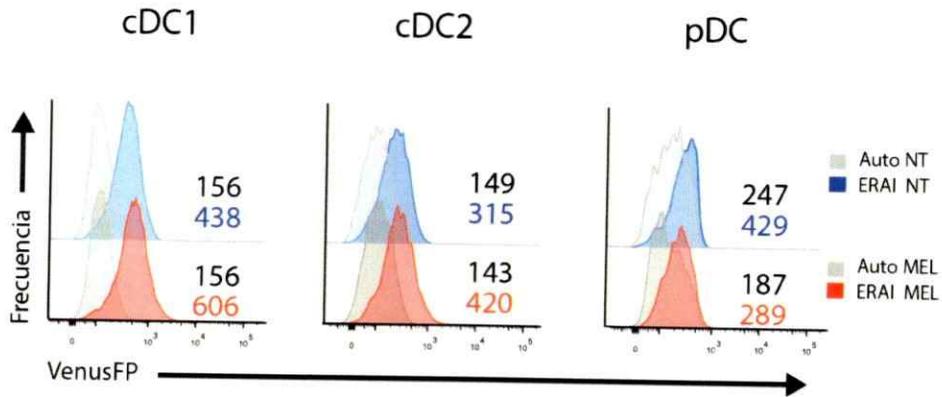


Figura Suplementaria 1: Auto-fluorescencia en ensayos de activación de DCs de ratones reporteros ERAI. 5×10^5 DCs obtenidas a partir de precursores de médula ósea de ratones ERAI o ratones *wild type* fueron estimuladas con MEL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 16 horas para luego ser analizadas por citometría de flujo. Se muestran histogramas representativos de los niveles de fluorescencia detectados en el canal FITC, utilizado para detectar la señal de la proteína reportera VenusFP en DCs de ratones ERAI. Se utilizó como control de auto-fluorescencia la señal detectada en DCs de ratones *wild type* tratadas con los mismos estímulos que DCs de ratones ERAI. Se muestran histogramas separados para la señal detectada en cDC1, cDC2 y pDC. La sección superior de los histogramas muestra la auto-fluorescencia (Auto NT) y la fluorescencia relativa de VenusFP (ERAI NT) de DCs no tratadas. La sección inferior de los histogramas muestra la auto-fluorescencia (Auto MEL) y la fluorescencia relativa de VenusFP (ERAI MEL) de DCs tratadas con MEL. En cada histograma se presenta a la derecha la intensidad media de fluorescencia para el control de auto-fluorescencia (negro) y para DCs ERAI no tratadas (azul) o tratadas con MEL (rojo),