

Tesis Doctoral

Clusterina Fucosilada: una nueva glicoforma de clusterina capaz de interactuar con células dendríticas y de modular su funcionalidad

Merlotti Ippólito, Antonela

2017-03-16

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Merlotti Ippólito, Antonela. (2017-03-16). Clusterina Fucosilada: una nueva glicoforma de clusterina capaz de interactuar con células dendríticas y de modular su funcionalidad. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Merlotti Ippólito, Antonela. "Clusterina Fucosilada: una nueva glicoforma de clusterina capaz de interactuar con células dendríticas y de modular su funcionalidad". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2017-03-16.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

**Clusterina Fucosilada: una nueva glicofoma de clusterina
capaz de interactuar con células dendríticas y de modular su
funcionalidad.**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el
área de Química Biológica

Lic. Antonela Merlotti Ippólito

Director de tesis: Dr. Juan A. Sabatté

Consejera de estudios: Dra. Elba Vázquez

Lugar de trabajo: Universidad de Buenos Aires. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas. Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y Sida (INBIRS). Facultad de Medicina. Buenos Aires, Argentina.

Buenos Aires, 2016

Fecha de defensa: 16-03-2017

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis representa la culminación de 5 años de trabajo. Muchas son las personas que hicieron sus aportes y me acompañaron en esta etapa de diferente manera, algunas quizá sin haberse dado cuenta, pero todas ellas fundamentales en cada momento.

Al Dr. Juan Sabatté, director de esta tesis y excelente guía en esta etapa. Puedo asegurar que el aprendizaje fue constante a su lado, permitiéndome crecer profesionalmente día a día, desde mis aciertos y errores. Por la confianza que deposito en mí, por brindarme siempre una visión crítica, por enseñarme a trabajar en esta profesión y enriquecerme ampliamente con sus conocimientos, por su compromiso pleno con este trabajo, por su presencia permanente y sobre todo, por su apoyo y ayuda incondicional en todos los objetivos que me propuse alcanzar. ¡Gracias!

Al Dr. Jorge Geffner, por su constante contribución y compromiso con esta tesis. Además de los valiosos aportes científicos, por sus consejos, por su sentido de justicia y su solidaridad que juntas derivan en la total ayuda de quien la requiere. Por todas las oportunidades brindadas y las puertas que me ayudó a abrir en este camino. ¡Gracias!

Al “grupo Geffner”, el mejor grupo que puede haber. Por la unión y el compañerismo que prima en cada día de trabajo, por la ayuda incondicional en la realización de experimentos, por las enriquecedoras charlas y discusiones científicas, por hacer que sea un equipo donde es placentero trabajar, un equipo que se quiere cuidar y difícil de dejar. ¡Gracias!

A todos los becarios del laboratorio. Porque siempre están para lo que se necesite, desde una mano en la mesada o un reactivo, hasta una oreja que te escuche o un abrazo que te levante en situaciones difíciles. Por las infinitas risas compartidas, los momentos inolvidables que pasamos en congresos, cumpleaños, “after-labs”, que nos

llevaron a generar miles de recuerdos y anécdotas. Porque vale la pena compartir cada día con ustedes en el laboratorio y en especial por dejar abierto ese lugar en cada uno en donde se puede encontrar un amigo. ¡Gracias!

Al Dr. Horacio Salomón, por brindarme un espacio en el equipo del INBIRS y realizar allí esta tesis, por generar un laboratorio de plenas facilidades, procurando siempre un crecimiento institucional y profesional de todos, por todo el apoyo brindado a través de estos años. ¡Gracias!

A toda la gente del INBIRS, al personal de apoyo, al personal no docente, a los investigadores. Por sus aportes científicos y colaboraciones. Por los momentos compartidos, porque con el trabajo de cada uno es posible generar un cálido y reconfortante clima de trabajo que hace tan especial a este lugar. ¡Gracias!

Finalmente, quiero agradecer a los colaboradores del laboratorio de Inmunooncología de la Academia Nacional de Medicina, al servicio de Hemoterapia del Sanatorio Méndez, al laboratorio de andrología del Instituto Médico Halitus y a los pacientes y donantes que colaboraron de forma anónima.

