



**Universidad de Valladolid**



**PROGRAMA DE DOCTORADO  
EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

**TESIS DOCTORAL:**

**Regulación de la transcripción de citoquinas por la  
modulación del metabolismo energético y el estrés del  
retículo endoplasmático en células dendríticas**

Presentada por **Saioa Márquez Piñeiro**  
para optar al grado de Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

**Dr. Mariano Sánchez Crespo**  
**Dra. M<sup>a</sup> Nieves Fernández García**





## AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR/A DE TESIS

(Art. 7.2 de la Normativa para la presentación y defensa de la Tesis Doctoral en la UVa)

**D. Mariano Sánchez Crespo**, con D.N.I. 10777731T, Profesor de Investigación del CSIC en el Instituto de Biología y Genética Molecular, Dirección a efecto de notificaciones Calle Sanz y Fores, 3, 47003 Valladolid, e-mail msces@ibgm.uva.es y **D<sup>a</sup> María Nieves Fernández García**, con D.N.I. 13914426R, Profesora del departamento de Bioquímica y Biología Molecular, y Fisiología en la Facultad de Medicina de la Universidad de Valladolid, como Directores de la Tesis Doctoral titulada **Regulación de la transcripción de citoquinas por la modulación del metabolismo energético y el estrés del retículo endoplasmático en células dendríticas** realizada por **D<sup>a</sup> Saioa Márquez Piñeiro** alumna del Programa de Doctorado en Investigación Biomédica **autorizan** su presentación, considerando que reúne los criterios de calidad científica suficientes para ser defendida públicamente en esta Universidad.

Valladolid,..... de..... de.....

Los Directores de la Tesis,

Fdo.: Mariano Sánchez Crespo

Fdo.: M<sup>a</sup> Nieves Fernández García

SR/SRA. PRESIDENTE/A DE LA COMISIÓN DE DOCTORADO



*A la memoria de amatsu  
y a mis chicos*

*“Necesitamos enseñar a que la duda no sea temida,  
sino bienvenida y debatida.  
No hay problema en decir: ‘No lo sé’”*

Richard Feynman



Había pensado saltarme este apartado, no porque no tenga nada que agradecer, sino porque padezco una extraña aversión a las ñoñerías y además mis dotes prosaicas dejan bastante que desear. Pero, me han comentado que los agradecimientos es lo único que se lee todo el mundo y que queda muy feo no ponerlos, así que he decidido hacer un esfuerzo y ahí van:

- ✓ A L@S que me abrieron la puerta de su laboratorio y no me han dado más que facilidades para que consiga terminar esta tesis
- ✓ A L@S que han compartido poyata y campana y han trabajado mano a mano conmigo
- ✓ A L@S que han tomado “el café”, me han amenizado los días y han pasado ratos de ocio, llamémoslo así, fuera del IBGM
- ✓ A L@S que me han entretenido en los pasillos, también de otras plantas, y durante las comidas
- ✓ A L@S que han coincidido en el laboratorio conmigo y han seguido su camino
- ✓ A L@S que han contribuido realizando algunas de las técnicas
- ✓ A L@S que me han sufrido fuera del laboratorio, sobre todo en casa

**¡¡ MILLONES DE GRACIAS !!**

Esta Tesis no hubiera podido ser sin vosotros.

- ✓ Ah, y una mención de honor para LA que con esta lleva su enésima tesis

Bueno, pues ya está, no ha sido tan difícil, sólo espero no haberme dejado a nadie  
gggg.



# Índice



<b>Abreviaturas</b>	<b>7</b>
<b>Resumen</b>	<b>11</b>
<b>Introducción</b>	<b>15</b>
<b>1. El sistema inmune</b>	<b>17</b>
1.1 Las células dendríticas	20
1.2 Citoquinas implicadas en la polarización de la respuesta inmune	22
• La interleuquina 10	22
• La interleuquina 23	24
• La interleuquina 1 $\beta$	26
<b>2. Reprogramación metabólica en el sistema inmune</b>	<b>26</b>
2.1 La ruta glucolítica	28
• La hexoquinasa	30
• La piruvato quinasa	32
2.2 El factor de transcripción HIF1 $\alpha$	33
<b>3. El estrés de retículo endoplasmático</b>	<b>35</b>
3.1 La respuesta a proteínas mal plegadas	36
• La rama ATF6 $\alpha$	38
• La rama PERK	38
• La rama IRE	39
<b>Objetivos</b>	<b>41</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>45</b>
<b>1. Reactivos</b>	<b>47</b>
<b>2. Cultivos celulares</b>	<b>48</b>
2.1 Obtención de células dendríticas humanas	48
2.2 Obtención de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón	49
<b>3. Análisis de la expresión génica</b>	<b>50</b>
3.1 Extracción del ARN total	50
3.2 Síntesis del ADN complementario	50
3.3 PCR cuantitativa en tiempo real	50
3.4 Análisis del <i>splicing</i> de <i>XBP1</i>	52
3.5 Análisis de las isoformas de la piruvato quinasa	52
3.6 Inmunoprecipitación de la cromatina	52

<b>4. Análisis de proteínas</b>	<b>54</b>
4.1 Obtención de extractos celulares para inmunodetecciones ( <i>Western Blot</i> )	54
• Extractos celulares totales	54
• Extractos nucleares y citosólicos	54
• Electroforesis en condiciones desnaturalizantes, transferencia a membranas de nitrocelulosa e inmunodetección	55
4.2 <i>Cross linking</i> de PKM2	56
4.3 ELISA	57
4.4 Microscopía de fluorescencia confocal de barrido láser	57
<b>5. Estudios bioenergéticos</b>	<b>58</b>
<b>6. Medida de lactato</b>	<b>59</b>
6.1 Medida de lactato extracelular	59
6.2 Medida de lactato intracelular	59
<b>7. Medida de la corriente de Ca<sup>2+</sup> intracelular</b>	<b>60</b>
<b>8. Análisis estadístico</b>	<b>61</b>
<b>Resultados</b>	<b>63</b>
<b>1. Reprogramación metabólica tras la estimulación de las células dendríticas</b>	<b>65</b>
1.1 Análisis del mecanismo implicado en la reprogramación metabólica	67
<b>2. Modulación del metabolismo de la glucosa y regulación transcripcional de la producción de citoquinas en células dendríticas</b>	<b>71</b>
2.1 Efectos de la privación de glucosa	72
• Expresión de citoquinas	72
• Producción de lactato	73
• Efecto del lactato de sodio y de la modulación del flujo de piruvato	75
• Implicación de la respuesta a proteínas mal plegadas: el papel de la rama IRE	77
• El papel de las ramas ATF6 y PERK	85
2.2 Efectos de la regulación de la actividad de la PKM2	90
• Expresión de citoquinas	91
• Producción de lactato	91
• Estudios bioenergéticos	92
• Conformación y actividad quinasa de la PKM2	94

---

<b>Discusión</b>	<b>97</b>
<b>1. Caracterización de la reprogramación metabólica en células dendríticas</b>	<b>99</b>
<b>2. Modulación del metabolismo de la glucosa y regulación transcripcional de la producción de citoquinas en células dendríticas</b>	<b>101</b>
2.1 Efectos de la privación de glucosa	101
• Implicación de la respuesta a proteínas mal plegadas	105
2.2 Efectos de la regulación de la actividad de la PKM2	109
<b>Conclusiones</b>	<b>113</b>
<b>Bibliografía</b>	<b>117</b>
<b>Anexo I</b>	<b>133</b>



# Abreviaturas



<b>ADN:</b> Ácido desoxirribonucleico	<b>EGTA:</b> Ácido etilenebis(oxonitrilo)tetraacético
<b>ADNc:</b> ADN complementario	<b>ERAD:</b> Degradación asociada al retículo endoplasmático
<b>ARN:</b> Ácido ribonucleico	<b>ERSE:</b> Elemento de respuesta a estrés de RE
<b>ARNm:</b> ARN mensajero	<b>eIF2<math>\alpha</math>:</b> Factor iniciador de la traducción eucariótica 2 $\alpha$
<b>Asn:</b> Asparagina	<b>FADH<sub>2</sub>:</b> Flavín adenín dinucleótido
<b>ATF:</b> Factor activador de la transcripción	<b>FBSi:</b> Suero bovino fetal inactivado
<b>BCR:</b> Receptor de linfocitos B	<b>GAPDH:</b> Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
<b>BMDC:</b> Célula dendrítica derivada de médula ósea	<b>GM-CSF:</b> Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
<b>BiP:</b> Proteína de unión a la inmunoglobulina	<b>GSK3<math>\beta</math>:</b> Glicógeno sintasa quinasa 3 $\beta$
<b>BSA:</b> Albúmina sérica bovina	<b>G-6-P:</b> Glucosa-6-fosfato
<b>CBP:</b> Proteína de unión a CREB	<b>HBS:</b> Tampón HEPES salino
<b>CD:</b> Célula dendrítica	<b>HEPES:</b> Ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-etansulfónico
<b>C/EBP:</b> CCAAT/ <i>enhancer-binding protein</i>	<b>HIF:</b> Factor inducible por hipoxia
<b>CHOP/DDIT3:</b> <i>DNA damage-inducible transcript 3</i>	<b>HK:</b> Hexoquinasa
<b>COX2:</b> Ciclooxygenasa 2	<b>HRE:</b> Elemento de respuesta a hipoxia
<b>CPA:</b> Célula presentadora de antígeno	<b>IFN:</b> Interferón
<b>CRTC/TORC:</b> <i>cAMP regulated transcriptional transducers of regulated CREB activity</i>	<b>IKK:</b> Quinasa de I $\kappa$ B
<b>CREB:</b> <i>cyclic AMP response element-binding protein</i>	<b>IL:</b> Interleuquina
<b>Ct:</b> Ciclo umbral	<b>IRE:</b> Enzima que requiere inositol
<b>DAMP:</b> Patrón molecular asociado a daño	<b>IRF3:</b> <i>IFN regulatory factor 3</i>
<b>DAPI:</b> 4',6-diamidin-2-fenilindol dihidroclorhídrico	<b>JAK:</b> <i>Janus kinase</i>
<b>DCA:</b> Dicloroacetato	<b>kDa:</b> KiloDalton
<b>DEPC:</b> Dietil-pirocarbonato	<b>LDH:</b> Lactato deshidrogenasa
<b>DSS:</b> Disuccinimidil suberato	<b>LPS:</b> Lipopolisacárido bacteriano
<b>DTT:</b> Ditiotreitól	<b>MAPK:</b> <i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<b>dNTP:</b> Desoxinucleótido trifosfato	<b>MCT:</b> Transportador de ácidos monocarboxílicos
<b>ECAR:</b> Tasa de acidificación extracelular	<b>MHC:</b> Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>EDTA:</b> Ácido etilendiaminotetraacético	<b>MPC:</b> Transportador mitocondrial de piruvato
<b>EEM:</b> Error estándar de la media	

**MSK1:** *Mitogen and stress activated protein kinase-1*

**NAD:** Nicotin adenin dinucleótido

**NF- $\kappa$ B:** *Nuclear factor  $\kappa$ -light-chain-enhancer of activated B cells*

**NK:** Célula *Natural Killer*

**NLRP3:** *NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3*

**OCR:** Tasa de consumo de oxígeno

**OXPPOS:** Fosforilación oxidativa

**PAMP:** Patrón molecular asociado a patógeno

**PBS:** Tampón fosfato salino

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PDH:** Piruvato deshidrogenasa

**PDK:** Piruvato deshidrogenasa quinasa

**PHD:** Prolil-hidroxilasa

**PERK:** *Protein kinase RNA-like endoplasmatic reticulum kinase*

**PK:** Protein quinasa

**PKM:** Piruvato quinasa

**PPP:** Ruta de las pentosas fosfato

**PRR:** Receptor de reconocimiento de patrones

**pb:** Pares de bases

**qPCR:** PCR cuantitativa en tiempo real

**RE:** Retículo endoplasmático

**RIDD:** Decaimiento regulado dependiente de IRE1

**RIP:** Proteólisis intra-membrana regulada

**RPMI:** Medio *Roswell Park Memorial Institute*

**TCA:** Ciclo de los ácidos tricarboxílicos

**TCR:** Receptor de linfocitos T

**Th:** Linfocito T colaborador

**TLR:** Receptor tipo *Toll*

**TRIF:** *Domain-containing adaptor-inducing interferon  $\beta$*

**TRAF2:** *TNF receptor-associated factor 2*

**UPR:** Respuesta a proteínas mal plegadas

**SERCA:** ATPasa de calcio del retículo endoplasmático

**STAT:** *Signal transducer and activator of transcription*

**sXBP1:** Proteína de unión a Caja-X

**2-DG:** 2-desoxi-D-glucosa

# Resumen



Las células dendríticas (CD) responden a señales procedentes del micro-entorno y desarrollan funciones fundamentales para la defensa del individuo y la homeostasis de los tejidos, pero que pueden ser nocivas si no se controlan adecuadamente. Sus funciones efectoras están íntimamente ligadas a cambios en el metabolismo celular por lo que la estimulación de las CD por patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) conduce a una reprogramación metabólica cuya característica más significativa es el aumento de la glucólisis aerobia que se refleja en la acumulación de lactato y la acidificación extracelular.

En consonancia con estos cambios, la modulación farmacológica de la glucólisis influye sobre el patrón transcripcional de manera dependiente del estímulo. Las investigaciones realizadas hasta la fecha han correlacionado los cambios en la expresión de citoquinas con las variaciones en los flujos de lactato, pero no se ha podido explicar suficientemente la magnitud de los cambios transcripcionales producidos lo que deja abierta la vía a nuevas investigaciones.

La inhibición de la hexoquinasa (HK) con 2-desoxi-D-glucosa (2-DG) aumenta la transcripción del gen *IL23A* en respuesta al patrón fúngico *zymosan* y al lipopolisacárido bacteriano (LPS), y de forma paralela disminuye la transcripción del gen *IL10* en respuesta al LPS. Además de reducir los niveles de lactato, la 2-DG activa la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) asociada al estrés de retículo endoplasmático. La forma en la que las distintas ramas de la UPR influyen en la transactivación de *IL23A* es estímulo-dependiente: La rama IRE1 $\alpha$ /sXBP1 está implicada en respuesta al *zymosan*, y la rama PERK y el factor de transcripción C/EBP $\beta$  en el caso del LPS. Asimismo, la disminución de la transcripción de *IL10* observada en presencia de 2-DG en respuesta al LPS depende de la activación de PERK.

La modulación de la actividad de la piruvato quinasa (PKM2) con el compuesto ML-265 disminuye la transcripción de las citoquinas IL-23, IL-10 e IL-1 $\beta$  en respuesta al *zymosan*. Dado que no hemos podido caracterizar un patrón metabólico inducido por el ML-265, estos efectos pueden explicarse por la interferencia del ML-265 con la actividad proteínica quinasa asociada a la PKM2.



# Introducción



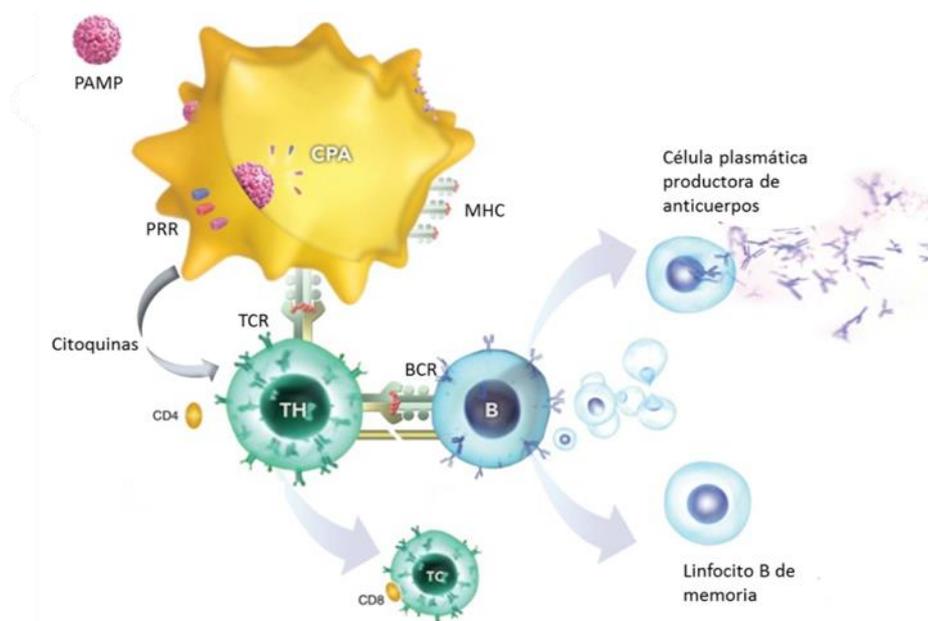
## 1. El sistema inmune

La función principal del sistema inmune es el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos y la integridad del organismo. Para ello posee una serie de elementos humorales y celulares que intervienen en procesos fisiológicos fundamentales como el desarrollo, la reproducción y la reparación de los tejidos, y que además son los encargados de la defensa del organismo frente a diversos agentes (Sattler, 2017).

La respuesta defensiva depende de la capacidad que tienen las células del sistema inmune para diferenciar “lo infeccioso no propio de lo propio no infeccioso” (Janeway, 1992). En los mamíferos se distinguen dos modalidades de esta respuesta: la respuesta innata y la respuesta adaptativa, aunque ambas están estrechamente relacionadas. La respuesta inmune adaptativa incluye elementos humorales, como los anticuerpos, y se organiza alrededor de dos clases de células especializadas, los linfocitos T y los linfocitos B, que exhiben un amplio repertorio de receptores, TCR (receptor de linfocitos T) y BCR (receptor de linfocitos B), cuya especificidad depende de reordenamientos génicos que permiten un reconocimiento específico del antígeno y la eliminación selectiva del patógeno, además de permitir la construcción de una memoria inmunológica que protege de posibles reinfecciones.

Por el contrario, la inmunidad innata proporciona una respuesta más inmediata y no específica, que constituye la primera línea de defensa del huésped. Está formada también por elementos celulares (células epiteliales, monocitos, células dendríticas, macrófagos, neutrófilos y células *Natural Killer* [NK]) y sistemas de activación humorales como los sistemas del complemento, de la coagulación y de la fibrinólisis. El componente celular está mayoritariamente compuesto por células fagocitarias y presentadoras de antígenos (CPA). Las CPA, en especial las células dendríticas y los macrófagos, tienen un papel fundamental en la conexión entre la inmunidad innata y la adaptativa, ya que son las responsables de procesar y presentar antígenos a los linfocitos T en el contexto del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (Figura 1). En consecuencia, la inmunidad innata tiene la función de iniciar, estimular y polarizar la respuesta inmune adaptativa con objeto de eliminar el patógeno y minimizar los daños causados al huésped (Medzhitov, 2007). Para ello, las células fagocíticas, poseen receptores de reconocimiento de patrones (PRR) que

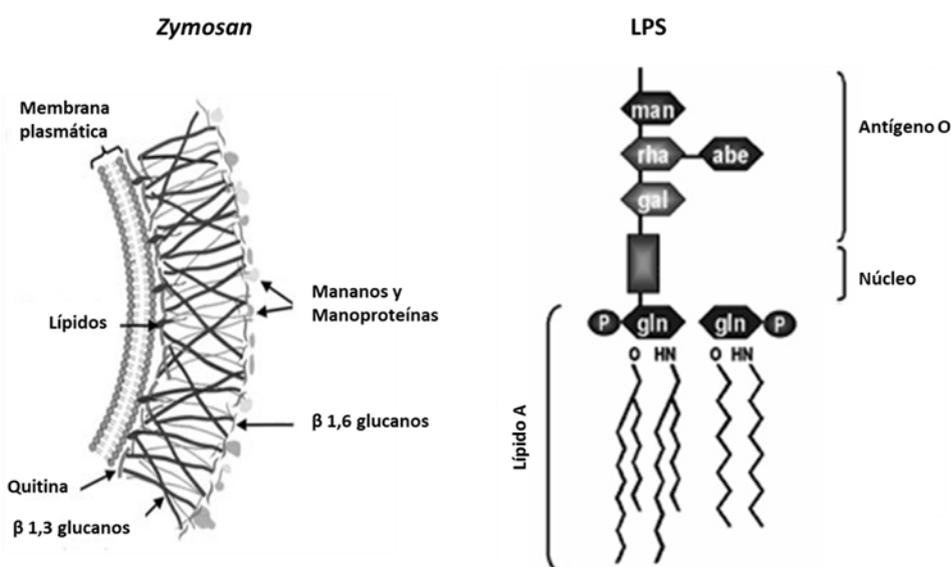
interaccionan con los patrones moleculares asociados a patógenos expresados en los microorganismos (Janeway, 1989) y con señales endógenas asociadas al daño tisular (DAMP) (Matzinger, 1994). Estas moléculas activan distintas vías de señalización intracelular que conducen a la liberación de citoquinas, quemoquinas, y otros mediadores, que promueven la eliminación del patógeno y la activación y polarización de la respuesta inmune adaptativa.



**Figura 1. Interconexión entre la inmunidad innata y la adaptativa.** Las células presentadoras de antígenos tienen la capacidad de detectar y reconocer diferentes patógenos a través de sus receptores de reconocimiento de patrones. Los PRR captan el antígeno para iniciar su procesamiento en pequeños péptidos que unen a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II expresadas en su superficie. La respuesta inmune adaptativa comienza con el reconocimiento del antígeno por los receptores específicos de membrana de las células T. El linfocito T se activa tras reconocer el antígeno procesado asociado con las moléculas MHC de clase II en la superficie de la CPA con dos consecuencias: la activación de los linfocitos B por su receptor y su propia diferenciación que dependerá del patrón de citoquinas secretado por la CPA. Figura adaptada de Cambronero *et al.*, 2017.

Los microorganismos presentan gran cantidad de patrones moleculares asociados a patógenos que son estructuras muy diversas altamente conservadas a lo largo de la evolución. Ejemplo de ellos son el lipopolisacárido bacteriano y el *zymosan*. El LPS presente en la membrana exterior de las bacterias Gram negativas, está formado por dos dominios hidrofílicos y un dominio hidrofóbico. Los dominios hidrofílicos son el núcleo central, que se compone de motivos repetidos de polisacáridos, y el antígeno O, que es un glucano que se expone al exterior. El dominio hidrofóbico, denominado lípido A, se compone de seis cadenas de ácidos grasos que lo anclan a la membrana y

es el componente biológicamente activo del LPS. El *zymosan* es una preparación insoluble y particulada de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* que se utiliza desde hace más de 50 años como arquetipo de estímulo fagocítico e inflamatorio. Se compone de  $\beta(1-3)$  y  $\beta(1-6)$  glucanos,  $\alpha$ -mananos, quitinas, proteínas y lípidos (Figura 2).



**Figura 2. Composición del *zymosan* y del lipopolisacárido bacteriano.** El *zymosan* está compuesto por un 73% de polisacáridos (de fuera hacia adentro  $\alpha$ -mananos,  $\beta$ -glucanos y quitina), un 15% de proteínas frecuentemente manosiladas y un 7% de lípidos que permanecen en el interior como resto de la membrana plasmática (Fitzpatrick y DiCarlo, 1964). El LPS está compuesto por un polisacárido que se expone al exterior (Antígeno O), el oligosacárido nuclear y el Lípido A que contiene fosfoglucoilmiristamida y ácidos grasos que lo anclan a la membrana.

En la denominada sinapsis fagocítica, varios componentes de la pared celular interaccionan con distintos PRR, inician el proceso fagocitario y el material englobado se degrada en los fagolisosomas. Ello permite la liberación de nuevos PAMP (ADN o ARN), que a su vez pueden activar PRR intracelulares. La integración de las señales de diferentes PRR durante la fagocitosis induce la liberación de citoquinas y mediadores lipídicos y la regulación de genes implicados en la respuesta inmune (Blander y Sander, 2012). De los PRR expresados en las células dendríticas, el LPS es reconocido por el receptor tipo *Toll* 4 (TLR4) (Lu, Yeh y Ohashi, 2008), mientras que los encargados del reconocimiento de los patrones fúngicos son, principalmente, los receptores lectina tipo C, Dectin-1 que reconoce el componente  $\beta$ -glucano, y Dectin-2

y TLR2 que reconocen el componente constituido por las manosas de la pared (Brown *et al.*, 2003; Gantner *et al.*, 2003; Dillon *et al.*, 2006).

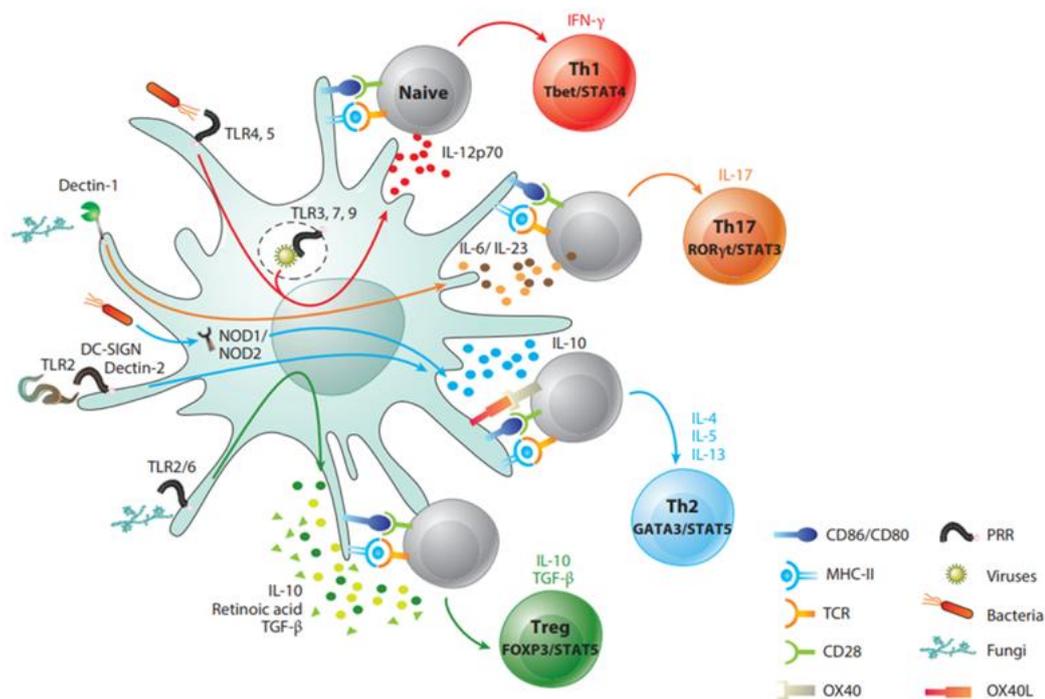
### **1.1 Las células dendríticas**

Las células dendríticas se identificaron en 1973 por Steinman y Cohn, por su morfología característica con pseudópodos de gran envergadura que las distinguía de los macrófagos (Steinman y Cohn, 1973). Las CD se encuentran en los órganos linfoides secundarios, en la mayoría de los tejidos periféricos y también en órganos no linfoides, como la piel, los músculos, los pulmones, los riñones, los intestinos o el hígado. Por ser células presentadoras de antígeno están equipadas con la maquinaria para capturar y procesar antígenos, presentarlos a los linfocitos T y proporcionar señales co-estimuladoras (moléculas de membrana y citoquinas) que polarizan la respuesta inmunitaria (Steinman, 1991).

Las CD son una población heterogénea compuesta de varios subconjuntos distintos: CD convencionales (cDC), células de Langerhans, células dendríticas plasmocitoides (pDC) y células dendríticas derivadas de monocitos (moDC). Estos grupos se separaron inicialmente de acuerdo con su fenotipo de superficie, pero se ha demostrado que los subconjuntos de CD se pueden distinguir aún más por su ontogenia y firma transcriptómica (Merad *et al.*, 2013). Cuando se produce una infección, aparecen en el foco inflamatorio las denominadas células dendríticas inflamatorias, que se producen a partir de la diferenciación de los monocitos reclutados al foco inflamatorio (León, López-Bravo y Ardavín, 2007). Estas células dendríticas inflamatorias aparecen en respuesta a patógenos (Domínguez y Ardavín, 2010) y en enfermedades de base inflamatoria como el asma (Hammad *et al.*, 2010) o la artritis reumatoide (Campbell *et al.*, 2011). La firma genética de las células dendríticas inflamatorias es similar a la de las células dendríticas derivadas de monocitos generadas *in vitro* (moDC), por lo que éstas serían sus homólogos (Segura *et al.*, 2013). El proceso de diferenciación de monocitos a células dendríticas se controla por citoquinas que actúan como factores de crecimiento y diferenciación por lo que en presencia del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleuquina-4 (IL-4) se pueden generar moDC *in vitro*. Estas células poseen la capacidad de capturar y procesar antígenos, y presentan en su superficie

altos niveles de MHC, CD1, Fc $\gamma$ RII, CD40, complejo B7 (CD80/CD86), CD44, ICAM-1 y CD11c y escasa expresión de CD14 (Sallusto y Lanzavecchia, 1994).

Cuando entran en contacto con el patógeno, las CD se someten a un programa de cambios fenotípicos y moleculares denominado "maduración". El proceso de maduración produce la disminución de la capacidad fagocitaria, la translocación a la membrana plasmática de moléculas MHC de clase II, la secreción de citoquinas y la migración hacia los ganglios linfáticos (Banchereau *et al.*, 2000). La presentación de los péptidos antigénicos en el MHC II a los linfocitos T vírgenes o *naive* junto con el patrón de citoquinas liberado por la CD, en función del patógeno detectado, polarizan la respuesta inmune adaptativa pudiendo diferenciar los linfocitos T colaboradores (Th) a linfocitos Th1 (León, López-Bravo y Ardavín, 2007; Nakano *et al.*, 2009), linfocitos Th2 (Kool *et al.*, 2008; Hammad *et al.*, 2010), linfocitos Th17 (Segura *et al.*, 2013) o linfocitos Treg (Figura 3).



**Figura 3. Polarización de la respuesta inmune adaptativa.** La activación de las células dendríticas a través de la mayoría de los TLR induce una robusta producción de IL-12p70 y la inducción de respuestas Th1. En contraste, algunos ligandos de TLR2 inducen escasa producción de IL-12p70 y abundante IL-10 por lo que inclinan el equilibrio hacia las respuestas Th2 o Treg. La señalización a través de Dectin-1 induce la producción de IL-23 que se asocia con la inducción de una respuesta de tipo Th17. Figura tomada de Pulendran, 2015.

## 1.2 Citoquinas implicadas en la polarización de la respuesta inmune

Las citoquinas son pequeñas proteínas secretadas por las células del sistema inmunitario que se unen a receptores de membrana de las células diana y desencadenan cambios en la expresión génica y en el fenotipo que determinan las características de la respuesta inmune (Blanco *et al.*, 2008). Las citoquinas se pueden clasificar por sus propiedades estructurales o funcionales. Se ha descrito que la estimulación del TLR2 y de los receptores de lectina tipo C con *zymosan* induce una fuerte producción de IL-23 e IL-10, mientras que estas citoquinas se producen en menor medida tras la estimulación del TLR4 por LPS (Gerosa *et al.*, 2008; Dennehy *et al.*, 2009). Asimismo, los glucanos favorecen la producción de IL-1 $\beta$  (Kankkunen *et al.*, 2010).

- **La interleuquina 10**

La interleuquina 10 es un modulador negativo de la respuesta inmune. Su importancia en el control de la respuesta inflamatoria se descubrió tras observarse que ratones deficientes en IL-10 sufrían colitis no remitente en respuesta a la microbiota intestinal (Kühn *et al.*, 1993). La IL-10 puede regular directamente la inmunidad innata y adaptativa a través de varios mecanismos, entre los que se incluyen: la limitación de la activación y diferenciación de las células T en los ganglios linfáticos, la supresión de la respuesta pro-inflamatoria en los tejidos, el control de la eliminación de patógenos y la reducción del daño tisular (Couper, Blount y Riley, 2008). La IL-10 se produce por numerosos tipos celulares del sistema inmune, entre los que se incluyen las células dendríticas, los macrófagos y los linfocitos T y B. Entre sus efectos, típicamente anti-inflamatorios, se destaca su capacidad para reprimir la producción de citoquinas pro-inflamatorias por las células del sistema inmune bloqueando la respuesta Th1 (Fiorentino, Bond y Mosmann, 1989) y promoviendo una respuesta Th2 o Treg.

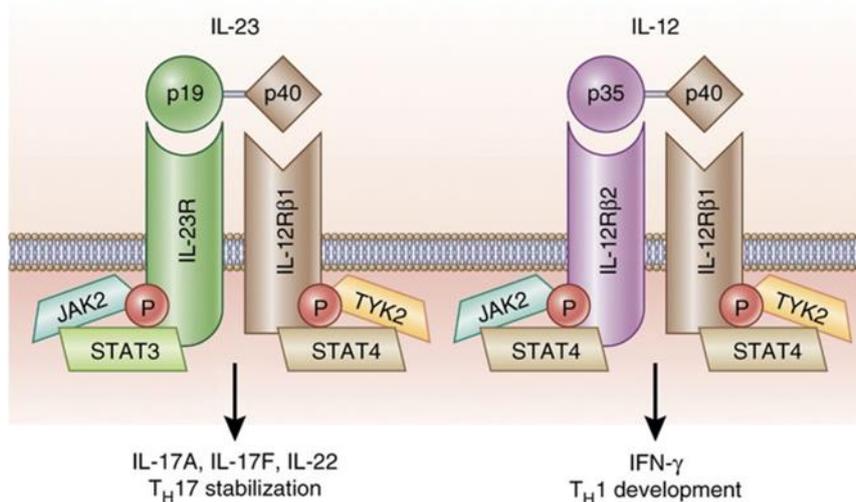
El estudio de la regulación de la producción de IL-10 se ha centrado en el análisis de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales. El papel de la regulación post-transcripcional se ha destacado porque el ARNm de la IL-10 contiene un alto número de elementos ricos en AU en la zona 3'-UTR (*3'-untranslated region*) que pueden unir la proteína desestabilizadora tristetraprolina, implicada en la

degradación del ARNm (Powell *et al.*, 2000; Stoecklin *et al.*, 2008). En cuanto a los mecanismos transcripcionales, actualmente se acepta el papel central del factor de transcripción CREB y sus co-activadores (Alvarez *et al.*, 2009; Kelly, Wang e Ivashkiv, 2010; Mellett *et al.*, 2011). La actividad de CREB depende de sus co-activadores CBP y CRTC/TORC2 y puede regularse por varias quinasas incluyendo la glicógeno sintasa quinasa 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ). Esta serina-treonina quinasa regula negativamente la actividad de CREB al disminuir su capacidad de unión al ADN (Grimes y Jope, 2001). La actividad de GSK3 $\beta$  se relaciona también con la retención de CRTC/TORC en el citoplasma de las células al favorecer la actividad de quinasas activadas por AMP como SIK2 (Kato *et al.*, 2006). En consecuencia, la inhibición de GSK3 $\beta$  favorece la unión de CREB al sitio CRE presente en el promotor de *IL10*, el reclutamiento de CBP y la translocación de CRTC/TORC2 al núcleo para la formación del complejo nuclear P-CREB/TORC2/CBP que es necesario para la trans-activación de *IL10* (Alvarez *et al.*, 2009). En el caso del LPS se ha descrito también la participación de STAT3 y un ciclo autocrino dependiente de interferón  $\beta$  (IFN- $\beta$ ) e IRF3 (*IFN regulatory factor 3*) (Chang *et al.*, 2007) mientras que en respuesta al *zymosan* la activación por fosforilación de STAT3 depende de otros mediadores secundarios y no se relacionaría con la producción de IL-10 (Rodríguez *et al.*, 2017).

El estudio de los mecanismos de regulación de la transcripción de *IL10* puede tener importancia clínica porque el descontrol de la producción de IL-10 es una estrategia utilizada por algunos microorganismos patógenos, como los hongos, para evadir el sistema inmune. Actualmente se está produciendo un aumento de la incidencia de micosis invasivas como consecuencia del extendido uso de antibióticos, el elevado número de pacientes inmunosuprimidos y la aplicación de técnicas de diagnóstico intervencionistas. El hongo que más frecuentemente se aísla en los pacientes es *Candida*, aunque *Aspergillus*, *Cryptococcus* y *Pneumocystis*, son también patógenos oportunistas de relevancia en pacientes inmunodeprimidos. La candidiasis es una de las principales causas de las infecciones sistémicas adquiridas en el hospital y, a pesar de la terapia anti fúngica, al menos el 30% de los individuos afectados fallecen por esta causa (Horn *et al.*, 2009).

- **La interleuquina 23**

La IL-23 es una citoquina pro-inflamatoria que favorece la proliferación y diferenciación de células Th17. Forma parte de la familia de citoquinas de IL-12 como la IL-12p70, con la que comparte la subunidad p40 (codificada por el gen *IL12B*). La dimerización de p40 con una subunidad de 19 kDa (gen *IL23A*) da lugar a la IL-23. Al igual que la sub-unidad específica de la IL-12 p70, p35 (gen *IL12A*), p19 no se secreta si no está asociada a la cadena p40 (Oppmann *et al.*, 2000). La modulación de la transcripción de las subunidades específicas (p35 y p19) es el principal mecanismo de regulación del balance entre IL-12p70 e IL-23 y es de suma importancia en la polarización de la respuesta inmune a los tipos Th1 y Th17 (Figura 4).



**Figura 4. Esquema de la estructura de IL-23 e IL-12p70, receptores y vías de señalización.** La IL-12 se compone de las subunidades IL-12/23p40 e IL-12p35. La IL-23 incluye IL-23p19 e IL-12/23p40. La IL-12 señala a través de las subunidades IL-12Rβ1 e IL-12Rβ2 y la IL-23 a través de las subunidades IL-12Rβ1 e IL-23R. La estimulación de los receptores de IL-12 conduce a la fosforilación de STAT4 a través de la actividad de las quinasas JAK2 y TYK2. La IL-23 también activa la vía JAK-STAT pero actúa principalmente sobre STAT3. La IL-12 induce la producción de IFN-γ, que se requiere para el desarrollo de la respuesta inmune Th1 mientras que IL-23 induce IL-17A, IL-17F y/o IL-22 y estabiliza las células Th17. Figura tomada de Teng *et al.*, 2015.

El estudio de los factores de transcripción implicados en la regulación transcripcional de *IL23A* ha demostrado que el *zymosan* aumenta la unión del miembro de la familia NF-κB, c-Rel al promotor de *IL23A* junto a la quinasa MSK1 y al co-activador CBP. Esto permite la fosforilación temprana de la serina 10 de la histona H3, lo que genera condiciones óptimas para la activación de la transcripción. Por el contrario, el LPS

tiene un efecto más débil sobre la unión de c-Rel al promotor de *IL23A* y produce su unión al promotor de *IL12A*. Estas diferencias en la intensidad de ocupación de los promotores por c-Rel explican la especificidad de la respuesta a los distintos estímulos, de forma que el LPS produce principalmente IL-12p70 y el *zymosan* IL-23 (Alvarez *et al.*, 2012). Además de la implicación de c-Rel, la activación de la transcripción de *IL23A* con *zymosan* requiere la participación de otros factores como ATF2, que se regula mediante dos fosforilaciones complementarias que dependen de las proteínas quinasas C y A (PKC y PKA). La cascada Ras/Raf/MEK/ERK fosforila la treonina 71 y la MAPK p38 fosforila la treonina 69 (Rodríguez *et al.*, 2014). En experimentos en células murinas estimuladas con LPS, se ha descrito el reclutamiento de otros factores de transcripción al promotor de *Il23a* como CREB y C/EBP (Kocieda *et al.*, 2012), XBP1 (Wang *et al.*, 2013) o CHOP/DDIT3 (Goodall *et al.*, 2010). La posible implicación XBP1 y CHOP tiene especial interés ya que son factores de transcripción que participan en la respuesta a proteínas mal plegadas que se produce en condiciones que implican estrés de retículo endoplasmático.

La hiperactivación de linfocitos T con fenotipo Th17 es un factor patogénico de varias enfermedades autoinmunes (McGeachy y Cua, 2007), entre las que se incluyen la esclerosis múltiple (Cua *et al.*, 2003), la psoriasis (Lee *et al.*, 2004) y la artritis reumatoide (Singh, Aggarwal y Misra, 2007). La inhibición de citoquinas con anticuerpos monoclonales se ha convertido en una buena terapia para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, lo que explica el desarrollo de tratamientos con los anticuerpos humanizados frente a IL-12 p40, ustekinumab y briakinumab, aprobados para el tratamiento de la psoriasis y de la artritis psoriásica (Teng *et al.*, 2015) y que se estén llevando a cabo numerosos ensayos clínicos con anticuerpos frente a la cadena p19, como el LY2525623, para el tratamiento general de otras enfermedades autoinmunes. Dado que la susceptibilidad genética a la enfermedad muchas veces no está directamente asociada con las citoquinas o sus receptores sino con elementos claves en las rutas de señalización, incidir directamente en el mecanismo patogénico efector podría ser más beneficioso (Liu *et al.*, 2013). Del mismo modo, conocer estas cascadas de señalización puede ser importante para potenciar la producción de IL-23 en los casos en que la respuesta Th 17 sea deficiente, como ocurre en algunos procesos cancerosos (Zou y Restifo, 2010) e infecciones fúngicas como las producidas por *Candida albicans*. Además, algunos autores relacionan el fenotipo Th17 con el

crecimiento tumoral (Grivennikov *et al.*, 2012) aunque es un tema controvertido ya que también se ha descrito que los linfocitos Th17 pueden potenciar una respuesta antitumoral (Martin-Orozco *et al.*, 2009). Estos datos justifican la relevancia clínica del estudio de los mecanismos de regulación de la producción de IL-23.

