

UCH-FC
Biotecnología
842
1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO



**“IDENTIFICACIÓN DE ACTIVADORES INMUNOLÓGICOS DE LA
VÍA ASOCIADA A LA RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL
PLEGADAS IRE1 α /XBP-1s EN CÉLULAS DENDRÍTICAS”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

Cristóbal Javier Costoya Tolosa

Director del Seminario de Título:

Dra. Fabiola Osorio

Co-Director: Dr. Flavio Salazar-Onfray

Directora Patrocinante:

Dra. María Rosa Bono

Marzo 2016

Santiago – Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

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

Cristóbal Javier Costoya Tolosa

**“IDENTIFICACIÓN DE ACTIVADORES INMUNOLÓGICOS DE LA
VÍA ASOCIADA A LA RESPUESTA A PROTEÍNAS MAL PLEGADAS
IRE1 α /XBP-1s EN CÉLULAS DENDRÍTICAS”**

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

Dra. Fabiola Osorio Olivares
Directora Seminario de Título

Dr. Flavio Salazar Onfray
Co-Director Seminario de Título

Dra. María Rosa Bono
Prof. Patrocinante del Seminario

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Daniela Sauma Mahaluf
Presidente Comisión

Dr. Marco Tulio Nuñez González
Evaluador

The image shows three handwritten signatures in blue ink, each written over a horizontal line. To the right of the signatures is a circular stamp with the text "FACULTAD DE CIENCIAS", "BIBLIOTECA CENTRAL", and "U. DE CHILE" around the perimeter. The stamp is partially obscured by the signatures.

Santiago de Chile, Enero de 2016

II. 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.

Desde el año 2014 hasta la actualidad realizó su trabajo de Seminario de Título en el Laboratorio de Inmunología Anti Tumoral a cargo de la Dra. Fabiola Osorio como tutora y el Dr. Flavio Salazar-Onfray en calidad de co-tutor. Además, ingresó el año 2015 al programa de Magíster en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

IV. AGRADECIMIENTOS

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

Gracias especialmente 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 de Inmunología Tumoral por hacer más ameno el día a día.

Gracias a mi familia por el apoyo firme y constante.

Gracias a Eduardo Costoya por siempre esperarme con una buena cerveza helada después de un mal día de experimentos.

INDICE DE CONTENIDOS

BIOGRAFÍA	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
INDICE DE TABLAS	vi
INDICE DE FIGURAS	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	viii
RESUMEN	
ABSTRACT	
INTRODUCCIÓN	1
Retículo endoplásmico y la respuesta a proteínas mal plegadas.	1
Sistema inmune y las células dendríticas.	5
La función de la respuesta a proteínas mal plegadas en el sistema inmune y en las células dendríticas.	9
Hipótesis	12
Objetivos	12
Objetivo General	12
Objetivos Específicos	12
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Reactivos	14
Células y ratones	15
Ensayos in vitro de activación de DCs derivadas de médula ósea	17
Cocultivos de linfocitos T CD8 ⁺ con DCs derivadas de médula ósea	18

Citometría de flujo	19
Biología Molecular	21
Análisis de citometría y estadística	24
RESULTADOS	25
Caracterización fenotípica de células dendríticas derivadas de medula ósea cultivadas en presencia de la citoquina FLT3-L.	25
DCs activadas con lisados celulares de melanoma activan eficientemente el eje IRE1 α /XBP-1s asociado a la respuesta a proteínas mal plegadas.	27
El uso de un inhibidor del dominio endoribonucleasa de IRE1 α bloquea el splicing de XBP-1s y puede ser usado en cultivos de DCs.	34
La inhibición de la actividad RNAsa de IRE1 α no afecta la expresión de moléculas de superficie en DCs activadas con lisados celulares de melanoma pero disminuye la producción de IL-12 en respuesta a este estímulo.	36
La inhibición de la actividad RNAsa de IRE1 α en DCs disminuye la capacidad de activar linfocitos T CD8 ⁺ .	40
DISCUSIÓN	43
CONCLUSIONES	50
BIBLIOGRAFÍA	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Anticuerpos de superficie utilizados para citometría de flujo	20
Tabla 2. Partidores utilizados en PCR cuantitativo en tiempo real	22

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la vía IRE1 α /XBP-1s.	5
Figura 2. Análisis de subpoblaciones de DCs generadas con FLT3L.	26
Figura 3. Estímulos inmunológicos inducen el splicing de XBP-1.	29
Figura 4. Lisados de líneas celulares de melanoma inducen XBP-1s y BiP a nivel de proteína.	32
Figura 5. Estímulos inmunológicos no activan RIDD.	33
Figura 6. Determinación de dosis óptima del inhibidor 4 μ 8C.	35
Figura 7. Efecto del inhibidor 4 μ 8C en moléculas de superficie en DCs.	37
Figura 8. El inhibidor 4 μ 8C disminuye la producción de IL-12 en cDC1 (CD24 ⁺) estimuladas con lisados de líneas celulares de melanoma.	39
Figura 9. El inhibidor 4 μ 8C disminuye la adjuvanticidad de lisados de melanoma en la capacidad de DCs de activar LT CD8 ⁺ .	42

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
- HDM: Extracto de ácaro de polvo
- 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 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.

RNAse: Endoribonucleasa

SEM: Error Standard de la Media

SFB: Suero Fetal Bovino.

Sirp1 α : CD172a, Proteína reguladora de señales 1 α

TAP: Transportador asociado con presentación antigénica

TCR: Receptor de Linfocitos T.

T_h1: Linfocitos T CD4⁺ cooperadores de tipo 1.

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. En el sistema inmune, se ha descrito que la respuesta a proteínas mal plegadas modula el desarrollo y función de diversos tipos celulares incluyendo las células dendríticas (DCs). De hecho, 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 DCs en donde controlan diversos procesos los que incluyen la expresión de integrinas, la homeostasis del RE y el proceso de presentación cruzada. Si bien lo anterior ha sido estudiado en DCs en ausencia de inflamación, aún se desconoce si la respuesta a proteínas mal plegadas modula la función de DCs durante condiciones inflamatorias tales como infección, alergia o cáncer. En este trabajo de tesis, establecimos como objetivo principal el elucidar si la detección de estímulos innatos derivados de alérgenos, bacterias o tumores eran capaces de activar la vía IRE1 α /XBP-1s en DCs y por otra parte, nos propusimos definir la relevancia de este eje en la función de DCs activadas.

Para estudiar este fenómeno, se generaron DCs de manera *in vitro* a partir de precursores de médula ósea de ratones C57BL/6 en presencia de la citoquina FLT3-L. Estos cultivos fueron estimulados con un compuesto derivado de pared celular de bacterias Gram negativas (lipopolisacárido, LPS), un alérgeno representativo del desarrollo de asma alérgico (extracto de ácaro de polvo) o con una preparación de

lisados de células derivadas de melanoma metastásico, que ha sido utilizado eficientemente en una vacuna basada en DCs para pacientes con melanoma avanzado. Nuestros resultados indican que, de estos tres estímulos, los lisados celulares de melanoma son los compuestos más eficientes en inducir la activación de miembros de la respuesta a proteínas mal plegadas tales como XBP-1s, BiP y CHOP tanto a nivel de RNA mensajero (mRNA) como proteína. Por otro lado, también demostramos que la inhibición del dominio endoribonucleasa (RNAsa) de IRE1 α en DCs, reduce su capacidad de secretar interleuquina 12 en respuesta a activación con lisados celulares de melanoma. Adicionalmente, la inhibición de la actividad RNAsa de esta enzima en DCs activadas con lisados celulares de melanoma tiende a reducir los niveles de expresión del marcador de activación temprana CD69 en linfocitos T CD8⁺ específicos para un antígeno modelo.

En resumen, nuestros resultados demuestran que los lisados de líneas celulares de melanoma son potentes activadores del eje IRE1 α /XBP-1s en DCs y que esta vía es importante para la producción de citoquinas y activación de linfocitos T CD8⁺ en respuesta a la activación con lisados de células cancerosas. Este trabajo constituye un aporte para comprender de mejor manera el rol de la respuesta a proteínas mal plegadas en la función de células dendríticas, especialmente en un contexto anti-tumoral.

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 protein folding intermediates in the endoplasmic reticulum (ER), or when it fails to do so, trigger cell death. In the immune system, it has been described that the UPR can modulate the development and function of different cell types including dendritic cells (DCs). In fact, one of the ER stress sensors, IRE1 α and its target the transcription factor XBP-1s, are constitutively activated in DCs, where they control different processes that includes integrin expression, RE homeostasis and cross presentation of dead-cell associated antigens. While this process has been studied in DCs in the absence of inflammation, the role of the UPR remains unclear in inflammatory contexts such as infection, allergy, or cancer. In this thesis work we established as our main objective to elucidate whether the detection of innate stimuli derived allergens, bacteria, or tumors were capable of activating the IRE1 α /XBP-1s pathway in DCs, and on the other hand, we propose to define the functional relevance of this axis in the function of activated DCs.

In order to address these questions, DCs were generated in vitro from C57BL/6 mice bone marrow in the presence of the cytokine FLT3-L. These cultures were stimulated with a compound derived from the cell wall of Gram negative bacteria (Lipopolysaccharide, LPS), a common allergen involved in the development of allergic asthma (house dust mite extract) or with a cell lysate preparation derived from human metastatic melanoma lines that has been used efficiently in a DC-based vaccine for patients with advanced melanoma. Our results show that out of the stimuli tested, the

melanoma cell lysates are the most efficient compounds at inducing the activation of specific UPR components, such as XBP-1s, BiP and CHOP, both at messenger RNA (mRNA) and at protein level. On the other hand, we also demonstrated that inhibition of the IRE1 α endoribonuclease (RNase) domain in DCs decreases the capacity of DCs to secrete interleukin 12 in response to activation with melanoma cell lysates. Furthermore, inhibition of the IRE1 α RNase domain in DCs activated with melanoma cell lysates show a tendency to decrease expression of the early activation marker CD69 in CD8⁺ T cells specific for a model antigen.

In summary, our results show that melanoma cell lysates act as potent activators of the IRE1 α /XBP-1s axis in DCs and that this pathway is relevant for the production of cytokines and T cell activation in response to activation with cancer cells. This work serves to better understand the role of the UPR in the functionality of DCs, particularly in an anti-tumoral context.

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 (Westrate y col. 2015, Hetz 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-traducciona (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 (Hetz y col. 2015). 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), mientras que proteínas plegadas incorrectamente permanezcan retenidas en el organelo para ser posteriormente destinadas a degradación a través de mecanismos que incluyen degradación de proteínas asociada a retículo endoplásmico (*ER-associated protein degradation*, ERAD) o autofagia (Alberts y col. 2014, Janssens 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 (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 (Koumenis y col. 2007, Kempner 2009, Palorini y col. 2013, Lazar y col. 2014, Mardones y col. 2014). 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 (Janssens y col. 2014). 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 (Janssens y col. 2014, Hetz y col. 2015, 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. La respuesta a proteínas mal plegadas es controlada por tres sensores ubicados en el lumen del RE denominados ATF6, IRE1 α y PERK (Gardner y col. 2013). 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. En este contexto, 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 quinasa 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, involucrado en procesos de muerte celular (Szegezdi y col. 2006; Ron & Walter, 2007). 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 quinasa 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).

Por otra parte, además de procesar el RNA mensajero codificante para XBP-1, el dominio endoribonucleasa de IRE1 α puede procesar 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). Sin embargo, se ha reportado recientemente en ensayos de microarreglo que dentro de los mRNA que son sustratos de RIDD se encuentran varios genes involucrados en la función del sistema inmune, específicamente en el procesamiento antigénico 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), lo que la funcionalidad de IRE1 α incide directamente en la regulación de procesos asociados con el sistema inmune.