Parte de los resultados de esta tesis fueron desarrollados en Instituto Curie de Paris, Francia, en el marco de una estadía doctoral. Por ello, agradezco especialmente al Dr. Sebastián Amigorena, por los valiosos aportes brindados a este trabajo y por abrirme las puertas de su laboratorio, permitiéndome vivir una experiencia invaluable para mi formación profesional. Agradezco también a la Dra. Eliane Piaggio por incorporarme a su grupo de trabajo durante mi estadía y por sus colaboraciones con este trabajo. Gracias a todos mis compañeros del Instituto Curie que me integraron de la mejor manera y ayudaron siempre durante el tiempo que compartí con ellos.

Claro está que la tesis no transcurre solamente en la mesada, como todo en la vida, el apoyo y compañía de nuestros afectos es fundamental para transitar cualquier camino, y es a ellos a quienes también quiero agradecer.

A mis amigos, a todos, a quienes conocí antes o durante mi tesis. Les quiero agradecer por haber estado siempre a mi lado de mil maneras diferentes y en cualquier situación, por brindarme siempre una amistad plena e incondicional con todo lo que eso implica y en especial por hacerme sentir que no importa que pase, seguirán estando. ¡Gracias!

Gracias a toda mi familia por su apoyo constante. A mis abuelos, por transmitirme siempre una profunda calma y felicidad con solo mirarme. A la genia de mi hermana, por ser una gran hermana, una amiga, mi médica (ja), por siempre esperarme cuando llego del laboratorio con la comida lista (jaja), pero por sobre todo por el aguante. ¡Gracias!

A mis padres, por permitirme tomar mis decisiones con libertad, apoyándolas e impulsándolas, respetando y aceptando aún aquellas que no comparten. Por estar, estar, y seguir estando una vez más en todas con todo su amor incondicional y su generosidad infinita. ¡Eternamente gracias!

a Negra y Adela

Parte de los resultados de este trabajo de tesis fueron publicados en la revista *Human Reproduction* en el año 2015.

Hum Reprod. 2015 Jul;30(7):1545-56. doi: 10.1093/humrep/dev113. Epub 2015 May 23.

Fucosylated clusterin in semen promotes the uptake of stress-damaged proteins by dendritic cells via DC-SIGN.

Merlotti A¹, Dantas E¹, Remes Lenicov F¹, Ceballos A¹, Jancic C², Varese A¹, Rubione J¹, Stover S¹, Geffner J¹, Sabatté J³.

¹Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (UBA)-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires 1121, Argentina.

²Laboratorio de Inmunología Oncológica, Instituto de Medicina Experimental (IMEX), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)-Academia Nacional de Medicina, Ciudad Autónoma de Buenos Aires 1425, Argentina.

³Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires (UBA)-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Ciudad Autónoma de Buenos Aires 1121, Argentina jsabatte@fmed.uba.ar.

RESUMEN

Clusterina es una glicoproteína de 70 kDa, secretada por diferentes tipos celulares y presente en casi todos los tejidos y fluidos corporales. Nuestro grupo de investigación demostró anteriormente que la clusterina presente en el semen se une a la molécula DC-SIGN, un receptor expresado por las células dendríticas (CDs), inhibiendo su interacción con el HIV. Esta propiedad no es compartida por la clusterina sérica debido a que clusterina del plasma seminal expresa un patrón inusual de glicosilación, caracterizado por la presencia de abundantes motivos fucosilados que le confieren la habilidad de unirse a DC-SIGN. De esta forma, la clusterina fucosilada presente en el semen representa una nueva glicofoma con propiedades biológicas diferentes a la clusterina sérica, la cual se encuentra glicosilada principalmente con motivos sialidados.

Clusterina fue la primera chaperona extracelular descrita. La principal propiedad de las chaperonas extracelulares es su capacidad de interactuar con proteínas estresadas previniendo su agregación e inhibiendo el desarrollo de las enfermedades por depósito de proteínas. Posteriormente, los complejos chaperona-proteína son endocitados por diferentes tipos celulares y degradados.

En la presente tesis demostramos que clusterina fucosilada aislada del plasma seminal, de igual forma que su contraparte sérica, actúa como chaperona extracelular interactuando con proteínas estresadas y previniendo su agregación. Demostramos la capacidad de clusterina fucosilada de dirigir proteínas estresadas hacia DC-SIGN presente en CDs, promoviendo la endocitosis de las mismas y su posterior degradación. Este proceso podría modular la función de las CDs y favorecer la presentación de los péptidos derivados de estas proteínas estresadas a los linfocitos T. En este sentido, demostramos que la unión de clusterina fucosilada a las CDs a través de DC-SIGN ejerce un importante efecto modulador ya que es capaz de estimular la expansión células T CD4+FOXP3+CD25+ promoviendo la tolerancia inmunológica. Estos

hallazgos sugieren que clusterina fucosilada presente en el semen podría promover la tolerancia hacia antígenos paternos y de esta forma, la tolerancia materno-fetal.