- **La interleuquina 1 $\beta$**

De forma opuesta a la IL-10, y al igual que la IL-12 p70 y la IL-23, la interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) es una citoquina pro-inflamatoria producida predominantemente por monocitos y macrófagos que se ha relacionado con la polarización de los linfocitos al tipo Th17 en el micro-entorno tumoral (Kryczek *et al.*, 2009). Esta citoquina es una diana para el tratamiento de enfermedades inflamatorias con anticuerpos como el canakinumab (anti-IL-1 $\beta$ ) y el receptor soluble anakinra. La IL-1 $\beta$  se produce en forma de precursor inactivo (pro-IL-1 $\beta$ ) que debe sufrir un procesamiento enzimático para producir la proteína activa. Este proceso está regulado por unas plataformas proteicas denominadas inflamasomas. Las caspasas intracelulares son unas de las principales enzimas encargadas de este procesamiento. En respuesta a distintas señales, los inflamasomas se ensamblan mediante interacciones proteína/proteína y la formación del complejo desencadena la activación de las caspasas. El estrés de retículo también se ha relacionado con la producción de la IL-1 $\beta$  a través de la activación del inflamasoma NLRP3 en la aterosclerosis (Hoseini *et al.*, 2018), o por la activación de TRIF y la caspasa-8 en macrófagos estimulados con LPS (Shenderov *et al.*, 2014).

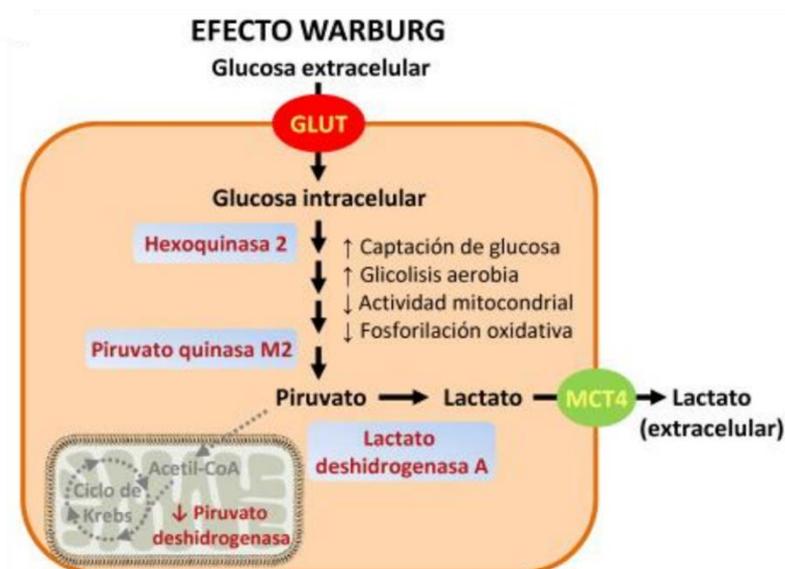
## **2. Reprogramación metabólica en el sistema inmune**

La conexión entre el metabolismo y las funciones de las células del sistema inmune se describió a principios de los años 60 al observarse que el bloqueo de rutas metabólicas utilizadas para obtener energía generaba cambios en las funciones de las células inmunitarias (Oren *et al.*, 1963). En los últimos años, el papel fundamental del metabolismo energético en la determinación de la función de las células inmunitarias ha alcanzado gran relevancia, lo que ha conducido a la definición del "Inmunometabolismo" como un nuevo campo de investigación (Pearce y Pearce,

2013). El metabolismo celular se considera actualmente un elemento fundamental de la respuesta inmune que puede conducir al desarrollo de pequeñas moléculas que por su participación en distintas rutas metabólicas pueden tener aplicaciones terapéuticas (O'Neill, Kishton y Rathmell, 2016).

Las rutas metabólicas cumplen generalmente tres funciones principales: i) generación de energía, ii) producción de “bloques de construcción” necesarios para el mantenimiento y la proliferación celular, y iii) modulación de la respuesta celular. Tras la activación por los PAMP, las células inmunes aumentan notablemente su demanda de nutrientes para iniciar una respuesta inmune efectiva. El tipo y el destino de los nutrientes utilizados por las células inmunitarias son muy diferentes y dependen de los requisitos funcionales de la célula. Por ejemplo, la presentación de antígenos por las células mieloides precisa la producción de lípidos y ácidos nucleicos obtenidos a través de la reutilización de intermediarios de las rutas metabólicas (O'Neill y Pearce, 2016). Además, algunos metabolitos funcionan como moléculas de señalización durante la estimulación celular (Haas *et al.*, 2016).

La reprogramación metabólica de las células dendríticas y los macrófagos se ha estudiado detalladamente en respuesta al LPS. En este caso se produce un cambio caracterizado por la caída de la fosforilación oxidativa (OXPHOS) y el aumento de la producción de lactato a partir del piruvato generado en la glucólisis, a pesar de la presencia de oxígeno en cantidad suficiente (Kelly y O'Neill, 2015). Este cambio es similar a la firma metabólica descrita en las células tumorales denominada efecto Warburg (Warburg, 1956) (Figura 5). Estas observaciones han permitido elaborar la hipótesis de que el efecto Warburg es una característica general de las células mieloides activadas en la respuesta inmune innata. Sin embargo, pruebas recientes sugieren una reprogramación metabólica mucho más compleja, con la activación de diferentes vías metabólicas en las células mieloides en función del tipo de estímulo y del contexto inmunológico (Lachmandas *et al.*, 2016).

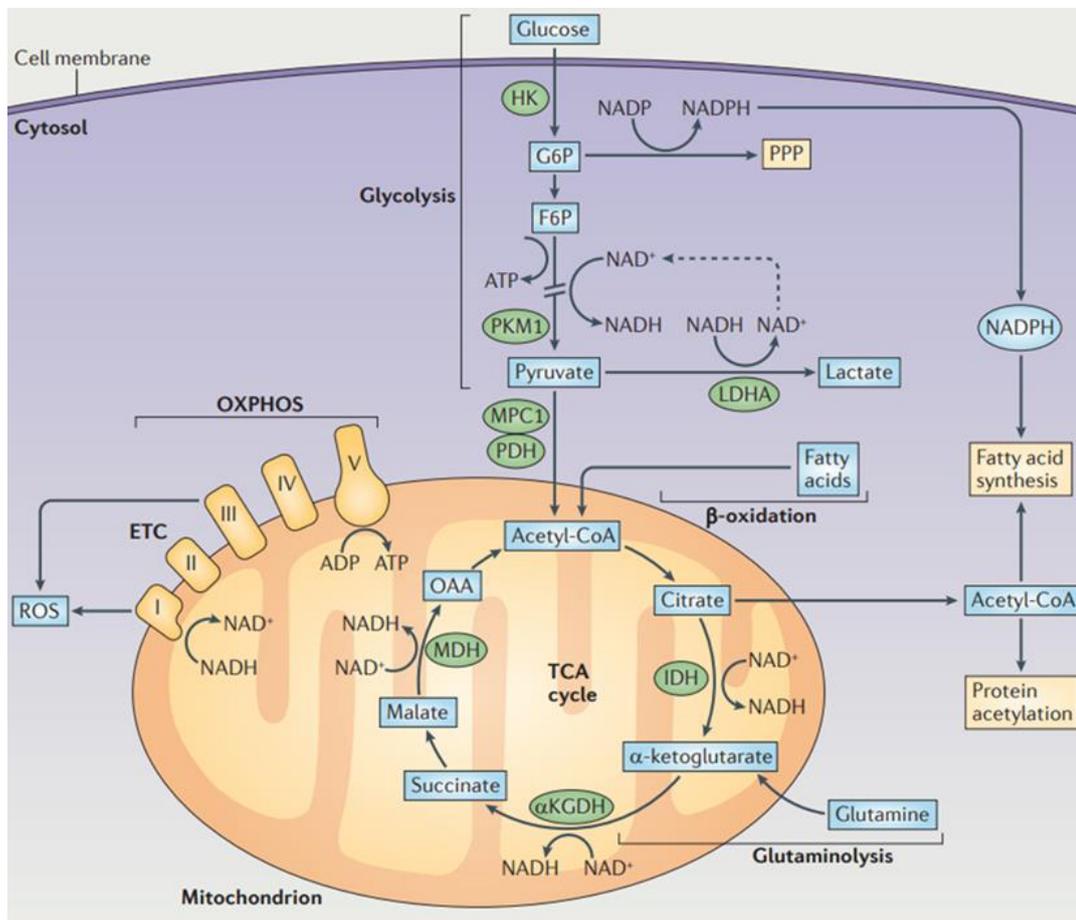


**Figura 5. Efecto Warburg.** En las células diferenciadas, en reposo, la glucosa se metaboliza a piruvato. Parte del piruvato se convierte en lactato, pero la mayoría se utiliza en el ciclo de Krebs tras su conversión en acetil-CoA. El ciclo de Krebs genera NADH y FADH<sub>2</sub>, que donan electrones a la cadena mitocondrial de transporte de electrones para que la fosforilación oxidativa pueda progresar, rindiendo hasta 36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. En células altamente proliferativas o tumorales, el perfil metabólico cambia de la OXPHOS a la glucólisis aerobia para la obtención de ATP, donde la mayoría del piruvato se utiliza para la producción de lactato, incluso en presencia de oxígeno, rindiendo sólo 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa. A cambio de este menor rendimiento energético, la acumulación de intermediarios glucolíticos proporciona los sustratos necesarios para la biosíntesis de otras moléculas, por ejemplo ribosa-5-P para la síntesis de nucleótidos a través de la ruta de las pentosas fosfato. Figura adaptada de Martínez-Costa, 2015.

## 2.1 La ruta glucolítica

La naturaleza del estímulo tiene un efecto importante sobre la reprogramación metabólica de las células mieloides. Esto se explica por la diversidad de patrones presentes en los distintos microorganismos y el reclutamiento selectivo de rutas de señalización específicas. No obstante, el aumento del flujo glucolítico en células dendríticas tras su estimulación es una constante (Kelly y O'Neill, 2015). La glucólisis comienza con la captación de glucosa y su procesamiento en el citosol hasta la formación de piruvato. La vía glucolítica es relativamente ineficaz desde el punto de vista energético, puesto que produce dos moléculas de ATP por cada glucosa incorporada. Sin embargo, es beneficiosa para las células ya que en ella se produce la reducción de NAD<sup>+</sup> a NADH y pueden desviarse numerosos intermediarios metabólicos a rutas anabólicas, tales como la síntesis de ácidos grasos, de aminoácidos y de nucleótidos. El piruvato tiene dos destinos principales: la

conversión en lactato en una reacción catalizada por la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) o, alternativamente, entrar en la mitocondria a través del transportador de piruvato mitocondrial 1 (MPC1) para su conversión en acetil-CoA por el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) (Figura 6).



**Figura 6. Principales rutas metabólicas en células dendríticas.** La vía de la glucólisis permite la importación de glucosa y su conversión a piruvato en el citosol. El piruvato tiene dos posibles destinos. El primero es la conversión en lactato por la LDH, que produce NAD<sup>+</sup> que puede reutilizarse para la producción de ATP en la glucólisis (flecha punteada). Alternativamente, el piruvato entra en la mitocondria a través del transportador MPC1, donde el complejo piruvato deshidrogenasa lo convierte en acetil-CoA. En la mitocondria, el acetil-CoA se incorpora al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y conduce a la producción de NADH y FADH<sub>2</sub>, que sirven como sustratos para la cadena de transporte de electrones (ETC), y por lo tanto mantienen la fosforilación oxidativa y la producción de ATP. Las células inmunes utilizan, además, tres vías adicionales para satisfacer sus demandas metabólicas y funcionales: la ruta de las pentosas fosfato (PPP), la glutaminólisis y la oxidación de ácidos grasos. La G-6-P es el punto de entrada para la PPP, que genera ribosas para la síntesis de nucleótidos. Durante la glutaminólisis, la glutamina se metaboliza a glutamato y posteriormente a α-cetoglutarato, que puede incorporarse al TCA. El destino de la glutamina depende del estado de activación de la célula inmune. Puede oxidarse completamente para generar ATP o usarse "in reverse" para reponer los intermedios metabólicos del TCA, puesto que el citrato en estas células se exporta de la mitocondria para generar acetil-CoA en el compartimento citoplasma/núcleo que se utiliza en reacciones biosintéticas. La β-oxidación de los ácidos grasos produce acetil-CoA, que ingresa en el TCA para generar ATP. Figura tomada de Pearce y Everts, 2015.

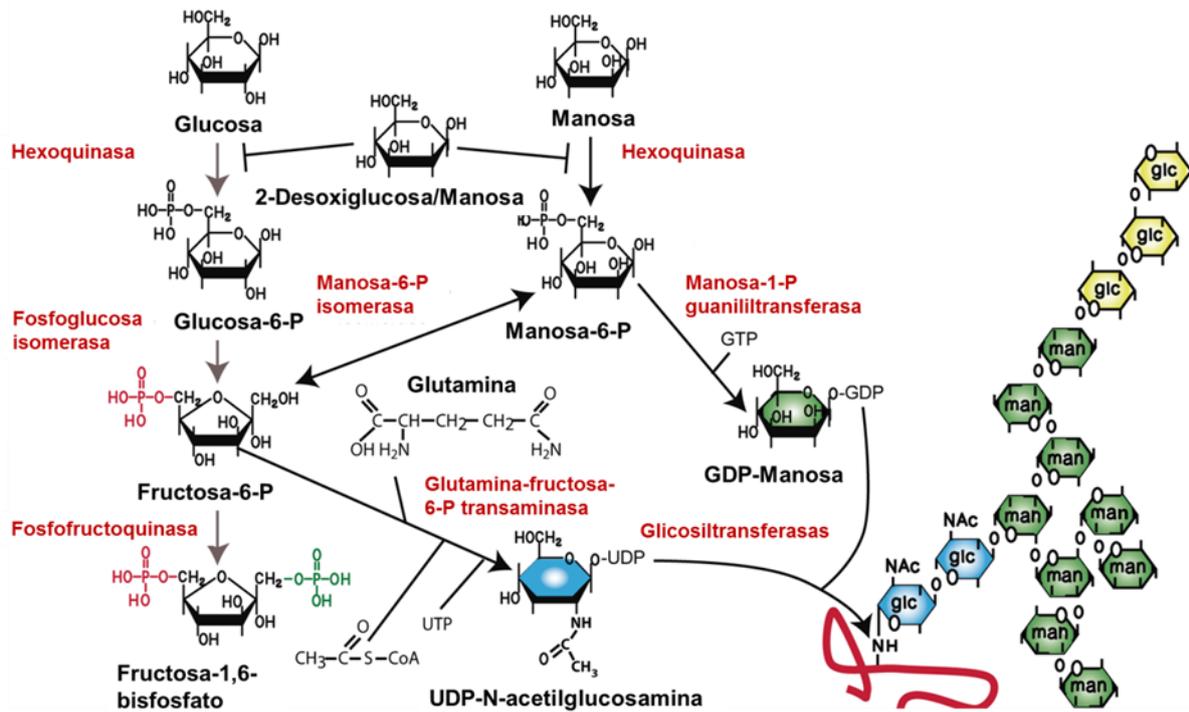
Los datos disponibles indican que las células no mejoran la actividad glucolítica simplemente regulando la expresión de las enzimas de la ruta para acelerar las reacciones y los mecanismos moleculares que explican este cambio aún no han sido completamente establecidos. La mayoría de la investigación dedicada a explicar estos mecanismos se ha llevado a cabo en células tumorales, las cuales muestran una reprogramación metabólica similar a la descrita en las células del sistema inmune, como son el aumento de la glucólisis y la glutaminólisis y la disminución de la OXPHOS. En la terapia anti-tumoral se están probando numerosos compuestos que actúan sobre enzimas claves de la vía glucolítica, como la hexoquinasa y la piruvato quinasa por su implicación en el cambio metabólico requerido para la proliferación de estas células (Akins, Nielson y Le, 2018). A pesar de que este tema ha sido menos estudiado en células dendríticas, el consenso actual es que ambas enzimas están implicadas en el cambio metabólico que se observa en las células del sistema inmune (Everts y Pearce, 2014; Pearce y Everts, 2015).

- **La hexoquinasa**

La hexoquinasa es una enzima específica de tejido que fosforila la glucosa a glucosa-6-fosfato (G-6-P). La formación de G-6-P es la primera reacción de la glucólisis y también el punto de partida de la vía de las pentosas fosfato, una vía metabólica paralela a la glucólisis, que genera NADPH, pentosas y ribosa-5-fosfato, un precursor para la síntesis de nucleótidos. Se han descrito cuatro isoformas de HK en mamíferos. Las hexoquinasas I, II y III tienen un tamaño de aproximadamente 100 kDa y comprenden dos dominios hexoquinasa (N y C-terminal), con una secuencia altamente homóloga. Además, comparten varias propiedades incluida una alta afinidad por la glucosa, incluso en bajas concentraciones (por debajo de 1 mM), y la inhibición por el producto de reacción glucosa-6-fosfato. La hexoquinasa IV o glucoquinasa tiene un tamaño aproximado de 50 kDa, posee un único dominio hexoquinasa y se caracteriza por su baja afinidad por la glucosa (Li *et al.*, 2014). La mayoría de las hexoquinasas se expresan ampliamente aunque las distintas isoformas predominan en algunos tejidos. La HK-I se expresa de forma ubicua y es más abundante en el cerebro y el riñón. La HK-II se expresa en niveles altos sólo en un número limitado de tejidos adultos como el adiposo (Wilson, 2003). La HK-III se expresa principalmente en el bazo y los linfocitos y la HK-IV es la isoforma

predominante en el hígado y el páncreas. La HK-II se considera la forma de HK inducible, ya que su expresión puede aumentar aproximadamente 100 veces en las células Th17 y además se ha observado que su inhibición con 2-desoxi-D-glucosa mejora la inflamación en ratones en un modelo de encefalomielitis autoinmune experimental al facilitar la formación de células Treg y suprimir la diferenciación de células Th17 (Shi *et al.*, 2011). También se ha descrito que la 2-DG suprime la activación de las células dendríticas inducida por la ocupación del receptor TLR4 que provoca la translocación de la HK-II a la mitocondria, siendo esta translocación el mecanismo implicado en el aumento de la glucólisis (Everts *et al.*, 2014).

La 2-DG es un mimético de la glucosa que tiene el grupo hidroxilo de la posición 2 reemplazado por hidrógeno y que actúa como un inhibidor competitivo del metabolismo de la glucosa (Grossbard y Schimke, 1966). En la mayoría de las células, la HK fosforila la 2-desoxi-D-glucosa para transformarla en 2-desoxi-D-glucosa-6-fosfato que no puede metabolizarse y se acumula inhibiendo la fosfoglucosa isomerasa y la HK (Ralser *et al.*, 2008). Asimismo, por su similitud estructural con la manosa, la 2-DG ejerce un mayor efecto competitivo con ésta que con la glucosa al encontrarse la manosa en los tejidos en concentraciones mucho menores (Kurtoglu, Maher y Lampidis, 2007). Este hecho tiene gran repercusión en todas las reacciones que requieren manosa como sustrato además de glucosa, incluidas las N-glicosilaciones de proteínas. La N-glicosilación consiste en la incorporación de un precursor glicano formado por N-acetilglucosamina, manosa y glucosa a residuos de asparagina (Asn) presentes en las proteínas. Por este motivo la 2-DG puede desencadenar el estrés del retículo endoplasmático y la respuesta a proteínas mal plegadas (Andresen *et al.*, 2012) (Figura 7).



**Figura 7. Esquema del mecanismo de acción de la 2-desoxi-D-glucosa.** Al ser el compuesto resultante de la pérdida del grupo hidroxilo del carbono 2 de la manosa y de la glucosa, la 2-DG produce una disminución de los niveles de glucosa-6-P y de manosa-6-P necesarios para la formación de UDP-N-acetilglucosamina y GDP-manosa, respectivamente. La carencia de estas moléculas puede alterar la N-glicosilación de proteínas afectando a su plegamiento y desencadenar el estrés de retículo endoplasmático y la respuesta a proteínas mal plegadas.

- **La piruvato quinasa**

La piruvato quinasa cataliza el último e irreversible paso de la glucólisis: la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato mediante la transferencia de un grupo fosfato al ADP. En los mamíferos hay cuatro isoformas de la piruvato quinasa (Harada *et al.*, 1978) codificadas por dos genes, *PKLR* y *PKM* cuya expresión se regula por factores específicos de tejido (Noguchi *et al.*, 1987) y por *splicing* alternativo (Noguchi, Inoue y Tanaka, 1986). El gen *PKLR* codifica la PKL expresada en hígado, intestino y riñón, y la PKR, expresada en eritrocitos. El gen *PKM* codifica las isoformas PKM1, que es un tetrámero constitutivamente activo (Ikeda, Tanaka y Noguchi, 1997) expresado en muchos tejidos diferenciados, y PKM2 que se expresa universalmente durante la embriogénesis y mayoritariamente en células en proliferación, aunque también se ha demostrado que se expresa en tejidos diferenciados y células que no proliferan, y se sobre-expresa en tumores (Altenberg y Greulich, 2004; Clower *et al.*,

2010). Durante la reprogramación metabólica, que tiene lugar en células inmunes activadas y en células tumorales, la expresión de la PKM1 disminuye en favor de la PKM2.

De las isoformas de *PKM* presentes en las células humanas sólo la conformación y actividad de la PKM2 puede modificarse alostéricamente (Ikeda y Noguchi, 1998; Ashizawa *et al.*, 1991; Christofk *et al.*, 2008) y se le atribuyen distintas funciones dependiendo de su conformación y localización (Gao *et al.*, 2012; Matsuda *et al.*, 2016). Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual esta isoforma aumenta el flujo glucolítico aún no se ha esclarecido. Mientras la forma tetramérica de PKM2 es altamente glucolítica (Tamada, Suematsu y Saya, 2012), la forma dimérica presente en el núcleo de las células tumorales sería responsable del efecto Warburg por su interacción con el factor de transcripción HIF1 $\alpha$  (Luo *et al.*, 2011; Tennant, 2011; Wang *et al.*, 2014a). La interacción HIF1 $\alpha$ /PKM2 y su influencia en el aumento de la glucólisis se ha descrito también en macrófagos murinos (Palsson-McDermott *et al.*, 2015).

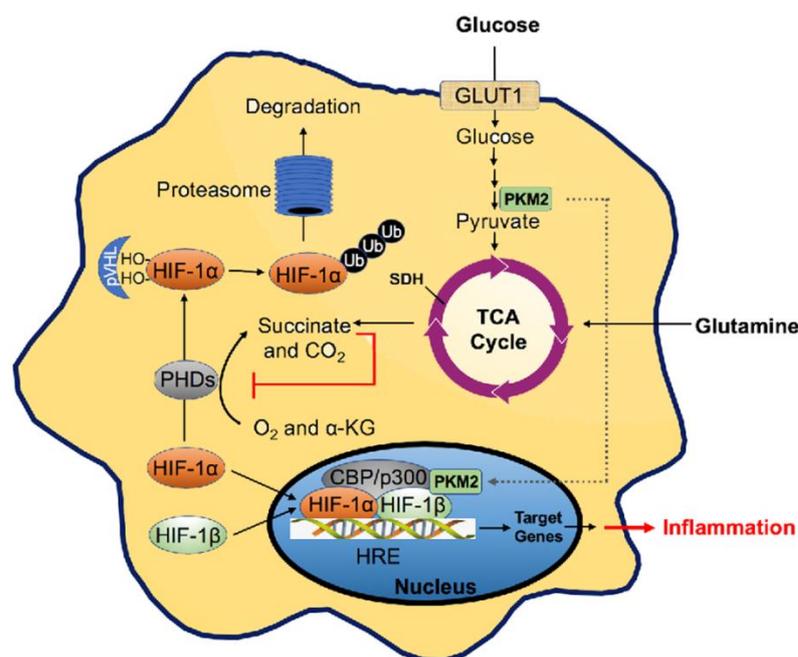
## 2.2 El factor de transcripción HIF1 $\alpha$

HIF es un miembro altamente conservado de la subfamilia PER-ARNT-SIM (PAS) perteneciente a la familia de factores de transcripción hélice-bucle-hélice básica (bHLH) (Wang *et al.*, 1995). Para el desarrollo de su función, HIF forma un complejo heterodimérico consistente en una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$ . La subunidad  $\alpha$  tiene dos isoformas, HIF1 $\alpha$  o HIF2 $\alpha$ . La subunidad  $\beta$  es el translocador nuclear del receptor de hidrocarburos arílicos (ARNT) y se expresa de forma constitutiva. Tras la dimerización, el complejo HIF $\alpha$ /HIF $\beta$  se traslada al núcleo donde se une a los promotores de genes diana que contienen elementos de respuesta a la hipoxia (HRE). Esta unión inicia la transcripción de una batería de genes involucrados en la adaptación celular a la hipoxia, el metabolismo y la función celular (Semenza, 2001).

La señalización de HIF se regula principalmente por la estabilidad de su subunidad  $\alpha$ . En células en reposo, HIF1 $\alpha$  se hidroxila en residuos de prolina por las prolin-hidroxilasas (PHD). Esta hidroxilación permite la ubiquitinación de HIF1 $\alpha$  por la ubiquitina ligasa de von Hippel-Lindau (VHL) E3, y el consiguiente marcaje para una rápida degradación proteasomal. Las PHD son dependientes de oxígeno, por lo tanto,

en condiciones normóxicas, HIF1 $\alpha$  se degrada continuamente, lo que explica los bajos niveles de HIF1 $\alpha$  detectados en condiciones basales. Por el contrario, la hipoxia inhibe la actividad de la PHD y atenúa la hidroxilación de HIF1 $\alpha$ , por lo que en ausencia de degradación proteasomal, se acumula, se traslada al núcleo y aumenta la transcripción de los genes que contienen secuencias HRE. Entre estos genes se encuentran los de las enzimas glucolíticas hexoquinasa II y fosfofructoquinasa (Riddle *et al.*, 2000; Obach *et al.*, 2004) y el de la lactato deshidrogenasa (Firth, Ebert y Ratcliffe, 1995).

En las células inmunes la estabilización de HIF1 $\alpha$  puede ocurrir de manera independiente del oxígeno ya que se ha demostrado la inducción de la expresión de HIF1 $\alpha$  en macrófagos cultivados en condiciones normóxicas en presencia de diferentes patógenos (Peyssonnaud *et al.*, 2005). Del mismo modo, el LPS induce la acumulación de la proteína HIF1 $\alpha$  en macrófagos a través de la activación transcripcional y traduccional, actuando independientemente de la estabilización de HIF1 $\alpha$  inducida por hipoxia (Blouin *et al.*, 2004) y se ha determinado que el factor nuclear NF- $\kappa$ B, que desempeña un papel central en la regulación de la respuesta inmune a la infección, también es necesario para la respuesta transcripcional del ARNm de HIF1 $\alpha$  inducida por bacterias (Rius *et al.*, 2008). Al igual que los macrófagos, tras la estimulación de los TLR, las células dendríticas estabilizan HIF1 $\alpha$  (Jantsch *et al.*, 2011) y experimentan un cambio metabólico similar al observado en otras células inmunes activadas, lo que les permite utilizar la glucólisis aerobia para inducir su maduración y desarrollar su función (Jantsch *et al.*, 2008; Krawczyk *et al.*, 2010).



**Figura 8. Regulación y activación de HIF1 $\alpha$  en células del sistema inmune.** Durante la hipoxia y en respuesta a los receptores de reconocimiento de patrones, HIF1 $\alpha$  se estabiliza y forma complejos con HIF1 $\beta$ . El complejo HIF1 completo se traslada al núcleo donde se une a los elementos sensibles a hipoxia con sus co-activadores, CBP/p300 y PKM2. Los genes con HRE en sus promotores incluyen enzimas metabólicas y mediadores pro-inflamatorios. Bajo una tensión normal de oxígeno, y en ausencia de estimulación, las enzimas proil-hidroxilasas (PHD) oxidan los residuos de prolina de HIF1 $\alpha$  lo que conlleva el reclutamiento de la ubiquitina ligasa de von Hippel-Lindau E3 (pVHL), que ubiquitina a HIF1 $\alpha$  para su degradación por el proteasoma. Figura adaptada de Stothers *et al.*, 2018.

### 3. El estrés de retículo endoplasmático

Los cambios en la composición del medio celular que ocurren durante la respuesta inmune pueden perturbar gravemente la función del retículo endoplasmático (RE). El retículo endoplasmático es una extensa red tubular-reticular separada del citosol circundante por una bicapa lipídica: la membrana del RE. Es un orgánulo crucial para el mantenimiento de la homeostasis del calcio y su función principal es la síntesis y el plegamiento de proteínas secretadas y transmembrana, que constituyen aproximadamente un tercio de todas las proteínas que se producen en la célula (Anelli y Sitia, 2008). Tras ser traducidas por los ribosomas asociados a la membrana del RE, las proteínas ingresan en el lumen del RE donde se produce su plegamiento, gracias a las chaperonas. En el lumen se producen también otras modificaciones complejas de las proteínas que incluyen, por ejemplo, la N-glicosilación y la formación de enlaces disulfuro (Saibil, 2013; Sevier y Kaiser, 2002). Debido a que las proteínas

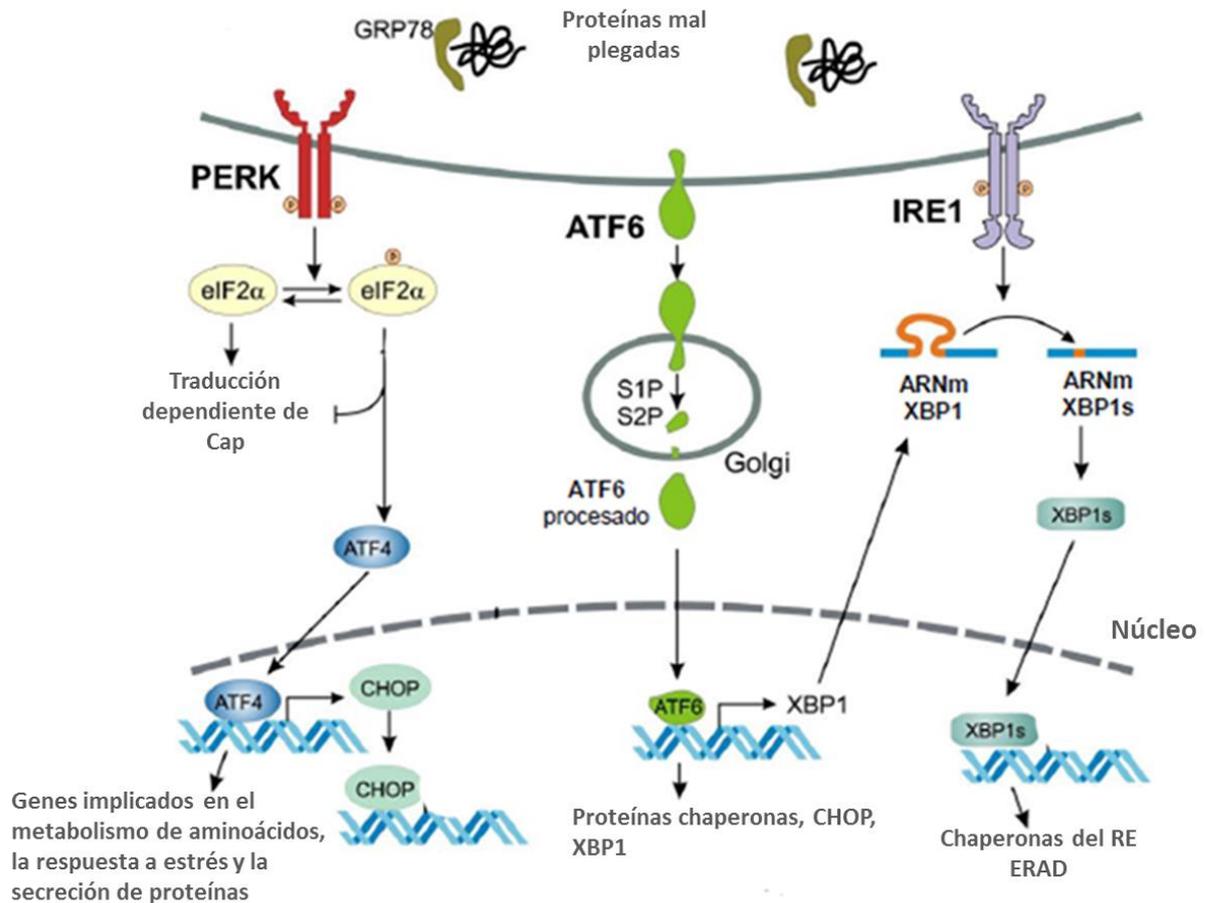
de la vía secretora a menudo median funciones de señalización cruciales, las formas que no están correctamente plegadas se eliminan a través de un proceso de degradación denominado degradación asociada al retículo endoplásmico (ERAD). De esta forma las proteínas mal plegadas se trasladan al citosol para su posterior ubiquitinación y degradación por el proteasoma 26S (Smith, Ploegh y Weissman, 2011).

Cuando la capacidad de plegamiento de las proteínas por el RE se ve superada, se dice que las células experimentan estrés de retículo (Tabas y Ron, 2011). La respuesta a proteínas mal plegadas es un mecanismo altamente conservado que permite a la célula manejar el estrés del retículo endoplásmico que se produce, por ejemplo, por la demanda secretora asociada con los cambios efectores sufridos por los fagocitos tras su activación por los PAMP. En este sentido, se ha demostrado que la UPR tiene funciones cruciales en la inmunidad y la inflamación habiéndose descrito su implicación en la diferenciación, maduración, supervivencia, y presentación antigénica de las células dendríticas (Martins *et al.*, 2016).

### **3.1 La respuesta a proteínas mal plegadas**

La comunicación entre el retículo endoplasmático y el núcleo en células que experimentaban estrés por la acumulación de proteínas mal plegadas, se describió en mamíferos por primera vez en 1988 (Kozutsumi *et al.*, 1988). Este fenómeno se caracterizó genéticamente en *S. cerevisiae*. En esta levadura, el estrés del RE regula positivamente un conjunto de genes involucrados en el plegamiento de proteínas, y el control de calidad y la secreción de las mismas (Cox y Walter, 1996). En vertebrados, la UPR ha evolucionado hacia el establecimiento de una red compleja de vías de señalización interconectadas iniciada por la estimulación de tres transductores de señal ubicados en la membrana del RE: ATF6 $\alpha$ , PERK e IRE1 $\alpha$ . En condiciones homeostáticas, los dominios luminales de estos sensores se mantienen en un estado inactivo mediante su asociación con la proteína de unión a la inmunoglobulina (BiP; también conocida como GRP78). Sin embargo, debido a la mayor afinidad de BiP por las proteínas mal plegadas, cuando éstas se acumulan en el lumen del RE, BiP se disocia de los transductores iniciándose así la señalización (Bertolotti *et al.*, 2000; Ye *et al.*, 2000) (Figura 9). De este modo, la activación de la UPR desencadena dos eventos celulares temporalmente distintos para mitigar el plegamiento incorrecto de

proteínas: una reacción inicial para reducir la síntesis de proteínas y mejorar la degradación de proteínas mal plegadas y una segunda ola de regulación de la transcripción de cientos de genes diana implicados en el control de proteostasis global.



**Figura 9. Esquema de la activación de las tres ramas de la respuesta a proteínas mal plegadas.**

La visión clásica de la activación de la UPR sugiere que GRP78 se une de manera constitutiva a los dominios luminales de ATF6, IRE1 $\alpha$  y PERK, para secuestrarlos en forma inactiva. Cuando las proteínas mal plegadas se acumulan en el lumen del RE, se unen a GRP78, lo que permite la liberación de los sensores UPR y que estos activen sus vías de señalización. PERK dimeriza y se autofosforila. Posteriormente fosforila a eIF2 $\alpha$ , se inhibe la traducción general dependiente de Cap y permite la traducción de ciertas proteínas como ATF4 que activa la transcripción de CHOP. Al liberarse de GRP78, ATF6 se moviliza al aparato de Golgi para su procesamiento por las proteasas S1P y S2P y la liberación de un fragmento citosólico que se traslada al núcleo para inducir la expresión de sus genes diana como XBP1. IRE1 activo también oligomeriza y actúa como quinasa y endonucleasa. Uno de sus objetivos es el ARNm de XBP1 que sufre un procesamiento para producir un factor de transcripción activo, XBP1s. Figura adaptada de Gorman *et al.*, 2012.

- **La rama ATF6 $\alpha$**

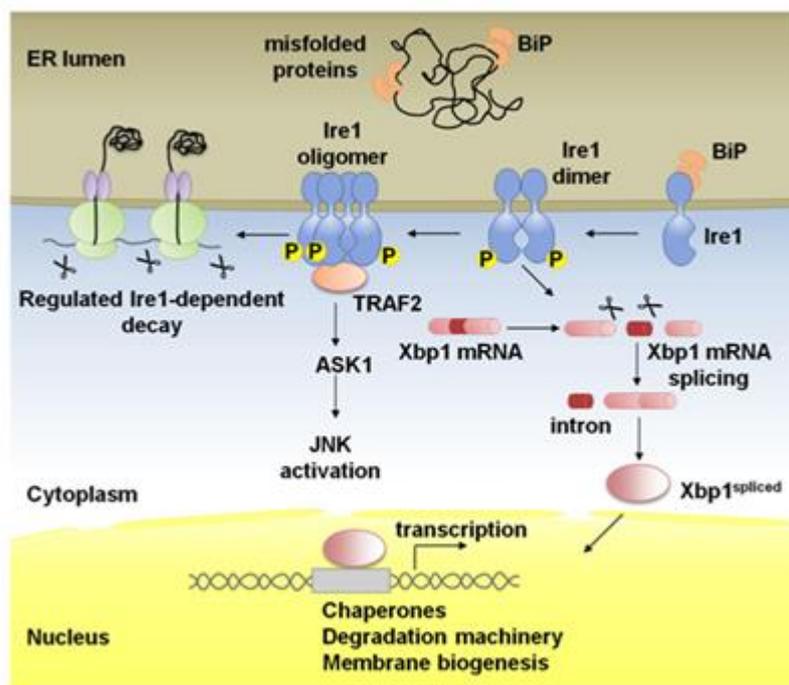
ATF6 $\alpha$  es una proteína transmembrana tipo II con un extremo N-citoplásmico que contiene un motivo básico de cremallera de leucina. En células sometidas a estrés de RE actúa como un factor de transcripción tras sufrir una proteólisis intra-membrana regulada (RIP). La forma presente en el RE es de 90 kDa y tiene dos secuencias de localización en Golgi que están enmascaradas por la unión a BiP (Shen *et al.*, 2002). Cuando se genera estrés en el RE, ATF6 $\alpha$  se disocia de BiP, se traslada al Golgi y su mitad C-terminal se escinde por la proteasa del sitio 1 (S1P). El extremo N-terminal anclado a la membrana se escinde por la proteasa del sitio 2 (S2P) y se libera una proteína de 50 kDa en el citosol. La proteína de 50 kDa se traslada al núcleo para activar la expresión de genes diana de la UPR como XBP1, CHOP o GRP78 junto con los elementos de respuesta a estrés de RE (ERSE). ATF6 $\alpha$  también puede activar transcripcionalmente componentes de la ERAD por heterodimerización con sXBP1 (Malhi y Kaufman, 2011).

- **La rama PERK**

PERK es una quinasa transmembrana de tipo I que en condiciones de estrés oligomeriza y se trans-autofosforila en el residuo treonina 981. Una vez activa inhibe la traducción general de proteínas al interferir con el ensamblaje 5'-cap a través de la fosforilación en la serina 51 del factor iniciador de la traducción eucariótica 2 (eIF2 $\alpha$ ) (Harding, Zhang y Ron, 1999). Este hecho reduce la sobrecarga de proteínas que entran en el RE de una célula estresada, pero también permite la traducción selectiva del ARNm que codifica el factor activador de la transcripción 4 (Vattem y Wek, 2004). ATF4 se traslada al núcleo, donde activa los genes UPR que codifican las proteínas que son necesarias para la respuesta antioxidante y la biosíntesis y transporte de aminoácidos. ATF4 también activa la transcripción de la proteína homóloga a C/EBP (CHOP/DDIT3), que forma heterodímeros con ATF4 para regular los genes con funciones en la UPR, la autofagia y la traducción del ARNm (Han *et al.*, 2013). Además, la fosforilación de eIF2 $\alpha$  representa un punto de convergencia de diferentes vías de estrés, conocidas como la "respuesta integrada al estrés", que se rige por quinzas específicas que se activan por inflamación, infecciones virales, privación de nutrientes y deficiencia de hemo (Pakos-Zebrucka *et al.*, 2016).