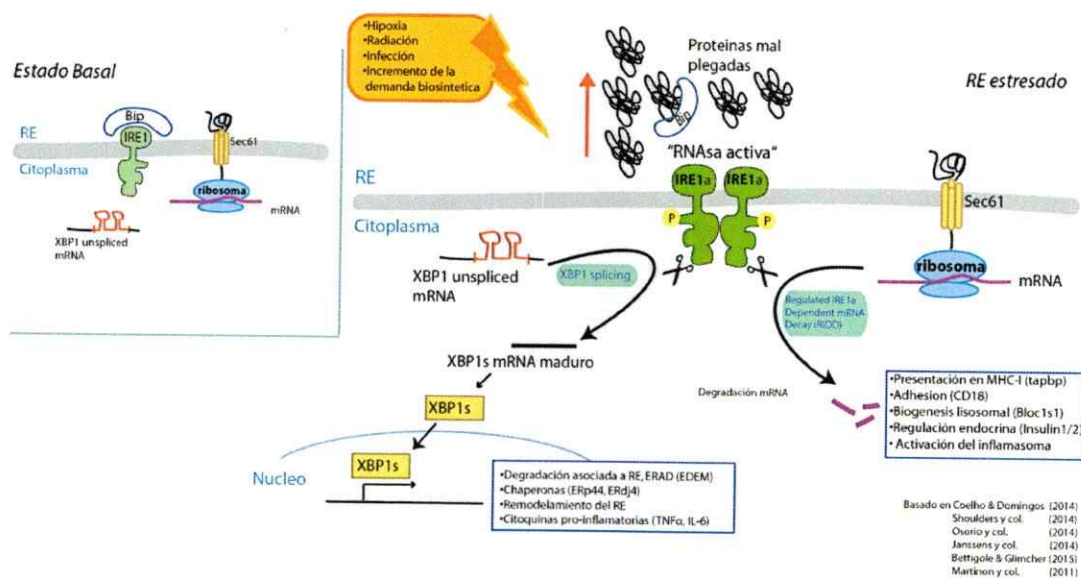


Figura 1: Esquema de la vía IRE1 α /XBP-1s. En estado basal (izquierda), el RE es capaz de plegar correctamente las proteínas destinadas a la ruta secretora. Frente a estímulos que perturben el plegamiento de proteínas, tales como hipoxia, radiación, infección o incremento de la demanda biosintética, 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 IRE1 α libre para dimerizar y activar su actividad endoribonucleasa (RNAsa). IRE1 α 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 IRE1 α puede degradar otros mRNA presentes en el RE, en un proceso denominado *Regulated IRE1 α 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 linfocitos T 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) (Morgensen, 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 (El Mezayen y col. 2007, 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 "maduro" o "activo", especializado en presentación antigénica, activación de linfocitos T y expresión de moléculas como citoquinas, quimioquinas y moléculas de co-estimulación (Banchereau & Steinman 1998, Joffre y col. 2009).

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 linfocitos T, 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 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, Cao y col. 2009, Ferrero y col. 2002, Schlitzer & Ginhoux 2014). Por otra parte cDC1s es 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, DNGR1 y CD24 (Dorner y col. 2009, Askew & Harding 2008, Edelson y col. 2010), y depender de los factores de transcripción BATF3, IRF8, ID2, además del receptor Flt3 para su diferenciación (Belz & Nutt 2012, Schlitzer & Ginhoux 2014). Funcionalmente, las cDC1s se especializan en secretar altos niveles de la citoquina inflamatoria interleucina 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 linfocitos T CD8⁺ (Segura & Villadangos, 2011, Guilliams et al 2014, Henry y col. 2008, Hey & O'Neill 2012). Por otra parte, cDC2s corresponde a un linaje de DCs que expresan los marcadores CD11b, CD172 α (Sirp1 α), dependen del factor de transcripción IRF4 para la diferenciación celular y tienen como función principal la presentación de antígenos mediada por MHC-II a linfocitos T CD4⁺ (Diao y col. 2010, Guilliams y col. 2014, Schlitzer y col. 2013, Schlitzer y col. 2014). 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 (Martinon & Glimcher 2011, Osorio y col. 2014, Janssens y col. 2014, Bettigole & Glimcher. 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 (Reimold y col. 2001, Bettigole y col. 2015, Kaser y col. 2008). 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 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 inflammasoma en respuesta a infección con *Brucella abortus* (Bronner y col. 2015). 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 via 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, Pearce & Everts, 2015, Krawczyk y col. 2010). 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 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 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 y col. 2014).

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, sin embargo, todos estos resultados se han obtenido utilizando DCs en estado estacionario o quiescente. Es por esto que todavía queda por determinar cuál es el rol que cumplen estas vías durante el proceso de activación de las DCs en contextos inflamatorios. 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.

Hipótesis

Durante la maduración de las células dendríticas con estímulos representativos de infección bacteriana, alergia y tumor, se activa la vía de señalización IRE1 α /XBP-1s, la cual contribuye al proceso de activación celular.

Objetivos

Objetivo General

Identificar si compuestos de relevancia inmunológica tales como un alérgeno, un lisado derivado de líneas celulares de melanoma o un compuesto bacteriano son capaces de activar la vía IRE1 α /XBP-1s en cultivos de células dendríticas (DCs) y revelar la contribución de esta vía en el proceso de maduración de DCs.

Objetivos Específicos

1. Analizar y cuantificar cambios en la expresión génica y proteica de miembros de la respuesta a proteínas mal plegadas, tales como XBP-1s, BiP y CHOP en DCs generadas en presencia de FLT3-L y activadas con estímulos inmunológicos representativos de 1) infección bacteriana (LPS, lipopolisacárido presente en la pared celular de bacterias Gram negativas, como *E. coli*), 2) alergia (HDM, alérgeno extraído del acaro de polvo) y 3) tumor (lisado celular derivado de líneas de melanoma humano). Además, cuantificar la activación de degradación de mRNAs dependiente de IRE1 α (RIDD), midiendo el sustrato reportado Bloc1s1.

2. Determinar mediante citometría de flujo la contribución de la vía IRE1 α /XBP-1s en la expresión de moléculas coestimuladoras CD80/CD86, la molécula inhibitoria PD-L1 y la producción de citoquinas pro inflamatorias, como interleuquina 12 (IL-12) en DCs generadas en presencia de FLT3-L y activadas con lisados celulares de melanoma, mediante el uso de un inhibidor farmacológico específico contra el dominio endoribonucleasa de IRE1 α denominado 4 μ 8C, previamente reportado.
3. Analizar la capacidad de DCs maduras tratadas con el inhibidor 4 μ 8C de activar linfocitos T CD8⁺ específicos de manera *in vitro*



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)

1.2 Proteínas, péptidos y citoquinas

Ovoalbúmina Low Endo™: Worthington Biochemical Corporation.

Péptido SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄): Gentilmente facilitados por el Dr. Alvaro Lladser, Fundación Ciencia & Vida.

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

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. 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.

LPS (de *Escherichia coli*): Sigma-Aldrich

HDM (extracto de *Dermatophagoides pteronyssinus*): Greer

Tunicamicina (de *Streptomyces sp*): Sigma-Aldrich

2 Células y ratones

2.1 Ratones

Ratones C57BL/6 *wild-type* de entre 5-18 semanas de edad fueron obtenidos del bioterio central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Ratones OT-I de entre 6-12 semanas de edad, los cuales poseen un TCR transgénico específico para el péptido SIINFEKL (OVA₂₅₇₋₂₆₄) presentado en MHC-I (H-2Kb) fueron obtenidos en colaboración con el Dr. Alvaro Lladser, Fundación Ciencia & Vida.

El trabajo con animales presentado en este trabajo de tesis se realizó de acuerdo a los protocolos de bioética correspondientes a la Facultad de Medicina, 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 plástico de 6 pocillos (4 mL/pocillo) (Falcon®, BD) o de 12 pocillos (2 mL/pocillo) (Falcon®, BD), dependiendo del experimento a realizar. 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 OT-I

Se aisló el bazo de un ratón OT-I 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 1×10^8 células + 70 μL por cada 1×10^8 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 1×10^8 células e incubadas por 15 minutos en hielo. Después fueron lavadas con FACS buffer, centrifugadas y resuspendidas en 1 mL de FACS buffer. Finalmente los 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 RNA

5×10^5 DCs fueron estimuladas al día 7-8 por 8 horas con los siguientes estímulos: MEL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), MEL + *heat shock* (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS (100 ng/mL),

HDM (50 µg/mL) o tunicamicina (1 µg/mL). Luego fueron recolectadas y lavadas con PBS 1X, para luego ser resuspendidas en reactivo de aislación TriPure (Roche, Sigma-Aldrich).

3.2 Estimulación para análisis de proteína

2x10⁶ DCs fueron estimuladas al día 7 por 24 horas con los siguientes estímulos: MEL (100 µg/mL), MEL + *heat shock* (100 µg/mL), LPS (100 ng/mL), HDM (50 µg/mL) o por 8 horas al día 8 con tunicamicina (1 µg/mL). Luego fueron recolectadas y lavadas 2 veces con PBS 1X, para luego ser resuspendidas en buffer de extracción de proteínas E1A (50 mM HEPES pH 7.0 (Sigma Aldrich), 250 mM NaCl (Winkler Ltda.), 0.1% Nonidet P-40 (Sigma-Aldrich), 5 mM EDTA (Ambion®, Thermofisher Scientific), inhibidor de proteasas cOmplete ULTRA Tablets (Roche, Sigma-Aldrich), inhibidor de fosfatasas PhosSTOP (Roche, Sigma-Aldrich)) y congelarlas a -80°C hasta su posterior uso.

3.3 Estimulación para análisis de producción de IL-12

2x10⁶ DCs fueron pretratadas al día 7 con el inhibidor 4µ8C (20 µM) o DMSO como control de vehículo por 2 horas para luego ser estimuladas con MEL (100 µg/mL) por 20 horas. Durante las últimas 4 horas se agregó brefeldina A (3 µg/mL, eBioscience) y posteriormente fueron colectadas y teñidas para ser analizadas por citometría de flujo.

4 Cocultivos de linfocitos T CD8⁺ con DCs derivadas de médula ósea

2x10⁶ DCs fueron pre-tratadas con el inhibidor 4µ8C (20 µM) o DMSO como control de vehículo por 16 horas. Posteriormente fueron colectadas, lavadas,

contadas y plaqueadas a 2×10^4 DCs/pocillo en una placa de 96 pocillos de fondo redondo (Falcon®, BD) en medio R10. Paralelamente, LT CD8⁺ OT-I fueron obtenidos como se indica en 2.3 y plaqueados con las DCs a 5×10^4 LT/pocillo en R10. Adicionalmente se agregó a los pocillos correspondientes ovoalbúmina (10 µg/mL) y MEL (100 µg/mL) como adyuvante. Para los tratamientos con SIINFEKL, las DCs fueron previamente incubadas el péptido SIINFEKL (100 pM) a 37°C por 25 minutos, para luego ser lavadas con R10 y ser plaqueadas 2×10^4 DCs/pocillo en los pocillos correspondientes. Las células del cocultivo fueron colectadas a las 16 horas y analizadas por citometría de flujo.