Numerosos trabajos demuestran que la producción de clusterina se encuentra incrementada en diferentes tumores malignos. Más aún, la producción exagerada de clusterina suele asociarse a una mayor agresividad tumoral y a un peor pronóstico. Sin embargo, la naturaleza de esta asociación no ha sido aún definida. En una segunda parte de la tesis, nos preguntamos si la clusterina producida por tumores podría expresar, tal como lo hace la clusterina seminal, un patrón de glicosilación que le permitiese interactuar con DC-SIGN y, de este modo, modular la funcionalidad de las CD_s promoviendo la tolerancia hacia antígenos tumorales. Para contestar esta pregunta, realizamos una serie de ensayos utilizando muestras de tumores de mama de tipo Luminal. Los principales hallazgos luego de realizar estos ensayos fueron los siguientes: a) Clusterina presente en los tumores mamarios presenta motivos fucosilados; b) es capaz de unirse a DC-SIGN; c) DC-SIGN es expresado por células mieloides intratumorales. Estos resultados sugieren que clusterina fucosilada podría actuar como un mecanismo de escape tumoral a la respuesta inmune.

Fucosylated Clusterin: a novel clusterin glycoform able to interact with dendritic cells and modulate their functions.

ABSTRACT

Clusterin is a secreted glycoprotein of 80 kDa present in almost all tissues and body fluids. Our group previously showed that semen clusterin binds to DC-SIGN, a C-type lectin receptor present on dendritic cells (DCs), inhibiting the interaction of HIV. This activity was dependent on fucosylated Lewis X and Lewis Y type glycans that confer clusterin the ability to bind with high affinity to DC-SIGN. Interestingly, in contrast with seminal plasma clusterin, serum clusterin does not interact with DC-SIGN.

Clusterin was the first extracellular chaperone described. Extracellular chaperones bind to stress-damaged proteins, preventing the formation and deposition of insoluble aggregates and promoting the clearance of extracellular stressed proteins by receptor-mediated endocytosis followed by lysosomal degradation. Failure of these mechanisms contributes to the development of the so-called protein deposition diseases.

In this thesis, we showed that fucosylated clusterin from seminal plasma, as its serum counterpart, acts as an extracellular chaperone interacting with stressed proteins and preventing their aggregation. We proved that fucosylated clusterin targets stressed proteins to DC-SIGN present on DCs, promoting their endocytosis and degradation. This process could modulate DC function favoring the presentation of stressed protein derived peptides to T lymphocytes. We demonstrated that fucosylated clusterin binding to DC-SIGN on DCs promotes the expansion of CD4⁺FOXP3⁺CD25⁺ T-cells. These findings suggest that fucosylated clusterin present in semen could promote tolerance to paternal antigens favoring fetomaternal tolerance.

Several works have shown that clusterin production is increased in malignant tumors. Moreover, the over-expression of clusterin is associated with more aggressive tumors and bad prognosis. Nevertheless, the nature of this association has not been

defined. In the second part of this thesis, we analyzed the properties of clusterin expressed on Luminal breast cancer samples. The main results were the following: a) clusterin produced by breast tumors bears fucosylated motifs; b) it is able to bind to DC-SIGN; c) DC-SIGN is expressed by intra-tumoral macrophages. We propose that fucosylated clusterin could be a novel mechanism of tumor escape from the immune response.