- **La rama IRE**

La rama IRE es la más arcaica y conservada de la UPR. En mamíferos se identificaron dos genes, *Ire1α* e *Ire1β*. *Ire1α* se expresa ampliamente mientras que la expresión de *Ire1β* se limita al epitelio intestinal aunque también podría estar presente en otros tipos celulares (Bertolotti *et al.*, 2001). IRE1α es una proteína transmembrana de tipo I con doble función ya que posee actividades serina/treonina quinasa y endoribonucleasa. En respuesta a la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE, el dominio luminal de IRE1α se autoasocia, permitiendo que IRE1α dimerice y se trans-autofosforile, induciendo así un cambio conformacional que activa su dominio RNasa para catalizar la escisión de un intrón de 26 nucleótidos del interior del ARNm de XBP1 (Calfon *et al.*, 2002). Este evento de *splicing* no convencional es completado por la liagasa RtcB que une los dos fragmentos del ARNm de XBP1 (Jurkin *et al.*, 2014) y cambia el marco de lectura abierto del ARNm para generar un factor de transcripción estable y activo conocido como sXBP1. El dominio RNasa de IRE1α también regula la estabilidad de múltiples ARN a través de una reacción de escisión endonucleolítica directa que involucra secuencias específicas en un proceso conocido como decaimiento regulado dependiente de IRE1 o RIDD (Hollien y Weissman, 2006). Aunque XBP1 es el sustrato de IRE1α preferido, bajo condiciones profundas de estrés, el RIDD puede ser impulsado por la formación de oligómeros de IRE1α de orden superior que dotan de una mayor avidéz por los sustratos de ARNm no XBP1 al dominio RNasa de IRE1α (Han *et al.*, 2009) (Figura 10).



**Figura 10. Esquema de la vía de señalización de la rama IRE.** En células sometidas a estrés, BiP se asocia a las proteínas mal plegadas e Ire1 se activa debido a los cambios conformacionales inducidos por la dimerización de monómeros y la trans-autofosforilación. Los oligómeros de orden superior, que podrían formarse con estímulos de estrés adicionales, refuerzan la actividad RNasa de Ire1. Ire1 activado media el *splicing* del ARNm de XBP1 en eucariotas superiores. Ire1 también puede actuar por vías alternativas. Ire1 fosforilado se asocia con TRAF2 y activa la ruta JNK a través de ASK1. Además mediante el RIDD, Ire1 degrada los ARNm localizados en la membrana del RE a través de su actividad RNasa, lo que conduce a una reducción en la cantidad de proteínas en el lumen del RE. Figura tomada de Coelho y Domingos, 2014.

Los genes diana de sXBP1 pueden variar según el tipo de tejido y los estímulos, ya que, sXBP1 tiene la capacidad de interactuar con otros factores de transcripción formando heterodímeros (Hetz, 2012). El eje de señalización IRE1 $\alpha$ /XBP1, por lo tanto, influye en muchas vías de señalización que anteriormente se creía que estaban fuera del alcance del programa tradicional de UPR. Además, la aplicación más reciente de las técnicas globales de creación de perfiles de ARNm ha expandido enormemente las dianas transcripcionales directas de XBP1 conocidas que abarcan, entre otras, el metabolismo de los lípidos (Lee *et al.*, 2008), las citoquinas pro-inflamatorias (Martinon *et al.*, 2010), la vía de respuesta a la hipoxia HIF1 $\alpha$  (Chen *et al.*, 2014), o la ruta de síntesis de hexosaminas (Wang *et al.*, 2014b). Esta extensión funcional se ha asignado también a otros factores de transcripción activados por la UPR como CHOP, aunque el número de estudios es más escaso.

# Objetivos



El objetivo general ha sido caracterizar la reprogramación metabólica que sufren las células dendríticas estimuladas por patrones moleculares asociados a patógenos y determinar los efectos que la modulación del metabolismo de la glucosa tiene sobre la regulación transcripcional de la producción de citoquinas. Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

**1. Caracterizar la reprogramación metabólica en células dendríticas estimuladas con *zymosan* y con LPS:**

- 1.1 Determinar el perfil metabólico inducido por la estimulación de las CD.
- 1.2 Estudiar los posibles mecanismos implicados en la reprogramación metabólica de las CD.

**2. Analizar los efectos de la modulación del metabolismo de la glucosa sobre la expresión de citoquinas en células dendríticas estimuladas con *zymosan* y con LPS:**

- 2.1 Determinar el efecto de la privación de glucosa sobre la transcripción de IL-23, IL-10 e IL-1 $\beta$  e identificar los mecanismos moleculares involucrados en el cambio transcripcional observado, lo que incluye:
  - Estudiar el efecto de la modulación farmacológica del metabolismo energético sobre los niveles de lactato y la producción de citoquinas.
  - Estudiar la implicación de la respuesta a proteínas mal plegadas.
- 2.2 Determinar el efecto de la regulación farmacológica de la actividad de la enzima PKM2 sobre la transcripción de IL-23, IL-10 e IL-1 $\beta$  y analizar si dicho efecto es consecuencia de cambios en su función glucolítica y/o quinasa.



# Materiales y métodos



## 1. Reactivos

El MKC8866 fue donado por el Dr. John Patterson, MannKind Corporation, Valencia, CA. El resto de reactivos fueron adquiridos a las siguientes casas comerciales:

- Active Motive: *Nuclear Extract Kit*
- Bio-Rad: Poliacrilamida
- Biotium: *GelRed nucleic acid stain*
- Calbiochem: tunicamicina
- Cayman Chemical Company: ML-265
- Fluca: Nonidet-P-40
- GE Healthcare: *Ficoll Paque*
- Gibco: Suero bovino fetal (FBS)
- Invitrogen: TRIzol, transcriptasa inversa, oligos N6
- Lonza: L-glutamina, penicilina/estreptomicina, RPMI 1640
- Merck: Tris-HCl, KCl, Tris, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>
- Miltenyi Biotec: GM-CSF murino, GM-CSF humano, IL-4
- NEB: StuI
- Promega: RNAsin
- R&D Systems: *kit ELISA IL-23*
- Santa Cruz: Reactivos para los estudios de inmunoprecipitación de cromatina
- Scharlab: Cloroformo, isopropanol, metanol, etanol, acetonitrilo, glicina, NaCl, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
- Sellenckchem: GSK2606414
- Sigma: albúmina de suero bovina (BSA), *SyBr Green I Master Mix*, *Lactate assay kit II*, *zymosan* de *Saccharomyces cerevisiae*, LPS de *Escherichia coli*, formaldehído, 2-desoxi-D-glucosa, tapsigargina, D-manosa, lactato de sodio, dicloroacetato (DCA), EDTA, EGTA, dodecilsulfato sódico (SDS), ortovanadato, *Tween-20*, HEPES, poli-L-lisina, Tritón, ditiotreitól (DTT), citrato sódico, β-glicerofosfato, acetato sódico
- Stemcell: *Optiprep*
- Thermo Scientific: ECL, dNTPs, disuccinimidil suberato (DSS), marcadores de peso molecular, Hoechst 33342
- Tocris: 4μ8C

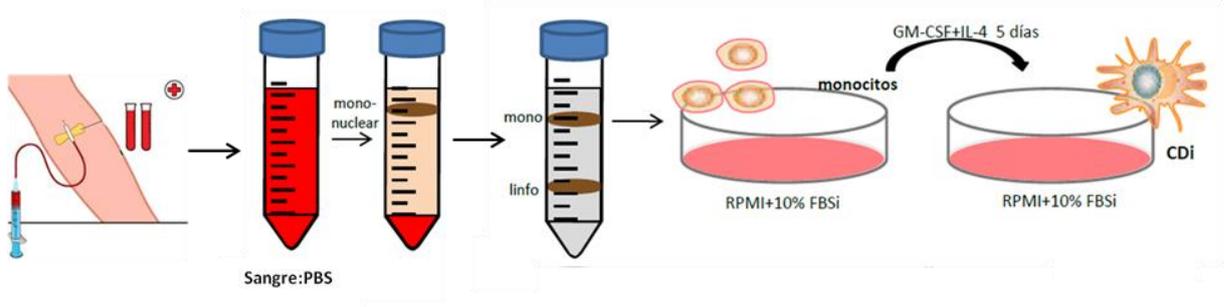
## 2. Cultivos celulares

### 2.1 Obtención de células dendríticas humanas

Las células dendríticas se obtuvieron de células mononucleares aisladas de la capa leuco-plaquetaria que aparece entre el plasma y los glóbulos rojos tras la centrifugación de la sangre total, y que se denomina habitualmente según el término inglés de *buffy coat*. Los concentrados sanguíneos de donantes sanos del grupo 0 fueron proporcionados por el Centro de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León, y se diluyeron en proporción 1:1 (v:v) con tampón fosfato salino (PBS) (136 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,4). Se añadieron 30 ml de esta mezcla sobre 15 ml de una solución de *Ficoll Paque* y se centrifugaron a 700 x g durante 30 minutos sin freno de desaceleración para obtener en la parte superior la fase acuosa con la mezcla de plasma y PBS, y en capas inferiores en forma sucesiva, un anillo en el que se encuentran las células mononucleares, el *Ficoll Paque* y por último los eritrocitos y los polimorfonucleares. Se recogieron 2 anillos de células mononucleares con pipeta *Pasteur* en tubos Falcon y se lavaron por centrifugación a 440 x g durante 10 minutos en 50 ml de PBS. El precipitado celular se resuspendió en 3 ml de *Optiprep* (Iodixanol 60%) y se creó un gradiente de densidades al añadir, sin mezclar, las fases de 7 ml de *Ficoll Paque*, 20 ml de una solución 1 mM EDTA, 0,5% BSA y 33% *Optiprep* en tampón HEPES salino (HBS) (10 mM HEPES y 0,8% NaCl pH 7,4) y 1 ml de HBS. Se centrifugó a 700 x g durante 25 minutos sin freno de desaceleración para obtener dos anillos celulares entre las distintas fases: en la parte superior uno formado por monocitos y otro en la parte inferior que contiene los linfocitos. Se recuperó el anillo de monocitos, se lavó en PBS y se repitió el proceso de separación por gradiente de densidad para obtener una población de monocitos de mayor pureza.

Tras realizar el recuento del número total de células, se distribuyeron 30 millones de las mismas en placas de cultivo de 100 mm de diámetro con 5 ml de medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (FBSi), 2 mM de L-glutamina y 100 U/ml de penicilina/estreptomicina. Las células se dejaron adherir durante al menos 60 minutos a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido este tiempo, se retiró por aspiración el medio con las células no adheridas y se inició el

proceso de diferenciación a células dendríticas inmaduras (CDi), añadiendo a 7 ml finales del medio anterior, 800 U/ml de GM-CSF y 500 U/ml de IL-4 (Valera *et al.*, 2008). La incubación se mantuvo durante 5 días a 37°C en atmósfera con un contenido de CO<sub>2</sub> del 5% (Figura 11). El FBSi se mantuvo al 10% durante el proceso de diferenciación y se redujo al 2% para la realización de los experimentos.

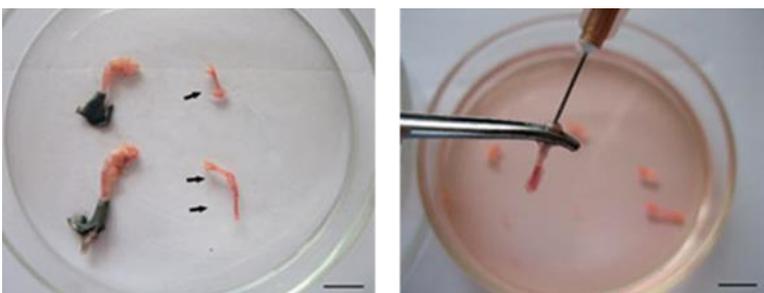


**Figura 11.** Esquema del proceso de obtención de células dendríticas humanas.

## 2.2 Obtención de células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón

Para obtener células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón (BMDC), se diseccionaron los fémures y las tibias de ratones con fondo genético C57BL6, se cortaron las epífisis y se extrajo la médula ósea mediante inyección de PBS frío (Figura 12). La suspensión de células se filtró y se centrifugó 10 minutos a 400 x g. Las células se resuspendieron en RPMI suplementado con 10% de FBSi, 2mM de L-glutamina, 100 U/ml de penicilina/estreptomicina y 10 ng/ml de GM-CSF murino y se mantuvieron en cultivo durante 5 días a 37°C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Para la realización de los experimentos el FBSi se redujo al 2%.

Los ratones *Ern1<sup>f/f</sup>Vav1-Cre* fueron obtenidos por el Dr. Cubillos-Ruiz (*Medical College*, NY, Estados Unidos) a través de una colaboración con el profesor Takao Iwawaki (*Kazanawa Medical University*, Ishikawa, Japón).



**Figura 12.** Imágenes del proceso de obtención de la médula ósea de un ratón.

### 3. Análisis de la expresión génica

#### 3.1 Extracción del ARN total

La extracción de ARN total se llevó a cabo mediante la adición de 1 ml de TRIzol a  $10^7$  CD. Tras la resuspensión en TRIzol, las células se centrifugaron a  $12000 \times g$  durante 10 minutos a  $4^\circ\text{C}$  para obtener el sobrenadante y eliminar los restos celulares. Para separar la fase acuosa, que contiene el ARN, de la orgánica, que contiene el ADN y las proteínas, se añadieron 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo, se agitó vigorosamente, y tras mantener la mezcla 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a  $12000 \times g$  durante 15 minutos a  $4^\circ\text{C}$ . La fase acuosa se suplementó con 250  $\mu\text{l}$  de isopropanol y 250  $\mu\text{l}$  de una disolución 0,8 M citrato sódico y 1,2 M NaCl en  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC. La mezcla se mantuvo 10 minutos a temperatura ambiente con agitación ocasional y se centrifugó a  $12000 \times g$  a  $4^\circ\text{C}$  durante 10 minutos para precipitar el ARN. El precipitado se lavó con etanol al 75% en  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC dos veces y se dejó secar al aire. Finalmente se resuspendió en 15  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC. La cantidad de ARN presente en la muestra se valoró con un NANO DROP (ratio  $A_{260}/A_{280}$ ).

#### 3.2 Síntesis del ADN complementario

Para la síntesis del ADN complementario (ADNc) se partió de 3  $\mu\text{g}$  de ARN que se diluyeron a un volumen final de 11,1  $\mu\text{l}$  con  $\text{H}_2\text{O}$ -DEPC. Tras el calentamiento durante 10 minutos a  $68^\circ\text{C}$ , se añadieron a cada muestra 8,9  $\mu\text{l}$  de un tampón de retrotranscripción formado por 50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM DTT, 1 mM desoxinucleotidos trifosfato (dNTP), 15 ng/ $\mu\text{l}$  oligos N6, 1U/ $\mu\text{l}$  RNAsin y 10 U/ $\mu\text{l}$  de transcriptasa inversa del virus de la leucemia murina (RT M-MLV). La incubación se mantuvo a  $37^\circ\text{C}$  durante 1 hora.

#### 3.3 PCR cuantitativa en tiempo real

La amplificación del ADNc se llevó a cabo con esta técnica basada en la detección continua del producto de amplificación durante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con un reactivo que aumenta su fluorescencia tras su unión al ADN de doble cadena. La reacción de PCR se llevó a cabo con el equipo *LightCycler*<sup>®</sup> 480 empleando *SyBr Green I Master*, 1,5  $\mu\text{l}$  de ADNc y 0,2 nM de cada cebador en placas de 96 pocillos. Las condiciones del termociclador fueron una desnaturalización inicial

(*hot start*) durante 5 minutos a 95°C seguida de 45 ciclos de tres pasos: 95°C durante 15 segundos (desnaturalización del ADN), 60°C durante 20 segundos (hibridación del ADN) y 72°C durante 5 segundos (elongación del ADN). La curva de fusión se realizó con el cambio paulatino de temperatura de 60°C a 95°C a razón de 0,2°C/segundo. Se utilizó la enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) como gen constitutivo para valorar la abundancia relativa de los diferentes ARNm usando el método comparativo del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (*Fold Increase*): se determina el ciclo umbral (Ct) que es aquél en el que la fluorescencia supera el umbral que marca que la amplificación comienza a ser exponencial. Los resultados se expresan como la media de los Ct del gen que se analiza con respecto a los Ct de la *GAPDH* ( $\Delta Ct$  condición x = Ct gen diana - Ct *GAPDH*) y a este valor se le resta el  $\Delta Ct$  del control ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  condición x -  $\Delta Ct$  control). En las Tablas 1 y 2 se muestran las secuencias de los cebadores utilizados para la detección de los transcritos de humanos y de múridos.

Humanos		
Nombre	Secuencias (5'-3')	
	Sentido	Antisentido
<i>DDIT3/CHOP</i>	GCAGAGATGGCAGCTGAGTC	AGCCAAGCCAGAGAAGCAGGGT
<i>GAPDH</i>	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	AGGGGAGATTCAGTGTGGTG
<i>HIF1<math>\alpha</math></i>	AGTGTACCCTAACTAGCCGA	GTGCAGTGC AATACCTTCC
<i>IL1B</i>	ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA	GTCGGAGATTCGTAGCTGGA
<i>IL10</i>	GAGAACAGCTGCACCCACTT	GGCCTTGCTCTTGTTTTTCC
<i>IL12B</i>	CATGGGCCTTCATGCTATTT	TTTGCATTGTCAGGTTTCCA
<i>IL23A</i>	CATGGGCCTTCATGCTATTT	TTTGCATTGTCAGGTTTCCA
<i>PKM1</i>	GCATCATGCTGTCTGGAGAA	AACTATCAAAGCTGCTGCTA
<i>PKM2</i>	CTATCCTCTGGAGGCTGTGC	ACGATTATGGCCCCACTGCA
<i>XBP1</i>	TAAGACAGCGCTTGGGGATGGA	ATACCGCCAGAATCCATGGGGA

Tabla 1. Cebadores utilizados para la detección de transcritos de humanos.

Múridos		
Nombre	Secuencias (5'-3')	
	Sentido	Antisentido
<i>Gapdh</i>	GTCAGTGGTGGACCTGACCT	AGGGGAGATTCAGTGGTG
<i>Il23a</i>	AGGGAACAAGATGCTGGATT	AGTAGATTCATATGTCCCGCT
<i>sXbp</i>	AAGAACACGCTTGGGAATGG	CTGCACCTGCTGCGGAC

Tabla 2. Cebadores utilizados para la detección de transcritos de múridos.

### 3.4 Análisis del *splicing* de *XBP1*

Tras realizar la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) con cebadores que abarcan las regiones sin *splicing* en las condiciones anteriormente señaladas, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa al 3%, con marcadores de peso molecular de ADN, en la que se corrió el producto de amplificación a 100 V durante 20 minutos. Para visualizar las bandas con y sin *splicing* que difieren en 26 pares de bases (pb) se tiñó el gel con *GelRed nucleic acid stain*. Se usó la expresión de *GAPDH* como control de carga.

### 3.5 Análisis de las isoformas de la piruvato quinasa

Las isoformas de la PKM se generan por el *splicing* alternativo de exones mutuamente excluyentes y se diferencian en que el ARNm de PKM1 contiene el exón 9 y carece del exón 10, mientras que el ARNm de PKM2 incluye el exón 10 y carece del exón 9. Las qPCR se llevaron a cabo con cebadores diseñados en los exones 8 y 11 que dan un producto de amplificación de 218 pb para la PKM1 y de 183 pb para la PKM2. Esto permite el análisis cuantitativo de cada isoforma y la confirmación de su identificación mediante el tratamiento del amplicón de PCR con la enzima de restricción *StuI* que reconoce la secuencia AGGCT en el exón 10 y digiere el fragmento de ARNm de PKM2 en dos productos de 149 pb y 34 pb. Para la digestión, se llevaron 5 µl del producto de PCR a un volumen final de 9 µl con un tampón 10 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub> y 0,1 mg/ml BSA, al que se añadieron 10 U (1 µl) de *StuI*. La incubación se mantuvo durante 1 hora a 37°C. Las diferentes bandas se visualizaron tras realizar una electroforesis en un gel de agarosa al 3%, con marcadores de ADN, teñido con *GelRed nucleic acid stain*.

### 3.6 Inmunoprecipitación de la cromatina

Con el fin de estudiar los mecanismos de regulación transcripcional, se llevaron a cabo experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) para analizar la unión directa de los factores de transcripción. Se utilizaron  $2 \times 10^7$  células dendríticas por condición a las que tras la estimulación se les añadió formaldehído (1 % final). Las CD se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos para fijar las uniones entre las proteínas y el ADN, y la reacción de entrecruzamiento se paró con

glicina 0,125 M. Tras 5 minutos de incubación se lavaron las células con PBS y se resuspendieron en un tampón de lisis en el que se mantuvieron durante 30 minutos a 4°C. Tras la centrifugación a 400 x g durante 5 minutos, el precipitado se lavó con PBS frío, se congeló en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80°C durante toda la noche. A las muestras descongeladas a temperatura ambiente se les añadieron 300 µl de un tampón de lisis con alta salinidad y para fragmentar la cromatina se procedió a su sonicación en un Bioruptor (Diagenode) para generar fragmentos de ADN de entre 100 y 1000 pares de bases. Tras la centrifugación a 9300 x g durante 15 minutos, se recuperó el sobrenadante que contiene la cromatina y parte de este se utilizó como control (*input*). La solución de cromatina se incubó a 4°C durante 1 hora en un rotador orbital en presencia de 50 µl de proteína A/G Plus Agarosa para disminuir las uniones inespecíficas. Tras eliminar las bolas por centrifugación, se añadieron 10 µg de anticuerpo frente al factor de transcripción de interés y se incubó a 4°C en un rotador orbital durante toda la noche. Al día siguiente se añadieron otros 50 µl de proteína A/G Plus Agarosa, se incubó durante 2 horas a 4°C en el rotador orbital, se centrifugó a 13400 x g durante 1 minuto y se desechó el sobrenadante. Las bolas de agarosa se lavaron 2 veces con un tampón de alta salinidad y 4 veces con un tampón de lavado comercial. Para romper los entrecruzamientos y liberar el ADN, se añadieron 400 µl de un tampón de elución y se incubó a 68°C durante 2 horas. Las muestras se centrifugaron para eliminar las partículas de agarosa y el ADN se purificó añadiendo 400 µl de fenol/cloroformo/isoamilalcohol, se centrifugó durante 3 minutos a 14000 x g y se recuperó la fase acuosa a la que se añadió 1 ml de etanol al 100% y 40 µl de acetato sódico 3 M. Tras mantenerlo a -20°C toda la noche, se centrifugó durante 25 minutos a 14000 x g y el ADN precipitado se lavó con etanol al 70% para ser resuspendido, finalmente, en 30 µl de H<sub>2</sub>O grado Milli-Q.

Una vez purificado el ADN, se llevó a cabo la amplificación por qPCR con cebadores diseñados frente a distintas zonas del promotor de *IL23A* y de *IL10* (Tabla 3). Para la cuantificación relativa se utilizaron los Ct del *input* ( $\Delta Ct = Ct \text{ condición X} - Ct \text{ input}$ ) y los resultados se expresan como % del mismo aplicando la ecuación  $2^{-\Delta Ct} \times 100/36$  en la que 36 es el factor de dilución.

Nombre	Secuencias (5'-3')	
	Sentido	Antisentido
<i>IL23A</i> Caja-X2 Proximal	CTCTAGCCACAGCAACCACA	GCCCCGCCCTTTATACCAGCA
<i>IL23A</i> Caja-X2 Medial	CTTAGCTGTTTCATCGATGTT	CAGGAGTTCTGGGTAGTCG
<i>IL23A</i> Caja-X2 Distal	TTCCATTGGTGTCCACCTTA	CTTTAGATTAAACATTTCCAGCA
<i>IL23A</i> CHOP-C/EBP Proximal	AGAACTCCTGGGCTTCTAGCCAT	GGCCTCATTCTGACGTCATCCA
<i>IL23A</i> CHOP-C/EBP Distal	TAACGGTTTAGGCCAGCTGAC	TGTTGCGTGGCAGGAACTACA
<i>IL10</i> Sitio CRE	GGCAATTTGTCCACGTCCT	TGATTTCTGGGGAGAACAG

Tabla 3. Cebadores utilizados en los estudios de ChIP.

## 4. Análisis de proteínas

### 4.1 Obtención de extractos celulares para inmunodetecciones (*Western Blot*)

- **Extractos celulares totales**

Tras ser lavadas con PBS por centrifugación, las CD se lisaron por la adición, para  $5 \times 10^6$  células, de 50  $\mu$ l de un medio compuesto por 20 mM HEPES, 40 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 2 mM ortovanadato, 10 mM EGTA, 2,5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM DTT y 1% Nonidet P-40 suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasa (1 mg/ml leupeptina, 5 mg/ml aprotinina, 0,1 M PMSF, 1 M NaF, 0,1 M pNPP, 0,1 M DTT y 200 mM ortovanadato). Tras la incubación en hielo durante 30 minutos, el lisado se centrifugó a 4°C durante 10 minutos a 10200 x g para obtener el sobrenadante con los extractos proteicos. La cuantificación de las proteínas se realizó mediante el método colorimétrico descrito por Bradford (Bradford, 1976) que se basa en un desplazamiento del máximo de absorción (entre 465-595 nm) del colorante azul de Coomassie G-250 unido a las proteínas. La concentración de las proteínas se determinó midiendo la absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro con la ayuda de una curva patrón construida usando BSA como estándar.

- **Extractos nucleares y citosólicos**

La obtención de los extractos nucleares se realizó empleando el *Nuclear Extract Kit* de Active Motif siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras lavar  $10^7$  células dendríticas en 1 ml de PBS con inhibidores de fosfatasa se añadieron 300  $\mu$ l de

tampón hipotónico y se incubaron durante 15 minutos en hielo. A continuación se añadieron 15 µl de detergente y, tras la agitación en vortex, se centrifugó a 14000 x g durante 30 segundos para recuperar el sobrenadante (extractos citosólicos) y el precipitado con la fracción nuclear. Al precipitado se le añadieron 50 µl del tampón de lisis AM1 suplementado con DTT e inhibidores de proteasas (PIC), se mantuvo 30 minutos en hielo, se centrifugó a 14000 x g durante 10 minutos y se recuperó el sobrenadante en el que se encuentra el extracto nuclear. La cantidad de proteína se valoró según el método Bradford.

- **Electroforesis en condiciones desnaturalizantes, transferencia a membranas de nitrocelulosa e inmunodetección.**

Las muestras se sometieron a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y reductoras según el procedimiento descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Se cargaron de 50 a 100 µg de los correspondientes extractos, previamente mezclados con tampón de Laemmli (60 mM Tris pH 6.8, 10 % glicerol (v/v), 2 % SDS (p/v), 0.002 % azul de bromofenol (p/v)) suplementado con 20 mM DTT, en geles de poliacrilamida (SDS/PAGE) a concentraciones finales de poliacrilamida de 8, 10 o 12% en función del peso molecular de la proteína de interés. El tampón de electroforesis estaba compuesto por 25 mM Tris, 0,2 M glicina y 1 g/l SDS.

Tras la electroforesis a 25 mA, el contenido del gel se transfirió a una membrana de nitrocelulosa mediante el sistema de transferencia de Bio-Rad en condiciones húmedas a 100 V, durante 90 min, utilizando un tampón de transferencia compuesto por 25 mM Tris, 0,2 M glicina, 20% metanol, 1 g/l SDS. Las membranas transferidas se bloquearon por incubación con agitación suave, durante 1 hora a temperatura ambiente en una solución compuesta por TTBS (0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween-20) y 5% BSA o 5% de leche desnatada, en función de las especificaciones del anticuerpo primario. Tras el bloqueo se añadió el anticuerpo primario resuspendido en su correspondiente solución de bloqueo y las muestras se mantuvieron durante toda la noche en agitación suave a 4°C. Tras 3 lavados de 10 minutos con TTBS, se añadió a las membranas el anticuerpo secundario, frente al anticuerpo primario, conjugado con peroxidasa de rábano y se mantuvieron en agitación suave durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras un nuevo lavado, se incubaron con el reactivo

comercial ECL que permite la detección de los anticuerpos conjugados con peroxidasa de rábano al originar un producto quimioluminiscente. Finalmente se expusieron a películas auto-radiográficas que se revelaron con un equipo Curix-60 de AGFA. Los anticuerpos primarios utilizados se muestran en la Tabla 4.

Anticuerpo	Casa Comercial	Dilución
ATF6	Abcam	1:500
$\beta$ -actina	Sigma	1:5000
CHOP	Santa Cruz	1:500
COX-2	Santa Cruz	1:500
eIF2 $\alpha$	Cell Signaling	1:1000
HIF1 $\alpha$	Novus Biologicals	1:500
Histona H3	Abcam	1:1000
PKM2	Cell Signaling	1:1000
Pro-IL1 $\beta$	Cell Signaling	1:1000
P-S52-eIF2 $\alpha$	Invitrogen	1:1000
P-Ser-9-GSK3 $\beta$	Cell Signaling	1:1000
P-Y705-STAT3	Cell Signaling	1:1000
STAT3	Cell Signaling	1:1000
sXBP1	BioLegend	1:500
TBP	Diagenode	1:30000

**Tabla 4.** Anticuerpos empleados en *Western Blot*, casas comerciales y concentraciones utilizadas.

#### 4.2 *Cross linking* de PKM2

Se sembraron  $10^7$  células dendríticas por condición y se lavaron 3 veces con PBS a pH 8. El *cross linking* se realizó incubando las células durante 30 minutos a temperatura ambiente, con disuccinimidil suberato  $650 \mu\text{M}$  según describió Palsson-McDermott *et al.*, 2015. La reacción se paró mediante la adición de 100 mM Tris-HCl pH 7,4, manteniendo las células durante 15 minutos a temperatura ambiente. La lisis celular se realizó en las condiciones anteriormente descritas, pero omitiendo el DTT. La electroforesis se realizó en gel de poliacrilamida al 8% para visualizar proteínas en el rango de 60-240 KDa.

### 4.3 ELISA

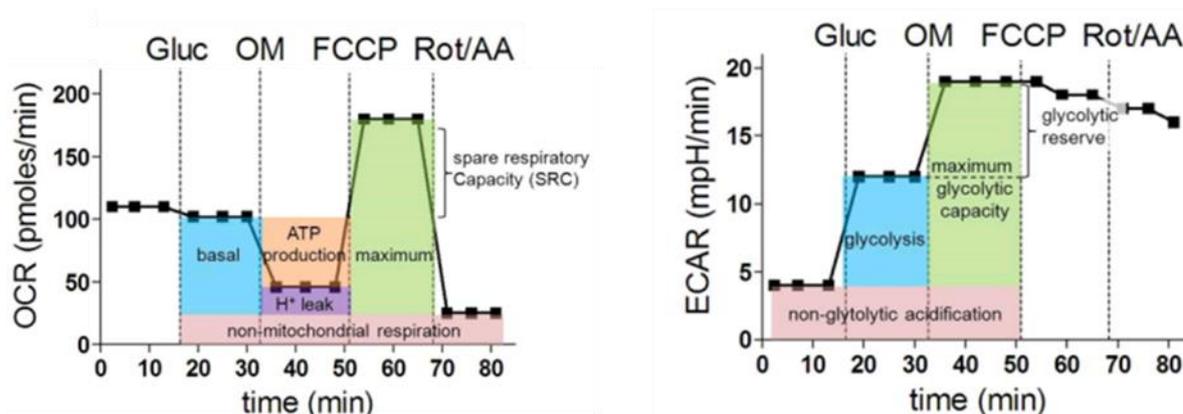
La IL-23 presente en los sobrenadantes provenientes de  $10^6$  células/ml se cuantificó mediante un *kit* comercial de ELISA de la marca R&D Systems siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células en suspensión se centrifugaron a  $6000 \times g$  durante 30 segundos y el sobrenadante se volvió a centrifugar a  $16000 \times g$  durante 1 minuto para eliminar los restos celulares. Se añadieron  $100 \mu\text{l}$  del reactivo RD1-22 a cada pocillo y  $100 \mu\text{l}$  del estándar, control o la muestra y se incubó durante 2 horas en agitación a temperatura ambiente. Se lavó la placa 4 veces, se añadieron  $200 \mu\text{l}$  del conjugado a cada pocillo y se volvió a incubar durante 2 horas. Tras lavar de nuevo se añadieron  $200 \mu\text{l}$  de la solución sustrato y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente protegido de la luz. Por último se añadieron  $50 \mu\text{l}$  de la solución de *stop* y se leyó la absorbancia a  $450 \text{ nm}$ .

### 4.4 Microscopía de fluorescencia confocal de barrido láser

Se añadieron  $500 \mu\text{l}$  de una suspensión de células a una concentración de  $4 \times 10^5$  células/ml sobre cristales de  $12 \text{ mm}$  de diámetro cubiertos con poli-L-lisina y se dejaron adherir durante al menos 12 horas. Tras la estimulación, se lavaron con una solución de BSA al 0,2% en PBS y se fijaron con formaldehído al 10% en PBS durante 30 minutos. Los cristales se volvieron a lavar 2 veces y se añadió Tritón al 0,3% para permeabilizar las células. Después de incubar durante 10 minutos se realizó el bloqueó con 10% de FBS en PBS durante 20 minutos. Los cristales se lavaron durante 5 minutos con PBS/BSA y se incubaron con los anticuerpos anti-HIF1 $\alpha$  o anti-PKM2 (dilución 1:200 en PBS suplementado con el 1% de BSA) durante 1 hora. Transcurrido este tiempo y tras 3 lavados de 5 minutos, se añadieron el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo generado en cabra marcado con Alexa-Fluor 480, dilución 1:100) y el DAPI (dilución 1:1000), para teñir los núcleos. Se lavaron por última vez las preparaciones, se montaron sobre una gota de Gelvatol en porta-objetos de un tamaño de  $26 \times 76 \text{ mm}$  y se sellaron con esmalte. Los cristales se observaron usando un microscopio Leica TCS SP5 con un láser de luz blanca y un objetivo de aceite de inmersión Leica 63PL APO NA 1.40. El análisis de las imágenes y los fluorogramas de co-localización subcelular se realizaron usando el paquete de *software* LAS AF Lite del confocal Leica y el *software* Adobe Photoshop CS5.1.

## 5. Estudios bioenergéticos

El análisis bioenergético de las CD se llevó a cabo utilizando los analizadores de flujo extracelular *Seahorse Bioscience XFe24* o *Seahorse Bioscience XFe96* en los experimentos en los que las células se pre-incubaron con el compuesto ML-265. En el primer caso, las células se estimularon con distintas concentraciones de *zymosan* o LPS durante 30 minutos y 4 horas. A continuación se adhirieron  $2 \times 10^5$  CD a placas de *Seahorse* cubiertas de poli-ornitina y se analizaron la tasa de acidificación extracelular (ECAR) y la tasa de consumo de oxígeno (OCR) de acuerdo con el protocolo *XF Cell Mito Stress Test* en medio XF (medio RPMI 1640 con 11,1 mM de glucosa, 4 mM de glutamina y 2% de FBSi). El equipo mide las variaciones en el pH y la presión de  $O_2$  bajo condiciones basales y en respuesta a distintos compuestos que se van adicionando secuencialmente: 1  $\mu$ M oligomicina (OM) que inhibe el complejo V mitocondrial o ATP sintasa, 1,5  $\mu$ M carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) agente desacoplante que permite el paso de protones a través de la membrana, y 100 nM rotenona /1  $\mu$ M antimicina A (Rot/AA) que bloquean los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Figura 13). Los datos obtenidos se normalizaron en función de la cantidad de proteína. En los experimentos en los que se utilizó el compuesto ML-265, las células se adhirieron con Cell-Tak a las placas de *Seahorse* y se pre-trataron con 50  $\mu$ M de ML-265 durante 30 minutos. Tras 30 minutos de estabilización en el equipo, se inyectaron los estímulos y se analizaron la ECAR y la OCR aplicando el protocolo anterior. En este caso la normalización, en función del número de células, se realizó mediante la medida de la absorbancia utilizando la tinción con Hoechst 33342.



**Figura 13. Representación de las gráficas de la tasa de consumo de oxígeno y de acidificación extracelular obtenidas con el Seahorse.** El protocolo XF Cell Mito Stress Test permite calcular distintos parámetros del metabolismo celular adicionando secuencialmente distintos compuestos: OM, FCCP y Rot/AA. Mediante las variaciones de la presión de O<sub>2</sub> provocadas se pueden calcular la respiración basal (basal), la respiración máxima (maximum), la capacidad respiratoria de reserva (SRC), el consumo de oxígeno destinado a la producción de ATP (ATP production), la fuga de protones (H<sup>+</sup> leak) y el consumo de oxígeno no debido a la respiración mitocondrial (non-mitochondrial respiration) y mediante las variaciones de pH la glucólisis basal (glycolysis), la capacidad glucolítica máxima (maximum glycolytic capacity) y la reserva glucolítica (glycolytic reserve).

## 6. Medida de lactato

### 6.1 Lactato extracelular

Se recuperaron los sobrenadantes correspondientes a 10<sup>6</sup> células/ml. La suspensión celular se centrifugó a 6000 x g durante 30 segundos para precipitar las células y el sobrenadante se centrifugó posteriormente a 13000 x g durante 10 minutos a 4°C para precipitar el material insoluble. Se desproteinizaron 500 µL de este sobrenadante mediante su paso por columnas MWCO de 10 kDa *cut-off* para eliminar la enzima lactato deshidrogenasa y la fracción soluble se analizó utilizando el test colorimétrico *Lactate Assay Kit II* de Sigma siguiendo las instrucciones del fabricante. Con este propósito se cargaron placas de 96 pocillos con de 0,5 a 10 µl de muestra en un volumen final de 50 µl con una mezcla de reacción compuesta por tampón de ensayo, enzima y sustrato. La placa se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente protegida de la luz y se midió la absorbancia a 450 nm.

### 6.2 Lactato intracelular

El lactato intracelular se midió por cromatografía líquida de ultra-rendimiento de fase reversa y espectrometría de masas (UPLC-MS). Se realizó una extracción de

metabolitos mediante la lisis de las células con una mezcla metanol:acetonitrilo:agua (2:2:1, v/v/v). Se utilizaron  $2 \times 10^7$  CD por condición, que se lavaron con PBS por centrifugación, previamente a la adición de 1 ml de la mezcla anteriormente descrita. La incubación se mantuvo a 4°C y el homogeneizado celular se traspasó a tubos Eppendorf, se agitó en vortex durante 30 segundos y se congeló en nitrógeno líquido durante 1 minuto. Tras la descongelación a temperatura ambiente, las muestras se sonicaron durante 15 minutos a 4°C. Después de un segundo ciclo de congelación y sonicación el lisado se mantuvo a -20°C durante 1 hora y se centrifugó a 16000 x g durante 15 minutos a 4°C para su desproteización. El sobrenadante se evaporó a sequedad en un evaporador *SpeedVac* y el residuo sólido se solubilizó en una mezcla de acetonitrilo:agua (1:1, v/v). Posteriormente se sonicó durante 10 minutos a 4°C y se centrifugó a 16000 x g durante 15 minutos para eliminar el material insoluble. Finalmente, para el análisis por UPLC-MS, las muestras se volvieron a evaporar a sequedad y se resuspendieron en agua Milli-Q.

La separación cromatográfica se realizó con una columna Acquity CORTECS UPLC® C18, 1.6  $\mu\text{m}$ , 2.1x100 mm (Waters) conectada a una fuente de ionización por *electrospray* de un espectrómetro de masas Q-TOF SYNAPT HDMS G2 (Waters). El gradiente de elución se hizo con dos eluyentes agua:metanol:ácido fórmico (95:5:0,1, v/v/v) con 5 mM de formato de amonio y 100% acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico y 5 mM de formato de amonio.

El análisis de los espectros de masas se calculó en el modo ión negativo para los ácidos carboxílicos, método que permite la detección de analitos tanto de alta (escaneo completo) como de baja energía (energía de colisión) con una fragmentación parcial del ión.

## **7. Medida de los niveles de $\text{Ca}^{2+}$ intracelular**

Se adhirieron  $2 \times 10^5$  células a cristales de 12 mm de diámetro cubiertos de poliornitina y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con 4  $\mu\text{M}$  fura 2-acetoximetil ester (FURA-2) en un medio con la siguiente composición: 145 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM glucosa, y 10 mM HEPES, pH 7,4.

Posteriormente los cristales se lavaron con medio fresco y se montaron en un microscopio Nikon Diaphot. Las soluciones test se aplicaron por perfusión continua a 2-3 ml/minuto. Para las medidas de fluorescencia, las CD se epi-iluminaron alternativamente a 340 y 380 nm y se analizó la luz emitida a 520 nm utilizando la Cámara Digital Hamamatsu C4742-98 con el software Hamamatsu Simple PCI 6.6. Los fotogramas consecutivos obtenidos se cuantificaron pixel por pixel usando el *software ImageJ*.