5 Citometría de flujo

5.1 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 de superficie 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
Sirp1 α (CD172a)	PerCP-Cy5.5	P84	1/400	Biolegend
XCR1	PE	ZET	1/400	Biolegend
CD80	PE	16-10A1	1/100	BD Pharmingen
CD86	FITC	GL-1	1/200	BD Pharmingen
CD24	eFluor 450	M1/69	1/400	eBioscience
PD-L1	PE	MIH5	1/400	eBioscience
CD69	APC	IM7	1/400	Biolegend
CD3 ϵ	PE-Cy5	145-2C11	1/400	Biolegend
CD8 α	PE	Leu-2	1/100	Miltenyi Biotec
CD16/32 (Fc Block)	-	93	1/400	Biolegend

5.2 Determinación de IL-12 mediante tinción intracelular

Luego de la tinción de superficie, las células fueron permeabilizadas y fijadas por 20 minutos por 20 minutos en oscuridad con el kit para tinción de Foxp3/factor de transcripción (Affymetrix, eBioscience). Posteriormente fueron lavadas con buffer para tinción de citometría de flujo (Affymetrix, Bioscience) y teñidas con un anticuerpo contra IL-12 (p40/p70, PE, clon C15.6, BD Pharmingen) o control de isotipo (Rat IgG1 κ , PE, clon R3-34, BD Pharmingen) por 20 minutos a 4°C en

oscuridad. Finalmente se resuspendieron en buffer para tinción de citometría de flujo y se adquirieron en un citómetro FACSverse.

6 Biología Molecular

6.1 Extracción de RNA

Las muestras almacenadas en fueron almacenadas a -20°C hasta su utilización. Brevemente, para la extracción de RNA se siguió el protocolo adjunto al reactivo de aislación TriPure, añadiendo $5\ \mu\text{g}$ de glicógeno (Ambion®, Life Technologies) por muestra como co-precipitante. El RNA extraído fue resuspendido en $20\ \mu\text{L}$ de agua libre de nucleasas (Ambion®, Life Technologies) a 37°C y el RNA se congeló a -80°C hasta su posterior utilización.

6.2 Generación de cDNA

Para la generación de cDNA, se utilizó el kit de la transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen®, Life Technologies), siguiendo el protocolo adjunto con el kit y utilizando $10\ \mu\text{L}$ de RNA total por muestra y utilizando hexámeros al azar como partidores a $150\ \text{ng}/\mu\text{L}$ (Invitrogen®, Life Technologies). Posteriormente a la amplificación, el cDNA fue diluido 1:2 con agua libre de nucleasas.

6.3 PCR y ensayo de digestión

Se utilizó la polimerasa GoTaq Flexi (Promega) para la amplificación de XBP-1s utilizando los partidores mXBP1.3S-F (5'-AAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC-3') y mXBP1.3S-R (5'-GGATCTCTAAACTAGAGGCTTGGTG-3') y actina como control de carga con los partidores B-ACTIN F (5'-CTAAGGCCAACCGTGAAAAG-

3') y B-ACTIN R (5'-TTGCTGATCCACATCTGCTG-3'). 50 μ L de amplicón fueron posteriormente digeridos durante 1 hora a 37°C con 10 U de enzima PstI (Promega) y separado por electroforesis en un gel de agarosa 1% (Lafken).

6.4 qRT-PCR

Se utilizó cDNA junto con SYBR-Green I (Invitrogen®, Life Technologies) y polimerasa GoTaq Flexi para las reacciones de qRT-PCR, utilizando los partidores indicados en la Tabla 2.

Tabla 2. Partidores utilizados en PCR cuantitativo en tiempo real

Nombre partidor	Secuencia
XBP1s F	5'-AAGAACACGCTTGGGAATGG-3'
XBP-1s R	5'-CTGCACCTGCTGCGGAC-3'
BiP F	5'-ATGAGGCTGTAGCCTATGGTG-3'
BiP R	5'-GGGGACAAACATCAAGCAG-3'
CHOP F	5'-CCACCACACCTGAAAGCAG-3'
CHOP R	5'-TCCTGCAGATCCTCATACCAG-3'
ERP44 F	5'-GACACAGCCCCAGGAGAG-3'
ERP44 R	5'-TCATCTCGATCCCTCAATAAAGTA-3'
BLOC1S1 F	5'-CACCCAGCCAGACTCGAC-3'
BLOC1S1 R	5'-GCAGCGATAGCTTCTCTCCTC-3'
L27 F	5'-GCCAAGCGATCCAAGATCAA-3'
L27 R	5'-GCTGGGTCCCTGAACACATC-3'

La lectura en tiempo real de la reacción se realizó en un equipo MX3005P (Stratagene, Agilent Technologies) y la abundancia de cada mRNA fue normalizada contra L27 mediante el método $\Delta\Delta C_t$.

6.5 Western Blot

Las muestras fueron centrifugadas a $1.6 \times 10^4 \times g$ por 15 minutos a 4°C y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo. La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Bradford (Sigma Aldrich) en un lector de placas Synergy HTX (Biotek). Las muestras fueron normalizadas en cuanto a su concentración de proteínas y se diluyeron 1:3 con buffer de muestra Laemmli 4X (Bio-Rad) suplementado con 10% v/v β -mercaptoetanol 14.2 M (Bio-Rad). Las muestras se calentaron por 5 minutos a 95°C y se separaron por electroforesis en un gel de bis-acrilamida (4% Stacking, 8% Running; Bio-Rad) a 50 V por 15 minutos y luego a 120 V por 60 minutos. Una vez finalizada la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de $0.45 \mu\text{M}$ (Bio-Rad) a 100 V por una hora. Posteriormente, la membrana fue bloqueada con una solución de TBS-Tween 1X con 5% p/v de leche descremada en polvo (Svelty, Nestlé). Luego de ser bloqueada, la membrana se lavó con TBS-Tween y se incubó en un shaker a 4°C *over night* con anticuerpo primario α -XBP-1s (clon Poly6195, Biolegend) 1/500, α -BiP (clon C50B12, Cell Signaling) 1/2000, o α - β actina (clon 13E5, Cell Signaling) 1/10000. A la mañana siguiente, la membrana se lavó con TBS-Tween y se incubó durante una hora con anticuerpo secundario conjugado a HRP α -rabbit (1:3000) o α -mouse (1:5000) según correspondiera (Cell Signaling). Luego de la incubación con anticuerpo secundario, se agregó a la membrana sustrato de HRP η C (Westar, Cyanagen) y West Pico (SuperSignal™, Thermo Scientific) en relación 1:1 para XBP-1s, 1:3 para BiP y 0:1 para β -actina. Inmediatamente se llevó la membrana a una sala oscura y fue expuesta a un film fotográfico (GE Healthcare Life Sciences) para luego ser revelada (GBX, Kodak).

7 Análisis de citometría y estadística

Para datos de citometría, los datos fueron analizados usando el software FlowJo 7.6.1. (Treestar). Para análisis de gráficos y estadísticas se utilizó el software Prism 6 (GraphPad) utilizando el la prueba t de student pareada o no pareada como se indica en cada caso .En todos los casos, se fijó el nivel de significancia mínimo en P menor a 0,05.



RESULTADOS

Caracterización fenotípica de células dendríticas derivadas de medula ósea cultivadas en presencia de la citoquina FLT3-L.

Para generar células dendríticas (DCs) murinas, se cultivaron 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 y col. 2005). Estos antecedentes son altamente relevantes para este proyecto dado que evidencia previa indica que el eje IRE1 α /XBP-1s opera preferencialmente en DCs del tipo convencional (cDCs) (Osorio 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 y col. 2005, Hey & O'Neill, 2012). En congruencia con estos antecedentes, en nuestras manos este protocolo genera una población heterogénea de DCs entre las cuales pueden identificarse las tres subpoblaciones previamente descritas (Figura 2). Las células equivalentes a pDCs se caracterizan por la expresión de la integrina $\text{CD}11c$, expresión reducida de MHC-II y niveles de expresión altos para el marcador B220. Por otra parte, las cDCs pueden ser claramente identificadas como

una población celular que expresa altos niveles de CD11c, MHC-II y CD11b. Dentro de esta subpoblación, se identifican las cDC1 como la población celular que expresa altos niveles de los marcadores de linaje CD24 y XCR1, mientras que la población cDC2 puede ser identificada por los altos niveles de expresión del marcador de linaje Sirp1 α .

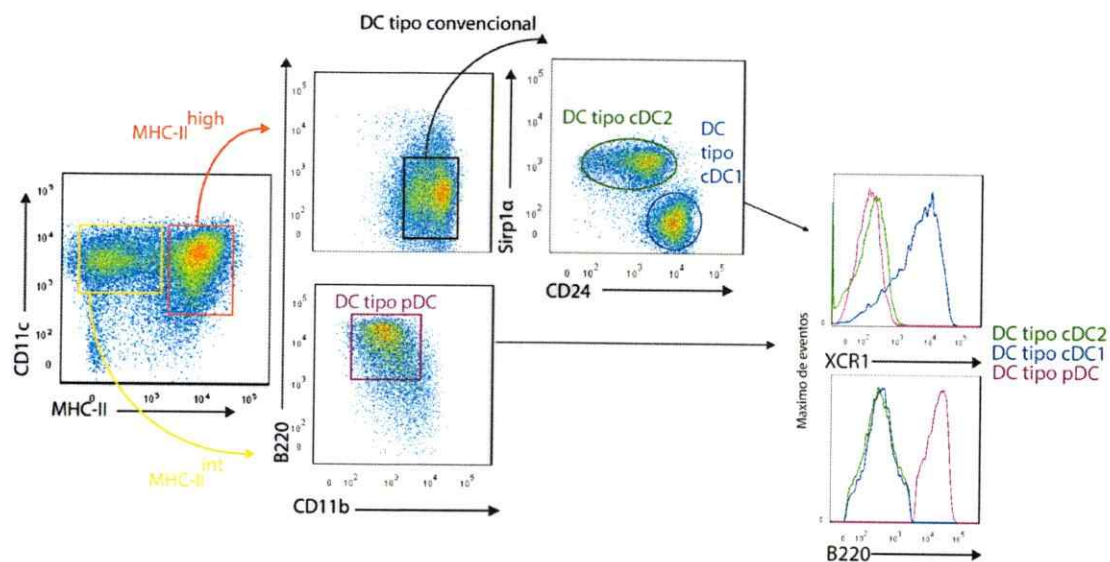


Figura 2. Análisis de subpoblaciones de DCs generadas con FLT3L. 1×10^6 DCs fueron obtenidas a partir de precursores de médula ósea y fueron cultivadas por 7 días en RPMI + 10% SFB + P/S. Al final del cultivo, las células fueron despegadas con PBS1x, marcadas con los siguientes anticuerpos y analizadas por citometría de flujo: CD11b FITC, XCR1 PE, CD172a (Sirp1 α) PerCP Cy5.5, B220 PE-Cy7, CD11c APC, MHC-II APC-Cy7, CD24 PB y marcador Live/Dead AmCyan, en presencia de Fc Block. Las subpoblaciones de DCs fueron identificadas de la siguiente manera: DC tipo pDC (FSC, SSC, vivas, CD11c^{high}, MHC-II^{int}, CD11b^{low}, B220^{high}, XCR1^{low}), DC tipo cDC1 (FSC, SSC, vivas, CD11c^{high}, MHC-II^{high}, CD11b^{high}, B220^{low}, Sirp1 α ^{low}, CD24^{high}, XCR1^{high}) y DC tipo cDC2 (FSC, SSC, vivas, CD11c^{high}, MHC-II^{high}, CD11b^{high}, B220^{low}, Sirp1 α ^{high}, CD24^{low}, XCR1^{low}).

DCs activadas con lisados celulares de melanoma activan eficientemente el eje IRE1 α /XBP-1s asociado a la respuesta a proteínas mal plegadas.