ABREVIATURAS	5
Introducción General	6
1.1. Clusterina	7
1.1.1. Estructura de la clusterina	7
<i>Figura 1 Estructura del gen de la clusterina y sus productos de transcripción</i>	8
<i>Figura 2 Representación esquemática de la clusterina humana.</i>	9
1.1.2. Actividad biológica de la clusterina	9
1.1.3. Clusterina y su rol como chaperona extracelular	10
<i>Figura 3 Representación esquemática del estrés proteico.</i>	12
1.1.4. Clusterina Fucosilada, una nueva glicofoma de la clusterina	13
<i>Figura 4 Análisis de los glicanos de la clusterina</i>	15
1.2. Células dendríticas	15
<i>Figura 5 Maduración de las CDs y activación de linfocitos T.</i>	17
<i>Figura 6 Inducción de diferentes perfiles efectoros en las células T CD4+</i>	18
1.2.1 Células dendríticas tolerogénicas	18
1.3. Receptores de reconocimiento de patrones (RRPS)	19
<i>Tabla 1 Principales características de las diferentes familias de RRP</i> s	21
1.3.1. Células dendríticas y receptores lectina tipo C (RLC)	21
1.3.2. DC-SIGN: contribuyendo al escape inmune	22
<i>Figura 7 Esquema de los motivos fucosilados de tipo Lewis.</i>	24
1.4. Relevancia fisiológica de la clusterina fucosilada	26
Parte I	27
INTRODUCCIÓN - PARTE I	28
2.1. El rol de la clusterina en la reproducción	28
2.2. Tolerancia materno-fetal	29
2.2.1. El semen en la tolerancia materno fetal	30
HIPÓTESIS I	33
OBJETIVO GENERAL I	35
3.1. Objetivos específicos	35
RESULTADOS - PARTE I	36
4.1. La clusterina fucosilada presente en el plasma seminal actúa como chaperona extracelular	36
<i>Figura 8 La clusterina fucosilada tiene actividad de chaperona extracelular.</i>	38
4.2. La clusterina fucosilada induce la unión de proteínas extracelulares estresadas a DC-SIGN	39

<i>Figura 9 La clusterina fucosilada dirige proteínas estresadas hacia DC-SIGN</i>	41
<i>Figura 10 La clusterina fucosilada transporta proteínas estresadas hacia células dendríticas</i>	42
<i>Figura 11 La clusterina fucosilada dirige proteínas estresadas hacia DC-SIGN en células dendríticas a través de sus motivos fucosilados</i>	44
4.3. La clusterina fucosilada induce la endocitosis de proteínas estresadas por células dendríticas	45
<i>Figura 12 Endocitosis de proteínas estresadas y clusterina por CDs</i>	47
<i>Figura 13 La clusterina fucosilada induce la endocitosis de catalasa a compartimentos positivos para DC-SIGN</i>	48
<i>Figura 14 Análisis de la endocitosis</i>	49
4.4. La clusterina fucosilada promueve la expansión de células T CD4+FOXP3+CD25+ inducida por CDs	50
<i>Figura 15 La clusterina fucosilada no modula la maduración fenotípica de las células dendríticas.</i>	51
<i>Figura 16 La clusterina fucosilada estimula la habilidad de las CDs de expandir células T CD4+CD25+FOXP3+.</i>	52
Parte II	53
INTRODUCCIÓN - PARTE II	54
5.1. Inmunidad y cáncer: eliminación, equilibrio y escape tumoral	54
<i>Figura 17 Inmunoeedición en cáncer</i>	56
5.2. El cáncer de mama:	57
<i>Figura 18 Perfil de marcadores que permite distinguir entre los distintos subtipos moleculares de cáncer de mama.</i>	59
5.3. La clusterina y cáncer: su relación con el cáncer de mama	59
HIPÓTESIS II	63
OBJETIVO GENERAL II	65
6.1. Objetivos específicos	65
RESULTADOS - PARTE II	66
7.1. Expresión de clusterina en muestras de tumores de mama	66
<i>Figura 19 Expresión de clusterina en muestras de tumores de mama de tipo Luminal A</i>	67
<i>Figura 20 Cuantificación de clusterina en muestras de tumores de mama de tipo Luminal A</i>	68
7.2. Expresión de clusterina con motivos fucosilados en muestras de tumores de mama	68
<i>Figura 21 Expresión de clusterina fucosilada en muestras de tumores de mama de tipo Luminal A</i>	69