## **8. Análisis estadístico**

Los datos obtenidos en al menos tres experimentos independientes se analizaron con el programa estadístico Prisma (*GraphPad Software*) y se representan como la media  $\pm$  error estándar de la media (EEM). La comparación entre dos grupos experimentales se llevó a cabo mediante el test *Student t-test* de dos colas. Las diferencias se consideraron significativas para un valor de  $p < 0,05$ .

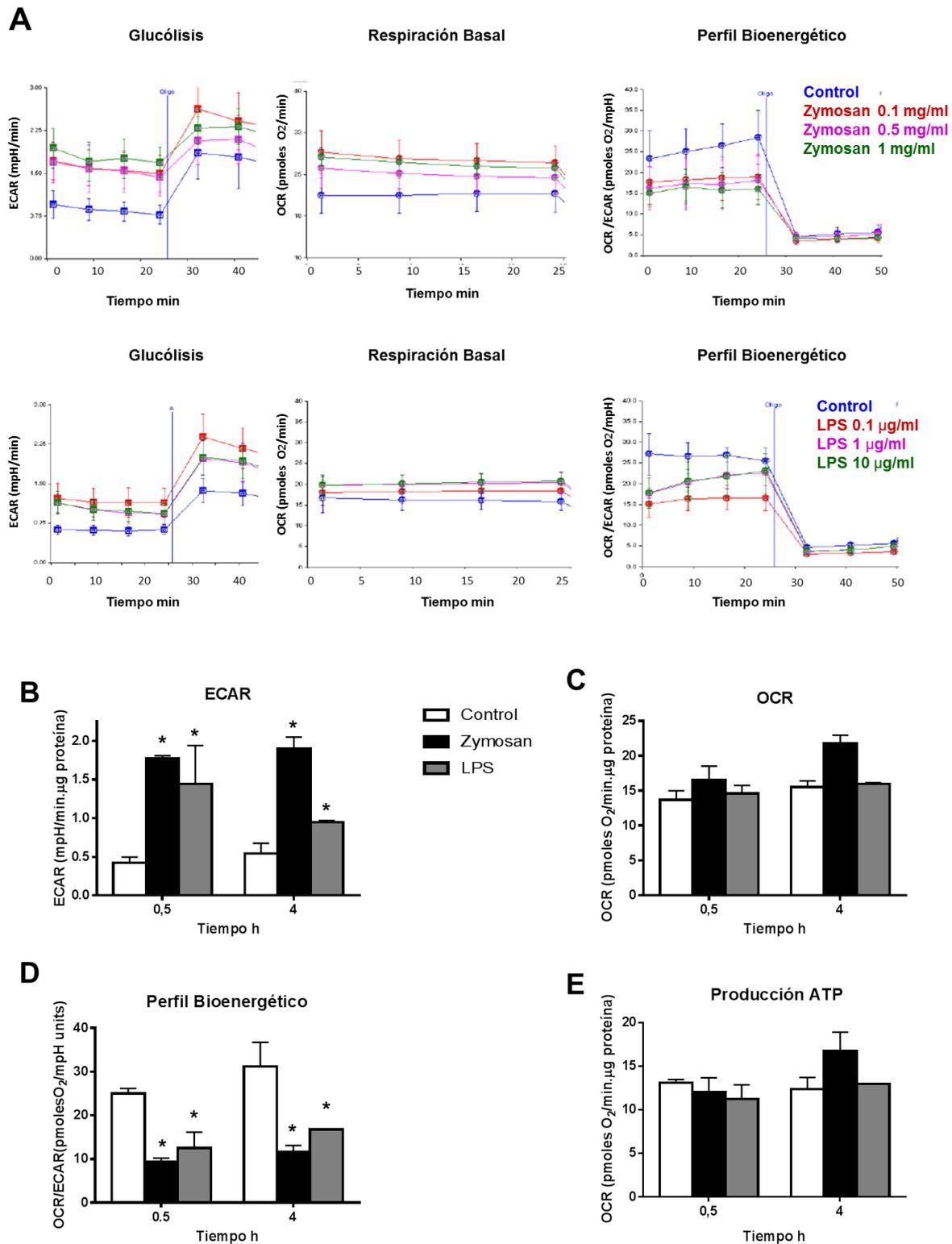


# Resultados



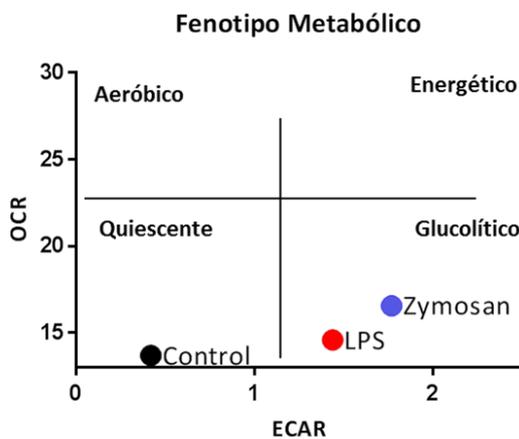
## 1. Reprogramación metabólica tras la estimulación de las células dendríticas

Con el fin de estudiar los cambios metabólicos, se realizaron mediciones en tiempo real del consumo de oxígeno y del pH del medio tras la estimulación de las CD con distintas concentraciones de *zymosan* y de LPS, utilizando el analizador de flujo extracelular *Seahorse* XFe24. Como se muestra en la Figura 14 (paneles B y C) ambos estímulos produjeron un incremento de la ECAR y, en el caso del *zymosan*, una tendencia al aumento de la OCR, especialmente tras 4 horas de estimulación. Este aumento fue similar con las distintas concentraciones de estímulo utilizadas (Figura 14 A) y se observó a partir de los 30 minutos de estimulación, lo que indica que el cambio en el perfil bioenergético caracterizado por una baja razón OCR/ECAR se produce rápidamente y en presencia de concentraciones reducidas de los estímulos (Figura 14 D). En concordancia con el aumento de la OCR inducida por el *zymosan*, el consumo de oxígeno destinado a la producción de ATP también tendió a aumentar a las 4 horas (Figura 14 E).



**Figura 14. Efecto del zymosan y del LPS sobre el metabolismo bioenergético de las células dendríticas.** (A) Registros del protocolo XF Mito Stress Test Kit obtenidos en CD estimuladas con distintas concentraciones de zymosan y de LPS. (B-E) Análisis de la ECAR y la OCR. Las CD se incubaron durante los tiempos indicados en presencia 1 mg/ml de zymosan o 10 µg/ml de LPS y se adhirieron a placas revestidas de poli-ornitina. Los datos se normalizaron en función de la cantidad de proteína y se representan como la media ± EEM de tres experimentos independientes.\* Indica  $p < 0.05$  con respecto al control.

El fenotipo metabólico, definido por la relación entre la OCR y la ECAR, se clasifica como quiescente, aeróbico, energético o glucolítico en función del predominio de la glucólisis o de la respiración mitocondrial, los resultados obtenidos muestran un fenotipo metabólico claramente desplazado hacia la zona glucolítica, asociado con una ligera desviación a la zona energética en el caso del *zymosan* (Figura 15).



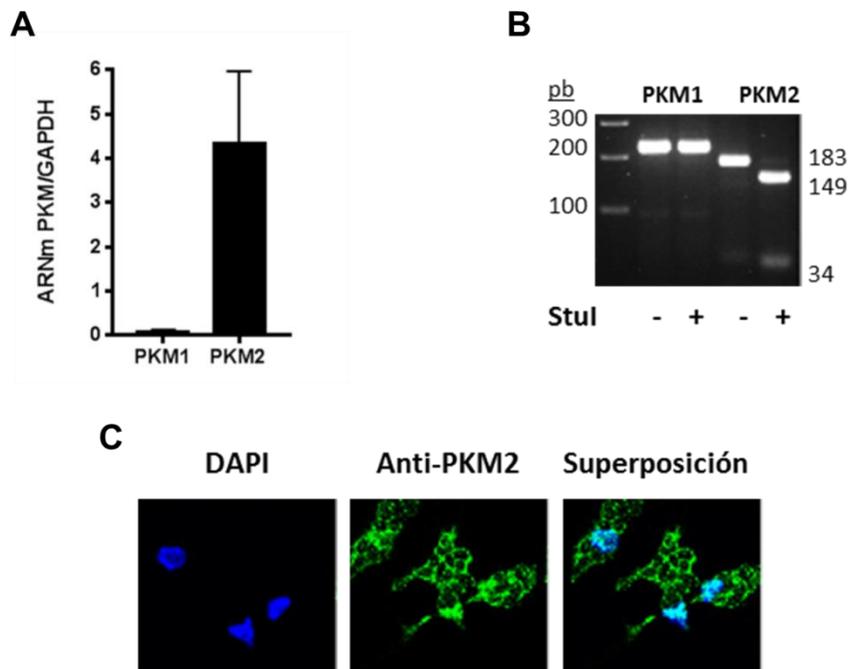
**Figura 15. Fenotipo metabólico de las células dendríticas.** Representación del fenotipo metabólico tras 30 minutos de estimulación con 1 mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS. Los resultados se representan como la media de tres experimentos independientes.

### 1.1 Análisis del mecanismo implicado en la reprogramación metabólica

Uno de los mecanismos que promueven el aumento de la glucólisis, incluso en situaciones de normoxia, es la activación del factor de transcripción HIF1. Esto se debe a la estabilización de su subunidad HIF1 $\alpha$  y a la subsiguiente inducción de la expresión de genes que codifican enzimas implicadas en la glucólisis. En macrófagos y algunos tipos de células tumorales la actividad de HIF1 $\alpha$  depende de la formación de un complejo en el núcleo con la PKM2. Asimismo, la PKM2 puede actuar como proteína quinasa y fosforilar STAT3 (Gao *et al.*, 2012), por lo que genera un bucle de retroalimentación positiva puesto que a su vez, P-Y705-STAT3 activa la transcripción de HIF1 $\alpha$  (Dang *et al.*, 2011; Shehade *et al.*, 2015). Sobre estas bases, se procedió a estudiar la posible participación de estas proteínas en la inducción de los cambios metabólicos.

Las distintas isoformas de la PKM catalizan el último paso de la glucólisis, consistente en la conversión del fosfoenolpiruvato en piruvato. En las células inmunes en reposo y en los tejidos diferenciados, esta reacción está mediada por PKM1. Sin embargo, durante la reprogramación metabólica que se produce en células inmunes activadas, la expresión de PKM1 puede disminuir en favor de PKM2. Con el fin de estudiar la expresión de las isoformas de *PKM* generadas por *splicing* alternativo de exones

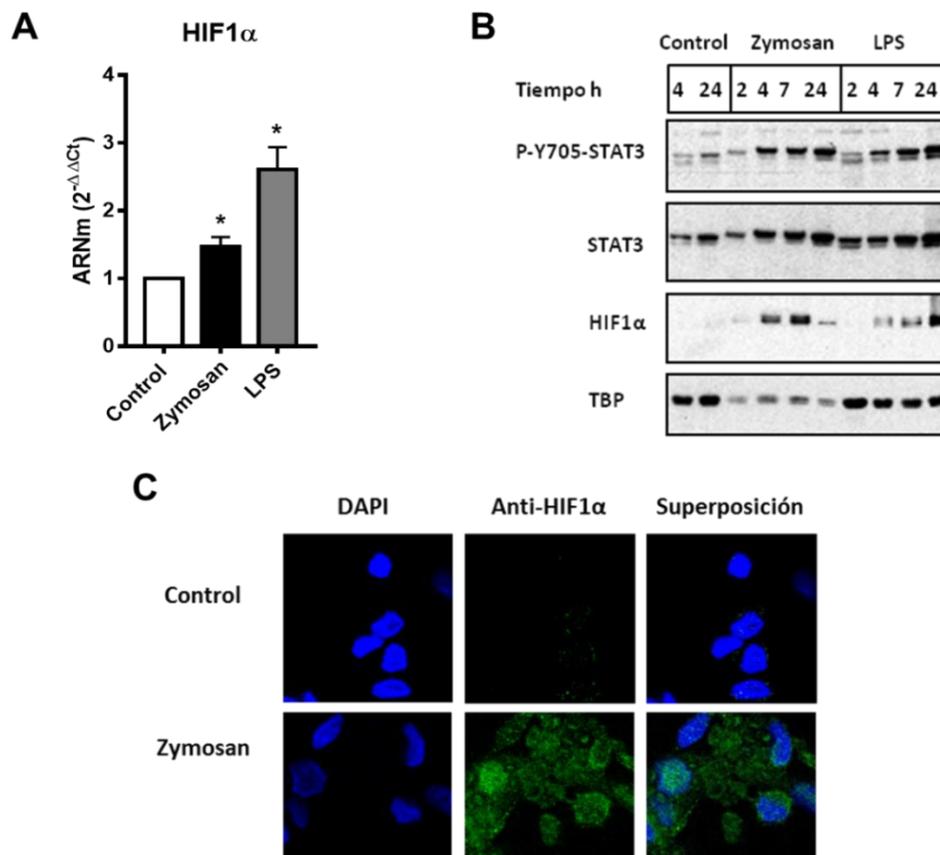
mutuamente excluyentes, se analizó su ARNm mediante qPCR con dos pares de cebadores que generan productos distinguibles por el número de pares de bases. Además, sus amplicones difieren en la presencia en el transcrito de *PKM2* de un sitio de restricción *StuI* que permite su digestión en dos productos de 149 pb y 34 pb. La normalización del ARNm de las isoformas de *PKM* con respecto a la *GAPDH* mostró una expresión preferencial del ARNm de *PKM2* frente a *PKM1* (Figura 16 A). La diferente migración de las dos isoformas y su distinta sensibilidad al tratamiento con *StuI* se muestran en la Figura 16 B. El estudio de la expresión de la proteína mediante microscopía confocal mostró una alta expresión de *PKM2* en el núcleo y en el citoplasma de las CD estimuladas con *zymosan* (Figura 16 C).



**Figura 16. Expresión de las isoformas de *PKM*.** (A y B) Tras 5 días de diferenciación en presencia de GM-CSF e IL-4 se extrajo el ARNm de las CDi y se analizó mediante qPCR. **(A)** Expresión del ARNm de las isoformas de *PKM* con respecto a la *GAPDH*. Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM de cuatro experimentos independientes. **(B)** Digestión por *StuI* del amplicon de *PKM2*. El resultado es representativo de cuatro experimentos independientes. **(C)** Imagen de microscopía de fluorescencia confocal de la enzima *PKM2*. Las células se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* durante 4 horas.

Con la intención de determinar los niveles de expresión de HIF1 $\alpha$  y la activación de STAT3, mediante la detección de la proteína fosforilada, se realizaron experimentos de qPCR y *Western Blot*. El *zymosan* y el LPS activaron la fosforilación de la tirosina 705 de STAT3 (Figura 17 B) y aumentaron la expresión del ARNm de HIF1 $\alpha$  y la

estabilización de la proteína (Figura 17 paneles A y B). El patrón temporal de fosforilación de STAT3 y de expresión de HIF1 $\alpha$  fue diferente para cada estímulo (Figura 17 B). En el caso del *zymosan* se apreció una clara fosforilación de STAT3 a las 4 horas que coincidió con la detección de HIF1 $\alpha$  a ese tiempo, aunque la expresión de HIF1 $\alpha$  alcanzó una mayor intensidad a las 7 horas, para disminuir posteriormente. En el caso del LPS, la fosforilación de STAT3 a las 4 horas fue menos evidente, al igual que la expresión de HIF1 $\alpha$  que alcanzó su máximo nivel de expresión a las 24 horas. La estabilización y translocación nuclear de HIF1 $\alpha$  en respuesta al *zymosan* se confirmó mediante estudios de inmunofluorescencia de microscopía confocal (Figura 17 C).

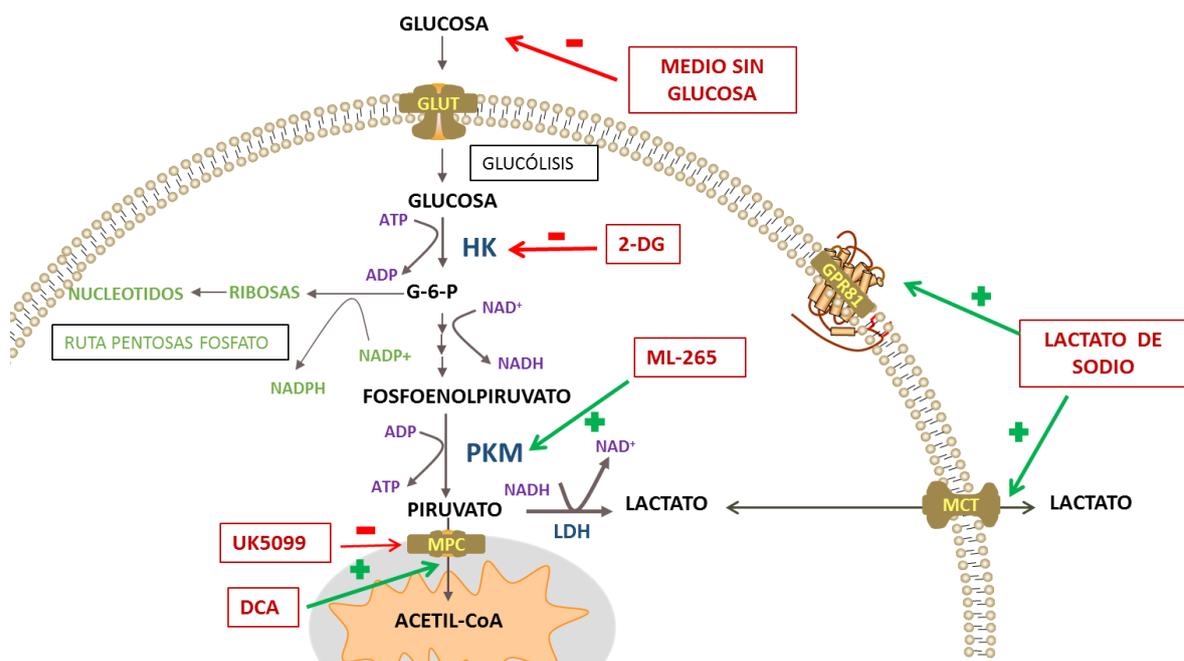


**Figura 17. Expresión de HIF1 $\alpha$  y fosforilación de STAT3.** Las CD se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS durante 4 horas (A y C) o los tiempos indicados (B). **(A)** Análisis de la inducción del ARNm de HIF1 $\alpha$  mediante qPCR. Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM de cinco experimentos independientes.\* Indica  $p < 0,05$  con respecto al control. **(B)** Expresión de HIF1 $\alpha$  y fosforilación de STAT3 en fracciones nucleares. Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot*. Se utilizó la proteína de unión a la caja TATA (TBP) como control de carga. El resultado es representativo de dos experimentos independientes. **(C)** Imagen de microscopía de fluorescencia confocal del factor de transcripción HIF1 $\alpha$ .

Tomados en conjunto, estos resultados muestran la presencia de estas proteínas en los núcleos de las CD estimuladas con *zymosan* y LPS. A pesar de que el patrón temporal de la estabilización de HIF1 $\alpha$  no explicaría los cambios en el perfil bioenergético que se observan a los 30 minutos, los resultados sugieren una posible implicación en el mantenimiento del mismo.

## 2. Modulación del metabolismo de la glucosa y regulación transcripcional de la producción de citoquinas en células dendríticas

El cambio más significativo que se encontró en el metabolismo de las CD estimuladas por PAMP fue el aumento de la ECAR que se explica por el incremento de la concentración de lactato extracelular como consecuencia del aumento de la glucólisis aerobia (Krawczyk *et al.*, 2010; Everts *et al.*, 2012; Kelly y O'Neill, 2015). Por este motivo se decidió realizar experimentos de modulación del flujo glucolítico con el fin de modificar los niveles de lactato y analizar su posible papel sobre la expresión de citoquinas, prestando especial atención a la citoquina IL-23. En la Figura 18 se muestra el esquema del mecanismo de actuación de algunos de los compuestos utilizados con este fin.



**Figura 18. Esquema del abordaje farmacológico empleado para modular el metabolismo de la glucosa.** Con el fin de inhibir el flujo glucolítico se utilizaron medio sin glucosa y el inhibidor de la hexoquinasa, 2-DG. El compuesto ML-265 actúa reforzando la forma tetramérica de la enzima PKM y aumentando su actividad glucolítica. El compuesto UK5099 inhibe el transportador mitocondrial de piruvato y bloquea el flujo de piruvato a la mitocondria, mientras que el DCA inhibe la piruvato deshidrogenasa quinasa, por lo que favorece la activación de la piruvato deshidrogenasa. El lactato de sodio puede aumentar las concentraciones intracelulares de lactato a través del transportador de monocarboxilatos y también puede activar el receptor GPR81.

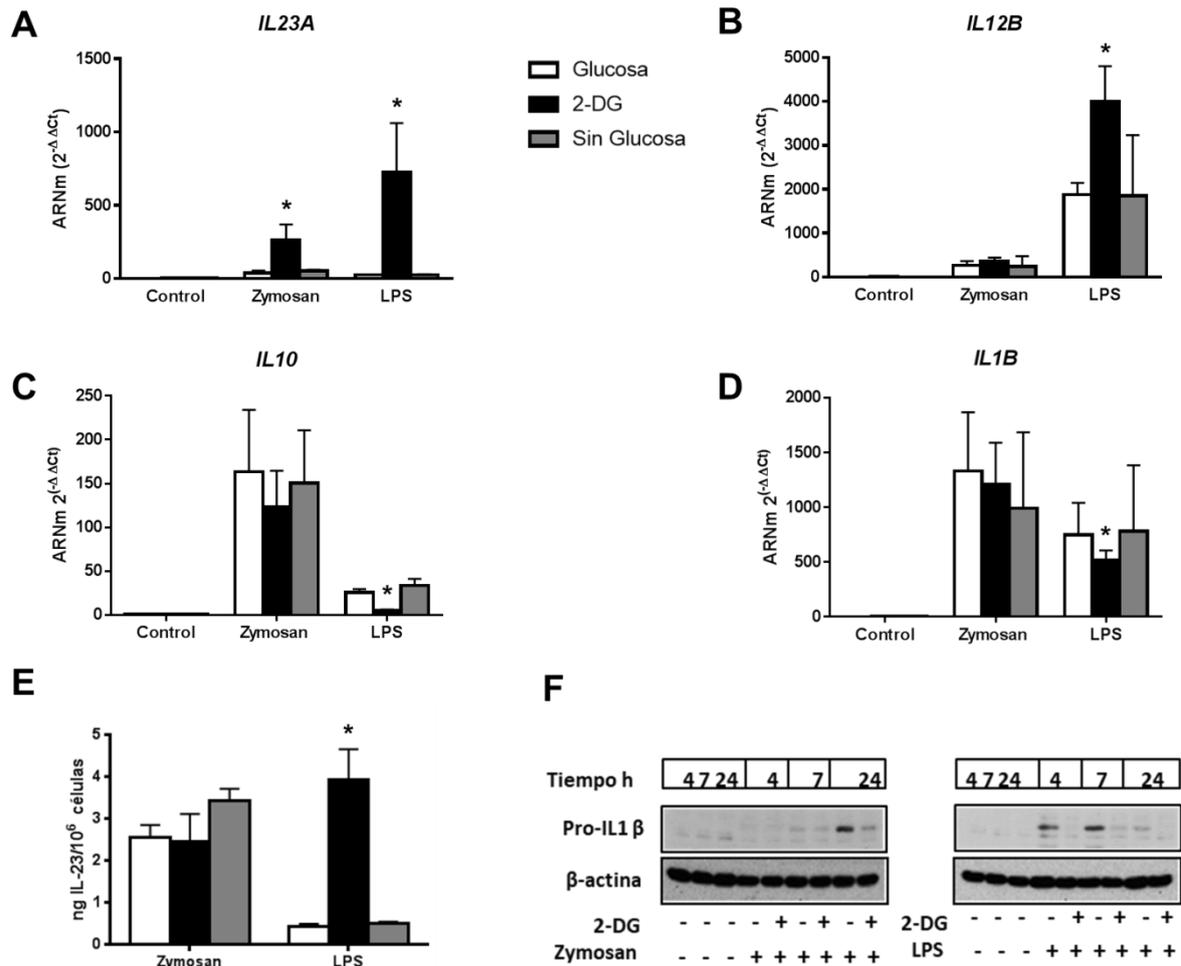
## 2.1 Efectos de la privación de glucosa

Con este propósito se utilizaron medio sin glucosa y 2-DG, un inhibidor de la HK y de la fosfoglucoasa isomerasa ampliamente utilizado para simular las condiciones de privación de glucosa en algunos procesos metabólicos.

- **Expresión de citoquinas**

Se analizó la transcripción del ARNm de la cadena p19 de la citoquina IL-23 (gen *IL23A*). La pre-incubación con 2-DG indujo un aumento significativo del transcrito mientras que la ausencia de glucosa en el medio no mostró ningún efecto (Figura 19 A). Este incremento de los niveles de ARNm sólo coincidió con el aumento de la cantidad de proteína, medida en los sobrenadantes, en respuesta al LPS (Figura 19 E). Una explicación plausible de estos resultados es que la IL-23 es una citoquina heterodimérica que incluye la cadena p40 (gen *IL12B*), por lo que la producción de la proteína depende también de la expresión de la cadena p40. En este sentido, el *zymosan* induce una escasa expresión de IL-12 p40 (Rodríguez *et al.*, 2014), mientras que el LPS es un potente inductor de la expresión de la cadena p40 (Figura 19 B). El hecho de que la disponibilidad de la cadena común p40 es un factor limitante para la secreción de la citoquina, junto a la elevada producción de IL-23 inducida por el *zymosan* (alcanzando casi los 4 ng por millón de células), pueden explicar la incapacidad de las CD para generar una mayor cantidad de IL-23 en respuesta al *zymosan* y la discordancia observada entre los niveles de proteína y ARNm.

Ni la privación de glucosa, ni la adición de 2-DG influyeron sobre la inducción del ARNm de las citoquinas IL-10 e IL-1 $\beta$  en respuesta al *zymosan*. Sin embargo, la 2-DG en combinación con el LPS produjo una disminución de los transcritos de ambas citoquinas, en especial de la IL-10 (Figura 19 paneles C y D). La IL-1 $\beta$  se produce en forma de un precursor inactivo (pro-IL-1 $\beta$ ) que debe sufrir un procesamiento enzimático para producir la proteína activa. Como se muestra en la Figura 19 F, el *zymosan* y el LPS indujeron la expresión de pro-IL-1 $\beta$  pero con patrones temporales diferentes, siendo mucho más temprana la aparición de la proteína en respuesta al LPS (4 horas) que al *zymosan* (24 horas). La pre-incubación de las CD con 2-DG abolió la expresión de pro-IL-1 $\beta$  en ambos casos.

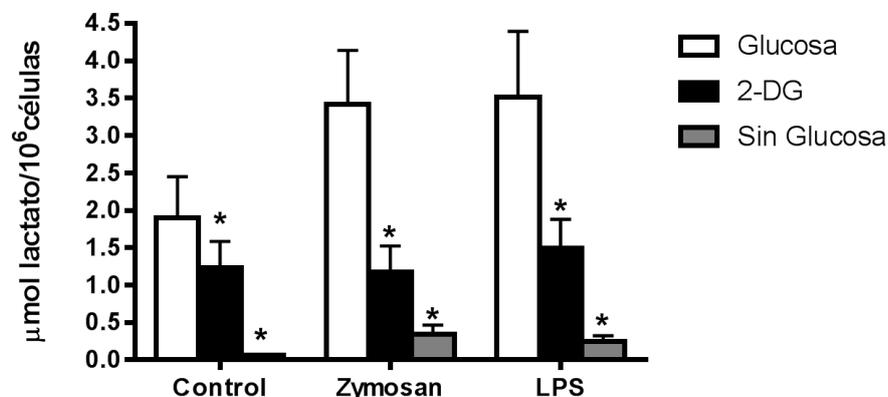


**Figura 19. Efecto de la 2-DG y de la privación de glucosa sobre la expresión de citoquinas.** Las CD se pre-incubaron en presencia de glucosa (11,1 mM), ausencia de glucosa o en presencia de 2-DG (10 mM) y glucosa durante 1 hora. **(A-D)** Análisis de la inducción del ARNm de distintas citoquinas mediante qPCR. Tras la pre-incubación las CD se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* o 10 µg/ml de LPS durante 4 horas. **(E)** Producción de IL-23. Tras la pre-incubación las CD se estimularon con *zymosan* o LPS durante 24 horas a las concentraciones anteriormente indicadas y se midió por ELISA la cantidad de IL-23 presente en los sobrenadantes. Los datos se normalizaron en función del número de células. Los resultados se representan como la media ± EEM de tres a diez experimentos independientes.\* Indica p<0.05 con respecto a la glucosa. **(F)** Expresión de pro-IL1β. Tras la pre-incubación las CD se estimularon con *zymosan* o LPS durante los tiempos señalados a las concentraciones anteriormente indicadas. Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot*. Se utilizó la β-actina como control de carga. El resultado es representativo de dos experimentos independientes.

- **Producción de lactato**

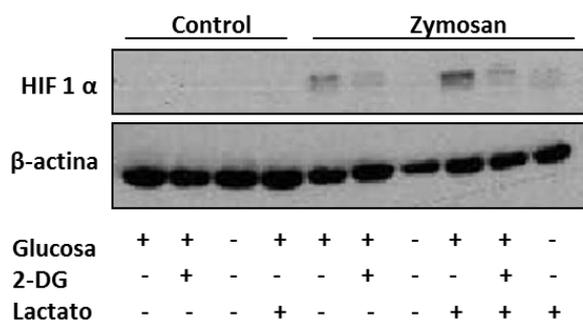
A la vista del distinto efecto producido por la privación de glucosa y la incubación con 2-DG y con el fin de determinar el modo en que estas condiciones afectaban al flujo glucolítico, se analizaron los niveles de lactato en los sobrenadantes. Como se

muestra en la Figura 20, el incremento de los niveles de lactato inducidos por el *zymosan* y el LPS disminuyó intensamente en ausencia de glucosa y en menor medida en presencia de 2-DG.



**Figura 20. Efecto de la 2-DG y de la privación de glucosa sobre la producción de lactato.** Las CD se pre-incubaron en presencia de glucosa (11,1 mM), ausencia de glucosa o en presencia de 2-DG (10 mM) y glucosa durante 1 hora y posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* o 10 µg/ml de LPS durante 24 horas. La producción de lactato se midió en los sobrenadantes mediante un *kit* comercial y se normalizó en función del número de células. Los resultados se representan como la media ± EEM de tres experimentos independientes.\* indica  $p < 0.05$  con respecto a la glucosa.

Además de regular la expresión de enzimas de la glucólisis, HIF1 $\alpha$  se ha relacionado con la producción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos (Tannahill *et al.*, 2013) y se ha descrito que su estabilización se regula por los niveles de lactato en monocitos (Wei *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2016). Por este motivo se estudió su expresión en las distintas condiciones. La privación de glucosa y la presencia de 2-DG disminuyeron la expresión de HIF1 $\alpha$  inducida por el *zymosan*, siendo este efecto revertido por el lactato de sodio (Figura 21).

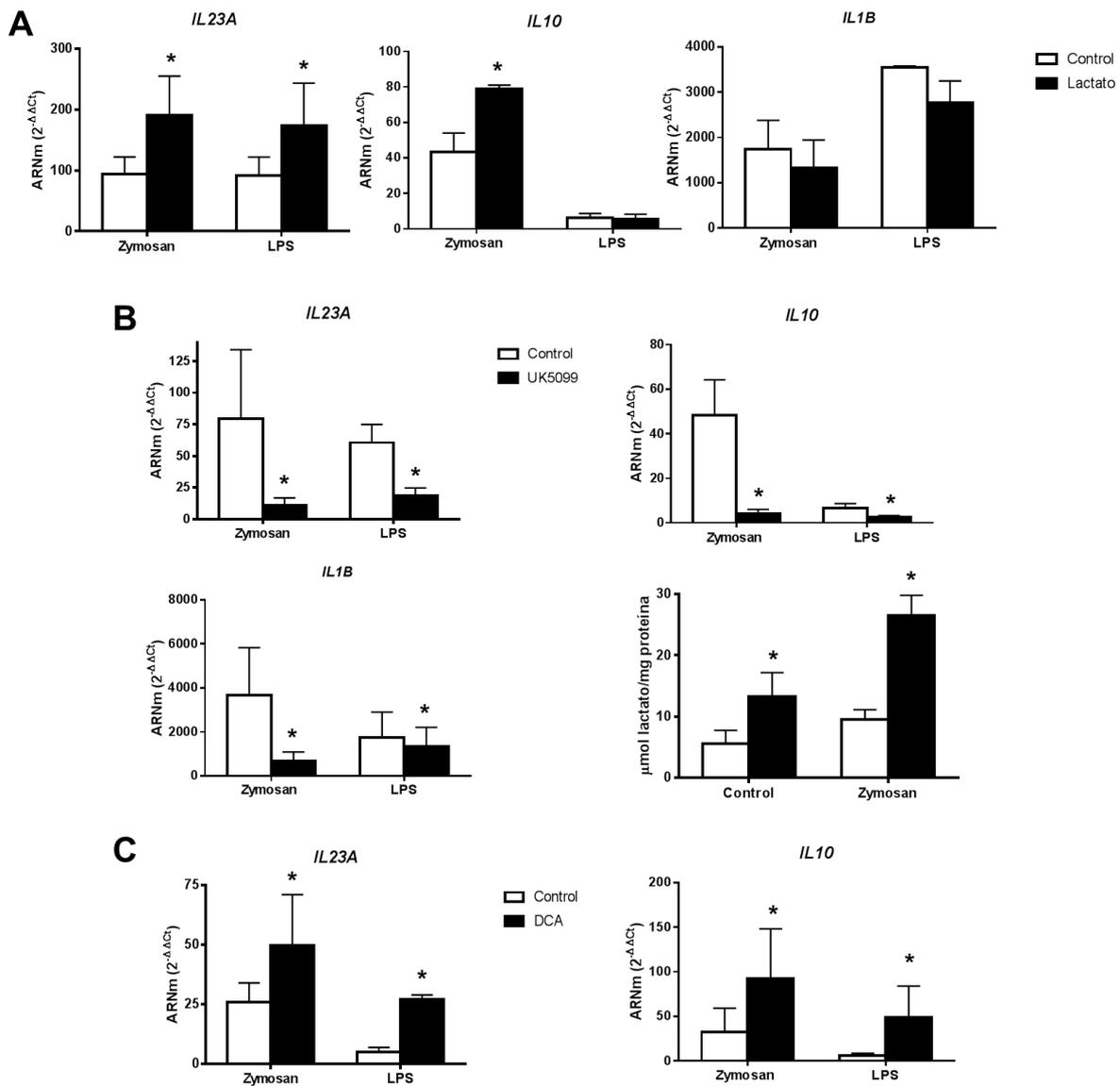


**Figura 21. Efecto de la 2-DG y de la privación de glucosa sobre la expresión de HIF1 $\alpha$ .** Las CD se pre-incubaron durante 1 hora con las adiciones indicadas a las siguientes concentraciones: glucosa 11,1 mM, 2-DG 10 mM y lactato de sodio 15 mM. Posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* durante 4 horas y los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot*. Se utilizó la  $\beta$ -actina como control de carga. El resultado es representativo de dos experimentos independientes.

- **Efecto del lactato de sodio y de la modulación del flujo de piruvato**

Para analizar el efecto del lactato sobre la expresión de citoquinas se adicionó lactato de sodio y se bloqueó la entrada de piruvato a la mitocondria con el inhibidor del transportador mitocondrial de piruvato UK5099.

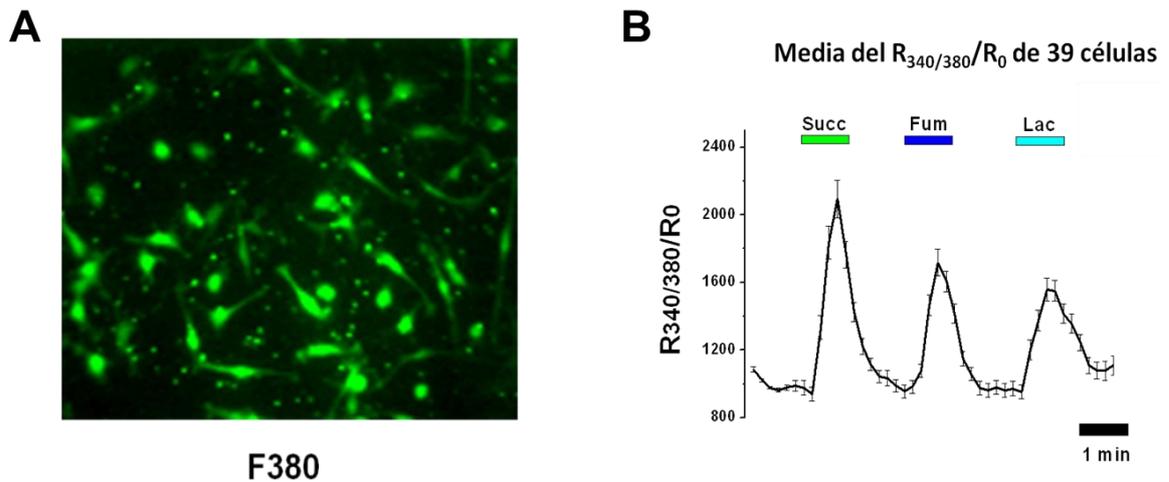
La adición de lactato de sodio tuvo efectos diferentes en función del estímulo utilizado. Produjo el aumento del ARNm de *IL23A* e *IL10* y una tendencia a disminuir el ARNm de *IL1B* en respuesta al *zymosan*. En el caso del LPS se observó un aumento de la transcripción de *IL23A* y no se observó efecto significativo sobre la inducción de las otras citoquinas (Figura 22 A). De forma opuesta, el compuesto UK5099 redujo la transcripción de todas las citoquinas, especialmente en respuesta al *zymosan* a pesar de aumentar la concentración de lactato intracelular (Figura 22 B), lo que pone de manifiesto la importancia de la entrada de piruvato a la mitocondria. De acuerdo con este resultado, la pre-incubación de las células con DCA, un compuesto que favorece la actividad de la piruvato deshidrogenasa al inhibir la actividad de la piruvato deshidrogenasa quinasa (Patel y Korotchkina 2006) y que aumenta la actividad del ciclo de Krebs y el flujo de piruvato a la mitocondria (Kaplon *et al.*, 2013; Meiser *et al.*, 2016) indujo un aumento del ARNm de *IL23A* e *IL10* (Figura 22 C).



**Figura 22. Efecto del lactato de sodio, del UK5099 y del DCA sobre la transcripción de citoquinas.** Las CD se pre-incubaron en presencia de lactato de sodio (15 mM) durante 1 hora, UK5099 (50 μM) o DCA (5 mM) durante 30 minutos y posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* o 10 μg/ml de LPS durante 4 horas o 30 minutos (B panel inferior derecho). **(A, B y C)** Análisis de la inducción del ARNm de distintas citoquinas mediante qPCR. **(B panel inferior derecho)** Niveles de lactato intracelular medidos por UPLC-MS y normalizados en función de la cantidad de proteína. Los resultados se representan como la media ± EEM de tres a cuatro experimentos independientes.\* Indica p<0.05.

Se ha descrito que las células del sistema inmune, además del transportador de monocarboxilatos, que es el utilizado por el lactato, también poseen un receptor acoplado a proteínas G, GPR81, que reconoce el lactato (Haas *et al.*, 2016). La activación de este receptor produce el aumento del inositoltrisfosfato e inhibe la

adenilato ciclasa a través de una ruta de señalización que incluye proteínas  $G_{\alpha i}$  (Ge *et al.*, 2008). Con el fin de determinar si la adición de lactato de sodio conduce a la activación de este receptor en células dendríticas, se realizaron experimentos con el sensor ratiométrico de calcio intracelular FURA2. La adición de lactato aumentó la razón de fluorescencia confirmando de esta forma la funcionalidad de este receptor y la actividad de esta ruta en las CD (Figura 23).



**Figura 23. Efecto del lactato de sodio sobre la concentración intracelular de calcio.** Las CD se adhirieron a placas de poli-ornitina y se marcaron con fura 2 acetoxi-metil-ester ( $4 \mu\text{M}$ ) durante 1 hora. **(A)** Imagen tomada del microscopio Nikon Diaphot con las células epi-iluminadas a 380 nm. **(B)** Razón de fluorescencia generada por la perfusión de las adiciones indicadas. Succinato ( $0,5 \text{ mM}$ ) (Succ), fumarato ( $0,5 \text{ mM}$ ) (Fum), lactato ( $15 \text{ mM}$ ) (Lac).