Si bien se ha descrito el rol de la vía IRE1 α /XBP-1s en la modulación de la función de DCs en condiciones no inflamatorias (Osorio y col. 2014, Iwakoshi y col. 2007, Bettigole & Glimcher 2014), su importancia en contextos de enfermedad no ha sido completamente elucidada. Más aún, se desconoce si las DCs pueden activar esta vía en respuesta a activación mediada por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Para simular distintos contextos inmunológicos, escogimos tres estímulos innatos representativos de condiciones de alergia, infección bacteriana y tumor, con el objetivo de estimular DCs y cuantificar la activación de XBP-1s y genes adicionales asociados a la respuesta a proteínas mal plegadas, 8 horas post estimulación. Estos estímulos corresponden al extracto del ácaro del polvo (HDM, *house dust mite*), el cual es uno de los alérgenos inhalados más relevantes en el desarrollo de asma alérgico (Lambrecht & Hammad, 2012); lipopolisacárido (LPS), componente predominante de la pared celular de bacterias Gram negativas; y un lisado celular obtenido a partir de tres líneas celulares de melanoma humano: Mel 1, Mel 2 y Mel 3. Este último estímulo (denominado "MEL") fue preparado en ausencia o presencia de un pre-condicionamiento con *shock* térmico a 42°C (denominado "MEL + HS"), ya que evidencia publicada por el Laboratorio de Inmunología Antitumoral de la Universidad de Chile indica que el pretratamiento con calor induce la liberación de señales de peligro por parte de las células de melanoma, las que contribuyen a la maduración óptima de las DCs (Aguilera y col. 2011).

Para realizar este experimento, DCs fueron activadas con los estímulos previamente descritos por 8 horas y se extrajo RNA para cuantificar la inducción de XBP-1s en respuesta a los diferentes tratamientos. Como control positivo de la activación de la vía IRE1 α /XBP-1s, las DCs fueron tratadas con tunicamicina, un inhibidor de la glicosilación de proteínas que causa una acumulación de glicoproteínas mal plegadas, generando estrés de retículo endoplásmico (RE) y activación de las vías convencionales de la respuesta a proteínas mal plegadas (Osowski & Urano, 2011). Para analizar la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas en DCs bajo estos estímulos, se analizó RNA de XBP-1s en sus formas activa o *spliced* y no-*spliced* mediante PCR convencional acoplado a una digestión con la enzima de restricción PstI, lo cual permite visualizar las dos especies en un gel de agarosa (ver esquema asociado a Figura 3A). Los resultados indican que el mRNA codificante para el factor de transcripción XBP-1s (Figura 3, gel superior, banda "S"), se induce potentemente en respuesta a estimulación con MEL y en un grado menor, con estimulación con LPS o HDM. Interesantemente, la activación de XBP-1s en respuesta a MEL es independiente del pre-condicionamiento con shock térmico (Figura 3, MEL + HS versus MEL) ya que ambos estímulos inducen activación del factor de transcripción, lo que sugiere que la activación de XBP-1s mediada por estos lisados sería independiente del condicionamiento con calor, el cual apunta a aumentar la concentración de señales de peligro presentes en la preparación (Aguilera y col. 2011).

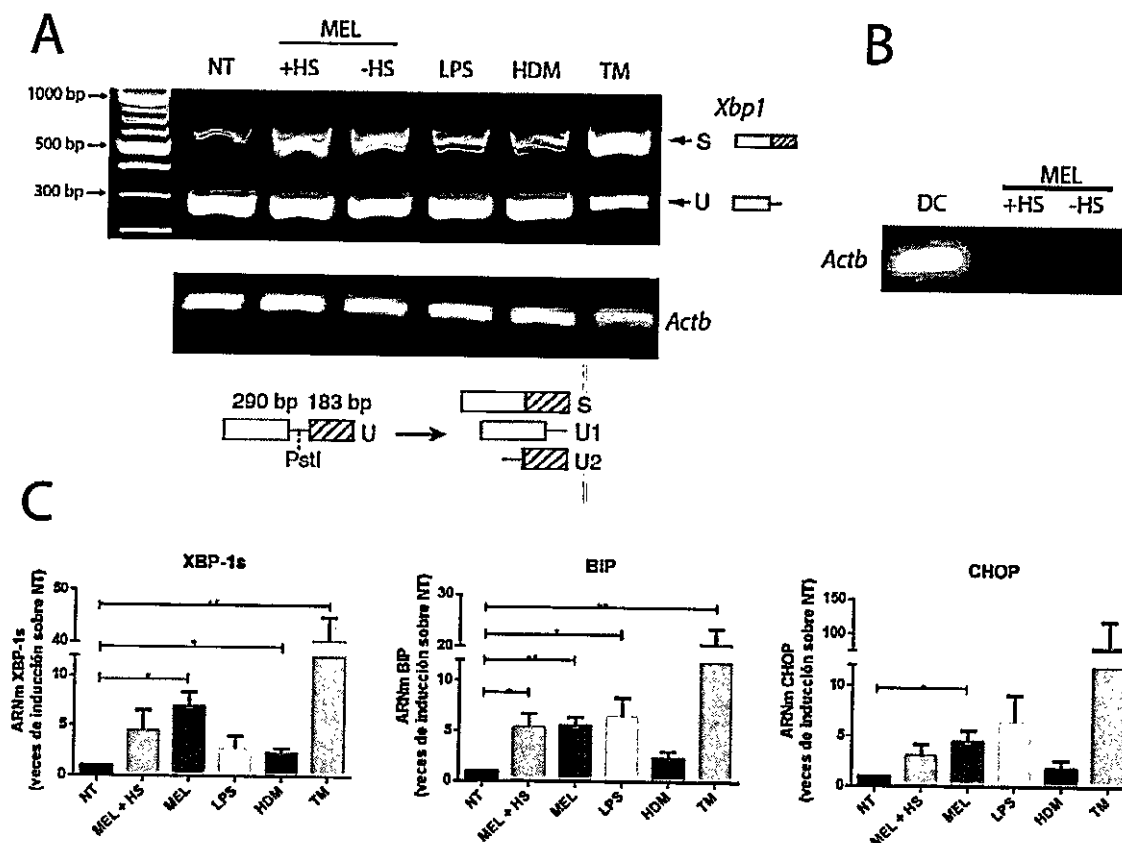


Figura 3. Estímulos inmunológicos inducen el *splicing* de XBP-1. 5×10^5 DCs murinas generadas a partir de medula ósea fueron estimuladas con MEL+HS o MEL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS (100 ng/mL), HDM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o TM (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como control positivo durante 8 horas. A) Se realizó un ensayo de digestión del producto de PCR de mRNA de XBP-1 no-*spliced* (U) y *spliced* (S) y fué visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. El mRNA codificante para β -actina (Actb) fue utilizado como control de carga y se utilizó un marcador de peso molecular de 100 bp. Se muestra una imagen representativa de 3 experimentos independientes. B) 100 μg de MEL o MEL+HS fueron utilizados para extracción de RNA. Se realizó un PCR para β -actina (Actb) el cual fue visualizado en un gel de agarosa 1%, utilizando el mRNA de una DC como control positivo. C) Análisis de PCR tiempo-real cuantitativo de genes blanco de la respuesta a proteínas mal plegadas en RNA total. Los gráficos de barras muestran la media \pm S.E.M. de las veces de inducción del gen relativo a un gen *housekeeping* control (L27) y normalizado frente a NT. Se muestran para los resultados de 3 experimentos independientes, excepto para TM en CHOP, el cual es el resultado de 2 experimentos independientes; * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$ (t de student no pareado). NT = no tratado

Estos resultados indican que MEL induce eficientemente la activación del factor de transcripción XBP-1s en cultivos de DCs. Para descartar la posibilidad de que el aumento en la inducción de XBP-1s observada en respuesta a la estimulación con MEL se deba a una contaminación con mRNA proveniente de los mismos lisados celulares y no de las DCs, decidimos aislar RNA directamente de las preparaciones de lisados y realizar PCR para el gen reportero ubicuo actina (Figura 3B). Como se observa en la Figura 3B, no es posible detectar mRNA presente en los lisados celulares de melanoma lo que confirma que la inducción de XBP-1s en respuesta a activación con lisados de melanoma es originada en respuesta al estrés de RE generado en la DC.

Para extender estos resultados y obtener información cuantitativa de la inducción de XBP-1s, se analizó el efecto de estos estímulos inmunológicos en la inducción de XBP-1s y en componentes adicionales de la respuesta a proteínas mal plegadas en DCs tales como BiP y CHOP mediante PCR tiempo-real cuantitativo. Como se observa en la Figura 3C, encontramos que XBP-1s es inducido fuertemente en respuesta a estimulación con el control positivo tunicamicina. Sin embargo, observamos también que, dentro de los estímulos inmunológicos utilizados y en concordancia con los datos de PCR convencional, los lisados de melanoma son los compuestos que activan más potentemente la inducción del factor de transcripción con un aumento correspondiente a $4,551 \pm 2,002$ (MEL+HS) y $6,975 \pm 1,422$ (MEL) veces de inducción comparado con DCs no tratadas, en contraste con HDM, el cual logró una inducción de $2,327 \pm 0,4192$ veces en comparación con DCs no tratadas, considerando media \pm SEM. Cuando se evaluó el efecto de LPS, a pesar de ser un potente activador de DCs, no logró inducir la expresión de XBP-1s de manera significativa. Aunque la activación con MEL y MEL + HS aumentan los niveles relativos de XBP-1s en DCs,

sólo la condición con MEL logró significancia estadística con respecto a la condición no tratada.

Por otra parte, cuantificamos la expresión de miembros adicionales del UPR tales como la chaperona BiP. En este contexto, observamos que tanto los lisados celulares de melanoma como LPS indujeron el mRNA codificante para la chaperona de manera significativa. En términos cuantitativos, los lisados de líneas celulares de melanoma MEL+HS y MEL fueron capaces de inducir la expresión de BiP $5,365 \pm 1,324$ y $5,580 \pm 0,7536$ veces, respectivamente, comparado con DCs no tratadas, mientras que LPS indujo $6,483 \pm 1,841$ veces, considerando media \pm SEM. Finalmente, la inducción de mRNA codificante para CHOP, el cual pertenece a la vía de respuesta a proteínas mal plegadas mediada por PERK, también se induce significativamente en respuesta a activación con MEL ($4,444 \pm 1,076$ veces, considerando media \pm SEM). En contraste con la inducción de XBP-1s, HDM no fue capaz de inducir la expresión de BiP de manera significativa. En vista de estos resultados, podemos concluir que la activación de DCs murinas con lisados celulares de melanoma induce la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas en DCs, a través de la activación del factor de transcripción XBP-1s, la chaperona BiP y la inducción de la transcripción del gen CHOP. Por otra parte, la inducción de estas vías en respuesta a los lisados de melanoma es superior a la inducida por los estímulos LPS y HDM ya que por una parte, si bien la activación con LPS resulta en inducción de BiP y CHOP, este compuesto no indujo altos niveles de XBP-1s. Por otra parte, activación de DCs con HDM tan solo indujo levemente XBP-1s de manera significativa y muy por debajo de los niveles producidos por la activación con lisados celulares de melanoma.

Adicionalmente, para obtener datos a nivel de proteína analizamos la inducción de las proteínas BiP y XBP-1s mediante Western Blot. Encontramos que, en congruencia con los resultados de PCR y PCR tiempo real cuantitativo, DCs estimuladas con MEL inducen considerablemente los niveles de expresión del factor de transcripción XBP-1s (Figura 4A) y la chaperona BiP (Figura 4B), en contraste con LPS y HDM, los cuales no fueron capaces de inducir la expresión de estos factores a nivel de proteínas.