<i>Figura 22 Expresión de clusterina fucosilada en células derivadas de un tumor de mama de tipo Luminal A</i>	70
7.3. <i>La clusterina fucosilada presente en tumores de mama de tipo Luminal A se une a DC-SIGN</i>	70
<i>Figura 23 La clusterina fucosilada se une a DC-SIGN</i>	71
7.4. <i>Análisis de la expresión de DC-SIGN en muestras de tumores de mama de tipo Luminal A</i>	72
<i>Figura 24 Presencia de células DC-SIGN positivas en tumores de mama de tipo Luminal A</i>	73
 Materiales y Métodos	74
8.1. Reactivos y medios de cultivo	75
8.2. Purificación de Anticuerpos anti-clusterina	75
8.3. Muestras de Plasma Seminal	76
8.4. Purificación de clusterina a partir del Plasma Seminal	76
<i>Figura 25 Caracterización de la clusterina fucosilada purificada a partir del plasma seminal mediante cromatografía de afinidad</i>	78
8.5. Análisis de la actividad de chaperona de la clusterina	78
8.6. Líneas celulares	79
8.7. Línea celular primaria	79
8.8 Cultivos Primarios	79
<i>8.8.1. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSPs)</i>	79
<i>8.8.2. Purificación de Monocitos</i>	80
<i>8.8.3. Purificación de linfocitos T CD4+</i>	81
<i>8.8.4. Diferenciación de Células Dendríticas</i>	82
8.9. Tratamiento de las CDs y análisis de su fenotipo	82
8.10. Tratamiento enzimático aplicado a la clusterina	82
<i>Figura 26 Diferenciación de células dendríticas a partir de monocitos.</i>	83
8.11. Citometría de Flujo	83
8.12. Biotinilización de proteínas	84
8.13. Unión de proteínas estresadas a DC-SIGN expresado en células Raji y CDs	84
8.14. Ensayos de Endocitosis	85
8.15. Microscopía confocal	85
<i>8.15.1. Análisis de la endocitosis de complejos proteína-clusterina estresada</i>	85
<i>8.15.2. Análisis de la expresión de clusterina fucosilada en una línea primaria de cáncer de mama</i>	86
8.16. Análisis de la expansión de células T FOXP3+ por CDs	86
8.17. Inmunohistoquímica	87
8.18. Muestras de tumores de mama	87
8.19. Procesamiento de muestras tumorales	87

8.20. Cuantificación de clusterina total y fucosilada en muestras tumorales _____	88
<i>Figura 27 Esquema del ensayo de ELISA.</i> _____	89
8.21. Análisis de la unión a DC-SIGN de la clusterina tumoral _____	89
8.22. Análisis de las subpoblaciones de células mieloides en tumores de mama _____	91
8.23. Análisis estadístico _____	91
Conclusiones y Discusión _____	92
CONCLUSIONES _____	93
DISCUSIÓN _____	94
9.1. La clusterina y su rol como chaperona extracelular en el plasma seminal _____	94
9.2. Clusterina fucosilada, ¿una glicoproteína tolerogénica? _____	95
9.3. La clusterina del plasma seminal como promotora de la tolerancia materno-fetal _____	96
9.4. Expresión de clusterina en cáncer de mama _____	99
9.5. Glicosilación, clusterina fucosilada y cáncer _____	101
9.6. Presencia de macrófagos DC-SIGN positivos en tumores de mama _____	103
Referencias _____	105

ABREVIATURAS

BSA: Albúmina sérica bovina

CDs: Células dendríticas

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CMPs: Células mononucleares de sangre periférica

DAB: 3,3'-diaminobenzidina tetrahidroclorídrico

DAMPs: *Danger Associated Molecular Patterns*

DC-SIGN: *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

DRC: Dominio de reconocimiento de carbohidratos

DTT: Ditiotritol

EEA1: *Early Endosome Antigen 1*

GM-CSF : Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos

GST: Glutación S-transferasa

HRP: Proteínas de shock térmico

IDO: Indolamina dioxigenasa

IFN- γ : Interferón gamma

Lamp 1: *Lysosomal-associated membrane protein 1*

LPS: Lipopolisacárido

PAMPs: Patrones moleculares asociados a patógenos

PBS: Buffer de sales de fosfato

PGE2: Prostaglandina E2

RLC: Receptor de Lectina tipo C

RRPs: Receptores de reconocimiento de patrones

TAMs: Macrófagos asociados a tumores

TCR: Receptor de células T

TGF- β : Factor de Crecimiento transformante beta

TLR: Receptores de tipo Toll

Treg: Linfocito T regulatorio

Introducción General

1.1. CLUSTERINA

La clusterina es una glicoproteína identificada en el año 1983 como un componente del fluido proveniente del testículo de ratas^{1,2}. Luego, fue descrita por diferentes grupos de investigación en una gran variedad de contextos donde adquirió una serie de nombres alternativos³. Entre ellos, el más utilizado fue el de Apolipoprotein J, el cual fue acuñado luego de encontrarla físicamente asociada con partículas de lipoproteína de alta densidad en el plasma humano⁴. Fue recién en el año 1992 donde se acordó adoptar universalmente el nombre de clusterina.