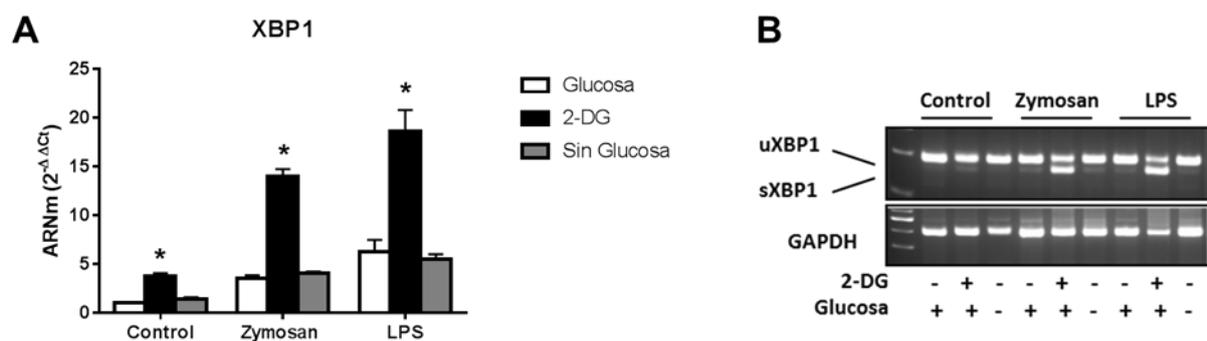
Estos resultados indican que existen receptores en las CD que reconocen como ligandos a intermediarios metabólicos de la glucólisis y del ciclo de Krebs, aunque no sea posible discriminar que parte del efecto pueda explicarse por la señalización de los receptores, frente al efecto dependiente de la entrada de lactato por el transportador de monocarboxilatos.

- **Implicación de la respuesta a proteínas mal plegadas: el papel de la rama IRE**

A la vista de que los resultados obtenidos no se podían explicar simplemente por las variaciones en los niveles de lactato generadas por el bloqueo del metabolismo de la glucosa, se estudiaron otros efectos de la 2-DG. La 2-DG, además de ser un mimético de la glucosa, es el producto resultante de la pérdida del grupo hidroxilo anclado al

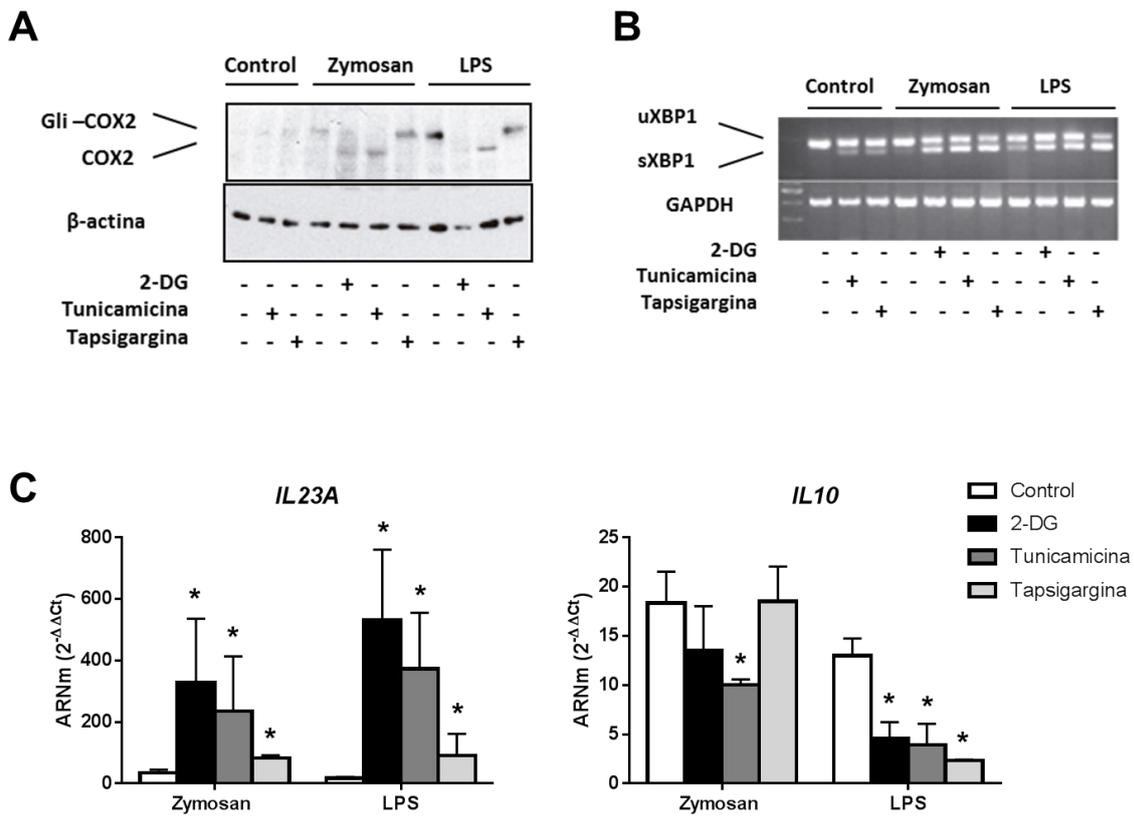
carbono-2 de la manosa por ello puede interferir en todas las reacciones que utilizan, además de glucosa, manosa como sustrato incluidas las N-glicosilaciones de proteínas, por lo que es razonable postular que este compuesto podría desencadenar el estrés del retículo endoplasmático y activar la UPR.

La activación del factor de transcripción XBP1 de la rama IRE de la UPR depende de la actividad endonucleasa de IRE1 $\alpha$ , que tras ser activada por fosforilación en condiciones de estrés, escinde 26 pb del ARNm inicial de XBP1 para que se traduzca la proteína activa (Calfon *et al.*, 2002). Para analizar la activación de la rama IRE, se estudió el *splicing* del ARNm de XBP1 mediante una reacción de qPCR con cebadores que amplifican la forma con *splicing* y la intacta. La Figura 24 A muestra como la pre-incubación de las células con 2-DG aumentó el ARNm de XBP1 de manera más significativa cuando las células se estimularon posteriormente con *zymosan* o LPS. Para analizar el *splicing* de XBP1, se realizó una electroforesis en gel de agarosa con el producto de amplificación de la qPCR que determinó que la pre-incubación de las células con 2-DG sólo generó un *splicing* evidente de XBP1 cuando se utilizó en combinación con los PAMP, como indica la aparición de la intensa banda sXBP1 (Figura 24 B). Por el contrario, la ausencia de glucosa en el medio no tuvo ningún efecto ni sobre la transcripción, ni sobre el *splicing* de XBP1.



**Figura 24. Efecto de la privación de glucosa y de la 2-DG sobre la transcripción y el *splicing* de XBP1.** Las CD se pre-incubaron en presencia de glucosa (11,1 mM), ausencia de glucosa o en presencia de 2-DG (10 mM) y glucosa durante 1 hora y posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS durante 4 horas. **(A)** Análisis de la inducción del ARNm de XBP1 mediante qPCR. Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM de cuatro experimentos independientes.\* Indica  $p < 0.05$  con respecto a la glucosa. **(B)** Análisis del *splicing* de XBP1. Tras realizar una qPCR con cebadores que abarcan las regiones sin el *splicing* se realizó una electroforesis en gel de agarosa con los productos de amplificación. *uXBP1* indica la forma sin *splicing*, *sXBP1* indica la forma con *splicing*. Se utilizó la expresión de *GAPDH* como control de carga. El resultado es representativo de cuatro experimentos independientes.

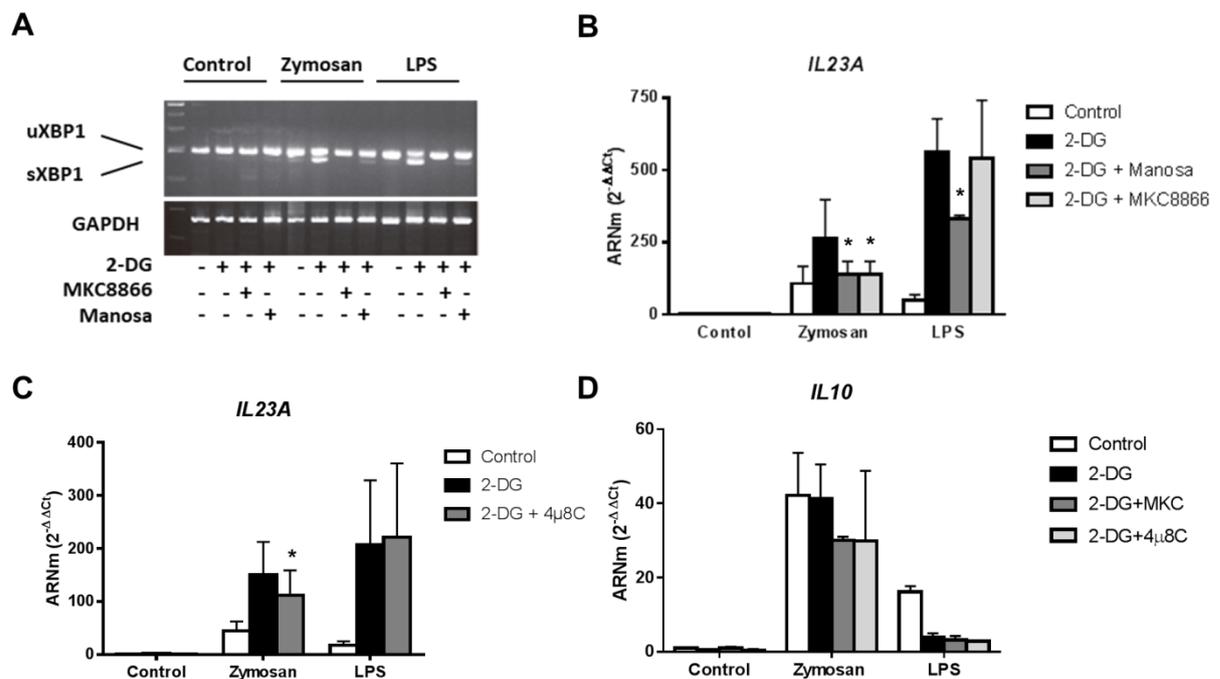
Con el fin de analizar estos resultados en el contexto de la UPR, se indujo estrés de retículo con compuestos que inducen la UPR por distintos mecanismos: la tunicamicina, un potente inhibidor de las N-glicosilaciones, y la tapsigargina que inhibe la ATPasa de calcio del retículo endoplasmático (SERCA) y genera estrés al modificar las concentraciones de calcio intracelular, pero que no influye en las reacciones de N-glicosilación. Para determinar el efecto de estos compuestos sobre la glicosilación de proteínas, se eligió la ciclooxigenasa 2 (COX2), como un representante característico de las posibles alteraciones en la N-glicosilación. La COX2 es una enzima que posee cuatro asparaginas glicosiladas, tres de las cuales se encuentran en su centro activo y son necesarias para su correcto plegamiento y actividad catalítica (Otto, DeWitt y Smith, 1993). La enzima completamente glicosilada posee una masa de 76 kDa y la forma no glicosilada en los residuos Asn 68, Asn 144 y Asn 410, presenta una masa molecular de 68 kDa. Como se observa en la Figura 25 A y en concordancia con la bibliografía (Yu y Kim, 2010) el pre-tratamiento de las células dendríticas con 2-DG y tunicamicina redujo la N-glicosilación de COX-2, produciendo un cambio en la migración de esta proteína, detectable por *Western Blot*, mientras que la tapsigargina no mostró ningún efecto. Sin embargo, los tres compuestos indujeron un gran *splicing* de *XBPI*, especialmente en presencia de los PAMP, lo que confirma la activación de la rama IRE de la UPR (Figura 25 B). Además, estos compuestos ofrecieron resultados similares a los generados por la 2-DG en combinación con los PAMP en cuanto a la transcripción de citoquinas, ya que tanto la pre-incubación de las CD con tunicamicina como con tapsigargina aumentaron los niveles del ARNm de *IL23A* cuando las células se estimularon con *zymosan* o LPS y redujeron los niveles de ARNm de IL-10 en respuesta al LPS (Figura 25 C).



**Figura 25. Efecto de la 2-DG, la tunicamicina y la taptigargin sobre la glicosilación de COX2, el *splicing* de XBP1 y la transcripción de citoquinas.** Las CD se pre-incubaron en presencia de 2-DG (10 mM), tunicamicina (10  $\mu$ M) o taptigargin (1  $\mu$ M) durante 1 hora y posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS durante 4 horas. **(A)** Análisis de la glicosilación de COX2. Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot*. Gli-COX2 indica la forma glicosilada. Se utilizó la  $\beta$ -actina como control de carga. El resultado es representativo de dos experimentos independientes. **(B)** Análisis del *splicing* de XBP1. Tras realizar una qPCR con cebadores que abarcan las regiones sin el *splicing* se realizó una electroforesis en gel de agarosa con los productos de amplificación. uXBP1 indica la forma sin *splicing*, sXBP1 indica la forma con *splicing*. Se utilizó la expresión de la GAPDH como control de carga. El resultado es representativo de tres experimentos independientes. **(C)** Análisis de la inducción del ARNm de *IL23A* e *IL10* mediante qPCR. Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM de tres a cuatro experimentos independientes. \* Indica  $p < 0.05$  con respecto al control.

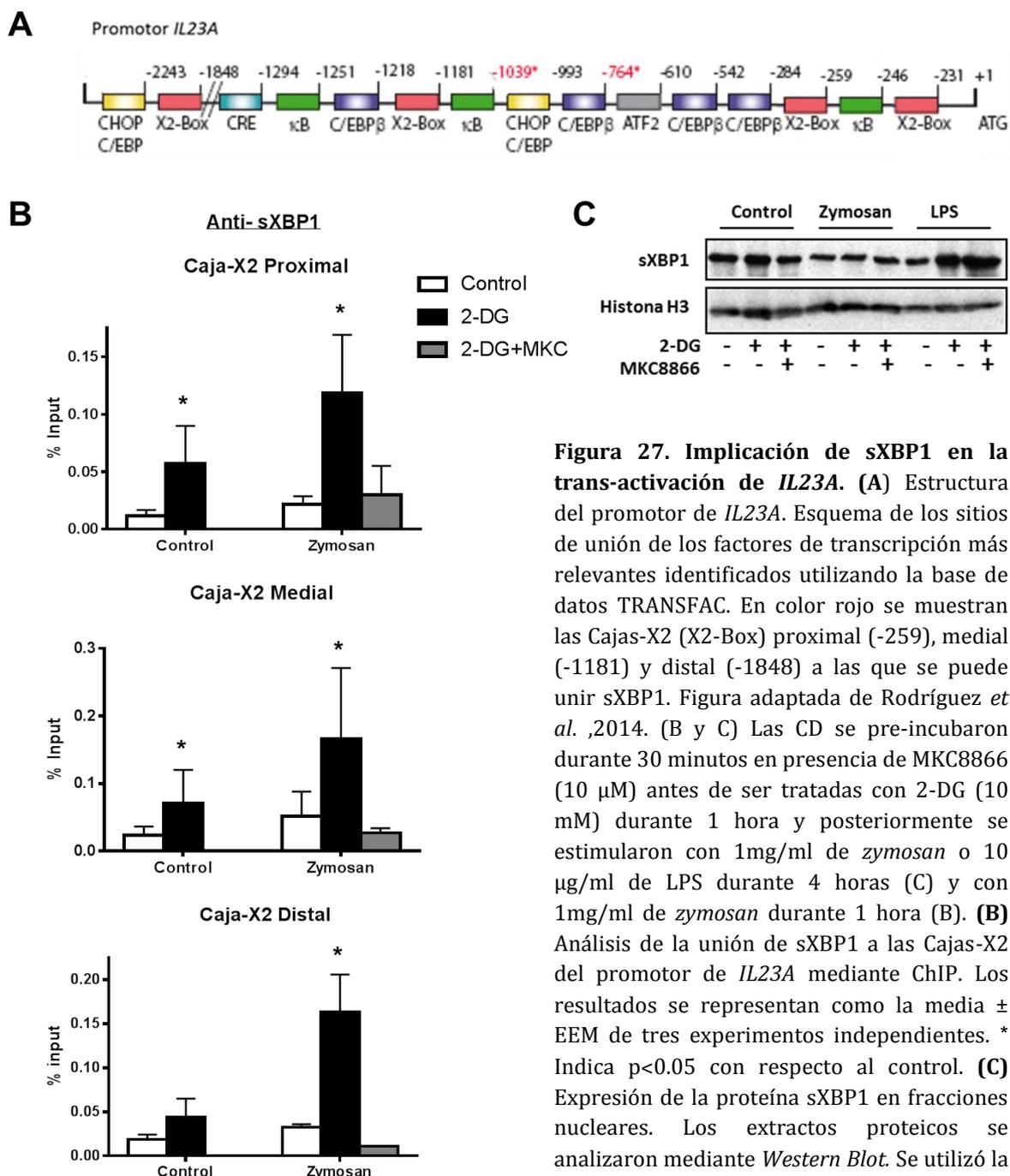
Los resultados anteriores mostraban una posible relación entre la transcripción de *IL23A* e *IL10* y la forma procesada de XBP1, por ello se llevaron a cabo experimentos de qPCR utilizando inhibidores de la actividad endonucleasa de IRE1 $\alpha$  y suplementos de manosa, con intención de revertir el impacto de la 2-DG sobre el *splicing* de XBP1 y valorar los efectos sobre la transcripción de estas citoquinas. La adición de manosa y el inhibidor de la actividad endonucleasa de IRE1 $\alpha$ , MKC8866, bloquearon el *splicing* del ARNm de XBP1 producido por la 2-DG en combinación con los PAMP, como indica la desaparición de la banda de la forma con *splicing* de XBP1 (Figura 26 A). El pre-

tratamiento de las células con estos compuestos revirtió el efecto de la 2-DG sobre la transcripción de *IL23A* en respuesta al *zymosan*, puesto que los niveles de ARNm fueron similares a los inducidos por la estimulación de las CD con *zymosan* en ausencia de 2-DG (Figura 26 B). El resultado con el LPS fue diferente, ya que dos inhibidores de la actividad endonucleasa de IRE1 $\alpha$  con distinta estructura química, MKC8866 y 4 $\mu$ 8C no inhibieron el incremento del ARNm de *IL23A* causado por la 2-DG (Figura 26 paneles B y C). Asimismo, se observó la ausencia de efecto del pre-tratamiento con 2-DG sobre la transcripción de *IL10* inducida por el *zymosan*, ya que los niveles de ARNm de esta citoquina no se modificaron en estas condiciones. Ninguno de los dos inhibidores de IRE1 $\alpha$  tuvo efecto sobre la disminución de la transcripción de *IL10* observada en el sistema 2-DG-LPS (Figura 26 D). Estos resultados sugieren la implicación de mecanismos diferentes para la modificación del patrón de citoquinas generado por la 2-DG en función de la naturaleza del PAMP.



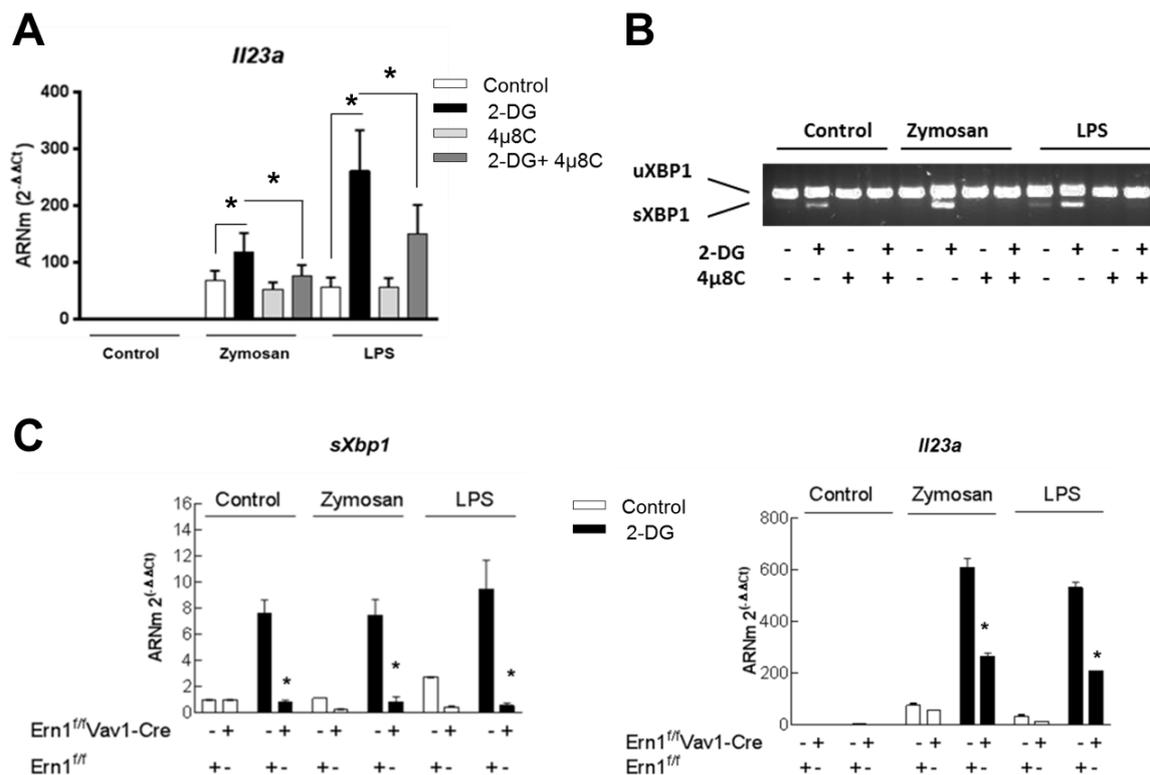
**Figura 26. Efecto de los inhibidores de IRE1 $\alpha$  y de la adición de manosa sobre el *splicing* de *XBP1* y la transcripción de citoquinas.** Las CD se pre-incubaron durante 30 minutos en presencia de MKC8866 (10  $\mu$ M), manosa (1 mM) o 4 $\mu$ 8C (10  $\mu$ M) antes de ser tratadas con 2-DG (10 mM) durante 1 hora y posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS durante 4 horas. **(A)** Análisis del *splicing* de *XBP1*. Tras realizar una qPCR con cebadores que abarcan las regiones sin el *splicing* se realizó una electroforesis en gel de agarosa con los productos de amplificación. *uXBP1* indica la forma sin *splicing*, *sXBP1* indica la forma con *splicing*. Se utilizó la expresión de *GAPDH* como control de carga. El resultado es representativo de tres experimentos independientes. **(B, C y D)** Análisis de la inducción del ARNm de *IL23A* e *IL10* mediante qPCR. Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM de tres a cuatro experimentos independientes. \* Indica  $p < 0.05$  con respecto a la 2-DG.

Además de los estudios de expresión de ARNm, se analizó mediante *Western Blot* la expresión de la proteína sXBP1. Esta se detectó en el núcleo de las CD sin estimular y, aunque pareció aumentar en combinación con la 2-DG con respecto al LPS, no sufrió grandes variaciones con los distintos pre-tratamientos (Figura 27 C). Teniendo en cuenta que estudios bioinformáticos previos mostraban la presencia de Cajas-X2 en el promotor de *IL23A* identificados con la base de datos TRANSFAC (Rodríguez *et al.*, 2014) (Figura 27 A), y que se ha descrito que XBP1 juega un papel en la regulación de diversas dianas que exhiben estas secuencias (Acosta-Alvear *et al.*, 2007), se realizaron estudios de inmunoprecipitación de cromatina para valorar la unión directa de sXBP1 a estas secuencias. La simple pre-incubación de las células con 2-DG aumentó la unión de sXBP1 a las tres Cajas-X2 que se analizaron y esta unión fue mayor cuando se estimularon las células con *zymosan*. Este efecto fue revertido por el inhibidor de la actividad endonucleasa de IRE1 $\alpha$  MKC8866 (Figura 27 B). El LPS mostró una tendencia a aumentar la unión de sXBP1 a la Caja-X2 distal y el pre-tratamiento de las CD con 2-DG no ofreció grandes variaciones al utilizar este estímulo (datos no mostrados).



**Figura 27. Implicación de sXBP1 en la trans-activación de *IL23A*.** (A) Estructura del promotor de *IL23A*. Esquema de los sitios de unión de los factores de transcripción más relevantes identificados utilizando la base de datos TRANSFAC. En color rojo se muestran las Cajas-X2 (X2-Box) proximal (-259), medial (-1181) y distal (-1848) a las que se puede unir sXBP1. Figura adaptada de Rodríguez *et al.*, 2014. (B y C) Las CD se pre-incubaron durante 30 minutos en presencia de MKC8866 (10  $\mu$ M) antes de ser tratadas con 2-DG (10 mM) durante 1 hora y posteriormente se estimularon con 1mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS durante 4 horas (C) y con 1mg/ml de *zymosan* durante 1 hora (B). (B) Análisis de la unión de sXBP1 a las Cajas-X2 del promotor de *IL23A* mediante ChIP. Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM de tres experimentos independientes. \* Indica  $p < 0.05$  con respecto al control. (C) Expresión de la proteína sXBP1 en fracciones nucleares. Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot*. Se utilizó la histona H3 como control de carga. El resultado es representativo de dos experimentos independientes.

Puesto que el abordaje farmacológico mostraba la implicación de sXBP1 en la transactivación de *IL23A*, se estudió el efecto de la delección del gen que codifica IRE1 $\alpha$ , *Ern1*, en experimentos con ratones *Ern1<sup>f/f</sup>Vav1-Cre* que tienen el gen delecionado específicamente en el sistema hematopoyético. En estudios preliminares se comprobó que las células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón respondían de forma similar a las CD derivadas de monocitos humanos a los diferentes compuestos. Como se muestra en la Figura 28 (paneles A y B), se observó un aumento de los niveles de ARNm de *Il23a* al combinar la 2-DG con los PAMP y la inducción de la UPR como demuestra la aparición de la banda de la forma con *splicing* de *Xbp1* en el gel de agarosa. Pero, a diferencia de las CD humanas, la inhibición de la actividad endonucleasa de IRE1 $\alpha$  con el compuesto 4 $\mu$ 8C revirtió parcialmente el efecto de la 2-DG en respuesta al LPS ya que, aunque los niveles del ARNm de *il23a* no llegaron a ser tan bajos como los inducidos por el estímulo en ausencia de 2-DG, sí se redujeron significativamente con respecto al incremento generado por la combinación 2-DG-LPS. Otra diferencia observada (Figura 28 C panel izquierdo), fue que la simple adición de 2-DG generó el *splicing* del ARNm de *Xbp1* en la misma medida que cuando se combina con el *zymosan* y el LPS, aunque en ese caso no induce la transcripción de *Il23a*. En concordancia con la respuesta a la inhibición farmacológica de la actividad endonucleasa de IRE1 $\alpha$ , la expresión del ARNm de IL-23 en respuesta a la 2-DG fue drásticamente inferior en las células de los ratones con la delección cuando se estimularon con *zymosan* o con LPS (Figura 28 C panel derecho).



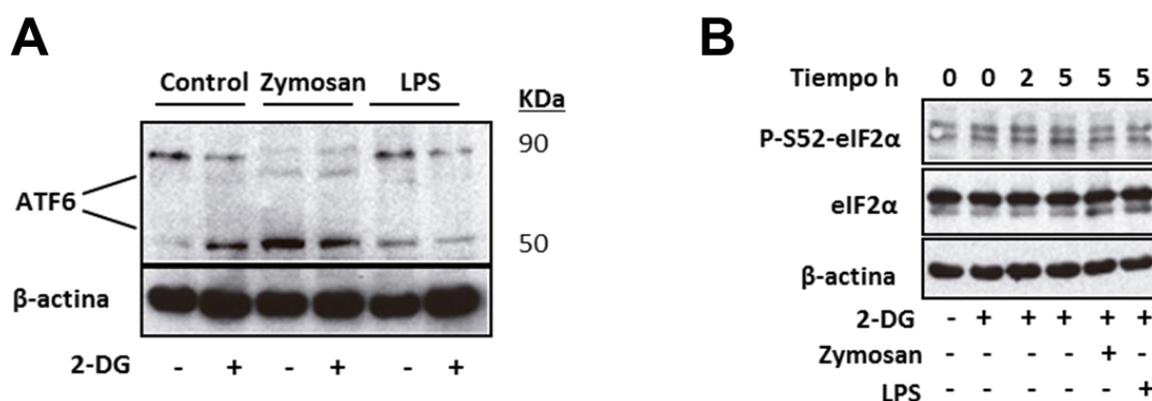
**Figura 28. Efecto de la inhibición farmacológica y de la delección de IRE1 $\alpha$  sobre la transcripción de *Il23a* en células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón.** Las BMDC se pre-incubaron durante 30 minutos en presencia de 4 $\mu$ 8C (10  $\mu$ M) antes de ser tratadas con 2-DG (10 mM) durante 1 hora y posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS durante 4 horas. **(A)** Análisis de la inducción del ARNm de *Il23a* mediante qPCR. Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM de tres experimentos independientes. \* Indica  $p < 0.05$ . **(B)** Análisis del *splicing* de *XBP1*. Tras realizar una qPCR con cebadores que abarcan las regiones sin el *splicing* se realizó una electroforesis en gel de agarosa con los productos de amplificación. *uXBP1* indica la forma sin *splicing*, *sXBP1* indica la forma con *splicing*. El resultado es representativo de tres experimentos independientes. **(C)** Análisis de la inducción del ARNm de *sXbp1* e *Il23a* mediante qPCR en BMDC de ratones control (*Ern1<sup>fl/fl</sup>*) y con el gen delecionado (*Ern1<sup>fl/fl</sup>Vav1-Cre*). Las BMDC se pre-incubaron en presencia de 2-DG (10 mM) durante 1 hora y posteriormente se estimularon con 1mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS durante 4 horas. Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM tres experimentos independientes.\* Indica  $p < 0.05$ .

- **El papel de las ramas ATF6 y PERK**

Para abordar la implicación de las otras dos ramas de la UPR que se pueden activar cuando hay estrés de retículo endoplasmático: ATF6 y PERK, se realizaron experimentos de *Western Blot* con intención de detectar la fragmentación de ATF6, que demostraría la activación de esta rama, y la fosforilación de eIF2 $\alpha$  como indicador de la activación de la ruta PERK. Como se muestra en la Figura 29 A, la 2-DG aumentó la fragmentación de ATF6 en las células sin estimular pero no incrementó el efecto del

*zymosan* y el LPS que por sí solos también indujeron su fragmentación. Los niveles de la proteína escindida fueron superiores tras la estimulación con *zymosan* que con el pre-tratamiento de las CD con 2-DG. El *zymosan* produjo un cambio en la migración de la proteína sin fraccionar probablemente debido a cambios en su glicosilación que se producen previamente a su escisión por las proteasas de Sitio-1 (S1p) (Hong *et al*, 2004).

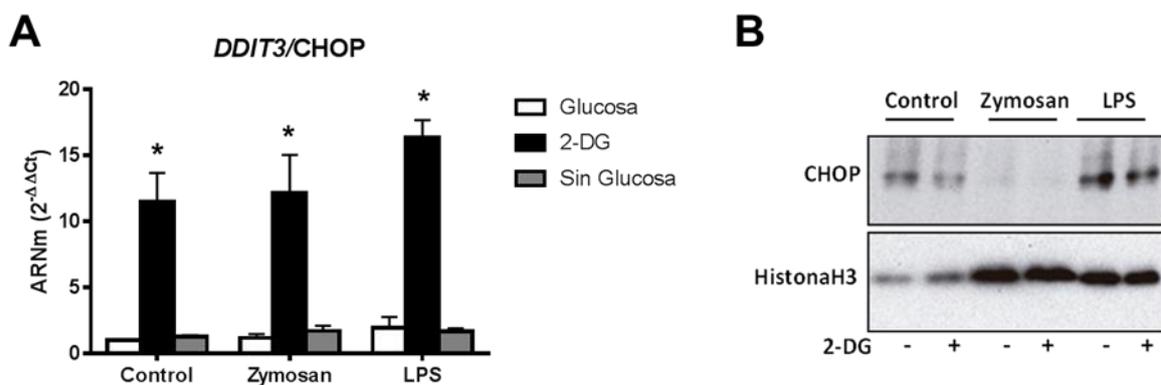
En cuanto a la fosforilación de eIF2 $\alpha$  y de acuerdo con una reciente publicación que muestra que el LPS no afecta la fosforilación de eIF2 $\alpha$  (Shan *et al*, 2017), no hubo variaciones en el nivel de fosforilación de eIF2 $\alpha$  al pre-tratar las células con 2-DG, incluso en presencia de los PAMP (Figura 29 B).



**Figura 29. Efecto de la 2-DG sobre la escisión de ATF6 y la fosforilación de eIF2 $\alpha$ .** Las CD se pre-incubaron en presencia de 2-DG (10 mM) durante 1 hora y posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS durante 1 hora (A) o los tiempos indicados (B). Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot*. Se utilizó la  $\beta$ -actina como control de carga. Los resultados son representativos de al menos dos experimentos independientes.

Dado que la fosforilación de eIF2 $\alpha$  no parecía la mejor forma de valorar la activación la vía PERK/eIF2 $\alpha$ /ATF4/CHOP y al existir publicaciones que relacionan directamente a *DDIT3*/CHOP con la transcripción de *IL23A* (Goodall *et al*, 2010), se decidió analizar la expresión de este factor de transcripción. La inducción del ARNm de *DDIT3*/CHOP no sufrió cambios al incubar las células en medio sin glucosa, pero sí se modificó con el pretratamiento con 2-DG, observándose un claro incremento independiente de la estimulación con los PAMP (Figura 30 A) lo que confirma la activación de la rama PERK de la UPR por la 2-DG. Al analizar la expresión de la proteína en extractos nucleares, CHOP pudo detectarse en las células en reposo, de

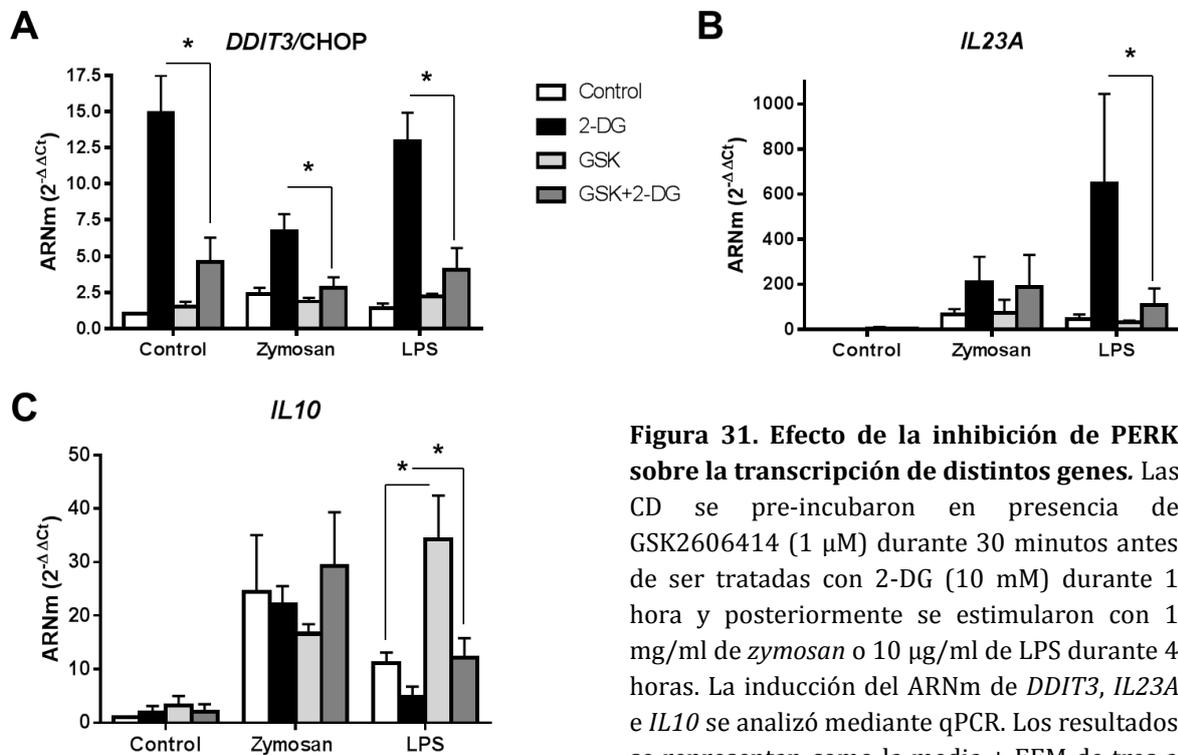
acuerdo con un estudio previo en monocitos humanos (Riek *et al.*, 2012). La 2-DG no produjo cambios en sus niveles nucleares en las células en reposo ni tras la estimulación con LPS (Figura 30 B). El pre-tratamiento de las CD con 2-DG tampoco revirtió la desaparición nuclear de CHOP provocada por el *zymosan*. Estos datos sugieren que en presencia de patrones fúngicos, las CD se protegen de los efectos proapoptóticos atribuidos a CHOP, lo que permitiría el mantenimiento de la capacidad fagocítica de las CD durante las infecciones por hongos (Rodríguez *et al.*, 2014) y permiten descartar la participación directa de CHOP/DDIT3 en la transcripción de citoquinas en CD estimuladas con *zymosan*.



**Figura 30. Efecto de la 2-DG sobre la expresión de CHOP.** Las CD se pre-incubaron en presencia de glucosa (11,1 mM), ausencia de glucosa o en presencia de 2-DG (10 mM) y glucosa durante 1 hora y posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS durante 4 horas. **(A)** Análisis de la inducción del ARNm de *DDIT3/CHOP* mediante qPCR. Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM de tres experimentos independientes.\* Indica  $p < 0.05$  con respecto a la glucosa. **(B)** Expresión de CHOP en fracciones nucleares. Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot*. Se utilizó la histona H3 como control de carga. El resultado es representativo de tres experimentos independientes.

Con el fin de abordar con más detalle la posible implicación de esta rama de la UPR se hicieron experimentos con el inhibidor de PERK, GSK2606414. El GSK2606414 revirtió el incremento de los niveles del ARNm de CHOP/*DDIT3* inducido por la 2-DG (Figura 31 A) y en concordancia con la desaparición de CHOP producida por el *zymosan*, no mostró ningún efecto sobre la transcripción de citoquinas en este sistema. Sin embargo, la inhibición de PERK con GSK2606414, redujo significativamente la inducción del ARNm de *IL23A* provocado por el LPS en presencia de 2-DG (Figura 31 B) y generó también un aumento inesperado del ARNm de *IL10* cuando se estimularon las células con LPS. Asimismo, la combinación del

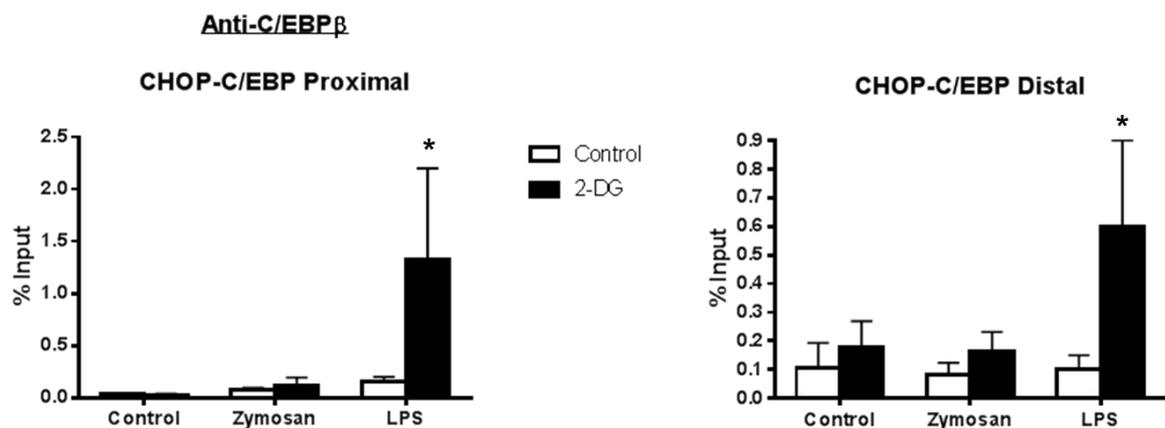
inhibidor de PERK con LPS, indujo la expresión del transcrito de *IL10* en niveles similares a los producidos por el LPS, incluso cuando la estimulación se hizo en presencia de 2-DG (Figura 31 C). Estos resultados indican que las distintas ramas de la UPR modulan la expresión de citoquinas de forma dependiente del estímulo.



**Figura 31. Efecto de la inhibición de PERK sobre la transcripción de distintos genes.** Las CD se pre-incubaron en presencia de GSK2606414 (1  $\mu$ M) durante 30 minutos antes de ser tratadas con 2-DG (10 mM) durante 1 hora y posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS durante 4 horas. La inducción del ARNm de *DDIT3*, *IL23A* e *IL10* se analizó mediante qPCR. Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM de tres a cinco experimentos independientes.\* Indica  $p < 0.05$ .