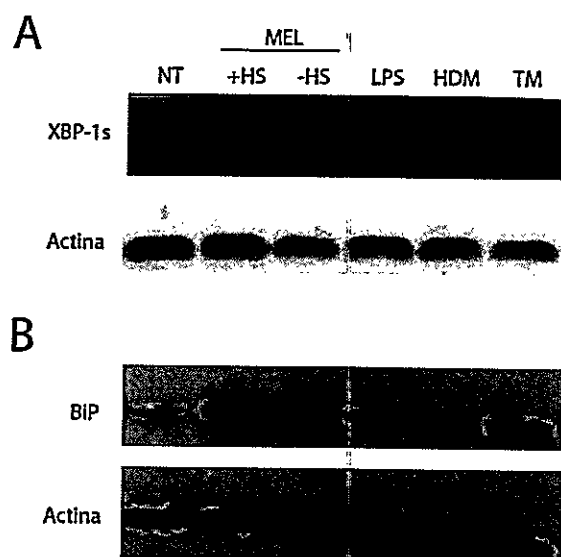


Figura 4. Lisados de líneas celulares de melanoma inducen XBP-1s y BiP a nivel de proteína. 2×10^6 DCs murinas generadas a partir de medula ósea fueron estimuladas con MEL+HS o MEL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS (100 ng/mL), HDM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 24 horas o TM (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como control positivo durante 8 horas. Luego se extrajo proteínas de los cultivos en presencia de inhibidores de proteasas y fueron analizados mediante Western Blot para (A) XBP-1s y (B) BiP. Actina fue utilizado como control de carga. Se muestra una imagen representativa para 3 experimentos independientes. NT = no tratado

Profundizando aún más la capacidad de estos estímulos de activar el eje IRE1 α /XBP-1s, se examinó también si estos son capaces de inducir RIDD mediante la degradación del sustrato Bloc1s1, un mRNA previamente descrito como un blanco convencional de RIDD (Bright y col. 2015). Encontramos que dentro de los estímulos analizados, los niveles de expresión de Bloc1s1 no varían significativamente en respuesta a los distintos tratamientos (Figura 5). Esta evidencia indicaría que la activación de IRE1 α en respuesta a activación con lisados de melanoma no activa RIDD.

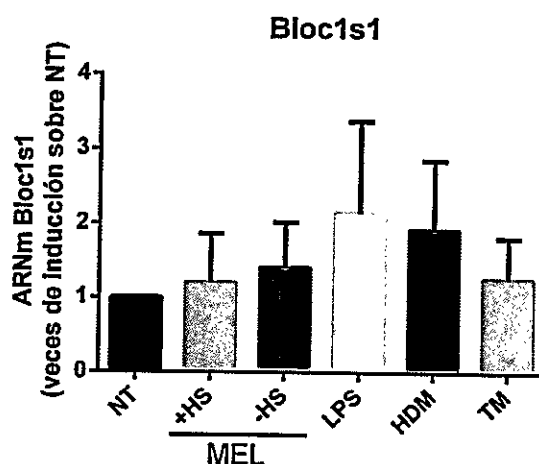


Figura 5. Estímulos inmunológicos no activan RIDD. 5×10^5 DCs murinas generadas a partir de medula ósea fueron estimuladas con MEL+HS o MEL (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), LPS (100 ng/mL), HDM (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o TM (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como control positivo durante 8 horas. Se muestra un análisis de PCR tiempo-real cuantitativo de el gen blanco de RIDD Bloc1s1 en RNA total. El gráfico de barras muestra la media \pm S.E.M. de las veces de inducción del gen relativo a un gen *housekeeping* control (L27) y normalizado frente a NT. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes. NT = no tratado.

Por lo tanto, evidencia experimental obtenida por técnicas de PCR, PCR tiempo-real cuantitativo y western blot demuestran que los lisados celulares de melanoma contienen activadores de la respuesta a proteínas mal plegadas y, preferencialmente del eje IRE1 α /XBP-1s en DCs, lo cual hasta el momento no ha sido descrito en la literatura. Debido a que la estimulación de DCs con LPS y HDM causó una baja expresión de mRNAs codificantes para componentes de la respuesta a proteínas mal plegadas y no apreciamos una inducción a nivel de proteínas, en comparación con MEL y MEL+HS, decidimos trabajar solamente con estos lisados para los experimentos posteriores.

El uso de un inhibidor del dominio endoribonucleasa de IRE1 α bloquea el *splicing* de XBP-1s y puede ser usado en cultivos de DCs.

Recientemente se ha descrito un inhibidor farmacológico específico para la actividad endoribonucleasa (RNAsa) de IRE1 α denominado 4 μ 8C, el cual es un aldehído que actúa como un inhibidor no competitivo mediante la formación de una base de Schiff con una lisina en la posición 907, ubicada en el sitio RNAsa de IRE1 α (Cross y col. 2012), sin embargo se desconoce si este inhibidor puede ser usado en experimentos con DCs. Para analizar su efecto en estas células, se realizó una curva de titulación con diluciones seriadas a partir de una concentración inicial de 4 μ 8C de 50 μ M, y se observó su capacidad de inhibir el *splicing* de XBP-1 en DCs activadas con tunicamicina. Adicionalmente, se determinó su efecto en la viabilidad celular a 24 horas post tratamiento. Observamos que la viabilidad de DCs en respuesta a las diferentes concentraciones del inhibidor 4 μ 8C no varía significativamente dentro del rango probado con respecto a DCs no tratadas (Figura 6A), lo que sugiere que este

compuesto puede ser usado en experimentos con DCs murinas. Por otra parte, detectamos una inhibición casi total de la actividad RNAsa medido mediante la disminución de los niveles de XBP-1s en respuesta a activación con tunicamicina, a dosis superiores a 12.5 μM (Figura 6B). Por lo tanto, basados en los datos de viabilidad y dosis óptima de inhibición de XBP-1s, escogimos como dosis efectiva una concentración de 20 μM .

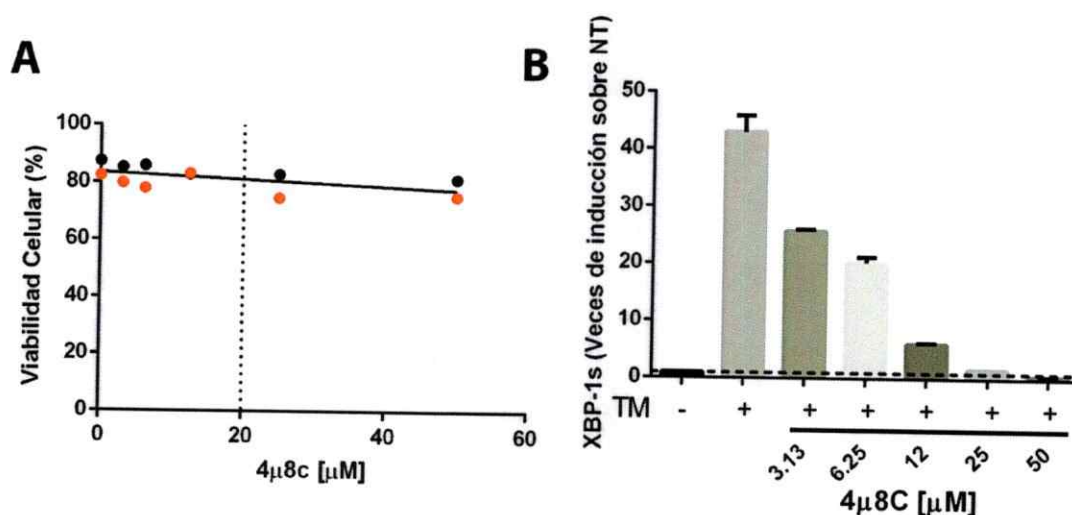


Figura 6. Determinación de dosis óptima del inhibidor 4μ8C. DCs murinas generadas a partir de medula ósea fueron tratadas con distintas dosis del inhibidor de la actividad RNAsa de IRE1α 4μ8C para analizar su efecto en la viabilidad celular y su capacidad de inhibir el *splicing* de XBP-1. A) 5×10^5 DCs fueron tratadas durante 24 horas con el inhibidor 4μ8C para luego ser analizadas por citometría de flujo utilizando el marcador de viabilidad celular Live Dead. El gráfico de puntos muestra los resultados de 2 experimentos independientes. B) 5×10^5 DCs fueron tratadas durante 8 horas con el inhibidor 4μ8C en diluciones seriadas a partir de 50 μM hasta 3.13 μM en ausencia o presencia de tunicamicina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). El gráfico de barras muestra un resultado representativo de 2 experimentos independientes e indica la media \pm S.E.M. de las veces de inducción de XBP-1s relativo a un gen *housekeeping* control (L27) y normalizados frente a NT. NT = no tratado

La inhibición de la actividad RNAsa de IRE1 α no afecta la expresión de moléculas de superficie en DCs activadas con lisados celulares de melanoma pero disminuye la producción de IL-12 en respuesta a este estímulo.

Debido a los resultados anteriores y considerando que trabajos recientes en modelos murinos *knock-out* para IRE1 α y XBP-1s han demostrado la importancia de esta vía en la función de DCs del tipo cDC1 (Osorio y col. 2014), se analizó como la inhibición farmacológica de la actividad RNAsa de IRE1 α afecta la funcionalidad de las DCs en respuesta a estimulación con lisados celulares de melanoma. Para esto, analizamos la dependencia de esta vía en la inducción de moléculas de superficie de DCs activadas con estos lisados en presencia de 20 μ M del inhibidor de IRE1 α . Para esto, escogimos los marcadores CD80 y CD86, los cuales son moléculas de co-estimulación características de DCs activadas y que se ha reportado que se inducen fuertemente en DCs humanas estimuladas con estos lisados junto con MHC-II (Aguilera y col. 2011). Para obtener información acerca de la inducción de moléculas inhibitorias, analizamos la expresión de la molécula PD-L1, el cual al interactuar con linfocitos envía una señal inhibitoria para su proliferación (Chemnitz y col. 2004). Al utilizar el inhibidor 4 μ 8C observamos que no hay diferencias significativas en la inducción de estas moléculas cuando las DCs son activadas con lisados de líneas celulares de melanoma (Figura 7), midiendo la intensidad media de fluorescencia (IMF) de todos los marcadores anteriormente descritos. Por esta razón, podemos concluir que la inhibición del dominio RNAsa de IRE1 α no afecta la expresión de moléculas de superficie activatorias, inhibitorias o MHC-II en los tres subtipos de DCs generadas en los cultivos generados en presencia de FLT3-L.