Se han encontrado homólogos de la clusterina en diversas clases de vertebrados incluyendo peces, anfibios y reptiles. En mamíferos, la clusterina es una proteína de expresión ubicua y constitutiva en casi todos los tejidos y conserva en un 70-80% su secuencia aminoacídica entre las diferentes especies⁵. Sin embargo, no se encuentra conservada en insectos u organismos invertebrados, lo que sugiere, junto con su amplia distribución filogenética, que la clusterina ha evolucionado en los vertebrados adquiriendo funciones biológicas de fundamental importancia.

1.1.1. Estructura de la clusterina

El gen que codifica la clusterina en humanos es de copia única. El mismo contiene 9 exones y está localizado en el cromosoma 8p21-p12 codificando un ARN mensajero de aproximadamente 2kb. El gen de la clusterina produce tres isoformas mayoritarias (isoforma 1, isoforma 2 e isoforma 11036), cada una con un fragmento único del exón 1⁶ (**Figura 1**). La isoforma 1 es el producto de los nueve exones, pero contiene solo el fragmento 1a del exón 1 y corresponde a la forma nuclear de la clusterina³. La isoforma 11036 contiene el fragmento 1c del exón 1 y corresponde a la forma citoplasmática de la clusterina⁷. La isoforma 2, correspondiente a la forma secretoria de la clusterina, contiene la fracción 1b del exón 1 y el codón de inicio principal

está localizado en el exón 2⁸⁻¹¹. Otras variantes e isoformas han sido descritas aunque el significado funcional de las mismas no está claro (ej.:^{12,13}).

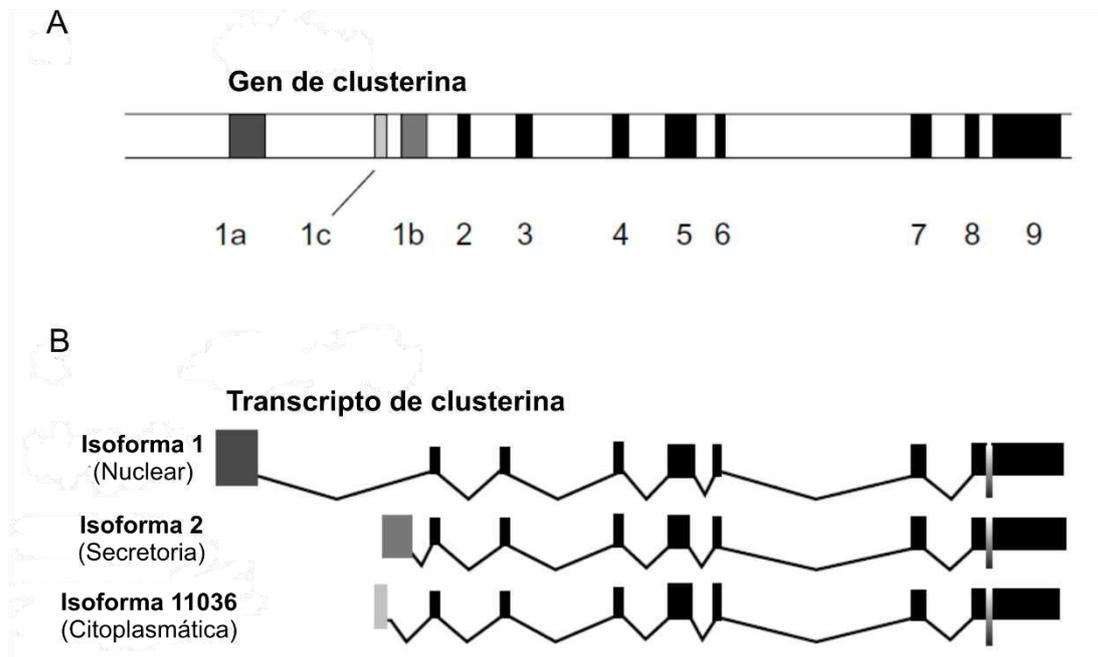


Figura 1 | Estructura del gen de la clusterina y sus productos de transcripción. En (A) se muestra el gen de la clusterina con las posiciones de los exones (barras negras) e intrones (barras blancas). En (B) se muestran las variantes exónicas del ARNm de la clusterina. Exón 1a de la isoforma 1 (gris oscuro); exón 1b de la isoforma 2 (gris intermedio); y exón 1c de la isoforma 11036 (gris claro). (Adaptado de Rizzi & Betuzzi⁶).