El hallazgo de que la inhibición farmacológica de PERK tuviera efectos sobre la transcripción de citoquinas en las células dendríticas estimuladas con LPS junto al hecho de que ATF4 se pudiera unir a los sitios ATF2 del promotor de *IL23A* (Rodríguez *et al.*, 2014) sugirieron la necesidad de realizar experimentos de inmunoprecipitación de la cromatina para valorar la implicación directa de este factor sobre la trans-activación de *IL23A*. Sin embargo, el análisis de la unión de ATF4 al promotor de *IL23A* no mostró ninguna variación en las distintas condiciones (datos no mostrados), por ello se postuló la participación de otros factores de transcripción. La trans-activación de *IL23A* en respuesta al LPS se ha relacionado con diversos factores incluido C/EBP $\beta$  (Kocieda *et al.*, 2012) que pertenece a la misma familia de factores de transcripción que CHOP y tiene varios sitios de unión al promotor de la *IL23A* (Figura 27 A). Estudios previos del laboratorio han demostrado una menor

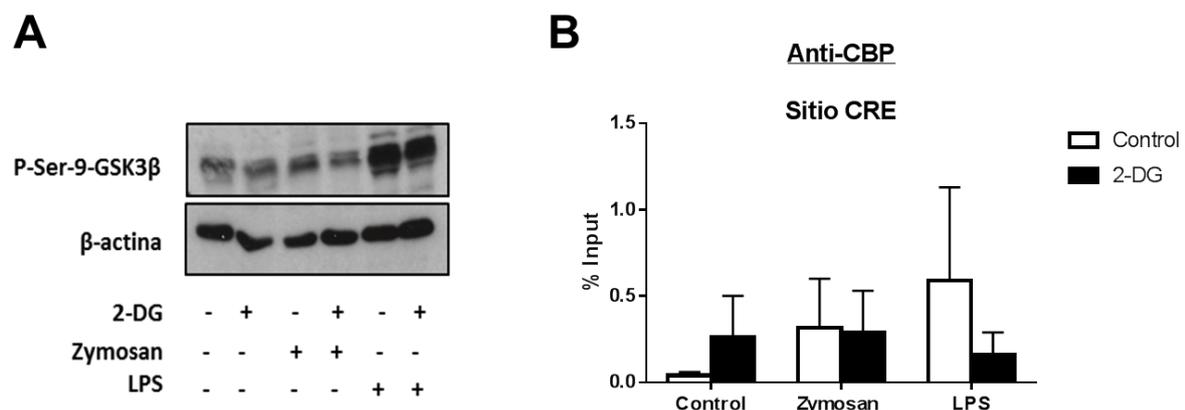
unión de CHOP y mayor unión de C/EBP $\beta$  a los sitios CHOP-C/EBP de este promotor en respuesta al LPS (Rodríguez *et al.*, 2014) y además se ha descrito la relación de C/EBP $\beta$  con las ramas IRE y PERK de la UPR (Hayakawa *et al.*, 2010) por lo que se estudió la unión de este factor a los sitios CHOP-C/EBP del promotor de *IL23A*. Como se muestra en la Figura 32, a diferencia de lo observado con el *zymosan*, la 2-DG incrementó significativamente la unión de C/EBP $\beta$  al promotor de *IL23A* en respuesta al LPS, lo que sugiere su asociación con el efecto de la 2-DG sobre la transcripción de *IL23A*.



**Figura 32. Análisis de la unión de C/EBP $\beta$  al promotor de *IL23A* mediante ChIP.** Las CD se preincubaron en presencia de 2-DG (10 mM) durante 1 hora y posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS durante 1 hora. Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM de tres experimentos independientes.\* Indica p<0.05.

En lo que se refiere a la regulación transcripcional de *IL10*, se acepta ampliamente el mecanismo dependiente de CREB y del co-activador CBP. La actividad de CREB se regula negativamente por la glicógeno sintasa quinasa 3 $\beta$ . Por este motivo, la inhibición de GSK3 $\beta$  favorece la unión de CREB al sitio CRE del promotor de *IL10*, el reclutamiento de CBP y la translocación de CRTC/TORC2 al núcleo para la formación del complejo nuclear P-CREB/TORC2/CBP que es necesario para la trans-activación de *IL10*. Además, hay numerosos estudios que relacionan el estrés de retículo con la activación, por variaciones en el estado de fosforilación, de GSK3 $\beta$  (Chang *et al.*, 2011; McAlpine *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2015). La fosforilación en la serina 9 de esta proteína es inhibitoria mientras que la fosforilación de la tirosina 216 aumenta su actividad (Beurel, Grieco y Jope, 2015).

Para valorar el estado de activación de GSK3 $\beta$  dependiente de su fosforilación, se realizaron experimentos utilizando anticuerpos específicos frente a ambas fosforilaciones. Las células dendríticas mostraron un aumento la fosforilación inhibitoria de la serina 9 cuando se estimularon con LPS, efecto que fue en parte contrarrestado por la pre-incubación de las CD con 2-DG (Figura 33 A) y no se observaron variaciones en la fosforilación activadora de la tirosina 216 (datos no mostrados). También se analizó la unión directa del co-activador CBP al sitio CRE del promotor de *IL10*. Tanto el *zymosan* como el LPS aumentaron la unión de CBP con respecto a las células sin estimular y la pre-incubación con 2-DG no tuvo efecto en las CD estimuladas con *zymosan*, pero sí redujo la unión de CBP al promotor de IL-10 en las células tratadas con LPS (Figura 33 B). Este resultado explicaría la disminución de la transcripción de *IL10* inducida por la 2-DG en respuesta al LPS.



**Figura 33. Efecto de la 2-DG sobre la fosforilación de GSK3 $\beta$  y la unión de CBP al promotor de *IL10*.** Las CD se pre-incubaron en presencia de 2-DG (10 mM) durante 1 hora y posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS durante 1 hora. **(A)** Análisis de la fosforilación de GSK3 $\beta$ . Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot*. Se utilizó la  $\beta$ -actina como control de carga. El resultado es representativo de tres experimentos independientes. **(B)** Análisis de la unión de CBP al sitio CRE del promotor de *IL10* mediante ChIP. Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM de dos experimentos independientes.

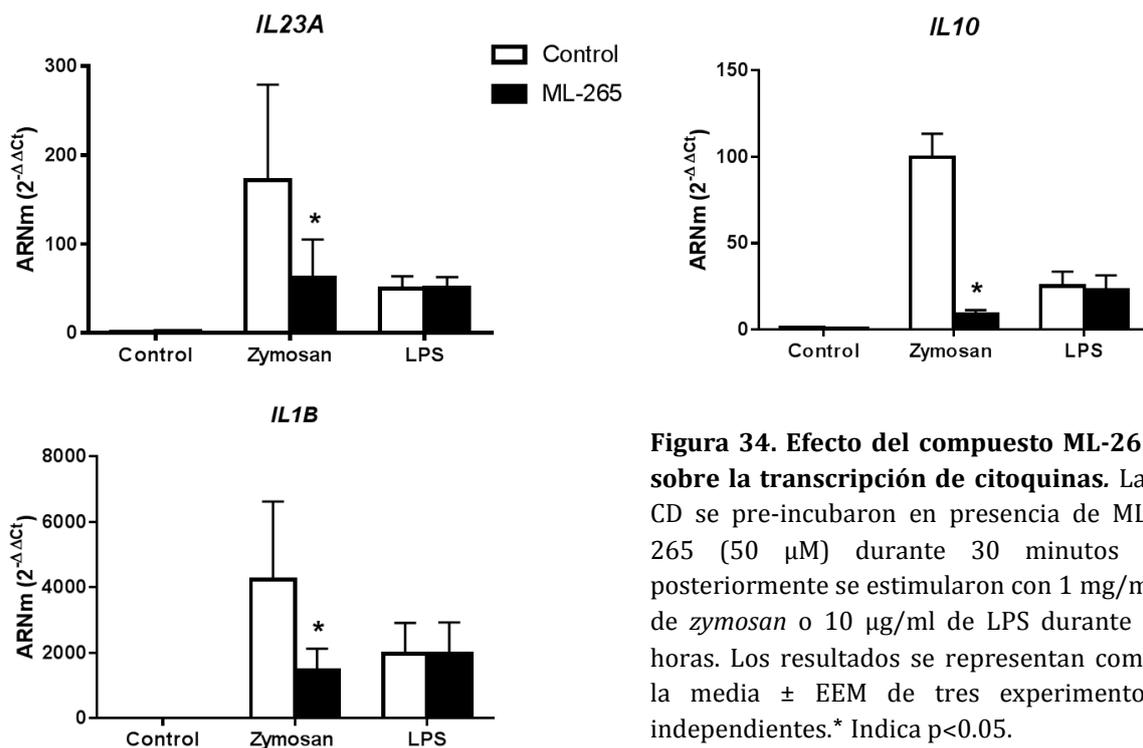
## 2.2 Efectos de la regulación de la actividad de la PKM2

La piruvato quinasa cataliza el último paso de la glucólisis, la conversión de fosfoenolpiruvato a piruvato a través de la transferencia de un grupo fosfato al ADP. La conformación y actividad de la PKM2 pueden modificarse alostéricamente por intermediarios metabólicos y por compuestos farmacológicos. Tras haber confirmado la expresión preferencial de la isoforma PKM2 en las células dendríticas (Figura 16),

se utilizó el compuesto ML-265 (también denominado TEPP-46) con el fin de aumentar el flujo glucolítico. Este compuesto refuerza la tetramerización de PKM2 y la convierte en una enzima altamente glucolítica que incrementa la formación de lactato y disminuye el flujo de piruvato a la mitocondria (Christofk *et al.*, 2008; Anastasiou *et al.*, 2012).

- **Expresión de citoquinas**

Las CD se pre-trataron con ML-265 previamente a la estimulación y se midió la inducción de la transcripción de distintas citoquinas mediante qPCR. Como se muestra en la Figura 34, los resultados difirieron según el estímulo utilizado. Los niveles de los transcritos de *IL23A*, *IL10* e *IL1B* disminuyeron de forma muy significativa en presencia de ML-265 en respuesta al *zymosan*, mientras que no experimentaron variación alguna en respuesta al LPS.

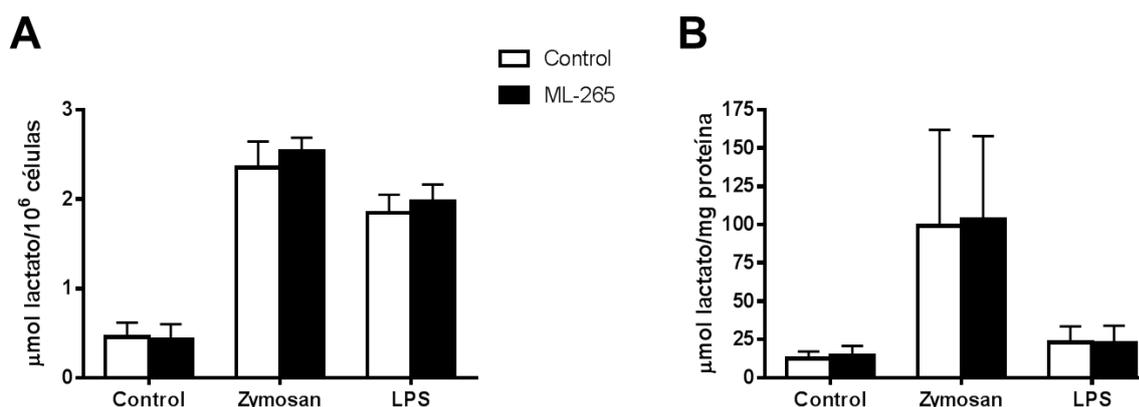


**Figura 34. Efecto del compuesto ML-265 sobre la transcripción de citoquinas.** Las CD se pre-incubaron en presencia de ML-265 (50  $\mu$ M) durante 30 minutos y posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS durante 4 horas. Los resultados se representan como la media  $\pm$  EEM de tres experimentos independientes.\* Indica  $p < 0.05$ .

- **Producción de lactato**

Con el fin de determinar si los cambios sobre la actividad glucolítica generados por el compuesto ML-265 podían explicar las variaciones observadas sobre la transcripción de citoquinas, se analizaron los niveles de lactato intracelular y en el medio de cultivo.

De forma inesperada, no se observó ningún cambio en los niveles de este metabolito en presencia de ML-265 (Figura 35). La producción de lactato aumentó en respuesta al *zymosan* y al LPS, aunque el efecto de los estímulos mostró notables diferencias. A las 24 horas el aumento de la concentración extracelular inducida por ambos estímulos fue similar. Sin embargo, la medida de los niveles intracelulares de lactato realizada tras 30 minutos de estimulación mostró niveles más elevados en el caso del *zymosan*, lo que indicaría una mayor rapidez de acción de este estímulo.

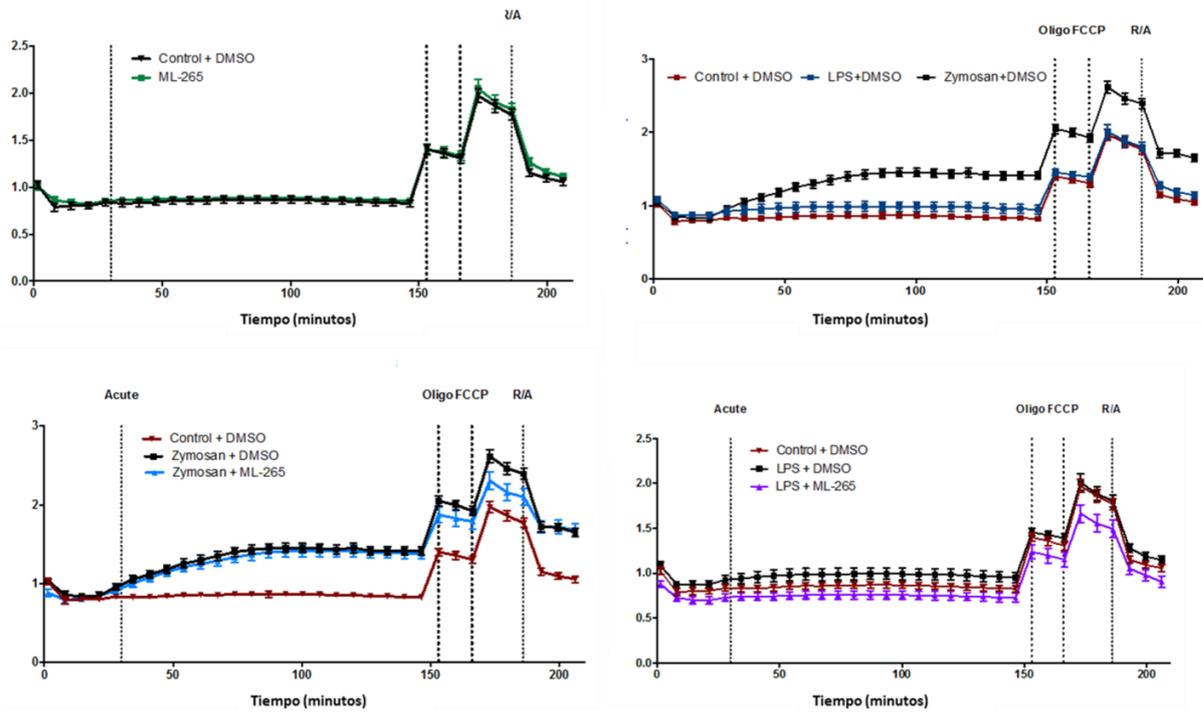


**Figura 35. Efecto del compuesto ML-265 sobre la producción de lactato.** Las CD se pre-incubaron en presencia de ML-265 (50 µM) durante 30 minutos y posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* o 10 µg/ml de LPS durante 24 horas (A) o 30 minutos (B). **(A)** Niveles de lactato extracelular medidos mediante un *kit* comercial. La cantidad de lactato presente en los sobrenadantes se normalizó en función del número de células. **(B)** Niveles de lactato intracelular medidos por UPLC-MS. La cantidad de lactato presente en las células se normalizó en función de la cantidad de proteína. Los resultados se representan como la media ± EEM de tres a cuatro experimentos independientes.

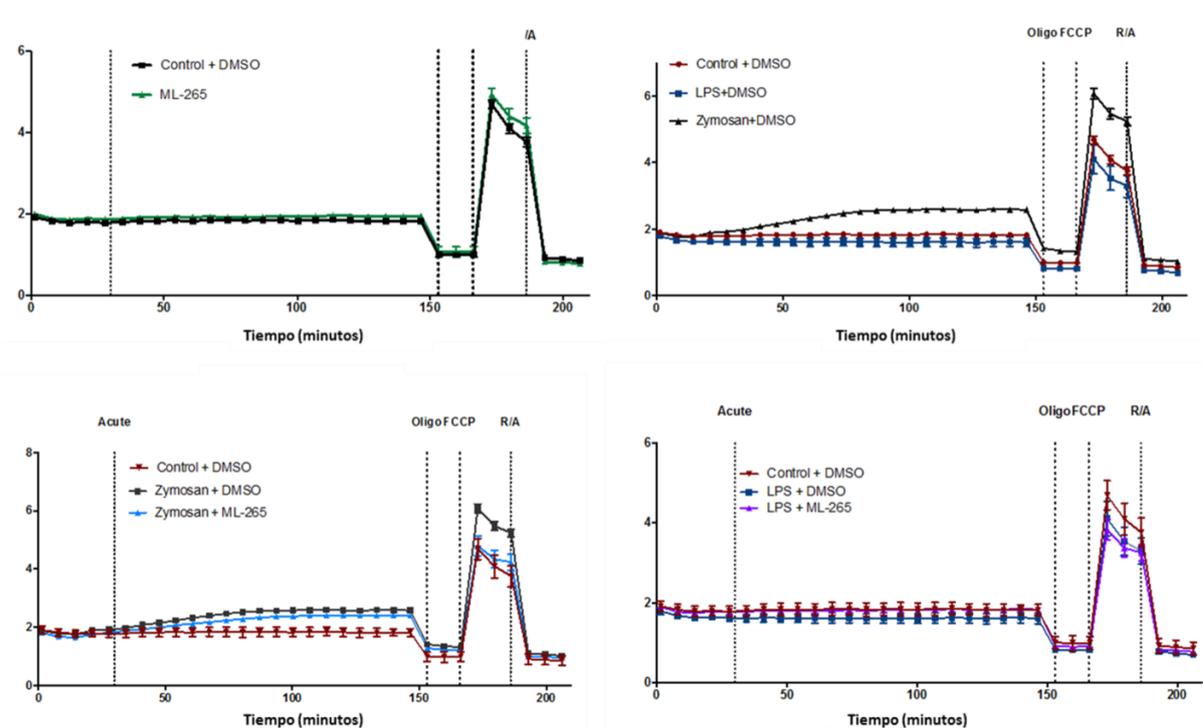
### • Estudios bioenergéticos

En un intento adicional para caracterizar el efecto global del ML-265, se realizaron nuevos experimentos dirigidos a monitorizar la bioenergética de las CD en tiempo real con el analizador de flujo extracelular *Seahorse* XFe96. La Figura 36 muestra como el pre-tratamiento de las células con ML-265 no produjo cambios ni en la tasa de acidificación extracelular ni en la de consumo de oxígeno distintos de los inducidos por los estímulos. Sin embargo, estos experimentos permitieron mostrar, una vez más, los distintos patrones de respuesta asociados con cada estímulo. Mientras que el *zymosan* aumentó de forma notable la ECAR y la OCR, el LPS sólo aumentó ligeramente la ECAR a lo largo del ensayo.

**A** ECAR Normalizado (mpH/min/2x10<sup>6</sup> células)



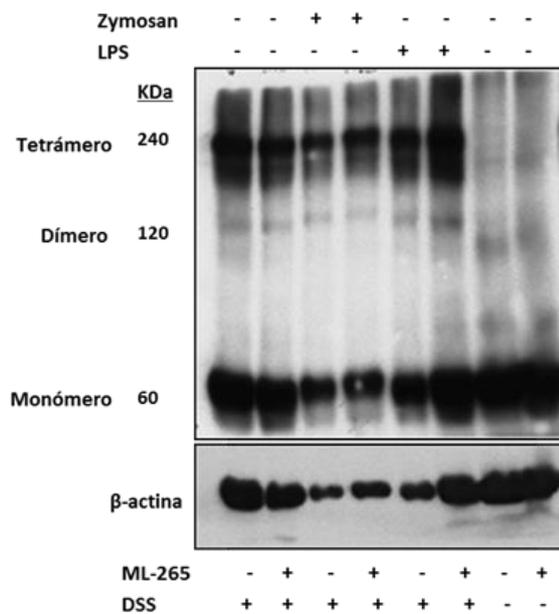
**B** OCR Normalizado (pmol oxígeno/min/2x10<sup>6</sup> células)



**Figura 36. Efecto del compuesto ML-265 sobre la bioenergética de las células dendríticas.** Registros del equipo Seahorse Bioscience XFe96 tras la aplicación del protocolo XF *Mito Stress Test Kit* obtenidos tras la pre-incubación de las CD con ML-265 (50  $\mu$ M) durante 30 minutos y su posterior estimulación con 1 mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS, normalizados en función del número de células. **(A)** Tasa de acidificación del medio. **(B)** Tasa de consumo de oxígeno.

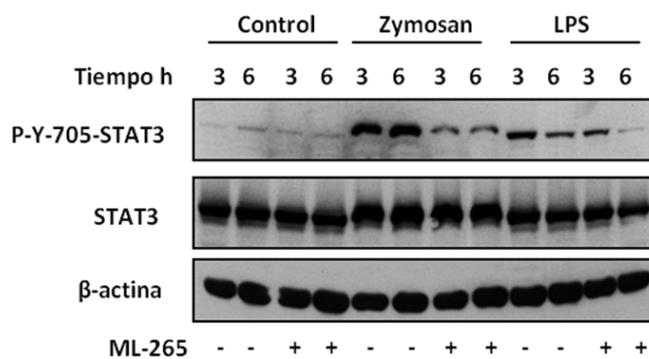
- **Conformación y actividad quinasa de la PKM2**

A la vista de la ausencia de cambios metabólicos inducidos por el ML-265 y puesto que a la PKM2 se atribuyen distintas funciones y grado de actividad dependiendo de su conformación, se llevó a cabo un ensayo de *cross linking* para estudiar su ensamblaje. De acuerdo con los resultados obtenidos en otros tipos celulares como los macrófagos y las células glomerulares de riñón (Shirai *et al.*, 2016; Qi *et al.*, 2017), las CD mostraron una gran cantidad de las formas monomérica y tetramérica en comparación con la forma dimérica. La distribución entre las tres conformaciones no se modificó ni por el ML-265, ni por los estímulos, tanto cuando se utilizaron de forma aislada como con la combinación de ambos (Figura 37).



**Figura 37. Efecto del zymosan, LPS y ML-265 sobre la conformación de la enzima PKM2.** Las CD se pre-incubaron en presencia de ML-265 (50  $\mu$ M) durante 30 minutos y posteriormente se estimularon con 1mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS durante 1 hora. Pasado este tiempo se llevó a cabo el *cross-linking* mediante la adición de disuccinimidil suberato (650  $\mu$ M). Los extractos obtenidos, en condiciones no reductoras, se analizaron en un gel de poliacrilamida al 8% para visualizar proteínas en el rango de 60-240 kDa. Se utilizó la  $\beta$ -actina como control de carga. El resultado es representativo de dos experimentos independientes.

Tanto la histona H3 como STAT3 se encuentran entre las proteínas mejor caracterizadas susceptibles de ser fosforiladas por las formas monoméricas/diméricas de la PKM2, por ello se estudió el efecto del ML-265 en la fosforilación de la serina 10 de la histona H3 y la de la tirosina 705 de STAT3 a las 3 y 6 horas, en concordancia con el patrón temporal de fosforilación de STAT, previamente descrito en células estimuladas. Si bien no hubo variaciones en la fosforilación de la histona (datos no mostrados), el ML-265 inhibió fuertemente la fosforilación de STAT3 inducida por los PAMP (Figura 38).



**Figura 38. Efecto del compuesto ML-265 sobre la fosforilación de STAT3.**

Las CD se pre-incubaron en presencia de ML-265 (50  $\mu$ M) durante 30 minutos y posteriormente se estimularon con 1 mg/ml de *zymosan* o 10  $\mu$ g/ml de LPS durante los tiempos indicados. Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western Blot*. Se utilizó la  $\beta$ -actina como control de carga. El resultado es representativo de dos experimentos independientes.

Tomados en conjunto estos resultados y dado que el único efecto que pudo atribuirse al ML-265 fue la disminución de la fosforilación de STAT3, la caída de la transcripción de citoquinas inducida por el *zymosan* en presencia de ML-265 podría explicarse por la interferencia de este compuesto con la actividad proteíca quinasa de la enzima PKM2.



# Discusión



## 1. Caracterización de la reprogramación metabólica en células dendríticas

La activación de las células dendríticas por la interacción de los PAMP con sus receptores, induce la adquisición de nuevas funciones como la producción de citoquinas, de mediadores lipídicos y de otras moléculas de señalización, y la migración a los ganglios linfáticos (Joffre *et al.*, 2009). Este cambio de un estado quiescente a otro activado coincide con una reprogramación metabólica que modula la respuesta efectora y proporciona el soporte energético necesario para el cambio funcional (Pearce y Pearce, 2013; Ganeshan y Chawla, 2014).

En concordancia con los resultados obtenidos, numerosos estudios previos ponen de manifiesto que el cambio metabólico más prominente observado en las CD estimuladas por los PAMP es el aumento de la glucólisis (Krawczyk *et al.*, 2010; Everts *et al.*, 2012; O'Neill y Hardie, 2013). En estos estudios el patrón glucolítico se acompaña de un descenso paralelo de la OXPHOS. Sin embargo, los experimentos mostrados en el presente estudio indican que cuando las CD se activan con *zymosan* o LPS, además de producirse un aumento temprano (30 minutos) de la glucólisis, la OCR se mantiene o incluso se incrementa, al igual que el consumo de oxígeno destinado a la producción de ATP en la OXPHOS. En este sentido, se ha descrito que elevadas tasas glucolíticas y de respiración mitocondrial constituyen el fenotipo metabólico característico de CD tolerogénicas que expresan de forma abundante proteínas relacionadas con la OXPHOS y son resistentes a la maduración (Morelli y Thomson, 2007; Ferreira *et al.*, 2012; Malinarich *et al.*, 2015) mientras que en la maduración de las células dendríticas hay una regulación a la baja de los genes implicados en la OXPHOS (Jin *et al.*, 2010). En contraposición con estos estudios y en concordancia con los resultados obtenidos, estudios recientes concluyen que los macrófagos pro-inflamatorios mantienen la oxidación del piruvato para la producción de citoquinas (Meiser *et al.*, 2016) y que la activación de distintos TLR pueden inducir el aumento de la glucólisis y de la OXPHOS en monocitos humanos (Lachmandas *et al.*, 2016).

Independientemente de la controversia sobre la actividad de la OXPHOS, que parece depender del estado de maduración celular, del contexto inmune y del estímulo

utilizado, el aumento de la glucólisis es una constante. Numerosos estudios señalan al factor de transcripción HIF1, bien de forma aislada o en colaboración con otras proteínas como STAT3 y PKM2, como el principal activador de estos cambios. Los resultados presentados en esta memoria confirman la inducción de HIF1 $\alpha$  tras la activación de los PRR en ausencia de hipoxia, mediante mecanismos tanto transcripcionales como traduccionales, y muestran la presencia de estas proteínas en los núcleos de las CD. Sin embargo, el patrón temporal de aparición de HIF1 $\alpha$  no permite explicar plenamente el aumento de la glucólisis observado claramente tras 30 minutos de estimulación. Una interpretación plausible es que aunque HIF1, PKM2 y STAT3 puedan estar implicados en el mantenimiento de una respuesta más tardía, los cambios iniciales pueden explicarse más satisfactoriamente por la translocación de la hexoquinasa II a la mitocondria, de forma similar a lo que ocurre en los linfocitos T (van der Windt *et al.*, 2013). En respuesta a agonistas de los TLR, Akt fosforila la HK-II y promueve su unión a la membrana mitocondrial donde puede interactuar directamente con los canales de aniones dependientes de voltaje y aumentar su actividad, gracias a que esa localización facilita el acceso a altas concentraciones de ATP (Everts *et al.*, 2014). Esta interpretación concuerda con la abundante bibliografía mostrando que la vía PI3K/Akt está implicada en los cambios metabólicos inducidos en células dendríticas y monocitos murinos por la ocupación de los TLR (Krawczyk *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2014; Arts *et al.*, 2016). Además, un estudio reciente en células dendríticas derivadas de monocitos humanos confirma una mayor expresión y actividad de esta quinasa en respuesta a los TLR (Perrin-Cocon *et al.*, 2018).

## 2. Modulación del metabolismo de la glucosa y regulación transcripcional de la producción de citoquinas en células dendríticas

Los resultados obtenidos confirman el gran número de estudios señalando que el aumento del flujo glucolítico es de vital importancia para una correcta función efectora, en la que se incluye la producción de citoquinas. En el presente estudio destaca la prominencia de la producción de IL-10 e IL-23 en respuesta a los componentes  $\beta$ -glucano y  $\alpha$ -manano del *zymosan*, frente a una menor producción de estas citoquinas tras la estimulación del TLR4 por el LPS. La relevancia clínica de estos resultados se justifica por el papel de estas citoquinas en distintos procesos patológicos. Por ejemplo, la IL-23 promueve la diferenciación y proliferación de los linfocitos Th17 (Kreymborg *et al.*, 2007) y numerosos estudios confirman la participación de estos linfocitos en la patogenia de enfermedades autoinmunes como artropatía psoriásica, esclerosis múltiple y artritis reumatoide (McGeachy y Cua, 2007), y en el crecimiento tumoral (Grivennikov *et al.*, 2012). En este sentido, en el tratamiento de procesos como la psoriasis, la artritis psoriásica o la enfermedad de Crohn se utilizan anticuerpos monoclonales para bloquear la actividad de esta citoquina. Del mismo modo, la IL-10 está implicada en la polarización de los linfocitos a un fenotipo Threg o regulador que suprime la respuesta pro-inflamatoria y controla la producción de daño tisular por mecanismo inmune (Couper, Blount y Riley, 2008). Debido a esto, una excesiva producción de IL-10 puede contribuir a la expansión de micosis invasivas y a la infección por micobacterias.

### 2.1 Efectos de la privación de glucosa

A la vista de la importancia del metabolismo de la glucosa en la reprogramación metabólica, es comprensible que la intervención sobre el mismo afecte a la producción de citoquinas. La pre-incubación de las células dendríticas con 2-DG aumenta la transcripción de *IL23A* durante la estimulación con *zymosan* y LPS y genera una disminución de la transcripción de *IL10* e *IL-1B* en el caso del LPS. Sorprendentemente, la ausencia de glucosa en el medio no tiene consecuencias en respuesta a ninguno de los dos estímulos. Esta diferencia de comportamiento entre la privación de glucosa y el efecto de la 2-DG sobre la producción de citoquinas también

se ha descrito en linfocitos T humanos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> aunque no se propuso ninguna explicación sobre el posible mecanismo (Renner *et al.*, 2015). Una interpretación posible de este resultado es que las CD mantengan niveles intracelulares de glucosa suficientes durante un periodo prolongado de tiempo o que utilicen metabolitos alternativos como glutamina, ácidos grasos o aminoácidos de cadena ramificada. Sin embargo, el hallazgo más llamativo en este sentido ha sido la descripción de que las CD expresan la maquinaria necesaria para metabolizar el glucógeno, lo que permite la utilización de sus depósitos intracelulares para desarrollar su función efectora (Thwe *et al.*, 2017).

La ausencia de glucosa en el medio genera una bajada más drástica de lactato en los sobrenadantes de las CD estimuladas que la inhibición de la glucólisis con 2-DG. Esta caída del lactato inhibe la estabilización de HIF1 $\alpha$ , por lo que puede descartarse la participación de HIF en el incremento de la expresión del ARNm de *IL23A* observado en estas condiciones. Aunque algunos autores han demostrado una relación directa con la transcripción de IL-1 $\beta$  en astrocitos (Zhang *et al.*, 2006) y en macrófagos a tiempos más tardíos (Tannahill *et al.*, 2013), HIF1 $\alpha$  desaparece por completo de los extractos proteicos al utilizar un medio sin glucosa sin que ello se acompañe de cambios en la transcripción de citoquinas a las 4 horas, por lo que no podría explicarse por este mecanismo la disminución de la transcripción de *IL1B* observada con la combinación 2-DG-LPS, que además se acompaña de la abolición de la producción de pro-IL-1 $\beta$  inducida por la 2-DG. La ausencia de la actividad de HIF1 $\alpha$  tampoco explica el efecto de la 2-DG en la expresión de pro-IL-1 $\beta$ , dado que esta expresión se observa a las 24 horas en respuesta al *zymosan*, periodo que coincide con una menor expresión de HIF1 $\alpha$ . El hecho de que la pro-IL-1 $\beta$  no se detecte hasta las 24 horas en las células tratadas con *zymosan* indica una respuesta mucho más tardía que la inducida por el LPS y estaría de acuerdo con la ausencia de efecto de la 2-DG sobre el ARNm de *IL1B* a tiempos más precoces.

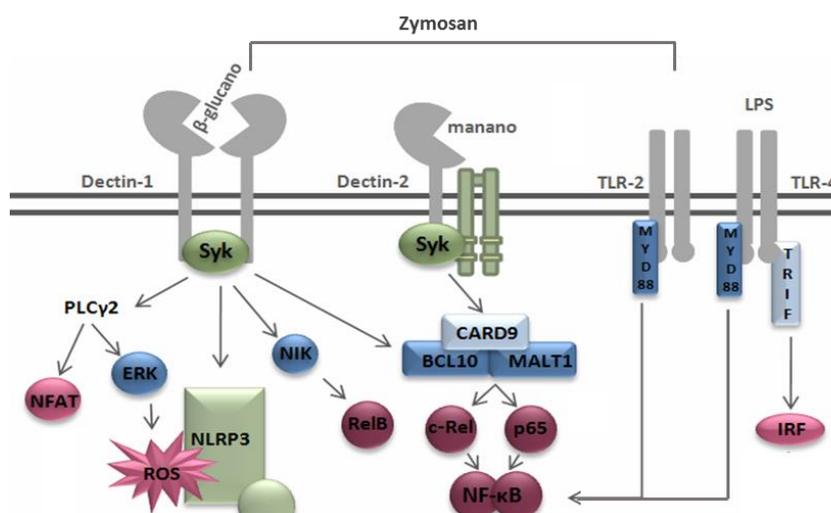
La adición de lactato de sodio también genera respuestas diferentes en función del estímulo. Con el *zymosan* se observa un aumento del ARNm de *IL23A* y de *IL10*, mientras que el LPS sólo aumenta el de *IL23A*. Sin embargo, la transcripción de la IL-1 $\beta$  muestra una tendencia a disminuir con ambos estímulos. Estos resultados coinciden en parte con otros estudios en los que el lactato secretado por las células

tumorales incrementa la transcripción de *IL23A* en células del sistema inmune estimuladas con ligandos de los TLR 2/4 (Shime *et al.*, 2008). Pero, en este caso, sería la entrada de lactato en la célula el responsable de los cambios del nivel de producción de citoquinas (Colegio *et al.*, 2014; Abebayehu *et al.*, 2016). Esta entrada se produciría a través de los transportadores MCT, que a su vez depende del pH, puesto que el lactato entra acompañado por un protón (Halestrap, 2012) y el efecto no se observa en presencia de lactato de sodio. Este hecho permite distinguir los efectos propiamente debidos al ion lactato de los efectos causados por la bajada de pH. A pesar de estos condicionantes, la bajada de pH que frecuentemente se observa en el micro-entorno tumoral no ha sido tomada en cuenta en todos los estudios.

El lactato también puede actuar a través del receptor GPR81 cuya funcionalidad se ha mostrado en este estudio. Este hecho añade complejidad a las contradictorias interpretaciones existentes en cuanto a la función de este receptor. Mientras que la delección del gen *Gpr81* en macrófagos murinos no induce cambios en la expresión de algunas citoquinas inducida por el lactato (Errea *et al.*, 2016), también se ha descrito que el *Gpr81* interviene en la producción de *IL-1 $\beta$*  inducida por la estimulación de los TLR (Hoque *et al.*, 2014).

La inhibición de la entrada de piruvato en la mitocondria con el compuesto UK5099, que aumenta los niveles de lactato intracelular, mostró un efecto negativo sobre la transcripción de *IL23A*, *Il10* e *IL1B*, mientras que el aumento del flujo de piruvato con el DCA indujo el efecto opuesto. Estos resultados confirman la importancia que tiene la entrada de piruvato a la mitocondria para la inducción de algunas citoquinas, como ya se había descrito para *IL-1 $\beta$* , *IL-6* y *PD-L1* (Shirai *et al.*, 2016; Watanabe *et al.*, 2017). Otro inhibidor del transportador de monocarboxilatos, el CHC, que se utiliza para bloquear el paso de lactato por los MCT mostró un efecto similar en resultados preliminares (no mostrados). Estos resultados son compatibles con la interpretación de que el efecto del lactato se debe a su entrada en la célula por el transportador en lugar de por la activación de su receptor (Colegio *et al.*, 2014). Dado que se ha descrito que el compuesto CHC también inhibe la entrada de piruvato a la mitocondria (Nancolas *et al.*, 2016), es difícil discriminar hasta qué punto alguno de los efectos atribuidos al lactato no puedan deberse a cambios paralelos en el metabolismo del piruvato.

Las diferencias observadas en la transcripción de *IL10* inducida por cada estímulo pueden explicarse por las distintas vías de señalización activadas por cada PAMP (Rodríguez *et al.*, 2017). El LPS actúa a través del receptor TLR4 y activa las vías de MyD88 y TRIF que inducen los factores reguladores de interferón (IRF) y el sistema JAK/STAT, mientras que los componentes del *zymosan* se reconocen por los receptores TLR2 y de lectina tipo C como Dectin 1 y 2 que inducen también la activación de Syk (Figura 39). Este distinto reclutamiento de vías de señalización es un factor de la mayor relevancia para explicar los resultados obtenidos.



**Figura 39. Esquema de las vías de señalización utilizadas por el *zymosan* y el LPS.** El *zymosan* señala a través de TLR-2 y receptores de lectina tipo C para activar las vías de MyD88 y Syk. El LPS es reconocido por el TLR4 y activa las rutas de los adaptadores TRIF/TRAM y MyD88.

Tomados en conjunto, los datos indican que las variaciones de los niveles de lactato están implicadas en el cambio de patrón de expresión de algunas citoquinas bien sea por sus efectos intracelulares o actuando a través de su receptor. Este resultado refuerza el papel funcional que estos últimos años se está asignando al lactato como molécula señalizadora, frente a la interpretación tradicional que lo consideraba un producto de desecho del metabolismo. Estos efectos son particularmente notables en el sistema inmune y en el micro-entorno tumoral, donde alcanza concentraciones muy elevadas y constituye un punto de confluencia entre la respuesta inmune y la proliferación cancerosa (Haas *et al.*, 2016; Pucino *et al.*, 2017). Aunque estos datos sean relevantes para explicar los distintos resultados obtenidos con los tratamientos de inmunoterapia anticancerosa (Nenu *et al.*, 2017; Ippolito *et al.*, 2018), los datos obtenidos indican que la intervención sobre el metabolismo de la glucosa en la

transcripción de citoquinas como *IL23A*, *IL10* e *IL1B* no se puede explicar simplemente por la reducción de los niveles de lactato y deben tenerse en cuenta otros mecanismos en los que interviene la glucosa, como es la glicosilación de proteínas.

- **Implicación de la respuesta a proteínas mal plegadas**

Algunos estudios han desvelado que la respuesta a proteínas mal plegadas forma parte de un programa transcripcional controlado por los receptores de reconocimiento de patógenos en las células del sistema inmune innato (Cláudio *et al.*, 2013) que conduce a la activación de los elementos de la UPR tras la interacción de los PAMP con los fagocitos. Los resultados presentados muestran que aunque el *zymosan* y el LPS pueden incidir ligeramente sobre estas vías, a la vista del leve *splicing* de XBP1 y el fraccionamiento de ATF6 observados, la combinación con la 2-DG potencia significativamente la activación de las ramas IRE Y PERK de la UPR. La 2-DG genera estrés de retículo endoplasmático al interferir con las reacciones de N-glicosilación de proteínas por un mecanismo similar a la tunicamicina, mientras que la tapsigargina produce el estrés por inhibición de la SERCA. El hecho de que los tres compuestos tengan efectos similares en la modificación del patrón de citoquinas, en respuesta al *zymosan* y al LPS, indicaría que es la inducción de la UPR, más que la inhibición de la glicosilación de proteínas, el mecanismo que explicaría el aumento de la trans-activación de *IL23A*. En este sentido debe mencionarse que en un modelo de espondiloartritis en ratas se ha podido correlacionar el estrés de retículo con la producción de IL-23 (DeLay *et al.*, 2009).