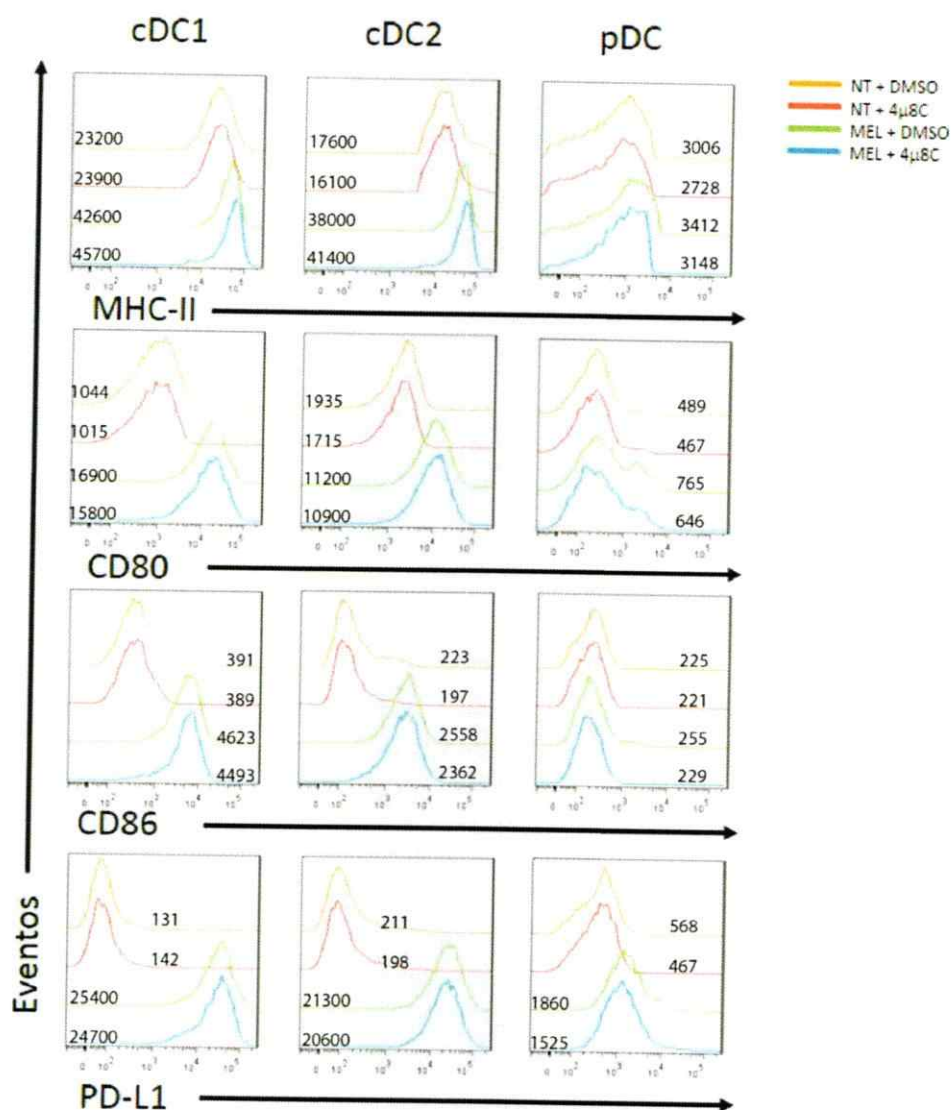


Figura 7. Efecto del inhibidor 4μ8C en moléculas de superficie en DCs. DCs generadas a partir de médula ósea fueron tratadas durante 2 horas con el inhibidor 4μ8C (20 μM) o DMSO como control de vehículo para luego ser estimuladas por 24 horas con lisados celulares de melanoma (MEL, 100 μg/mL) o control de vehículo y se les analizó por citometría de flujo la expresión en superficie de las moléculas MHC-II, CD80, CD86 y PD-L1 en los subtipos cDC1, cDC2 y pDC. Se muestran histogramas representativos de 2 experimentos independientes junto con los MFI correspondientes para cada marcador analizado.

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 (Dixon y col. 2001, Jensen & Gad 2010, Mattei y col. 2001, Lavelle y col. 2003, Bellinghausen y col. 2003, Zitvogel & Kroemer, 2014). En el contexto de inmunología antitumoral, se ha reportado que la subpoblación de DCs que es capaz de estimular linfocitos T citotóxicos intratumorales corresponde a cDC1s, las cuales producen niveles altos de interleuquina 12 (IL-12) dentro del nicho tumoral (Broz y col. 2014). IL-12 induce la producción de IFN- γ y TNF- α en linfocitos T CD8⁺ y células NK. IL-12 es además fundamental en la diferenciación de linfocitos CD4⁺ hacia un fenotipo T helper 1 (T_H1) (Zhu & Paul, 2010), los cuales contribuyen a la diferenciación y expansión óptima de linfocitos T citotóxicos específicos contra antígenos tumorales (Palucka & Banchereau, 2012). Por otra parte, la relevancia de la respuesta a proteínas mal plegadas en la respuesta inflamatoria se ha revelado en reportes que indican que macrófagos activan la vía IRE1 α /XBP-1s del UPR en respuesta a patógenos, la cual es necesaria para la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Martinon y col. 2010). Por esta razón, resulta interesante analizar el papel de esta vía en la producción de IL-12 en DCs estimuladas con lisados celulares de melanoma. Para lograr este objetivo, DCs fueron estimuladas con 100 μ g/mL de lisados celulares de melanoma por 20 horas en presencia del inhibidor 4 μ 8C o DMSO como control de vehículo y se cuantificó la producción de IL-12 en las subpoblaciones de DCs mediante un protocolo de tinción intracelular para IL-12, analizado por citometría de flujo. Como se observa en la Figura 8, observamos que los lisados de melanoma inducen la producción de IL-12 y que el tratamiento con el inhibidor 4 μ 8C resulta en una disminución importante a aproximadamente la mitad en la producción de IL-12 por células cDC1, en comparación al control de vehículo (Figura 8). En contraste,

las células del linaje cDC2 y pDC producen niveles reducidos de la citoquina y por lo tanto no muestran diferencias significativas cuando se utiliza el inhibidor 4 μ 8C (Figura 8B).

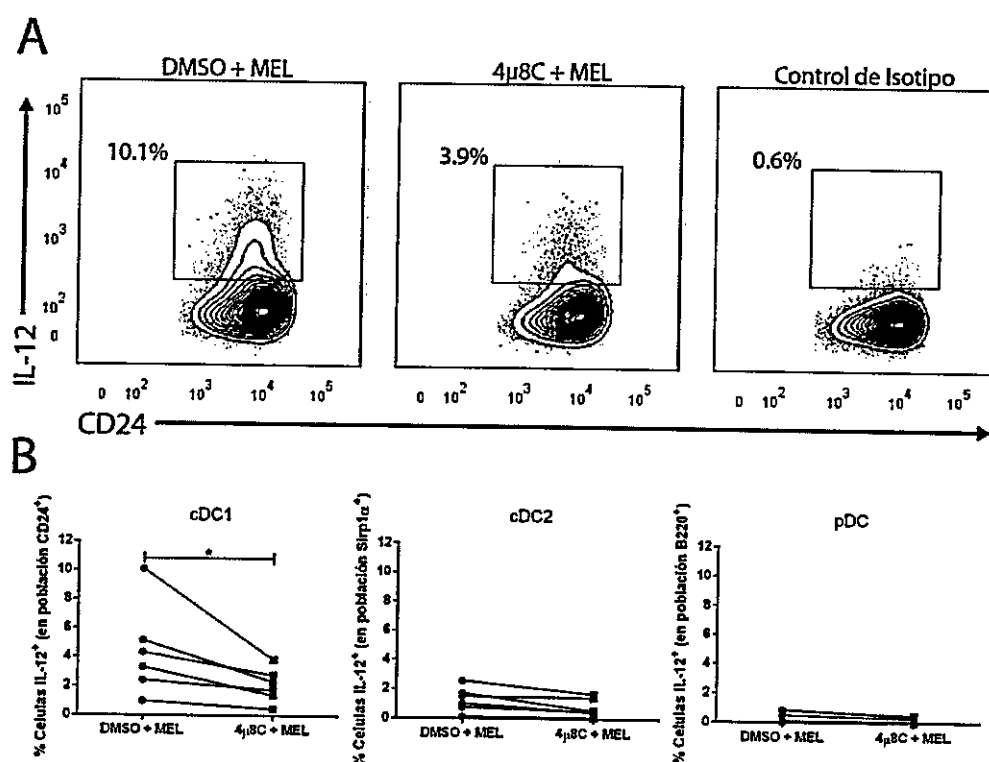


Figura 8. El inhibidor 4 μ 8C disminuye la producción de IL-12 en cDC1 (CD24⁺) estimuladas con lisados de líneas celulares de melanoma. 2×10^6 DCs murinas generadas a partir de medula ósea fueron tratadas durante 2 horas con el inhibidor 4 μ 8C (50 μ M) o DMSO como control de vehículo y luego estimuladas durante 20 horas con lisados de líneas celulares de melanoma, utilizando brefeldina A (3 μ g/mL) las últimas 4 horas para la acumulación intracelular de IL-12. Posteriormente fueron analizadas por citometría de flujo para la producción IL-12 intracelular en cDC1, cDC2 y pDC siguiendo la estrategia de *gating* ilustrada en la figura 1. A) DotPlot de DCs CD24⁺ positivas para IL-12p40/p70 (números al interior de cada gráfico). Se muestra DotPlot representativo de 6 experimentos independientes. B) Gráficos de puntos pareados muestran la media \pm S.E.M. del porcentaje de DCs positivas para IL-12p40/p70 en cDC1 (CD24⁺, izquierda), cDC2 (Sirp1 α ⁺, medio) y pDC (B220⁺, derecha). Se muestran los resultados de 6 experimentos independientes; $p \leq 0,05$ (t de student pareado).

En conclusión, en esta sección hemos demostrado que los lisados de líneas celulares de melanoma son capaces de activar la vía IRE1 α /XBP-1s en DCs y la actividad de esta vía es importante para la producción de IL-12, especialmente en células del tipo cDC1.

La inhibición de la actividad RNAsa de IRE1 α en DCs disminuye la capacidad de activar linfocitos T CD8 $^+$.

Las DCs son las células presentadoras de antígeno profesionales por excelencia debido a su alta capacidad fagocítica, procesamiento y presentación antigénica (Savina & Amigorena 2007, Trombetta & Mellman 2005). Dentro de los subtipos de DCs, las cDC1 tienen una capacidad excepcional de procesar antígenos exógenos y presentarlos en MHC clase I, a través de presentación cruzada (Rock & Shen, 2005). Para realizar esta función, las DCs realizan mecanismos que involucran directamente al RE, como transporte mediado por TAP, fusión fagosoma-RE y tráfico de MHC-I, entre otros (Guermónprez y col. 2003, Cebrian y col. 2011, Basha y col. 2012), lo cual sugiere que el mantenimiento de la homeostasis del RE es necesaria para este proceso. Más aún, estudios previos de esta unidad han demostrado que DCs CD8 α^+ (subtipo incluido dentro de las cDC1) XBP-1 $^{-/-}$ son incapaces hacer presentación cruzada de OVA (Osorio y col. 2014). Con estos antecedentes, y en vista de que el inhibidor 4 μ 8C disminuye la producción de IL-12, estudiamos el rol del eje IRE1 α /XBP-1s en la capacidad de presentación cruzada en DCs activadas con estímulos inmunológicos. Para analizar la presentación de antígeno a LT CD8 $^+$, se realizó un ensayo clásico de co-cultivo entre DCs y linfocitos T CD8 $^+$ de ratones OT-I (los cuales poseen un TCR transgénico que reconoce el péptido OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFEKL) proveniente de la proteína ovoalbúmina restringido a MHC-I). Estos ensayos fueron

realizados en presencia de la proteína OVA o el péptido SIINFEKL, en presencia o ausencia de lisados de melanoma y en presencia o ausencia del inhibidor 4 μ 8C y analizamos la activación de LT a 16 horas mediante el marcador de activación temprana CD69. Se observó que la inhibición de la actividad RNAsa de IRE1 α no tiene un efecto significativo en la activación temprana de linfocitos T CD8⁺ OT-I en presencia de la proteína OVA en ausencia de estímulo (Figura 9). Sin embargo, cuando los lisados celulares de melanoma están presentes en el cultivo como adyuvantes, existe una tendencia evidente indicando que el inhibidor 4 μ 8C disminuye la activación de LT (Figura 9A y 9B, abajo). Sin embargo, a pesar de mostrar una tendencia, las diferencias entre OVA + MEL en presencia o ausencia 4 μ 8C no alcanzan a demostrar significancia estadística ($p=0,06$), lo cual puede atribuirse por una parte a limitaciones en el uso de inhibidores. Por otra parte, cuando se analiza el efecto del inhibidor 4 μ 8C en la capacidad de DCs de activar LT en respuesta a péptido SIINFEKL, no se encontraron diferencias significativas, indicando que el efecto observado no se debe a una disminución de moléculas MHC-I (Figura 9B, arriba)