La forma secretoria de la clusterina es un heterodímero de 75-80 kDa. El mensajero maduro corresponde a una cadena polipeptídica primaria de 449 aminoácidos que contiene un péptido señal de 21 aminoácidos. El procesamiento proteolítico cliva la proteína en dos subunidades generando una cadena α de 204-206 aminoácidos y una cadena β de 219-222 aminoácidos unidas por cinco puentes disulfuro (**Figura 2**). Casi el 30% del peso de la proteína madura se compone de N-glicanos anclados en seis sitios de glicosilación^{3,8,14}. La clusterina secretoria se encuentra en diferentes fluidos biológicos incluyendo el plasma, líquido cefalorraquídeo, leche materna, suero y semen^{3,9}.

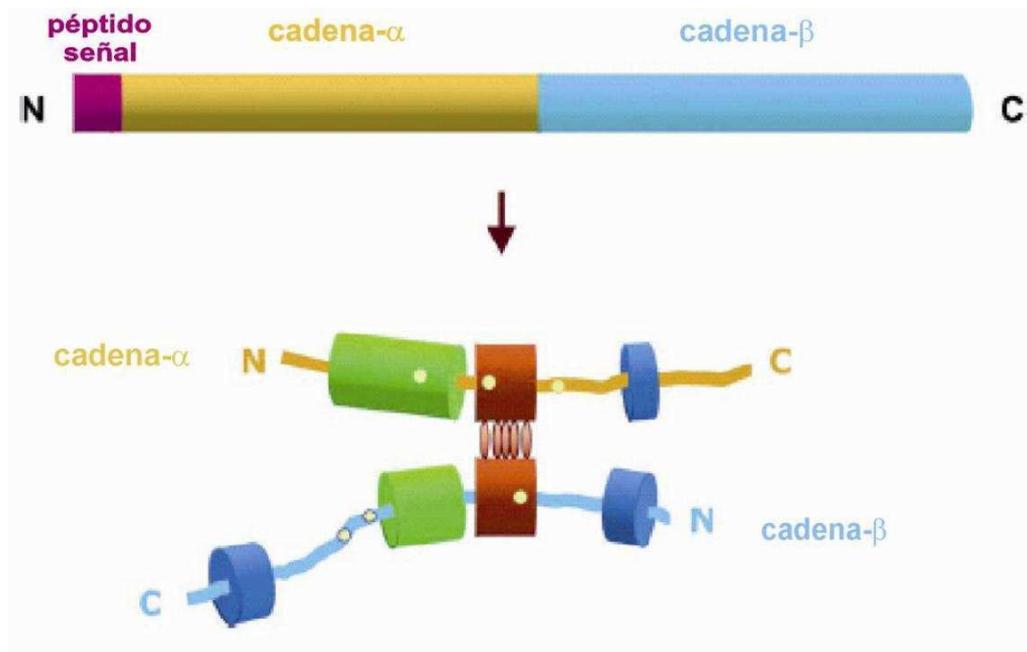


Figura 2 | Representación esquemática de la clusterina humana. La cadena polipeptídica precursora (arriba) es clivada para remover el péptido señal (violeta) y luego entre los residuos 227/228 para generar las cadenas α (amarillo) y β (celeste). Estas cadenas son ensambladas en sentido antiparalelo para generar una molécula heterodimérica (abajo) en donde los centros ricos en cisteína (rojo) son unidos por cinco puentes disulfuro (elipses rojas) y son flanqueados por dos α -hélices (verde) y tres α -hélices anfipáticas (azul). Los seis sitios de N-glicosilación están indicados con puntos amarillos. (Adaptado de Jones & Jomary³)

1.1.2. Actividad biológica de la clusterina

Desde que fue descrita inicialmente, descifrar la función la clusterina ha sido un desafío para los investigadores. La clusterina media un conjunto heterogéneo de funciones entre las cuales se destacan la regulación de la actividad del sistema complemento¹⁵, la modulación de la apoptosis^{16,17} y la actividad como chaperona extracelular¹⁸.