La participación de XBP1 en la producción de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos (Martinon *et al.*, 2010), su relación directa con la transcripción de *IL23A* (Wang *et al.*, 2013) y la presencia de Cajas-X2 a las que se puede unir en el promotor de *IL23A* hacían indispensable valorar la posible implicación de este factor en el aumento de transcripción de *IL23A* generado por la 2-DG. Los experimentos realizados con los inhibidores de la actividad endonucleasa de IRE1 $\alpha$  y la manosa, que revierten el *splicing* de XBP1 generado por la 2-DG, demuestran la importancia de sXBP1 en la regulación de *IL23A* en respuesta al *zymosan*. Asimismo, los resultados obtenidos en los estudios de CHIP confirman el aumento de la unión directa de este factor de transcripción al promotor de *IL23A* cuando las células se estimulan con

*zymosan* en presencia de 2-DG. Dado que sXBP1 puede encontrarse en el núcleo de las células en reposo, es posible que sea necesario algún mecanismo adicional como puede ser la interacción con otros factores de transcripción, como se ha descrito durante la regulación de la homeostasis de la glucosa (Zhou *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2014), o alguna modificación post-traducciona como la fosforilación por distintas quinasas para que pueda migrar al núcleo o ejercer su funcionalidad completa (Lee *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2016).

Los experimentos realizados con las BMDC de los ratones *Ern1<sup>f</sup>/Vav1-Cre*, que presentan la delección selectiva en el sistema hematopoyético del gen que codifica *Ire1α*, confirman que una parte del efecto sobre la trans-activación de *il23a* puede asociarse de forma inequívoca con esta ruta de la UPR. Aunque el abordaje farmacológico ha proporcionado resultados compatibles con esta interpretación, no se pueden descartar otros mecanismos puesto que la activación de NF-κB está alterada bajo condiciones de estrés en líneas celulares con *knockdown* de *Ire1α* y fibroblastos embrionarios de ratón *Ern1<sup>-/-</sup>*. El mecanismo propuesto tras estos estudios sería la formación de un complejo entre *Ire1α* y la quinasa de IκB (IKK) a través de la proteína adaptadora TRAF2 (Hu *et al.*, 2006). Además, recientemente se ha reforzado la relación directa entre ambas rutas ya que IKKβ puede fosforilar sXBP1 en los residuos T48 y S148 (Liu *et al.*, 2016).

En lo que respecta a la participación de PERK, el gran incremento en la inducción del ARNm de CHOP generada por la 2-DG confirma la activación de esta vía. Los resultados obtenidos con los inhibidores farmacológicos sobre la transcripción de *IL23A* e *IL10* en las células estimuladas con LPS indicarían su participación en respuesta a ese estímulo, pero no en el caso del *zymosan*, lo que de nuevo indicaría que las distintas ramas de la UPR pueden contribuir a la producción de citoquinas de forma dependiente del estímulo. Pueden citarse como ejemplos en este sentido la diferente regulación de la producción de CXCL10 y CCL2 en células foto-receptoras (Zhu *et al.*, 2017) y la producción de IL-1β en monocitos (Snodgrass *et al.*, 2016).

La reversión del aumento de transcripción de *IL23A* y de la disminución de la de *IL10* producidos por la inhibición farmacológica de la ruta PERK, concuerda con los resultados que muestran que la inhibición de PERK disminuye la respuesta al LPS mediante la reducción de la transcripción de genes pro-inflamatorios a través de la

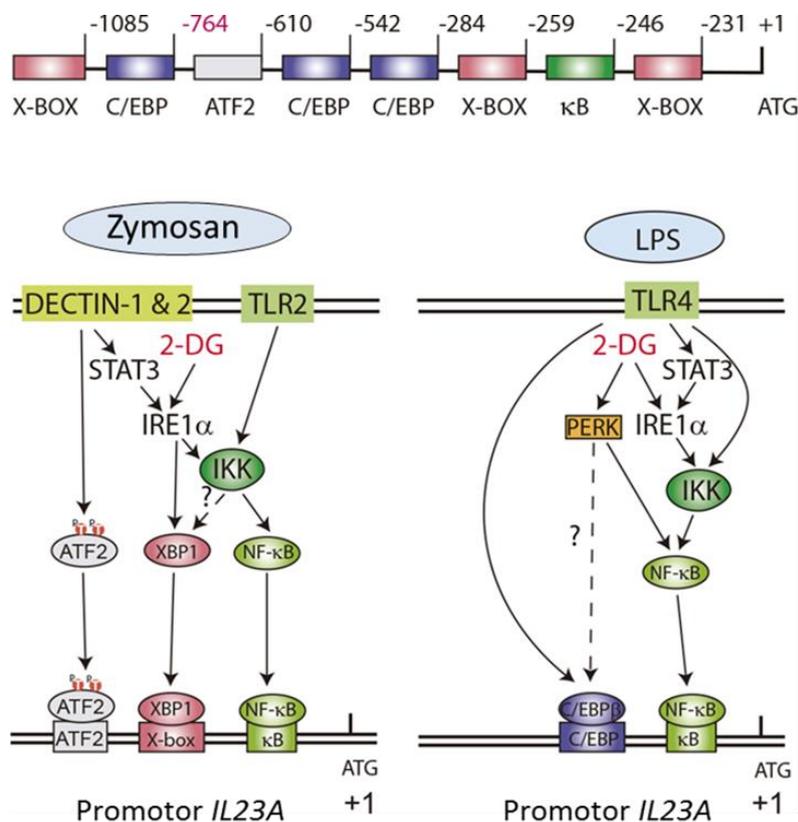
represión traduccional (Guthrie *et al.*, 2016). La activación de PERK se asocia con una activación máxima de NF- $\kappa$ B durante la UPR por la disminución de los niveles de IKK (Deng *et al.*, 2004; Tam *et al.*, 2012) y también a través de la competencia entre la subunidad RelA/p65 y CREB por la unión a CBP, que se encuentra en cantidades limitadas en el núcleo (Vo y Goodman, 2001). Además, en monocitos se ha demostrado un aumento de la producción de IL-10 ligado a la inhibición de GSK3 $\beta$ . La inhibición de esta quinasa aumenta la capacidad de unión de CREB fosforilado en la serina 133 a CBP y al ADN, paralelamente a la disminución de la unión RelA/p65 a CBP (Martin *et al.*, 2005). Este mecanismo coincide con los resultados obtenidos, a la vista de la reducción de la fosforilación inhibitoria de GSK3 $\beta$  y la menor unión de CBP al promotor de *IL10* en presencia de 2-DG que cuando las CD se estimulan sólo con LPS. La competencia entre NF- $\kappa$ B y CREB por CBP explicaría la recuperación de los niveles del ARNm de IL-10 tras la inhibición de PERK, ya que al existir menos subunidades RelA/p65 libres se favorecería la unión CREB-CBP y, en consecuencia, la trans-activación de *IL10*.

Los experimentos de CHIP confirman la participación directa de C/EBP $\beta$  en el incremento de la transcripción de *IL23A* en respuesta a la combinación 2-DG-LPS. La asociación de C/EBP $\beta$  con la UPR ha sido objeto de investigación detallada. Se ha descrito que C/EBP $\beta$  induce la activación transcripcional de XBP1 en adipocitos (Guo, Li y Tang, 2015) y, a su vez, XBP1 se induce por la ocupación de una Caja-X2 presente en células humanas y ausente en roedores (Chen *et al.*, 2004) y también por la ruta PERK (Hayakawa *et al.*, 2010). Además, su condición de factor pionero en macrófagos y su participación en la apertura de la estructura de la cromatina, posiciona a C/EBP $\beta$  como un elemento clave para la formar *enhanceosomas* con otros factores y estimular la transcripción (Plevy *et al.*, 1997; Bradley, Zhou y Smale, 2003).

Por otra parte, se ha descrito un nuevo mecanismo por el que la ruta PERK/JAK1/STAT3 contribuiría a la inflamación inducida por el estrés de retículo. La dimerización de PERK atraería a JAK a su entorno, lo que permitiría de forma sucesiva su autofosforilación, la fosforilación del dominio intracitoplasmático de PERK en las tirosinas 585 y 619, la activación de su actividad quinasa y la fosforilación de la tirosina 705 de STAT3 (Meares *et al.*, 2014). Datos recientes avalan la interconexión entre las rutas IRE y PERK a través de STAT3 ya que éste tiene un

papel crítico en la activación no canónica de la UPR mediante un mecanismo en el que intervienen IRE1 $\alpha$  y XBP1 y se produce tras la estimulación con citoquinas (Yan *et al.*, 2016). Los resultados mostrados en esta memoria indican que el *zymosan* y el LPS inducen la fosforilación de STAT3, bien a través de algún mediador secundario o por activación de la rama TRIF/TRAM en el caso del LPS/TLR4 (Rodríguez *et al.*, 2017).

Tomados colectivamente, los datos presentados indicarían que el mecanismo actualmente aceptado de regulación transcripcional de *IL23A*, en las CD, que incluye la activación de NF- $\kappa$ B, ATF2 y C/EBP $\beta$  (Brain *et al.*, 2013; Deng *et al.*, 2004; Al-Salleh y Petro, 2008) es potenciado por el reclutamiento de las ramas IRE y PERK, como se muestra en el diagrama explicativo (Figura 40).



**Figura 40. Esquema de las rutas implicadas en la regulación transcripcional de *IL23A* durante la respuesta a proteínas mal plegadas.** En la parte superior se muestra la estructura del promotor proximal de *IL23A* con los elementos reguladores para la unión de XBP1, ATF2, NF- $\kappa$ B y C/EBP $\beta$ . La formación de un *enhanceosoma* que contiene NF- $\kappa$ B, C/EBP $\beta$  y XBP1 parece ser el mecanismo más probable, con una distinta combinación de elementos dependiendo de la naturaleza del estímulo. La ruta IRE1 $\alpha$  está involucrada en todos los casos y afecta a la activación de NF- $\kappa$ B y a la actividad de XBP1, esta última en el caso del *zymosan*. STAT3 se activa por los patrones fúngicos a través de mediadores secundarios, mientras que el LPS activa IRF3 e IFN $\beta$  de forma dependiente de los adaptadores TRIF/TRAM acoplados a TLR4. La rama PERK de la UPR y C/EBP $\beta$  son más importantes en respuesta a LPS. Las líneas discontinuas indican rutas avaladas por otros estudios y no exploradas en los experimentos presentados.

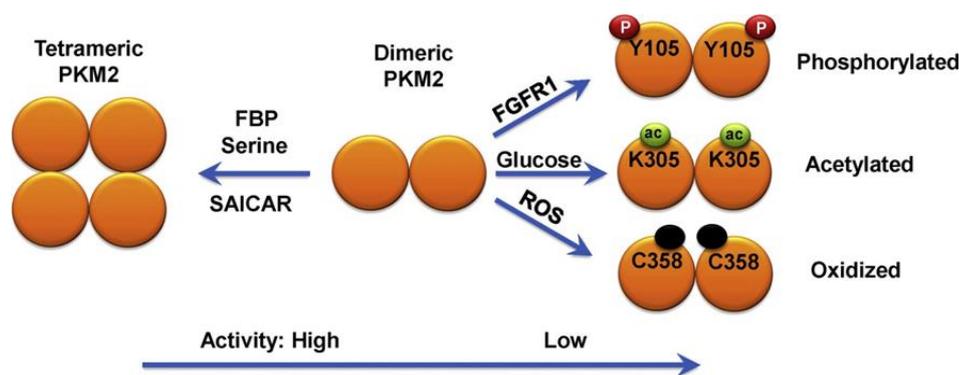
La relevancia clínica de estos resultados se demuestra por el hecho que las CD presentes en el ambiente tumoral muestran una activación de XBP1 que bloquea la respuesta inmune anti-tumoral y favorece la proliferación de las células cancerosas (Cubillos-Ruiz *et al.*, 2015). El presente estudio muestra que la estimulación de distintos PRR en condiciones de estrés de retículo induce un patrón transcripcional de citoquinas favorable a la progresión tumoral. En este sentido, se ha demostrado que la producción de IL-23 por las células mieloides asociadas a tumor en tejidos accesibles a productos microbianos es un factor favorecedor de la carcinomatosis de colon (Grivennikov *et al.*, 2012). Además, en contextos en los que la reacción inflamatoria se influye por la presencia de IL-23, como es el caso de la ateromatosis (Subramanian, Thorp y Tabas, 2015), se ha observado que la inhibición de la rama IRE frena su progresión (Tufanli *et al.*, 2017).

## **2.2 Efectos de la regulación de la actividad de la PKM2**

La regulación de la PKM2 ha sido objeto de especial interés desde que se demostró que se sobre-expresa en células tumorales con alto consumo de glucosa y elevada producción de lactato, aunque el mecanismo por el que puede influir en la demanda energética y la actividad anabólica precisas para mantener la proliferación de las células cancerosas no se ha definido satisfactoriamente. La PKM2 cataliza la transformación de fosfoenolpiruvato a piruvato mediante la donación de un grupo fosfato al ADP en el último paso de la glucólisis, pero además de llevar a cabo esta reacción, se le atribuyen distintas actividades dependientes de su conformación y localización (Boukouris, Zervopoulos y Michelakis, 2016). La semejanza del cambio metabólico sufrido por las células del sistema inmune con el de las células tumorales justifica el análisis de la función de PKM2 en la reprogramación metabólica y las consecuencias de su modulación farmacológica sobre la función efectora de las CD.

A la vista de la confirmación de que la PKM2 es la isoforma predominante en las CD, se decidió utilizar el compuesto ML-265 para reforzar su conformación tetramérica (Tamada, Suematsu y Saya, 2012) con el fin de aumentar el flujo glucolítico. La pre-incubación de las células con este compuesto produjo una disminución de la transcripción de *IL23A*, *IL10* e *IL1B* inducida por el *zymosan*, mientras que no se observó ningún efecto sobre la respuesta al LPS. Se ha descrito que el refuerzo de la conformación tetramérica de la PKM2 aumenta la producción de lactato y disminuye

el flujo de piruvato, probablemente por la formación de un complejo supramolecular con la lactato deshidrogenasa (Mazurek *et al.*, 2001; Christofk *et al.*, 2008; Anastasiou *et al.*, 2012). De forma opuesta, se ha referido que la fosforilación de la tirosina 105 de la PKM2, que previene la formación de tetrámeros, promueve el efecto Warburg en células tumorales (Hitosugi *et al.*, 2009) y la glucólisis en macrófagos de ratón, y reduce la producción de IL-1B, por un mecanismo dependiente de su presencia en el núcleo y su asociación con otras proteínas (Palsson-McDermott *et al.*, 2015). En nuestro sistema no hemos observado cambios apreciables en los niveles de intermediarios metabólicos inducidos por el ML-265, ni variaciones en la bioenergética estudiada a tiempo real. El hecho de que la actividad de la PKM2 también se pueda regular por modificaciones post-traduccionales, como se muestra en la Figura 41 (Yang y Lu, 2013) dificulta la elaboración de una hipótesis definida sobre el mecanismo de acción del ML-265.



**Figura 41. Mecanismo de regulación de la actividad glucolítica de la PKM2 descrito por Yang y Lu, 2013.** La actividad de la PKM2 puede regularse por intermediarios metabólicos y por modificaciones post-traduccionales inducidas por distintos estímulos. La presencia de fructosa bisfosfato (FBP) favorece la conformación tetramérica. El factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGFR1), la presencia de elevados niveles de glucosa y de especies reactivas de  $O_2$  (ROS) ejercen un efecto opuesto.

Los experimentos de *cross-linking* muestran una conformación de la PKM2 en la que a pesar de la predominancia de la forma monomérica, existe una cantidad notable de tetrámeros, tanto en las células en reposo como tras la estimulación. Estos resultados coinciden en parte con los de Palsson-McDermont, quienes muestran que el ML-265 inhibe la translocación nuclear de la PKM2 inducida por el LPS, sin que se aprecien cambios en los niveles de proteína en el citosol. La microscopía confocal confirmó la presencia de PKM2 en los núcleos de las células estimuladas con *zymosan*, pero no se

pudo determinar sin ambigüedad la redistribución de la PKM2 entre el citoplasma y el núcleo. La disminución de la conformación dimérica en el núcleo podría explicar por qué el ML-265 disminuye la fosforilación de la tirosina 705 de STAT3 inducida por los PAMP sin que se observe efecto sobre la fosforilación de la histona, ya que en estudios *in vitro* se ha determinado que la forma dimérica fosforila preferentemente STAT3 mientras que la forma tetramérica fosforila la histona H3 (Yang *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2012), aunque los datos disponibles indican que la forma dimérica predomina en el núcleo. También se ha descrito el papel de cambios post-traduccionales en la PKM2 en la mediación de su translocación al núcleo. Alguno de estos cambios son la fosforilación en la serina 37 por ERK2 (Yang *et al.*, 2012) y la sumoilación (Spoden *et al.*, 2009). Otra posible explicación de la discrepancia entre los efectos del ML-265 y la ausencia de cambios en la conformación de PKM2 es que la transición entre las formas monomérica/dimérica y tetramérica tiene una gran plasticidad y parece ser especie y célula-específica. Por ejemplo, la forma tetramérica no se encuentra en monocitos y sí en macrófagos de pacientes con enfermedad coronaria de los que desaparece tras la estimulación (Shirai *et al.*, 2016).

Dado que no se pudo encontrar ningún cambio metabólico asociado al ML-265 pero sí observamos la disminución de la fosforilación de STAT3, la explicación más plausible para la reducción en la transcripción de citoquinas podría encontrarse en la interferencia con la actividad quinasa de esta enzima sobre algún sustrato en las rutas de señalización activadas por el *zymosan*. Teniendo en cuenta que se ha definido como uno de los mecanismos de acción del ML-265 la resistencia de la forma tetramérica a la disociación por proteínas con fosfotirosinas (Anastasiou *et al.*, 2012) y que la fosforilación de tirosinas es un mecanismo de señalización ampliamente utilizado por los receptores de lectina tipo C, no se puede descartar un efecto a este nivel.

En resumen, los resultados obtenidos indican que el compuesto ML-265 regula la actividad quinasa de la PKM2 y tiene efectos sobre las funciones efectoras de las células dendríticas estimuladas por patrones fúngicos. Esto podría tener relevancia clínica a la vista de algunos estudios que demuestran una menor mortalidad por sepsis en relación con una menor producción de citoquinas como la IL-1 $\beta$  o la IL-18, en ratones con *knockout* condicional de la PKM2 en células mieloides (Xie *et al.*,

2016). Además, el intenso desarrollo que se está llevando a cabo de moléculas que modulen la actividad de PKM2 en procesos cancerosos (Adem, Comakli y Uzun, 2018) es un argumento importante para profundizar en el conocimiento de su función y su regulación en las células del sistema inmune.

# Conclusiones



1. Las células dendríticas experimentan un incremento rápido y sostenido de la glucólisis cuando se estimulan con *zymosan* y con LPS. La fosforilación oxidativa se mantiene en el caso del LPS y se incrementa en respuesta al *zymosan*.
2. La estimulación de las CD con *zymosan* y con LPS estabiliza el factor de transcripción HIF1 $\alpha$  con un patrón temporal compatible con su implicación en el mantenimiento del cambio bioenergético producido tras la activación celular, pero no en el inicio del mismo.
3. La 2-DG modula el patrón transcripcional de citoquinas de manera estímulo-dependiente. En respuesta al *zymosan* aumenta la transcripción de *IL23A* y en respuesta al LPS aumenta la transcripción de *IL23A* y reduce la transcripción de *IL10* e *IL1B*.
4. Los niveles de lactato influyen en la transcripción de citoquinas. El lactato de sodio aumenta el ARNm de *IL23A* en respuesta al *zymosan* y al LPS, y el ARNm de *IL10* en respuesta al *zymosan*.
5. El flujo de piruvato a la mitocondria es necesario para la transcripción de *IL10* e *IL23A* en las CD estimuladas con *zymosan* y con LPS.
6. La 2-DG activa la respuesta a proteínas mal plegadas y aumenta la trans-activación de *IL23A* en respuesta a los PAMP. La rama IRE1 $\alpha$ /sXBP1 está implicada en el aumento de la transcripción en respuesta al *zymosan* y la rama PERK y el factor de transcripción C/EBP $\beta$  en el caso del LPS.
7. La activación de la rama PERK está implicada en la disminución de la transcripción de *IL10* en respuesta a la 2-DG en combinación con el LPS.
8. La 2-DG aumenta la unión del factor sXBP1 a las Cajas-X del promotor de *IL23A* en respuesta al *zymosan* y la unión de C/EBP $\beta$  a los sitios CHOP-C/EBP en respuesta al LPS. Asimismo, en combinación con el LPS, la 2-DG disminuye la unión de CBP al sitio CRE del promotor de *IL10*.
9. La modulación de la actividad de la PKM2 con el compuesto ML-265 disminuye la transcripción del ARNm de las citoquinas IL-23, IL-10 e IL-1 $\beta$  en respuesta al *zymosan*. Ante la ausencia de un patrón metabólico característico inducido por el

ML-265, los efectos observados pueden explicarse por la interferencia del ML-265 con la actividad proteína quinasa asociada a la PKM2 ya que el ML-265 disminuye la fosforilación de STAT3 inducida por los PAMP.

# Bibliografía



- Abebayehu, D., Spence, A. J., Qayum, A. A., Taruselli, M. T., McLeod, J. J., Caslin, H. L., Chumanevich, A. P., Kolawole, E. M., Paranjape, A., Baker, B., Ndaw, V. S., Barnstein, B. O., Oskeritzian, C. A., Sell, S. A. y Ryan, J. J. (2016) 'Lactic Acid Suppresses IL-33-Mediated Mast Cell Inflammatory Responses via Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ -Dependent miR-155 Suppression', *J Immunol*, 197(7), pp. 2909-17.
- Acosta-Alvear, D., Zhou, Y., Blais, A., Tsikitis, M., Lents, N. H., Arias, C., Lennon, C. J., Kluger, Y. y Dynlacht, B. D. (2007) 'XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks', *Mol Cell*, 27(1), pp. 53-66.
- Adem, S., Comakli, V. y Uzun, N. (2018) 'Pyruvate kinase activators as a therapy target: a patent review 2011-2017', *Expert Opin Ther Pat*, 28(1), pp. 61-68.
- Akins, N. S., Nielson, T. C. y Le, H. V. (2018) 'Inhibition of Glycolysis and Glutaminolysis: An Emerging Drug Discovery Approach to Combat Cancer', *Curr Top Med Chem*, 18(6), pp. 494-504.
- Al-Salleeh, F. y Petro, T. M. (2008) 'Promoter analysis reveals critical roles for SMAD-3 and ATF-2 in expression of IL-23 p19 in macrophages', *J Immunol*, 181(7), pp. 4523-33.
- Altenberg, B. y Greulich, K. O. (2004) 'Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes', *Genomics*, 84(6), pp. 1014-20.
- Alvarez, Y., Municio, C., Alonso, S., Sánchez Crespo, M. y Fernández, N. (2009) 'The induction of IL-10 by zymosan in dendritic cells depends on CREB activation by the coactivators CREB-binding protein and TORC2 and autocrine PGE2', *J Immunol*, 183(2), pp. 1471-9.
- Alvarez, Y., Rodríguez, M., Municio, C., Hugo, E., Alonso, S., Ibarrola, N., Fernández, N. y Crespo, M. S. (2012) 'Sirtuin 1 is a key regulator of the interleukin-12 p70/interleukin-23 balance in human dendritic cells', *J Biol Chem*, 287(42), pp. 35689-701.
- Anastasiou, D., Yu, Y., Israelsen, W. J., Jiang, J. K., Boxer, M. B., Hong, B. S., Tempel, W., Dimov, S., Shen, M., Jha, A., Yang, H., Mattaini, K. R., Metallo, C. M., Fiske, B. P., Courtney, K. D., Malstrom, S., Khan, T. M., Kung, C., Skoumbourdis, A. P., Veith, H., Southall, N., Walsh, M. J., Brimacombe, K. R., Leister, W., Lunt, S. Y., Johnson, Z. R., Yen, K. E., Kunii, K., Davidson, S. M., Christofk, H. R., Austin, C. P., Inglese, J., Harris, M. H., Asara, J. M., Stephanopoulos, G., Salituro, F. G., Jin, S., Dang, L., Auld, D. S., Park, H. W., Cantley, L. C., Thomas, C. J. y Vander Heiden, M. G. (2012) 'Pyruvate kinase M2 activators promote tetramer formation and suppress tumorigenesis', *Nat Chem Biol*, 8(10), pp. 839-47.
- Andresen, L., Skovbakke, S. L., Persson, G., Hagemann-Jensen, M., Hansen, K. A., Jensen, H. y Skov, S. (2012) '2-deoxy D-glucose prevents cell surface expression of NKG2D ligands through inhibition of N-linked glycosylation', *J Immunol*, 188(4), pp. 1847-55.
- Anelli, T. y Sitia, R. (2008) 'Protein quality control in the early secretory pathway', *EMBO J*, 27(2), pp. 315-27.
- Arts, R. J. W., Carvalho, A., La Rocca, C., Palma, C., Rodrigues, F., Silvestre, R., Kleinnijenhuis, J., Lachmandas, E., Gonçalves, L. G., Belinha, A., Cunha, C., Oosting, M., Joosten, L. A. B., Matarese, G., van Crevel, R. y Netea, M. G. (2016) 'Immunometabolic Pathways in BCG-Induced Trained Immunity', *Cell Rep*, 17(10), pp. 2562-2571.
- Ashizawa, K., Willingham, M. C., Liang, C. M. y Cheng, S. Y. (1991) 'In vivo regulation of monomer-tetramer conversion of pyruvate kinase subtype M2 by glucose is mediated via fructose 1,6-bisphosphate', *J Biol Chem*, 266(25), pp. 16842-6.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. y Palucka, K. (2000) 'Immunobiology of dendritic cells', *Annu Rev Immunol*, 18, pp. 767-811.
- Bertolotti, A., Wang, X., Novoa, I., Jungreis, R., Schlessinger, K., Cho, J. H., West, A. B. y Ron, D. (2001) 'Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 $\beta$ -deficient mice', *J Clin Invest*, 107(5), pp. 585-93.

- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P. y Ron, D. (2000) 'Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response', *Nat Cell Biol*, 2(6), pp. 326-32.
- Beurel, E., Grieco, S. F. y Jope, R. S. (2015) 'Glycogen synthase kinase-3 (GSK3): regulation, actions, and diseases', *Pharmacol Ther*, 148, pp. 114-31.
- Blanco, P., Palucka, A. K., Pascual, V. y Banchereau, J. (2008) 'Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases', *Cytokine Growth Factor Rev*, 19(1), pp. 41-52.
- Blander, J. M. y Sander, L. E. (2012) 'Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat', *Nat Rev Immunol*, 12(3), pp. 215-25.
- Blouin, C. C., Pagé, E. L., Soucy, G. M. y Richard, D. E. (2004) 'Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1alpha', *Blood*, 103(3), pp. 1124-30.
- Boukouris, A. E., Zervopoulos, S. D. y Michelakis, E. D. (2016) 'Metabolic Enzymes Moonlighting in the Nucleus: Metabolic Regulation of Gene Transcription', *Trends Biochem Sci*, 41(8), pp. 712-730.
- Bradford, M. M. (1976) 'A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding', *Anal Biochem*, 72, pp. 248-54.
- Bradley, M. N., Zhou, L. y Smale, S. T. (2003) 'C/EBPbeta regulation in lipopolysaccharide-stimulated macrophages', *Mol Cell Biol*, 23(14), pp. 4841-58.
- Brain, O., Owens, B. M., Pichulik, T., Allan, P., Khatamzas, E., Leslie, A., Steevels, T., Sharma, S., Mayer, A., Catuneanu, A. M., Morton, V., Sun, M. Y., Jewell, D., Coccia, M., Harrison, O., Maloy, K., Schönefeldt, S., Bornschein, S., Liston, A. y Simmons, A. (2013) 'The intracellular sensor NOD2 induces microRNA-29 expression in human dendritic cells to limit IL-23 release', *Immunity*, 39(3), pp. 521-36.
- Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S. y Gordon, S. (2003) 'Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans', *J Exp Med*, 197(9), pp. 1119-24.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G. y Ron, D. (2002) 'IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA', *Nature*, 415(6867), pp. 92-6.
- Cambronero, M.R, D. Prado-Cohrs y M. Lopez Sanroma. (2017) 'Basic immunological concepts applied to vaccination.' *Elsevier.vacun*. doi: 10.1016/j.vacun.2017.10.001
- Campbell, I. K., van Nieuwenhuijze, A., Segura, E., O'Donnell, K., Coghill, E., Hommel, M., Gerondakis, S., Villadangos, J. A. y Wicks, I. P. (2011) 'Differentiation of inflammatory dendritic cells is mediated by NF-κB1-dependent GM-CSF production in CD4 T cells', *J Immunol*, 186(9), pp. 5468-77.
- Chang, E. Y., Guo, B., Doyle, S. E. y Cheng, G. (2007) 'Cutting edge: involvement of the type I IFN production and signaling pathway in lipopolysaccharide-induced IL-10 production', *J Immunol*, 178(11), pp. 6705-9.
- Chang, Y. S., Tsai, C. T., Huangfu, C. A., Huang, W. Y., Lei, H. Y., Lin, C. F., Su, I. J., Chang, W. T., Wu, P. H., Chen, Y. T., Hung, J. H., Young, K. C. y Lai, M. D. (2011) 'ACSL3 and GSK-3β are essential for lipid upregulation induced by endoplasmic reticulum stress in liver cells', *J Cell Biochem*, 112(3), pp. 881-93.
- Chen, C., Dudenhausen, E. E., Pan, Y. X., Zhong, C. y Kilberg, M. S. (2004) 'Human CCAAT/enhancer-binding protein beta gene expression is activated by endoplasmic reticulum stress through an unfolded protein response element downstream of the protein coding sequence', *J Biol Chem*, 279(27), pp. 27948-56.
- Chen, X., Iliopoulos, D., Zhang, Q., Tang, Q., Greenblatt, M. B., Hatziapostolou, M., Lim, E., Tam, W. L., Ni, M., Chen, Y., Mai, J., Shen, H., Hu, D. Z., Adoro, S., Hu, B., Song, M., Tan, C., Landis, M. D., Ferrari, M., Shin, S. J., Brown, M., Chang, J. C., Liu, X. S. y Glimcher, L. H. (2014) 'XBP1 promotes triple-negative breast cancer by controlling the HIF1α pathway', *Nature*, 508(7494), pp. 103-107.

- Cheng, S. C., Quintin, J., Cramer, R. A., Shepardson, K. M., Saeed, S., Kumar, V., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Martens, J. H., Rao, N. A., Aghajani-farah, A., Manjeri, G. R., Li, Y., Ifrim, D. C., Arts, R. J., van der Veer, B. M., van der Meer, B. M., Deen, P. M., Logie, C., O'Neill, L. A., Willems, P., van de Veerdonk, F. L., van der Meer, J. W., Ng, A., Joosten, L. A., Wijmenga, C., Stunnenberg, H. G., Xavier, R. J. y Netea, M. G. (2014) 'mTOR- and HIF-1 $\alpha$ -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity', *Science*, 345(6204), pp. 1250684.
- Christofk, H. R., Vander Heiden, M. G., Harris, M. H., Ramanathan, A., Gerszten, R. E., Wei, R., Fleming, M. D., Schreiber, S. L. y Cantley, L. C. (2008) 'The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth', *Nature*, 452(7184), pp. 230-3.
- Clower, C. V., Chatterjee, D., Wang, Z., Cantley, L. C., Vander Heiden, M. G. y Krainer, A. R. (2010) 'The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(5), pp. 1894-9.
- Cláudio, N., Dalet, A., Gatti, E. y Pierre, P. (2013) 'Mapping the crossroads of immune activation and cellular stress response pathways', *EMBO J*, 32(9), pp. 1214-24.
- Coelho, D. S. y Domingos, P. M. (2014) 'Physiological roles of regulated Ire1 dependent decay', *Front Genet*, 5, pp. 76.
- Colegio, O. R., Chu, N. Q., Szabo, A. L., Chu, T., Rhebergen, A. M., Jairam, V., Cyrus, N., Brokowski, C. E., Eisenbarth, S. C., Phillips, G. M., Cline, G. W., Phillips, A. J. y Medzhitov, R. (2014) 'Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid', *Nature*, 513(7519), pp. 559-63.
- Couper, K. N., Blount, D. G. y Riley, E. M. (2008) 'IL-10: the master regulator of immunity to infection', *J Immunol*, 180(9), pp. 5771-7.
- Cox, J. S. y Walter, P. (1996) 'A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response', *Cell*, 87(3), pp. 391-404.
- Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., Zurawski, S., Wiekowski, M., Lira, S. A., Gorman, D., Kastelein, R. A. y Sedgwick, J. D. (2003) 'Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain', *Nature*, 421(6924), pp. 744-8.
- Cubillos-Ruiz, J. R., Silberman, P. C., Rutkowski, M. R., Chopra, S., Perales-Puchalt, A., Song, M., Zhang, S., Bettigole, S. E., Gupta, D., Holcomb, K., Ellenson, L. H., Caputo, T., Lee, A. H., Conejo-Garcia, J. R. y Glimcher, L. H. (2015) 'ER Stress Sensor XBP1 Controls Anti-tumor Immunity by Disrupting Dendritic Cell Homeostasis', *Cell*, 161(7), pp. 1527-38.
- Dang, E. V., Barbi, J., Yang, H. Y., Jinasena, D., Yu, H., Zheng, Y., Bordman, Z., Fu, J., Kim, Y., Yen, H. R., Luo, W., Zeller, K., Shimoda, L., Topalian, S. L., Semenza, G. L., Dang, C. V., Pardoll, D. M. y Pan, F. (2011) 'Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1', *Cell*, 146(5), pp. 772-84.
- DeLay, M. L., Turner, M. J., Klenk, E. I., Smith, J. A., Sowders, D. P. y Colbert, R. A. (2009) 'HLA-B27 misfolding and the unfolded protein response augment interleukin-23 production and are associated with Th17 activation in transgenic rats', *Arthritis Rheum*, 60(9), pp. 2633-43.
- Deng, J., Lu, P. D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Sonenberg, N., Harding, H. P. y Ron, D. (2004) 'Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2', *Mol Cell Biol*, 24(23), pp. 10161-8.
- Dennehy, K. M., Willment, J. A., Williams, D. L. y Brown, G. D. (2009) 'Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-1 and TLR signaling pathways', *Eur J Immunol*, 39(5), pp. 1379-86.

- Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T. L., Oswald-Richter, K., Kasprovicz, D. J., Kellar, K., Pare, J., van Dyke, T., Ziegler, S., Unutmaz, D. y Pulendran, B. (2006) 'Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance', *J Clin Invest*, 116(4), pp. 916-28.
- Domínguez, P. M. y Ardavín, C. (2010) 'Differentiation and function of mouse monocyte-derived dendritic cells in steady state and inflammation', *Immunol Rev*, 234(1), pp. 90-104.
- Errea, A., Cayet, D., Marchetti, P., Tang, C., Kluza, J., Offermanns, S., Sirard, J. C. y Rumbo, M. (2016) 'Lactate Inhibits the Pro-Inflammatory Response and Metabolic Reprogramming in Murine Macrophages in a GPR81-Independent Manner', *PLoS One*, 11(11), pp. e0163694.
- Everts, B., Amiel, E., Huang, S. C., Smith, A. M., Chang, C. H., Lam, W. Y., Redmann, V., Freitas, T. C., Blagih, J., van der Windt, G. J., Artyomov, M. N., Jones, R. G., Pearce, E. L. y Pearce, E. J. (2014) 'TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKK $\epsilon$  supports the anabolic demands of dendritic cell activation', *Nat Immunol*, 15(4), pp. 323-32.
- Everts, B., Amiel, E., van der Windt, G. J., Freitas, T. C., Chott, R., Yarasheski, K. E., Pearce, E. L. y Pearce, E. J. (2012) 'Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells', *Blood*, 120(7), pp. 1422-31.
- Everts, B. y Pearce, E. J. (2014) 'Metabolic control of dendritic cell activation and function: recent advances and clinical implications', *Front Immunol*, 5, pp. 203.
- Ferreira, G. B., Kleijwegt, F. S., Waelkens, E., Lage, K., Nikolic, T., Hansen, D. A., Workman, C. T., Roep, B. O., Overbergh, L. y Mathieu, C. (2012) 'Differential protein pathways in 1,25-dihydroxyvitamin d(3) and dexamethasone modulated tolerogenic human dendritic cells', *J Proteome Res*, 11(2), pp. 941-71.
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W. y Mosmann, T. R. (1989) 'Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones', *J Exp Med*, 170(6), pp. 2081-95.
- Firth, J. D., Ebert, B. L. y Ratcliffe, P. J. (1995) 'Hypoxic regulation of lactate dehydrogenase A. Interaction between hypoxia-inducible factor 1 and cAMP response elements', *J Biol Chem*, 270(36), pp. 21021-7.
- Fitzpatrick FW y DiCarlo FJ (1964). 'Zymosan'. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 118: 233-262.
- Ganeshan, K. y Chawla, A. (2014) 'Metabolic regulation of immune responses', *Annu Rev Immunol*, 32, pp. 609-34.
- Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S. y Underhill, D. M. (2003) 'Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2', *J Exp Med*, 197(9), pp. 1107-17.
- Gao, X., Wang, H., Yang, J. J., Liu, X. y Liu, Z. R. (2012) 'Pyruvate kinase M2 regulates gene transcription by acting as a protein kinase', *Mol Cell*, 45(5), pp. 598-609.
- Ge, H., Weiszmann, J., Reagan, J. D., Gupte, J., Baribault, H., Gyuris, T., Chen, J. L., Tian, H. y Li, Y. (2008) 'Elucidation of signaling and functional activities of an orphan GPCR, GPR81', *J Lipid Res*, 49(4), pp. 797-803.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Lyakh, L. A., Batoni, G., Esin, S., Winkler-Pickett, R. T., Consolaro, M. R., De Marchi, M., Giachino, D., Robbiano, A., Astegiano, M., Sambataro, A., Kastelein, R. A., Carra, G. y Trinchieri, G. (2008) 'Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells', *J Exp Med*, 205(6), pp. 1447-61.
- Goodall, J. C., Wu, C., Zhang, Y., McNeill, L., Ellis, L., Saudek, V. y Gaston, J. S. (2010) 'Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(41), pp. 17698-703.

- Gorman, A. M., Healy, S. J., Jäger, R. y Samali, A. (2012) 'Stress management at the ER: regulators of ER stress-induced apoptosis', *Pharmacol Ther*, 134(3), pp. 306-16.
- Grimes, C. A. y Jope, R. S. (2001) 'CREB DNA binding activity is inhibited by glycogen synthase kinase-3 beta and facilitated by lithium', *J Neurochem*, 78(6), pp. 1219-32.
- Grivennikov, S. I., Wang, K., Mucida, D., Stewart, C. A., Schnabl, B., Jauch, D., Taniguchi, K., Yu, G. Y., Osterreicher, C. H., Hung, K. E., Datz, C., Feng, Y., Fearon, E. R., Oukka, M., Tessarollo, L., Coppola, V., Yarovinsky, F., Cheroutre, H., Eckmann, L., Trinchieri, G. y Karin, M. (2012) 'Adenoma-linked barrier defects and microbial products drive IL-23/IL-17-mediated tumour growth', *Nature*, 491(7423), pp. 254-8.
- Grossbard, L. y Schimke, R. T. (1966) 'Multiple hexokinases of rat tissues. Purification and comparison of soluble forms', *J Biol Chem*, 241(15), pp. 3546-60.
- Guo, L., Li, X. y Tang, Q. Q. (2015) 'Transcriptional regulation of adipocyte differentiation: a central role for CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP)  $\beta$ ', *J Biol Chem*, 290(2), pp. 755-61.
- Gupta, P., Singh, A., Gowda, P., Ghosh, S., Chatterjee, A. y Sen, E. (2016) 'Lactate induced HIF-1 $\alpha$ -PRMT1 cross talk affects MHC I expression in monocytes', *Exp Cell Res*, 347(2), pp. 293-300.
- Guthrie, L. N., Abiraman, K., Plyler, E. S., Sprenkle, N. T., Gibson, S. A., McFarland, B. C., Rajbhandari, R., Rowse, A. L., Benveniste, E. N. y Meares, G. P. (2016) 'Attenuation of PKR-like ER Kinase (PERK) Signaling Selectively Controls Endoplasmic Reticulum Stress-induced Inflammation Without Compromising Immunological Responses', *J Biol Chem*, 291(30), pp. 15830-40.
- Haas, R., Cucchi, D., Smith, J., Pucino, V., Macdougall, C. E. y Mauro, C. (2016) 'Intermediates of Metabolism: From Bystanders to Signalling Molecules', *Trends Biochem Sci*, 41(5), pp. 460-471.
- Halestrap, A. P. (2012) 'The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization', *IUBMB Life*, 64(1), pp. 1-9.
- Hammad, H., Plantinga, M., Deswarte, K., Pouliot, P., Willart, M. A., Kool, M., Muskens, F. y Lambrecht, B. N. (2010) 'Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen', *J Exp Med*, 207(10), pp. 2097-111.
- Han, D., Lerner, A. G., Vande Walle, L., Upton, J. P., Xu, W., Hagen, A., Backes, B. J., Oakes, S. A. y Papa, F. R. (2009) 'IRE1 $\alpha$  kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates', *Cell*, 138(3), pp. 562-75.
- Han, J., Back, S. H., Hur, J., Lin, Y. H., Gildersleeve, R., Shan, J., Yuan, C. L., Krokowski, D., Wang, S., Hatzoglou, M., Kilberg, M. S., Sartor, M. A. y Kaufman, R. J. (2013) 'ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death', *Nat Cell Biol*, 15(5), pp. 481-90.
- Harada, K., Saheki, S., Wada, K. y Tanaka, T. (1978) 'Purification of four pyruvate kinase isozymes of rats by affinity elution chromatography', *Biochim Biophys Acta*, 524(2), pp. 327-39.
- Harding, H. P., Zhang, Y. y Ron, D. (1999) 'Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase', *Nature*, 397(6716), pp. 271-4.
- Hayakawa, K., Nakajima, S., Hiramatsu, N., Okamura, M., Huang, T., Saito, Y., Tagawa, Y., Tamai, M., Takahashi, S., Yao, J. y Kitamura, M. (2010) 'ER stress depresses NF-kappaB activation in mesangial cells through preferential induction of C/EBP beta', *J Am Soc Nephrol*, 21(1), pp. 73-81.
- Hetz, C. (2012) 'The unfolded protein response: controlling cell fate decisions under ER stress and beyond', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13(2), pp. 89-102.
- Hitosugi, T., Kang, S., Vander Heiden, M. G., Chung, T. W., Elf, S., Lythgoe, K., Dong, S., Lonial, S., Wang, X., Chen, G. Z., Xie, J., Gu, T. L., Polakiewicz, R. D., Roesel, J. L., Boggon, T. J., Khuri, F. R., Gilliland, D. G., Cantley, L. C., Kaufman, J. y Chen, J. (2009) 'Tyrosine phosphorylation inhibits PKM2 to promote the Warburg effect and tumor growth', *Sci Signal*, 2(97), pp. ra73.