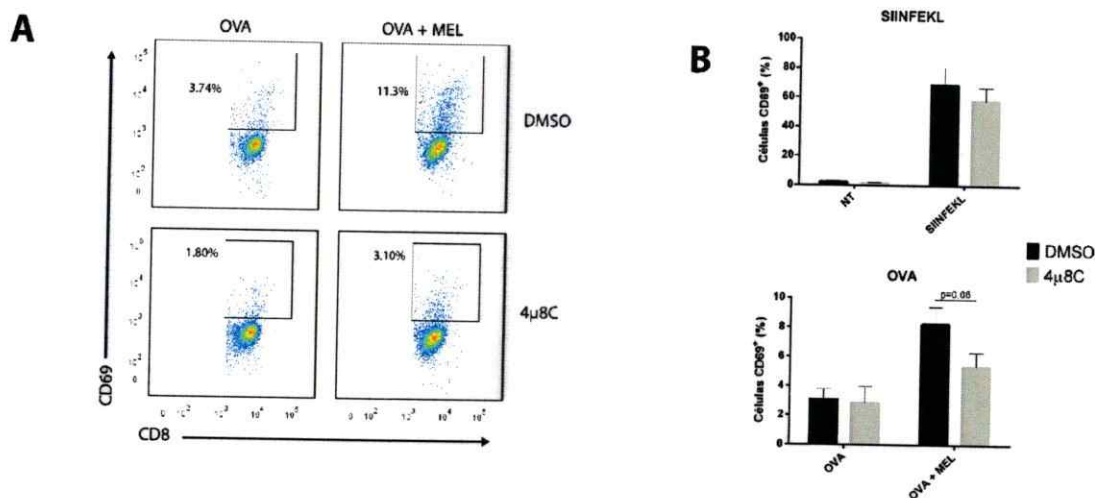


Figura 9: El inhibidor 4μ8C disminuye la adjuvanticidad de lisados de melanoma en la capacidad de DCs de activar LT CD8⁺. 2x10⁴ DCs murinas generadas a partir de medula ósea fueron tratadas durante 20 horas con el inhibidor 4μ8C (50 μM) o DMSO como control de vehículo y fueron cultivadas con 5x10⁴ LT CD8⁺ sorteados de bazo de ratones OT-I en presencia del péptido SIINFEKL (100 pM) u OVA soluble (10 μg/mL), en presencia o ausencia de MEL durante 16 horas. A) DotPlots representativos de LT CD8⁺ positivos para CD69 (números al interior de cada gráfico) cultivados con DCs en presencia de OVA y en presencia o ausencia de MEL. Se muestra DotPlot representativo de 6 experimentos independientes. B) Gráfico de barras que muestra la media ± S.E.M. del número de LT CD8⁺ CD69⁺ tras ser cultivados con DCs en presencia o ausencia de SIINFEKL (arriba) u OVA soluble en presencia o ausencia de MEL (abajo). Se muestran los resultados de 6 experimentos independientes; * = p ≤ 0,05 (t de student no pareado)

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 este trabajo, estudiamos la capacidad de tres distintos estímulos inmunológicos de activar el eje IRE1 α /XBP-1s de la respuesta a proteínas mal plegadas en DCs: 1) Lipolisacárido (LPS) de *E.coli*, un activador clásico de TLR4; 2) un extracto de acaro de polvo (HDM) derivado de *Dermatophagoides pteronyssinus*, el cual es un potente alérgeno asociado al desarrollo de asma alérgico y; 3) un lisado celular de líneas celulares de melanoma producido en el Laboratorio de Inmunología Antitumoral de la Universidad de Chile, el cual ha sido exitosamente utilizado como

recurso de antígeno y adyuvante en una inmunoterapia basada en DCs denominada TAPCells, para pacientes con melanoma avanzado (Salazar-Onfray y col. 2013)

Interesantemente, nuestros resultados indican que los lisados celulares de líneas de melanoma son los activadores más eficientes de la vía IRE1 α /XBP-1s en DCs, en comparación con LPS y HDM. Al momento de empezar este proyecto, no había evidencia previa que indicara que compuestos tumorales activaran la respuesta a proteínas mal plegadas en DCs. Sin embargo, en un trabajo recientemente publicado, se demuestra que ascitas derivadas de cáncer ovárico inducen la activación del eje IRE1 α /XBP-1s en DCs (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.

Existen diversos mecanismos por los cuales los lisados derivados de células tumorales podrían activar preferencialmente XBP-1s y la respuesta a proteínas mal plegadas en comparación con otros estímulos innatos tales como LPS o HDM en DCs. Por una parte, a diferencia de LPS y HDM que son estímulos de naturaleza soluble, los lisados celulares están constituidos por fragmentos y debris celular, los que deben ser capturados por las DCs a través de fagocitosis, que corresponde al proceso por el que partículas de mayor tamaño son internalizadas y procesadas dentro de una vesícula denominada fagosoma (Hochreiter-Hufford & Ravichandran 2013). El proceso de fagocitosis gatilla múltiples eventos intracelulares tales como reordenamiento del citoesqueleto y activación de proteínas kinasas, entre otros eventos de señalización

intracelular. Por lo tanto, una posibilidad es que el eje IRE1 α /XBP-1s se active preferentemente en respuesta a fagocitosis de ligandos particulados.

Por otra parte, a diferencia de LPS y HDM los cuales contienen ligandos específicos de PRRs tales como TLR4 para LPS, y TLR2 y Dectin-2 para HDM (Lu y col. 2008; Ryu y col. 2013; Barrett y col. 2009), los lisados celulares de melanoma son altamente complejos y contienen múltiples señales de peligro capaces de interactuar simultáneamente con PRRs tales como TLR2, TLR3, TLR4, DNGR-1, MINCLE, TLR9, AIM, DAI y NLRP3, entre otros (Zitvogel y col. 2010), generando un alto nivel de activación en DCs y favoreciendo la activación del eje IRE1 α /XBP-1s en estas células. Sin embargo, es importante mencionar que en nuestros experimentos, detectamos que los lisados de melanoma inducen la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas independiente del pre-tratamiento con shock térmico, el cual ha sido previamente reportado que aumenta la actividad inmunogénica de los lisados, lo que se atribuye a la liberación de las señales de peligro calreticulina y HMGB1 (Aguilera y col. 2011). Una manera plausible de explicar este fenómeno, es que los activadores de la respuesta a proteínas mal plegadas contenidos en los lisados de melanoma estarían preformados, y por lo tanto, no serían inducibles en respuesta a tratamiento con calor.

Como se mencionó previamente en la introducción, el dominio endoribonucleasa de IRE1 α posee dos funciones: regular el *splicing* alternativo del mRNA codificante para XBP-1, y por otra parte, procesar mRNAs asociados al RE en el proceso conocido como RIDD. En este trabajo, si bien detectamos que los lisados de melanoma inducen XBP-1s, no detectamos activación de RIDD, medido a través de la cuantificación del mRNA codificante para el sustrato Bloc1s1 (Hollien y col. 2009). Por

lo tanto, nuestros resultados sugieren que XBP-1s y no RIDD regularía aspectos funcionales de las DCs activadas con lisados de melanoma. Sin embargo, no es inesperado que los lisados de celulares melanoma induzcan solo un blanco de la actividad endoribonucleasa de IRE1 α , ya que se ha reportado que esta enzima posee distintos mecanismos catalíticos para la activación de XBP-1s y RIDD. En este contexto, se ha propuesto que la oligomerización de IRE1 α conduce al procesamiento de XBP-1s, mientras que monómeros de la enzima ejecutarían preferencialmente RIDD (Tam y col. 2015). En este contexto es importante mencionar que RIDD es un proceso extremadamente difícil de cuantificar en condiciones fisiológicas o en contextos *in vivo* en modelos *wild-type* y sólo se ha revelado su función en células deficientes para XBP-1, las cuales inducen RIDD de manera compensatoria (Osorio y col. 2014, Lee y col. 2008).

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 IL-12 en DCs activadas con estos lisados. Esta citoquina posee funciones relevantes en el sistema inmune ya que es capaz de inducir la producción de IFN- γ y TNF- α en linfocitos CD8⁺ y células NK, además de ser fundamental en la diferenciación de linfocitos CD4⁺ a T_H1 (Zhu y Paul, 2010). Nuestros resultados van en línea con lo publicado en la literatura, donde macrófagos deficientes para XBP-1 tienen una producción disminuida de citoquinas inflamatorias como IL-6 o TNF- α 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. Debido a la



naturaleza de este fenómeno, es relevante continuar estos estudios y sus perspectivas en inmunología tumoral e inmunoterapia. Experimentos en curso en nuestra unidad están enfocados en ampliar el espectro de citoquinas controladas por el eje IRE1 α /XBP-1s en DCs activadas con lisados de melanoma con el objetivo de entender con mayor profundidad la contribución de esta vía de señalización a la activación de DCs.

Además de producir altas cantidades de citoquinas inflamatorias, una de las características que definen a las DCs es su capacidad de inducir la diferenciación de linfocitos T. En particular, una característica de las cDC1 es su alta capacidad de realizar presentación cruzada a LT CD8⁺. Nuestros experimentos indican que el bloqueo de IRE1 α en DCs activadas con lisados celulares de melanoma tiende a disminuir la activación temprana de linfocitos T CD8⁺ específicos para el antígeno modelo ovoalbúmina, lo que sugiere que esta vía de señalización puede ser un blanco terapéutico interesante para futuros diseños de inmunoterapia del cáncer basada en DCs. Sin embargo, no logramos obtener estadística significativa ($p=0,06$, Figura 8B), lo que puede explicarse por las limitaciones asociadas al uso de inhibidores. 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 y col. 2012). Por lo tanto, es posible que no hayamos logrado el nivel de inhibición óptimo requerido para observar un efecto mayor en la presentación cruzada de antígenos. Experimentos futuros de nuestra unidad contemplan validar los resultados de este trabajo en modelos murinos *knock-out* para IRE1 α .

En línea con nuestros datos, se ha reportado recientemente que las DCs asociadas a tumores primarios (tDC) de cáncer de ovario murino tienen activado constitutivamente el eje IRE1 α /XBP-1s (Cubillos-Ruiz y col. 2015). Sin embargo y en contraste con nuestros datos, en este modelo la activación del eje IRE1 α /XBP-1s regula negativamente el desarrollo de la respuesta inmune antitumoral, ya que DCs deficientes para XBP-1 controlan más eficientemente el crecimiento tumoral que DCs de animales *wild-type* (Cubillos-Ruiz y col. 2015). La racional que puede dar cuenta de las diferencias entre este y nuestros resultados es que el trabajo reportado estudia en profundidad las DCs del tipo cDC2, las cuales no muestran dependencia del eje IRE1 α /XBP-1s para su función y homeostasis (Osorio y col. 2014). En contraste, nuestros estudios se enfocan en el estudio de DCs del tipo cDC1, las cuales son altamente susceptibles a los niveles de activación de IRE1 α intracelular (Osorio y col. 2014). Por lo tanto, estos y nuestros resultados sugieren que es importante estudiar detalladamente el papel de IRE1 α en cada linaje de DCs ya que dependiendo del tipo celular, la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas puede tener efectos opuestos en la modulación de la respuesta inmune adaptativa.

En resumen en este trabajo hemos descubierto que dentro de un panel de estímulos inmunológicos, los lisados celulares de melanoma son potentes activadores de la vía IRE1 α /XBP-1s en DCs, y que la señalización de esta vía es necesaria para la correcta ejecución de funciones importantes en cDC1s, tales como la producción de IL-12 y la activación de LT CD8⁺ mediante presentación cruzada por DCs.

Dentro de las perspectivas de este trabajo de tesis está el identificar la naturaleza del componente activador de XBP-1s presente en células tumorales, analizar su dependencia a la señalización de algún PRR en particular involucrado en el reconocimiento de células muertas y dentro de los próximos objetivos *in vivo*, planeamos inhibir este eje de señalización en un contexto de vacunas basadas en DCs para el tratamiento terapéutico y profiláctico de melanoma murino.

CONCLUSIONES

A partir del estudio realizado en este trabajo de tesis, observamos que los lisados de líneas celulares de melanoma actúan como activadores de la respuesta a proteínas mal plegadas en DCs. Adicionalmente, cuando las DCs son tratadas con un inhibidor específico para la actividad RNasa de IRE1 α , el linaje cDC1 disminuye la producción de IL-12 tras ser estimuladas con los lisados de líneas celulares de melanoma. Además, se observó que no hay una disminución de moléculas de las moléculas de superficie MHC-II, CD80, CD86 y PD-L1 cuando las DCs son tratadas con el inhibidor descrito. Finalmente, DCs tratadas con el inhibidor específico tienden a disminuir su capacidad de hacer presentación cruzada de un antígeno modelo y activar linfocitos antígeno-específicos. Estos resultados permiten afirmar la hipótesis propuesta ya que logramos identificar un potente activador de la respuesta a proteínas mal plegadas y el eje IRE1 α /XBP-1s en DCs, y observar que la señalización de esta vía tiene importancia funcional en estas células.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilera, R., Saffie, C., Tittarelli, A., González, F. 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**: 2474–83.
2. 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.
3. Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. **392**: 245–52.
4. Barrett, N. A., Maekawa, A., Rahman, O. M., Austen, K. F., & Kanaoka, Y. (2009). Dectin-2 recognition of house dust mite triggers cysteinyl leukotriene generation by dendritic cells. *Journal of Immunology*. **182**: 1119–28.
5. Basha, G., Omilusik, K., Chavez-Steenbock, A., Reinicke, A. T., Lack, N., Bok Choi, K., Jefferies, W. A. (2012). A CD74-dependent MHC class I endolysosomal cross-presentation pathway. *Nature Immunology*. **13**: 237–245.
6. 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.
7. Belz, G. T., & Nutt, S. L. (2012). Transcriptional programming of the dendritic cell network. *Nature Reviews. Immunology*. **12**: 101–13.
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.
9. Bettigole, S. E., & Glimcher, L. H. (2014). Endoplasmic Reticulum Stress in Immunity. *Annual Review of Immunology*. **33**: 1–31.
10. 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**: 829–37.
11. Bright, M. D., Itzhak, D. N., Wardell, C. P., Morgan, G. J., & Davies, F. E. (2015). Cleavage of BLOC1S1 mRNA by IRE1 is sequence-specific, temporally separate from XBP1 splicing, and dispensable for cell viability under acute ER-stress. *Molecular and Cellular Biology*. **35**: 2186–2202.
12. Bronner, D. N., Abuaita, B. H., Chen, X., Fitzgerald, K. A., Nuñez, G., He, Y., Xiao-Ming, Y., O’Riordan, M. X. D. (2015). Endoplasmic Reticulum Stress Activates the Inflammasome via NLRP3- and Caspase-2-Driven Mitochondrial Damage. *Immunity*. **43**: 451–62.
13. 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’t Veer, 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**: 638–52.
14. Cao, W., Bover, L., Cho, M., Wen, X., Hanabuchi, S., Bao, M., Rosen, D. B., Wang, Y. H., Shaw, J. L., Du, Q., Li, C., Arai, N., Yao, Z., Lanier, L. L., Liu, Y. J. (2009).

- Regulation of TLR7/TLR9 responses in plasmacytoid dendritic cells by BST2 and ILT7 receptor interaction. *J Exp Med.* **206**:1603-1614.
15. 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.
 16. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H., Riley, J. L. (2004). SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *Journal of Immunology.* **173**: 945–54.
 17. 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.
 18. Coelho, D. S., & Domingos, P. M. (2014). Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay. *Frontiers in Genetics.* **5**, 1-6.
 19. 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**: 869-78.
 20. 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-García, J. R., Glimcher, L. H. (2015). ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis. *Cell.* **161**: 1527-38.
 21. Diao, J., Zhao, J., Winter, E., & Cattral, M. S. (2010). Recruitment and differentiation of conventional dendritic cell precursors in tumors. *Journal of Immunology.* **184**: 1261–7.
 22. 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.
 23. 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., Kroczeck, R.A. (2009). Selective expression of the chemokine receptor XCR1 on cross-presenting dendritic cells determines cooperation with CD8+ T cells. *Immunity.* **31**: 823-833.
 24. 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., Holtzmann, 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.
 25. 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. *Immunol Lett.* **111**: 36-44.
 26. 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-*IKKε* supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nature Immunol.* **15**: 323–332.

27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., van Endert, P., Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature*. **425**: 397–402.
31. Williams, 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.
32. Harding H.P., Zhang Y., Ron D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase, *Nature*. **397**: 271–274.
33. 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*. **181**: 8576–8584.
34. Hetz, C., Chevet, E., & Oakes, S. a. (2015). Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nature Cell Biology*. **17**: 829–38.
35. 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.
36. Hochreiter-Hufford, A., & Ravichandran, K. S. (2013). Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **5**: a008748.
37. 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. *J Cell Biol*. **186**: 323–331.
38. Iwakoshi, N. N., Pypaert, M. & Glimcher, L. H. (2007). The transcription factor XBP-1 is essential for the development and survival of dendritic cells. *J. Exp. Med*. **204**: 2267–2275.
39. Janssens, S., Pulendran, B., & Lambrecht, B. N. (2014). Emerging functions of the unfolded protein response in immunity. *Nature Immunology*. **15**: 910–919.
40. 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*. **7**: 37.
41. Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A., & Amigorena, S. (2012). Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews. Immunology*. **12**: 557–69.
42. Joffre, O. P., 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.
43. 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., Bayliss, R. (2015). Molecular mechanisms of human IRE1 activation through dimerization and ligand binding. *Oncotarget*. **6**: 13019–35.

44. 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.
45. Kaser, A., Lee, A.-H., Franke, A., Glickman, J. N., Zeissig, S., Tilg, H., Nieuwenhuis, E. 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.
46. Kempner, E. S. (2009). Damage to proteins due to the direct action of ionizing radiation. *Quarterly Reviews of Biophysics*. **26**: 27.
47. Koumenis, C., Bi, M., Ye, J., Feldman, D., & Koong, A. C. (2007). Hypoxia and the unfolded protein response. *Methods in Enzymology*. **435**: 275–93.
48. 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. (2010). Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood*. **115**: 4742–4749.
49. Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2012). The airway epithelium in asthma. *Nature Medicine*. **18**: 684–92.
50. 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.
51. 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.
52. Lee, A.-H., Scapa, E. F., Cohen, D. E., & Glimcher, L. H. (2008). Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1. *Science*. **320**: 1492–6.
53. Liwski, R. S., Chase, J. C., Baldridge, W. H., Sadek, I., Rowden, G., West, K. A. (2006). Prolonged costimulation is required for naive T cell activation. *Immunol Lett*. **106**: 135–143.
54. Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. **42**: 145–51.
55. Mardones, P., Dillin, A., & Hetz, C. (2014). Cell-nonautonomous control of the UPR: mastering energy homeostasis. *Cell Metabolism*. **20**: 385–7.
56. Martinon, F., Xi Chen, A-H L., and Glimcher, L. H. (2010). TLR Activation of the Transcription Factor XBP1 Regulates Innate Immune Responses in Macrophages. *Nature Immunology*. **11**: 411–18.
57. 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.
58. 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.
59. McKenna, K., Beignon, A.-S., & Bhardwaj, N. (2005). Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *Journal of Virology*. **79**: 17–27.
60. Osowski, C. M., & Urano, F. (2011). Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system. *Methods in Enzymology*. **490**: 71–92.
61. Osorio, F., Tavernier, S. J., Hoffmann, E., Saeys, Y., Martens, L., Veters, J., Delrue, I., De Rycke, R., Parthoens, E., Pouliot, P., Takao, I., 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.
62. Pakula, T.M., Laxell, M., Huuskonen, A., Uusitalo, J., Saloheimo, M., Penttila, 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, *J. Biol. Chem.* **278**: 45011–45020.
63. Palorini, R., Cammarata, F. P., 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 & Disease*. **4**: e732.
64. Palucka, K., & Banchereau, J. (2012). Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature Reviews Cancer*. **12**: 265–77.
65. Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet*. **357**: 1777–89.
66. Pearce, E. J., & Everts, B. (2015). Dendritic cell metabolism. *Nat Rev Immunol*. **15**: 18–29.
67. Reimold, A. M., Iwakoshi, N. N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravalles, 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.
68. Rock, K. L., & Shen, L. (2005). Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunological Reviews*. **207**: 166–83.
69. Ron, D. and Walter, P. (2007). Signal Integration in the Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. **8**: 519–29.
70. Ryu, J.-H., Yoo, J.-Y., Kim, M.-J., Hwang, S.-G., Ahn, K. C., Ryu, J.-C., Choi, M.-K., Joo, J. H., Kim, C.-H., Lee, S.-N., Lee, W.-J., Kim, J., Shin, D. M., Kweon, M.-N., Bae, Y. S., Yoon, J.-H. (2013). Distinct TLR-mediated pathways regulate house dust mite-induced allergic disease in the upper and lower airways. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. **131**: 549–61.
71. Salazar-Onfray, F., Pereda, C., Reyes, D., & López, M. N. (2013). TAPcells, the Chilean dendritic cell vaccine against melanoma and prostate cancer. *Biological Research*. **46**: 431–440.
72. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol*. **22**: 745-763.
73. Savina, A., & Amigorena, S. (2007). Phagocytosis and antigen presentation in dendritic cells. *Immunological Reviews*. **219**: 143–56.
74. Schlitzer, A., & Ginhoux, F. (2014). Organization of the mouse and human DC network. *Current Opinion in Immunology*. **26**: 90–99.
75. Schlitzer, A., McGovern, N., Teo, P., Zelante, T., Atarashi, K., Low, D., Ho, A. W., See, P., Shin, A., Wasan, P. S., Hoeffel, G., Malleret, B., Heiseke, A., Chew, S., Jardine, L., Purvis, H. A., Hilkens, C. M., 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.
76. Schröder, M. & Kaufman, R. J. (2005). *ER stress and the unfolded protein response*. *Mutat. Res*. **569**: 29–63.
77. Segura, E. & Villadangos, J.A. (2011). A modular and combinatorial view of the antigen cross-presentation pathway in dendritic cells. *Traffic*. **12**: 1677–1685.

78. Shoulders, M. D., Ryno, L. M., Genereux, J. C., Moresco, J. J., Tu, G., Wu, C., Yates III, J. R., Su, A. I., Kelly, J. W., Wiseman, L. R. (2014). Stress-Independent Activation of XBP1s and/or ATF6 Reveals Three Functionally Diverse ER Proteostasis Environments. *Cell Rep.* **3**: 1279–1292.
79. 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.
80. 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.
81. Striz, I., Brabcova, E., Kolesar, L., Sekerkova, A. (2014). Cytokine networking of innate immunity cells: a potential target of therapy. *Clin. Sci.* **126**: 593–612.
82. Szegezdi, E., Logue, S.E., Gorman, A.M. and Samali, A. (2006). Mediators of Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis. *EMBO Reports.* **7**: 880–85.
83. 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.
84. 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.
85. 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**: 920–940.
86. Todd, D.J., Lee, A.-H. & Glimcher, L.H. (2008). The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* **8**: 663–674.
87. Trombetta, E. S., & Mellman, I. 2005. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu. Rev. Immunol.* **23**: 975–1028.
88. Walter, P., & Ron, D. (2011). The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science.* **334**: 1081–1086.
89. 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.
90. 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. *J. Biochem.* **136**, 343–50.
91. Zhu, J., & Paul, W. E. (2010). Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Research.* **20**: 4–12.
92. Zitvogel, L., Kepp, O., & Kroemer, G. (2010). Decoding cell death signals in inflammation and immunity. *Cell.* **140**: 798–804.
93. Zitvogel, L., & Kroemer, G. (2014). CD103+ dendritic cells producing interleukin-12 in anticancer immunosurveillance. *Cancer Cell.* **26**: 591–3.