- Hollien, J. y Weissman, J. S. (2006) 'Decay of endoplasmic reticulum-localized mRNAs during the unfolded protein response', *Science*, 313(5783), pp. 104-7.
- Hoque, R., Farooq, A., Ghani, A., Gorelick, F. y Mehal, W. Z. (2014) 'Lactate reduces liver and pancreatic injury in Toll-like receptor- and inflammasome-mediated inflammation via GPR81-mediated suppression of innate immunity', *Gastroenterology*, 146(7), pp. 1763-74.
- Horn, D. L., Neofytos, D., Anaissie, E. J., Fishman, J. A., Steinbach, W. J., Olyaei, A. J., Marr, K. A., Pfaller, M. A., Chang, C. H. y Webster, K. M. (2009) 'Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry', *Clin Infect Dis*, 48(12), pp. 1695-703.
- Hoseini, Z., Sepahvand, F., Rashidi, B., Sahebkar, A., Masoudifar, A. y Mirzaei, H. (2018) 'NLRP3 inflammasome: Its regulation and involvement in atherosclerosis', *J Cell Physiol*, 233(3), pp. 2116-2132.
- Hu, P., Han, Z., Couvillon, A. D., Kaufman, R. J. y Exton, J. H. (2006) 'Autocrine tumor necrosis factor alpha links endoplasmic reticulum stress to the membrane death receptor pathway through IRE1alpha-mediated NF-kappaB activation and down-regulation of TRAF2 expression', *Mol Cell Biol*, 26(8), pp. 3071-84.
- Ikeda, Y. y Noguchi, T. (1998) 'Allosteric regulation of pyruvate kinase M2 isozyme involves a cysteine residue in the intersubunit contact', *J Biol Chem*, 273(20), pp. 12227-33.
- Ikeda, Y., Tanaka, T. y Noguchi, T. (1997) 'Conversion of non-allosteric pyruvate kinase isozyme into an allosteric enzyme by a single amino acid substitution', *J Biol Chem*, 272(33), pp. 20495-501.
- Ippolito, L., Morandi, A., Giannoni, E. y Chiarugi, P. (2018) 'Lactate: A Metabolic Driver in the Tumour Landscape', *Trends Biochem Sci*.
- Janeway, C. A. (1989) 'Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 54 Pt 1, pp. 1-13.
- Janeway, C. A. (1992) 'The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self', *Immunol Today*, 13(1), pp. 11-6.
- Jantsch, J., Chakravorty, D., Turza, N., Prectel, A. T., Buchholz, B., Gerlach, R. G., Volke, M., Gläsner, J., Warnecke, C., Wiesener, M. S., Eckardt, K. U., Steinkasserer, A., Hensel, M. y Willam, C. (2008) 'Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function', *J Immunol*, 180(7), pp. 4697-705.
- Jantsch, J., Wiese, M., Schödel, J., Castiglione, K., Gläsner, J., Kolbe, S., Mole, D., Schleicher, U., Eckardt, K. U., Hensel, M., Lang, R., Bogdan, C., Schnare, M. y Willam, C. (2011) 'Toll-like receptor activation and hypoxia use distinct signaling pathways to stabilize hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF1A) and result in differential HIF1A-dependent gene expression', *J Leukoc Biol*, 90(3), pp. 551-62.
- Jin, P., Han, T. H., Ren, J., Saunders, S., Wang, E., Marincola, F. M. y Stroncek, D. F. (2010) 'Molecular signatures of maturing dendritic cells: implications for testing the quality of dendritic cell therapies', *J Transl Med*, 8, pp. 4.
- Joffre, O., Nolte, M. A., Spörri, R. y Reis e Sousa, C. (2009) 'Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity', *Immunol Rev*, 227(1), pp. 234-47.
- Jurkin, J., Henkel, T., Nielsen, A. F., Minnich, M., Popow, J., Kaufmann, T., Heindl, K., Hoffmann, T., Busslinger, M. y Martinez, J. (2014) 'The mammalian tRNA ligase complex mediates splicing of XBP1 mRNA and controls antibody secretion in plasma cells', *EMBO J*, 33(24), pp. 2922-36.
- Kankkunen, P., Teirilä, L., Rintahaka, J., Alenius, H., Wolff, H. y Matikainen, S. (2010) '(1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages', *J Immunol*, 184(11), pp. 6335-42.

- Kaplon, J., Zheng, L., Meissl, K., Chaneton, B., Selivanov, V. A., Mackay, G., van der Burg, S. H., Verdegaal, E. M., Cascante, M., Shlomi, T., Gottlieb, E. y Peeper, D. S. (2013) 'A key role for mitochondrial gatekeeper pyruvate dehydrogenase in oncogene-induced senescence', *Nature*, 498(7452), pp. 109-12.
- Katoh, Y., Takemori, H., Lin, X. Z., Tamura, M., Muraoka, M., Satoh, T., Tsuchiya, Y., Min, L., Doi, J., Miyauchi, A., Witters, L. A., Nakamura, H. y Okamoto, M. (2006) 'Silencing the constitutive active transcription factor CREB by the LKB1-SIK signaling cascade', *FEBS J*, 273(12), pp. 2730-48.
- Kelly, B. y O'Neill, L. A. (2015) 'Metabolic reprogramming in macrophages and dendritic cells in innate immunity', *Cell Res*, 25(7), pp. 771-84.
- Kelly, E. K., Wang, L. e Ivashkiv, L. B. (2010) 'Calcium-activated pathways and oxidative burst mediate zymosan-induced signaling and IL-10 production in human macrophages', *J Immunol*, 184(10), pp. 5545-52.
- Kim, S., Joe, Y., Kim, H. J., Kim, Y. S., Jeong, S. O., Pae, H. O., Ryter, S. W., Surh, Y. J. y Chung, H. T. (2015) 'Endoplasmic reticulum stress-induced IRE1 $\alpha$  activation mediates cross-talk of GSK-3 $\beta$  and XBP-1 to regulate inflammatory cytokine production', *J Immunol*, 194(9), pp. 4498-506.
- Kocieda, V. P., Adhikary, S., Emig, F., Yen, J. H., Toscano, M. G. y Ganea, D. (2012) 'Prostaglandin E2-induced IL-23p19 subunit is regulated by cAMP-responsive element-binding protein and C/ATF enhancer-binding protein  $\beta$  in bone marrow-derived dendritic cells', *J Biol Chem*, 287(44), pp. 36922-35.
- Kool, M., Soullié, T., van Nimwegen, M., Willart, M. A., Muskens, F., Jung, S., Hoogsteden, H. C., Hammad, H. y Lambrecht, B. N. (2008) 'Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells', *J Exp Med*, 205(4), pp. 869-82.
- Kozutsumi, Y., Segal, M., Normington, K., Gething, M. J. y Sambrook, J. (1988) 'The presence of malformed proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins', *Nature*, 332(6163), pp. 462-4.
- 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. y Pearce, E. J. (2010) 'Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation', *Blood*, 115(23), pp. 4742-9.
- Kreymborg, K., Etzensperger, R., Dumoutier, L., Haak, S., Rebollo, A., Buch, T., Heppner, F. L., Renaud, J. C. y Becher, B. (2007) 'IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis', *J Immunol*, 179(12), pp. 8098-104.
- Kryczek, I., Banerjee, M., Cheng, P., Vatan, L., Szeliga, W., Wei, S., Huang, E., Finlayson, E., Simeone, D., Welling, T. H., Chang, A., Coukos, G., Liu, R. y Zou, W. (2009) 'Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments', *Blood*, 114(6), pp. 1141-9.
- Kurtoglu, M., Maher, J. C. y Lampidis, T. J. (2007) 'Differential toxic mechanisms of 2-deoxy-D-glucose versus 2-fluorodeoxy-D-glucose in hypoxic and normoxic tumor cells', *Antioxid Redox Signal*, 9(9), pp. 1383-90.
- Kühn, R., Löhler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. y Müller, W. (1993) 'Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis', *Cell*, 75(2), pp. 263-74.
- Lachmandas, E., Boutens, L., Ratter, J. M., Hijmans, A., Hooiveld, G. J., Joosten, L. A., Rodenburg, R. J., Fransen, J. A., Houtkooper, R. H., van Crevel, R., Netea, M. G. y Stienstra, R. (2016) 'Microbial stimulation of different Toll-like receptor signalling pathways induces diverse metabolic programmes in human monocytes', *Nat Microbiol*, 2, pp. 16246.
- Laemmli, U. K. (1970) 'Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4', *Nature*, 227(5259), pp. 680-5.

- Lee, A. H., Scapa, E. F., Cohen, D. E. y Glimcher, L. H. (2008) 'Regulation of hepatic lipogenesis by the transcription factor XBP1', *Science*, 320(5882), pp. 1492-6.
- Lee, E., Trepicchio, W. L., Oestreicher, J. L., Pittman, D., Wang, F., Chamian, F., Dhodapkar, M. y Krueger, J. G. (2004) 'Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris', *J Exp Med*, 199(1), pp. 125-30.
- Lee, J., Sun, C., Zhou, Y., Gokalp, D., Herrema, H., Park, S. W., Davis, R. J. y Ozcan, U. (2011) 'p38 MAPK-mediated regulation of Xbp1s is crucial for glucose homeostasis', *Nat Med*, 17(10), pp. 1251-60.
- León, B., López-Bravo, M. y Ardavín, C. (2007) 'Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania', *Immunity*, 26(4), pp. 519-31.
- Li, M., Gao, Z., Wang, Y., Wang, H. y Zhang, S. (2014) 'Identification, expression and bioactivity of hexokinase in amphioxus: insights into evolution of vertebrate hexokinase genes', *Gene*, 535(2), pp. 318-26.
- Liu, J., Ibi, D., Taniguchi, K., Lee, J., Herrema, H., Akosman, B., Mucka, P., Salazar Hernandez, M. A., Uyar, M. F., Park, S. W., Karin, M. y Ozcan, U. (2016) 'Inflammation Improves Glucose Homeostasis through IKK $\beta$ -XBP1s Interaction', *Cell*, 167(4), pp. 1052-1066.e18.
- Liu, X., Fang, L., Guo, T. B., Mei, H. y Zhang, J. Z. (2013) 'Drug targets in the cytokine universe for autoimmune disease', *Trends Immunol*, 34(3), pp. 120-8.
- Lu, Y. C., Yeh, W. C. y Ohashi, P. S. (2008) 'LPS/TLR4 signal transduction pathway', *Cytokine*, 42(2), pp. 145-151.
- Luo, W., Hu, H., Chang, R., Zhong, J., Knabel, M., O'Meally, R., Cole, R. N., Pandey, A. y Semenza, G. L. (2011) 'Pyruvate kinase M2 is a PHD3-stimulated coactivator for hypoxia-inducible factor 1', *Cell*, 145(5), pp. 732-44.
- Malhi, H. y Kaufman, R. J. (2011) 'Endoplasmic reticulum stress in liver disease', *J Hepatol*, 54(4), pp. 795-809.
- Malinarich, F., Duan, K., Hamid, R. A., Bijin, A., Lin, W. X., Poidinger, M., Fairhurst, A. M. y Connolly, J. E. (2015) 'High mitochondrial respiration and glycolytic capacity represent a metabolic phenotype of human tolerogenic dendritic cells', *J Immunol*, 194(11), pp. 5174-86.
- Martin, M., Rehani, K., Jope, R. S. y Michalek, S. M. (2005) 'Toll-like receptor-mediated cytokine production is differentially regulated by glycogen synthase kinase 3', *Nat Immunol*, 6(8), pp. 777-84.
- Martin-Orozco, N., Muranski, P., Chung, Y., Yang, X. O., Yamazaki, T., Lu, S., Hwu, P., Restifo, N. P., Overwijk, W. W. y Dong, C. (2009) 'T helper 17 cells promote cytotoxic T cell activation in tumor immunity', *Immunity*, 31(5), pp. 787-98.
- Martinez-Costa, O. (2015) 'Glicolisis, efecto Warburg y flexibilidad metabólica tumoral'. SEBBM doi.org/10.18567/sebbmdiv\_RPC.2015.06.1
- Martinon, F., Chen, X., Lee, A. H. y Glimcher, L. H. (2010) 'TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages', *Nat Immunol*, 11(5), pp. 411-8.
- Martins, A. S., Alves, I., Helguero, L., Domingues, M. R. y Neves, B. M. (2016) 'The Unfolded Protein Response in Homeostasis and Modulation of Mammalian Immune Cells', *Int Rev Immunol*, 35(6), pp. 457-476.
- Matsuda, S., Adachi, J., Ihara, M., Tanuma, N., Shima, H., Kakizuka, A., Ikura, M., Ikura, T. y Matsuda, T. (2016) 'Nuclear pyruvate kinase M2 complex serves as a transcriptional coactivator of arylhydrocarbon receptor', *Nucleic Acids Res*, 44(2), pp. 636-47.
- Matzinger, P. (1994) 'Tolerance, danger, y the extended family', *Annu Rev Immunol*, 12, pp. 991-1045.

- Mazurek, S., Zwerschke, W., Jansen-Dürr, P. y Eigenbrodt, E. (2001) 'Effects of the human papilloma virus HPV-16 E7 oncoprotein on glycolysis and glutaminolysis: role of pyruvate kinase type M2 and the glycolytic-enzyme complex', *Biochem J*, 356(Pt 1), pp. 247-56.
- McAlpine, C. S., Bowes, A. J., Khan, M. I., Shi, Y. y Werstuck, G. H. (2012) 'Endoplasmic reticulum stress and glycogen synthase kinase-3 $\beta$  activation in apolipoprotein E-deficient mouse models of accelerated atherosclerosis', *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32(1), pp. 82-91.
- McGeachy, M. J. y Cua, D. J. (2007) 'The link between IL-23 and Th17 cell-mediated immune pathologies', *Semin Immunol*, 19(6), pp. 372-6.
- Meares, G. P., Liu, Y., Rajbhandari, R., Qin, H., Nozell, S. E., Mobley, J. A., Corbett, J. A. y Benveniste, E. N. (2014) 'PERK-dependent activation of JAK1 and STAT3 contributes to endoplasmic reticulum stress-induced inflammation', *Mol Cell Biol*, 34(20), pp. 3911-25.
- Medzhitov, R. (2007) 'Recognition of microorganisms and activation of the immune response', *Nature*, 449(7164), pp. 819-26.
- Meiser, J., Krämer, L., Sapcariu, S. C., Battello, N., Ghelfi, J., D'Herouel, A. F., Skupin, A. y Hiller, K. (2016) 'Pro-inflammatory Macrophages Sustain Pyruvate Oxidation through Pyruvate Dehydrogenase for the Synthesis of Itaconate and to Enable Cytokine Expression', *J Biol Chem*, 291(8), pp. 3932-46.
- Mellett, M., Atzei, P., Jackson, R., O'Neill, L. A. y Moynagh, P. N. (2011) 'Mal mediates TLR-induced activation of CREB and expression of IL-10', *J Immunol*, 186(8), pp. 4925-35.
- Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J. y Mortha, A. (2013) 'The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting', *Annu Rev Immunol*, 31, pp. 563-604.
- Morelli, A. E. y Thomson, A. W. (2007) 'Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance', *Nat Rev Immunol*, 7(8), pp. 610-21.
- Nakano, H., Lin, K. L., Yanagita, M., Charbonneau, C., Cook, D. N., Kakiuchi, T. y Gunn, M. D. (2009) 'Blood-derived inflammatory dendritic cells in lymph nodes stimulate acute T helper type 1 immune responses', *Nat Immunol*, 10(4), pp. 394-402.
- Nancolas, B., Guo, L., Zhou, R., Nath, K., Nelson, D. S., Leeper, D. B., Blair, I. A., Glickson, J. D. y Halestrap, A. P. (2016) 'The anti-tumour agent lonidamine is a potent inhibitor of the mitochondrial pyruvate carrier and plasma membrane monocarboxylate transporters', *Biochem J*, 473(7), pp. 929-36.
- Nenu, I., Gafencu, G. A., Popescu, T. y Kacso, G. (2017) 'Lactate - A new frontier in the immunology and therapy of prostate cancer', *J Cancer Res Ther*, 13(3), pp. 406-411.
- Noguchi, T., Inoue, H. y Tanaka, T. (1986) 'The M1- and M2-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing', *J Biol Chem*, 261(29), pp. 13807-12.
- Noguchi, T., Yamada, K., Inoue, H., Matsuda, T. y Tanaka, T. (1987) 'The L- and R-type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from a single gene by use of different promoters', *J Biol Chem*, 262(29), pp. 14366-71.
- O'Neill, L. A. y Hardie, D. G. (2013) 'Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation', *Nature*, 493(7432), pp. 346-55.
- O'Neill, L. A., Kishton, R. J. y Rathmell, J. (2016) 'A guide to immunometabolism for immunologists', *Nat Rev Immunol*, 16(9), pp. 553-65.
- O'Neill, L. A. y Pearce, E. J. (2016) 'Immunometabolism governs dendritic cell and macrophage function', *J Exp Med*, 213(1), pp. 15-23.

- Obach, M., Navarro-Sabaté, A., Caro, J., Kong, X., Duran, J., Gómez, M., Perales, J. C., Ventura, F., Rosa, J. L. y Bartrons, R. (2004) '6-Phosphofructo-2-kinase (pfkfb3) gene promoter contains hypoxia-inducible factor-1 binding sites necessary for transactivation in response to hypoxia', *J Biol Chem*, 279(51), pp. 53562-70.
- Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F. y Kastelein, R. A. (2000) 'Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12', *Immunity*, 13(5), pp. 715-25.
- Oren, R., Farnham, A. E., Saito, K., Milofsky, E. y Karnovsky, M. L. (1963) 'Metabolic patterns in three types of phagocytizing cells', *J Cell Biol*, 17, pp. 487-501.
- Otto, J. C., DeWitt, D. L. y Smith, W. L. (1993) 'N-glycosylation of prostaglandin endoperoxide synthases-1 and -2 and their orientations in the endoplasmic reticulum', *J Biol Chem*, 268(24), pp. 18234-42.
- Pakos-Zebrucka, K., Koryga, I., Mnich, K., Ljujic, M., Samali, A. y Gorman, A. M. (2016) 'The integrated stress response', *EMBO Rep*, 17(10), pp. 1374-1395.
- Palsson-McDermott, E. M., Curtis, A. M., Goel, G., Lauterbach, M. A., Sheedy, F. J., Gleeson, L. E., van den Bosch, M. W., Quinn, S. R., Domingo-Fernandez, R., Johnston, D. G., Jiang, J. K., Israelsen, W. J., Keane, J., Thomas, C., Clish, C., Vander Heiden, M., Vanden Heiden, M., Xavier, R. J. y O'Neill, L. A. (2015) 'Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 $\alpha$  activity and IL-1 $\beta$  induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages', *Cell Metab*, 21(1), pp. 65-80.
- Park, S. W., Herrema, H., Salazar, M., Cakir, I., Cabi, S., Basibuyuk Sahin, F., Chiu, Y. H., Cantley, L. C. y Ozcan, U. (2014) 'BRD7 regulates XBP1s' activity and glucose homeostasis through its interaction with the regulatory subunits of PI3K', *Cell Metab*, 20(1), pp. 73-84.
- Pearce, E. J. y Everts, B. (2015) 'Dendritic cell metabolism', *Nat Rev Immunol*, 15(1), pp. 18-29.
- Pearce, E. L. y Pearce, E. J. (2013) 'Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence', *Immunity*, 38(4), pp. 633-43.
- Perrin-Cocon, L., Aublin-Gex, A., Diaz, O., Ramière, C., Peri, F., André, P. y Lotteau, V. (2018) 'Toll-like Receptor 4-Induced Glycolytic Burst in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells Results from p38-Dependent Stabilization of HIF-1 $\alpha$  and Increased Hexokinase II Expression', *J Immunol*, 201(5), pp. 1510-1521.
- Peyssonnaud, C., Datta, V., Cramer, T., Doedens, A., Theodorakis, E. A., Gallo, R. L., Hurtado-Ziola, N., Nizet, V. y Johnson, R. S. (2005) 'HIF-1 $\alpha$  expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes', *J Clin Invest*, 115(7), pp. 1806-15.
- Plevy, S. E., Gemberling, J. H., Hsu, S., Dorner, A. J. y Smale, S. T. (1997) 'Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins', *Mol Cell Biol*, 17(8), pp. 4572-88.
- Powell, M. J., Thompson, S. A., Tone, Y., Waldmann, H. y Tone, M. (2000) 'Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region', *J Immunol*, 165(1), pp. 292-6.
- Pucino, V., Bombardieri, M., Pitzalis, C. y Mauro, C. (2017) 'Lactate at the crossroads of metabolism, inflammation, and autoimmunity', *Eur J Immunol*, 47(1), pp. 14-21.
- Pulendran, B. (2015) 'The varieties of immunological experience: of pathogens, stress, and dendritic cells', *Annu Rev Immunol*, 33, pp. 563-606.

- Qi, W., Keenan, H. A., Li, Q., Ishikado, A., Kannt, A., Sadowski, T., Yorek, M. A., Wu, I. H., Lockhart, S., Coppey, L. J., Pfenninger, A., Liew, C. W., Qiang, G., Burkart, A. M., Hastings, S., Pober, D., Cahill, C., Niewczasz, M. A., Israelsen, W. J., Tinsley, L., Stillman, I. E., Amenta, P. S., Feener, E. P., Vander Heiden, M. G., Stanton, R. C. y King, G. L. (2017) 'Pyruvate kinase M2 activation may protect against the progression of diabetic glomerular pathology and mitochondrial dysfunction', *Nat Med*, 23(6), pp. 753-762.
- Ralsler, M., Wamelink, M. M., Struys, E. A., Joppich, C., Krobitsch, S., Jakobs, C. y Lehrach, H. (2008) 'A catabolic block does not sufficiently explain how 2-deoxy-D-glucose inhibits cell growth', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(46), pp. 17807-11.
- Renner, K., Geiselhöringer, A. L., Fante, M., Bruss, C., Färber, S., Schönhammer, G., Peter, K., Singer, K., Andreesen, R., Hoffmann, P., Oefner, P., Herr, W. y Kreutz, M. (2015) 'Metabolic plasticity of human T cells: Preserved cytokine production under glucose deprivation or mitochondrial restriction, but 2-deoxy-glucose affects effector functions', *Eur J Immunol*, 45(9), pp. 2504-16.
- Riddle, S. R., Ahmad, A., Ahmad, S., Deeb, S. S., Malkki, M., Schneider, B. K., Allen, C. B. y White, C. W. (2000) 'Hypoxia induces hexokinase II gene expression in human lung cell line A549', *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 278(2), pp. L407-16.
- Riek, A. E., Oh, J., Sprague, J. E., Timpson, A., de las Fuentes, L., Bernal-Mizrachi, L., Schechtman, K. B. y Bernal-Mizrachi, C. (2012) 'Vitamin D suppression of endoplasmic reticulum stress promotes an antiatherogenic monocyte/macrophage phenotype in type 2 diabetic patients', *J Biol Chem*, 287(46), pp. 38482-94.
- Rius, J., Guma, M., Schachtrup, C., Akassoglou, K., Zinkernagel, A. S., Nizet, V., Johnson, R. S., Haddad, G. G. y Karin, M. (2008) 'NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha', *Nature*, 453(7196), pp. 807-11.
- Rodríguez, M., Domingo, E., Alonso, S., Frade, J. G., Eiros, J., Crespo, M. S. y Fernández, N. (2014) 'The unfolded protein response and the phosphorylations of activating transcription factor 2 in the trans-activation of il23a promoter produced by  $\beta$ -glucans', *J Biol Chem*, 289(33), pp. 22942-57.
- Rodríguez, M., Márquez, S., de la Rosa, J. V., Alonso, S., Castrillo, A., Sánchez Crespo, M. y Fernández, N. (2017) 'Fungal pattern receptors down-regulate the inflammatory response by a cross-inhibitory mechanism independent of interleukin-10 production', *Immunology*, 150(2), pp. 184-198.
- Saibil, H. (2013) 'Chaperone machines for protein folding, unfolding and disaggregation', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 14(10), pp. 630-42.
- Sallusto, F. y Lanzavecchia, A. (1994) 'Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha', *J Exp Med*, 179(4), pp. 1109-18.
- Sattler, S. (2017) 'The Role of the Immune System Beyond the Fight Against Infection', *Adv Exp Med Biol*, 1003, pp. 3-14.
- Segura, E., Touzot, M., Bohineust, A., Cappuccio, A., Chiocchia, G., Hosmalin, A., Dalod, M., Soumelis, V. and Amigorena, S. (2013) 'Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation', *Immunity*, 38(2), pp. 336-48.
- Semenza, G. L. (2001) 'HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing', *Curr Opin Cell Biol*, 13(2), pp. 167-71.
- Sevier, C. S. y Kaiser, C. A. (2002) 'Formation and transfer of disulphide bonds in living cells', *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3(11), pp. 836-47.
- Shan, B., Wang, X., Wu, Y., Xu, C., Xia, Z., Dai, J., Shao, M., Zhao, F., He, S., Yang, L., Zhang, M., Nan, F., Li, J., Liu, J., Jia, W., Qiu, Y., Song, B., Han, J. J., Rui, L., Duan, S. Z. y Liu, Y. (2017) 'The metabolic ER stress sensor IRE1 $\alpha$  suppresses alternative activation of macrophages and impairs energy expenditure in obesity', *Nat Immunol*, 18(5), pp. 519-529.

- Shehade, H., Acolty, V., Moser, M. y Oldenhove, G. (2015) 'Cutting Edge: Hypoxia-Inducible Factor 1 Negatively Regulates Th1 Function', *J Immunol*, 195(4), pp. 1372-6.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L. y Prywes, R. (2002) 'ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of Golgi localization signals', *Dev Cell*, 3(1), pp. 99-111.
- Shenderov, K., Riteau, N., Yip, R., Mayer-Barber, K. D., Oland, S., Hieny, S., Fitzgerald, P., Oberst, A., Dillon, C. P., Green, D. R., Cerundolo, V. y Sher, A. (2014) 'Cutting edge: Endoplasmic reticulum stress licenses macrophages to produce mature IL-1 $\beta$  in response to TLR4 stimulation through a caspase-8- and TRIF-dependent pathway', *J Immunol*, 192(5), pp. 2029-2033.
- Shi, L. Z., Wang, R., Huang, G., Vogel, P., Neale, G., Green, D. R. y Chi, H. (2011) 'HIF1 $\alpha$ -dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells', *J Exp Med*, 208(7), pp. 1367-76.
- Shime, H., Yabu, M., Akazawa, T., Kodama, K., Matsumoto, M., Seya, T. e Inoue, N. (2008) 'Tumor-secreted lactic acid promotes IL-23/IL-17 proinflammatory pathway', *J Immunol*, 180(11), pp. 7175-83.
- Shirai, T., Nazarewicz, R. R., Wallis, B. B., Yanes, R. E., Watanabe, R., Hilhorst, M., Tian, L., Harrison, D. G., Giacomini, J. C., Assimes, T. L., Goronzy, J. J. y Weyand, C. M. (2016) 'The glycolytic enzyme PKM2 bridges metabolic and inflammatory dysfunction in coronary artery disease', *J Exp Med*, 213(3), pp. 337-54.
- Singh, R., Aggarwal, A. y Misra, R. (2007) 'Th1/Th17 cytokine profiles in patients with reactive arthritis/undifferentiated spondyloarthritis', *J Rheumatol*, 34(11), pp. 2285-90.
- Smith, M. H., Ploegh, H. L. y Weissman, J. S. (2011) 'Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum', *Science*, 334(6059), pp. 1086-90.
- Snodgrass, R. G., Huang, S., Namgaladze, D., Jandali, O., Shao, T., Sama, S., Brüne, B. y Hwang, D. H. (2016) 'Docosahexaenoic acid and palmitic acid reciprocally modulate monocyte activation in part through endoplasmic reticulum stress', *J Nutr Biochem*, 32, pp. 39-45.
- Spoden, G. A., Morandell, D., Ehehalt, D., Fiedler, M., Jansen-Dürr, P., Hermann, M. y Zwerschke, W. (2009) 'The SUMO-E3 ligase PIAS3 targets pyruvate kinase M2', *J Cell Biochem*, 107(2), pp. 293-302.
- Steinman, R. M. (1991) 'The dendritic cell system and its role in immunogenicity', *Annu Rev Immunol*, 9, pp. 271-96.
- Steinman, R. M. y Cohn, Z. A. (1973) 'Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution', *J Exp Med*, 137(5), pp. 1142-62.
- Stoeklin, G., Tenenbaum, S. A., Mayo, T., Chittur, S. V., George, A. D., Baroni, T. E., Blackshear, P. J. y Anderson, P. (2008) 'Genome-wide analysis identifies interleukin-10 mRNA as target of tristetraprolin', *J Biol Chem*, 283(17), pp. 11689-99.
- Stothers, C. L., Luan, L., Fensterheim, B. A. y Bohannon, J. K. (2018) 'Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  regulation of myeloid cells', *J Mol Med (Berl)*, 96(12), pp. 1293-1306.
- Subramanian, M., Thorp, E. y Tabas, I. (2015) 'Identification of a non-growth factor role for GM-CSF in advanced atherosclerosis: promotion of macrophage apoptosis and plaque necrosis through IL-23 signaling', *Circ Res*, 116(2), pp. e13-24.
- Tabas, I. y Ron, D. (2011) 'Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress', *Nat Cell Biol*, 13(3), pp. 184-90.
- Tam, A. B., Mercado, E. L., Hoffmann, A. y Niwa, M. (2012) 'ER stress activates NF- $\kappa$ B by integrating functions of basal IKK activity, IRE1 and PERK', *PLoS One*, 7(10), pp. e45078.

- Tamada, M., Suematsu, M. y Saya, H. (2012) 'Pyruvate kinase M2: multiple faces for conferring benefits on cancer cells', *Clin Cancer Res*, 18(20), pp. 5554-61.
- Tannahill, G. M., Curtis, A. M., Adamik, J., Palsson-McDermott, E. M., McGettrick, A. F., Goel, G., Frezza, C., Bernard, N. J., Kelly, B., Foley, N. H., Zheng, L., Gardet, A., Tong, Z., Jany, S. S., Corr, S. C., Haneklaus, M., Caffrey, B. E., Pierce, K., Walmsley, S., Beasley, F. C., Cummins, E., Nizet, V., Whyte, M., Taylor, C. T., Lin, H., Masters, S. L., Gottlieb, E., Kelly, V. P., Clish, C., Auron, P. E., Xavier, R. J. y O'Neill, L. A. (2013) 'Succinate is an inflammatory signal that induces IL-1 $\beta$  through HIF-1 $\alpha$ ', *Nature*, 496(7444), pp. 238-42.
- Teng, M. W., Bowman, E. P., McElwee, J. J., Smyth, M. J., Casanova, J. L., Cooper, A. M. y Cua, D. J. (2015) 'IL-12 and IL-23 cytokines: from discovery to targeted therapies for immune-mediated inflammatory diseases', *Nat Med*, 21(7), pp. 719-29.
- Tennant, D. A. (2011) 'PK-M2 Makes Cells Sweeter on HIF1', *Cell*, 145(5), pp. 647-9.
- Tufanli, O., Telkoparan Akillilar, P., Acosta-Alvear, D., Kocaturk, B., Onat, U. I., Hamid, S. M., Çimen, I., Walter, P., Weber, C. y Erbay, E. (2017) 'Targeting IRE1 with small molecules counteracts progression of atherosclerosis', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(8), pp. E1395-E1404.
- Valera, I., Fernández, N., Trinidad, A. G., Alonso, S., Brown, G. D., Alonso, A. y Crespo, M. S. (2008) 'Costimulation of dectin-1 and DC-SIGN triggers the arachidonic acid cascade in human monocyte-derived dendritic cells', *J Immunol*, 180(8), pp. 5727-36.
- van der Windt, G. J., O'Sullivan, D., Everts, B., Huang, S. C., Buck, M. D., Curtis, J. D., Chang, C. H., Smith, A. M., Ai, T., Faubert, B., Jones, R. G., Pearce, E. J. y Pearce, E. L. (2013) 'CD8 memory T cells have a bioenergetic advantage that underlies their rapid recall ability', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(35), pp. 14336-41.
- Vattem, K. M. y Wek, R. C. (2004) 'Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(31), pp. 11269-74.
- Vo, N. y Goodman, R. H. (2001) 'CREB-binding protein and p300 in transcriptional regulation', *J Biol Chem*, 276(17), pp. 13505-8.
- Wang, G. L., Jiang, B. H., Rue, E. A. y Semenza, G. L. (1995) 'Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(12), pp. 5510-4.
- Wang, H. J., Hsieh, Y. J., Cheng, W. C., Lin, C. P., Lin, Y. S., Yang, S. F., Chen, C. C., Izumiya, Y., Yu, J. S., Kung, H. J. y Wang, W. C. (2014a) 'JMJD5 regulates PKM2 nuclear translocation and reprograms HIF-1 $\alpha$ -mediated glucose metabolism', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111(1), pp. 279-84.
- Wang, Q., Franks, H. A., Lax, S. J., El Refaee, M., Malecka, A., Shah, S., Spendlove, I., Gough, M. J., Seedhouse, C., Madhusudan, S., Patel, P. M. y Jackson, A. M. (2013) 'The ataxia telangiectasia mutated kinase pathway regulates IL-23 expression by human dendritic cells', *J Immunol*, 190(7), pp. 3246-55.
- Wang, Z. V., Deng, Y., Gao, N., Pedrozo, Z., Li, D. L., Morales, C. R., Criollo, A., Luo, X., Tan, W., Jiang, N., Lehrman, M. A., Rothermel, B. A., Lee, A. H., Lavandero, S., Mammen, P. P. A., Ferdous, A., Gillette, T. G., Scherer, P. E. y Hill, J. A. (2014b) 'Spliced X-box binding protein 1 couples the unfolded protein response to hexosamine biosynthetic pathway', *Cell*, 156(6), pp. 1179-1192.
- Warburg, O. (1956) 'On the origin of cancer cells', *Science*, 123(3191), pp. 309-14.
- Watanabe, R., Shirai, T., Namkoong, H., Zhang, H., Berry, G. J., Wallis, B. B., Schaeffgen, B., Harrison, D. G., Tremmel, J. A., Giacomini, J. C., Goronzy, J. J. y Weyand, C. M. (2017) 'Pyruvate controls the checkpoint inhibitor PD-L1 and suppresses T cell immunity', *J Clin Invest*, 127(7), pp. 2725-2738.

- Wei, L., Zhou, Y., Yao, J., Qiao, C., Ni, T., Guo, R., Guo, Q. y Lu, N. (2015) 'Lactate promotes PGE2 synthesis and gluconeogenesis in monocytes to benefit the growth of inflammation-associated colorectal tumor', *Oncotarget*, 6(18), pp. 16198-214.
- Wilson, J. E. (2003) 'Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function', *J Exp Biol*, 206(Pt 12), pp. 2049-57. y Tang, D. (2016) 'PKM2-dependent glycolysis promotes NLRP3 and AIM2 inflammasome activation', *Nat Commun*, 7, pp. 13280.
- Yan, D., Wang, H. W., Bowman, R. L. y Joyce, J. A. (2016) 'STAT3 and STAT6 Signaling Pathways Synergize to Promote Cathepsin Secretion from Macrophages via IRE1 $\alpha$  Activation', *Cell Rep*, 16(11), pp. 2914-2927.
- Yang, W. y Lu, Z. (2013) 'Regulation and function of pyruvate kinase M2 in cancer', *Cancer Lett*, 339(2), pp. 153-8.
- Yang, W., Xia, Y., Hawke, D., Li, X., Liang, J., Xing, D., Aldape, K., Hunter, T., Alfred Yung, W. K. y Lu, Z. (2012) 'PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis', *Cell*, 150(4), pp. 685-96.
- Ye, J., Rawson, R. B., Komuro, R., Chen, X., Davé, U. P., Prywes, R., Brown, M. S. y Goldstein, J. L. (2000) 'ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs', *Mol Cell*, 6(6), pp. 1355-64.
- Yu, S. M. y Kim, S. J. (2010) 'Endoplasmic reticulum stress (ER-stress) by 2-deoxy-D-glucose (2DG) reduces cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and N-glycosylation and induces a loss of COX-2 activity via a Src kinase-dependent pathway in rabbit articular chondrocytes', *Exp Mol Med*, 42(11), pp. 777-86.
- Zhang, W., Petrovic, J. M., Callaghan, D., Jones, A., Cui, H., Howlett, C. y Stanimirovic, D. (2006) 'Evidence that hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) mediates transcriptional activation of interleukin-1beta (IL-1beta) in astrocyte cultures', *J Neuroimmunol*, 174(1-2), pp. 63-73.
- Zhou, Y., Lee, J., Reno, C. M., Sun, C., Park, S. W., Chung, J., Fisher, S. J., White, M. F., Biddinger, S. B. y Ozcan, U. (2011) 'Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction', *Nat Med*, 17(3), pp. 356-65.
- Zhu, S., Liu, H., Sha, H., Qi, L., Gao, D. S. y Zhang, W. (2017) 'PERK and XBP1 differentially regulate CXCL10 and CCL2 production', *Exp Eye Res*, 155, pp. 1-14.
- Zou, W. y Restifo, N. P. (2010) 'T(H)17 cells in tumour immunity and immunotherapy', *Nat Rev Immunol*, 10(4), pp. 248-56.

# Anexo I



Durante la realización de la tesis he participado en diferentes proyectos de investigación que han dado lugar a las siguientes publicaciones:

\***Márquez, S.**, J. J. Fernández, C. Mancebo, C. Herrero-Sánchez, S. Alonso, T. A. Sandoval, M. Rodríguez Prados, J. R. Cubillos-Ruiz, O. Montero, N. Fernández, y M. Sánchez Crespo. 2019. Tricarboxylic Acid Cycle Activity and Remodeling of Glycerophosphocholine Lipids Support Cytokine Induction in Response to Fungal Patterns. *Cell Rep* 27 (2):525-536.e4. doi: 10.1016/j.celrep.2019.03.033.

Herrero-Sánchez, M. C., E. B. Angomás, C. de Ramón, J. J. Tellería, L. A. Corchete, S. Alonso, M. D. C. Ramos, M. J. Peñarrubia, **S. Márquez**, N. Fernández, L. J. García Frade, y M. Sánchez Crespo. 2018. Polymorphisms in Receptors Involved in Opsonic and Nonopsonic Phagocytosis, and Correlation with Risk of Infection in Oncohematology Patients. *Infect Immun* 86 (12). doi: 10.1128/IAI.00709-18.

\***Márquez, S.**, J. J. Fernández, E. Terán-Cabanillas, C. Herrero, S. Alonso, A. Azogil, O. Montero, T. Iwawaki, J. R. Cubillos-Ruiz, N. Fernández, y M. S. Crespo. 2017. Endoplasmic Reticulum Stress Sensor IRE1 $\alpha$  Enhances IL-23 Expression by Human Dendritic Cells. *Front Immunol* 8:639. doi: 10.3389/fimmu.2017.00639.

Rodríguez, M., **S. Márquez**, J. V. de la Rosa, S. Alonso, A. Castrillo, M. Sánchez Crespo, y N. Fernández. 2017. Fungal pattern receptors down-regulate the inflammatory response by a cross-inhibitory mechanism independent of interleukin-10 production. *Immunology* 150 (2):184-198. doi: 10.1111/imm.12678.

Rodríguez, M., **S. Márquez**, O. Montero, S. Alonso, J. G. Frade, M. S. Crespo, y N. Fernández. 2016. Pharmacological inhibition of eicosanoids and platelet-activating factor signaling impairs zymosan-induced release of IL-23 by dendritic cells. *Biochem Pharmacol* 102:78-96. doi: 10.1016/j.bcp.2015.12.001.

\*Artículos en los que están publicados la mayoría de los resultados presentados en esta tesis.