La capacidad de inhibir el sistema de complemento fue una de las primeras funciones descritas para la clusterina¹⁹. La clusterina circula normalmente en el plasma humano siendo capaz de inhibir la formación del complejo de ataque a la membrana. La inhibición de la citólisis es mediada por la capacidad de la clusterina de interactuar con

los sitios hidrofóbicos de anclaje en la membrana de los componentes C5b-7. En este sentido, se ha demostrado que la secuencia de aminoácidos de la clusterina contiene un dominio estructural en la porción amino terminal apto para interactuar con segmentos hidrofóbicos. Por otro lado, han sido detectados sitios de unión de alta afinidad entre la clusterina y los componentes C7, C8 y C9 del complemento²⁰. Sin embargo, estas interacciones son inhibidas cuando C9 está polimerizado, lo que sugiere que solo las formas activadas de los componentes terminales del sistema de complemento exponen estos sitios de unión, evitando así, la unión de la clusterina a los componentes del complemento que circulan normalmente en el plasma²⁰.

En relación a la capacidad de la clusterina de modular la apoptosis, se ha observado que mientras la forma citoplasmática de la clusterina media una actividad antiapoptótica, la clusterina nuclear promueve la muerte celular^{21,22}. La forma citoplasmática de la clusterina es capaz de estabilizar complejos proteicos en el citoplasma que contienen a Bax, una proteína proapoptótica, impidiendo su translocación hacia la mitocondria, mientras que la forma nuclear interactúa con Bcl-XL, proteína inhibidora de la apoptosis, promoviendo la liberación de Bax y la consecuente muerte celular^{16,17}.

1.1.3. Clusterina y su rol como chaperona extracelular

Tanto *in-vivo* como *in-vitro*, la agregación proteica ocurre cuando un estímulo, como el calor, el estrés oxidativo o agentes químicos entre otros^{23,24}, generan alteraciones en el normal plegamiento de las proteínas, las cuales pueden comenzar a exponer porciones hidrofóbicas en su superficie. Suspendidas en un ambiente acuoso, estas regiones hidrofóbicas se unen a zonas similares en las proteínas que las rodean. Este proceso culmina con la formación de agregados proteicos de alto peso molecular, que se organizan de manera amorfa o bien formando estructuras fibrilares²⁴. Una de las

funciones más importantes de las chaperonas extracelulares es, precisamente, la de interactuar con proteínas mal plegadas inhibiendo su agregación y promoviendo la remoción de las mismas del espacio extracelular por endocitosis mediada por receptor seguida de degradación lisosomal^{25,26} (**Figura 3**). La falla en los mecanismos de remoción de las proteínas estresadas conduce a la agregación y el posterior depósito de proteínas, procesos que subyacen a la patogenia de numerosas enfermedades, tales como la enfermedad de Alzheimer, la Aterosclerosis, la Enfermedad de Creutzfeldt–Jakob y la Amiloidosis, entre otras.

Clusterina fue la primera chaperona extracelular descrita¹⁸. Otras chaperonas extracelulares son la haptoglobina y la α -2 microglobulina²⁵⁻²⁷. La actividad de la clusterina como chaperona extracelular es independiente del ATP²⁸. Luego de su secreción, la clusterina es capaz de unirse a las regiones hidrofóbicas expuestas por proteínas estresadas mediante dominios anfipáticos, proceso que resulta en la formación de complejos solubles de alto peso molecular²³ (**Figura 3**). En este sentido, ha sido demostrada la capacidad de la clusterina de interactuar con diferentes proteínas (apolipoproteína A I, receptores I y II para TGF- β y fibras β amiloides) a través de uniones de alta afinidad²⁹. *In-vitro*, la clusterina es capaz de inhibir la agregación amorfa, inducida por estrés térmico o químico, de proteínas tales como glutation-S-transferasa, catalasa, alcohol dehidrogenasa, albúmina bovina, lactoalbúmina, lisosima y ovotransferrina^{28,30-32}. Sin embargo, la clusterina no es capaz de restaurar la actividad de las proteínas estresadas. Esto implica que la clusterina no posee la habilidad de volver a plegar y devolver las proteínas a su estado original²⁸, función que sí puede ser llevada adelante por las proteínas de estrés térmico, las chaperonas más estudiadas^{23,28}. La clusterina puede ser reconocida por los receptores de lipoproteínas *Megalina*, *Receptor de ApoE* y por el *Receptor de VLDL*³³⁻³⁵. Estos receptores expresados en diferentes tipos celulares son los responsables de mediar la remoción de los complejos proteína estresada-clusterina.

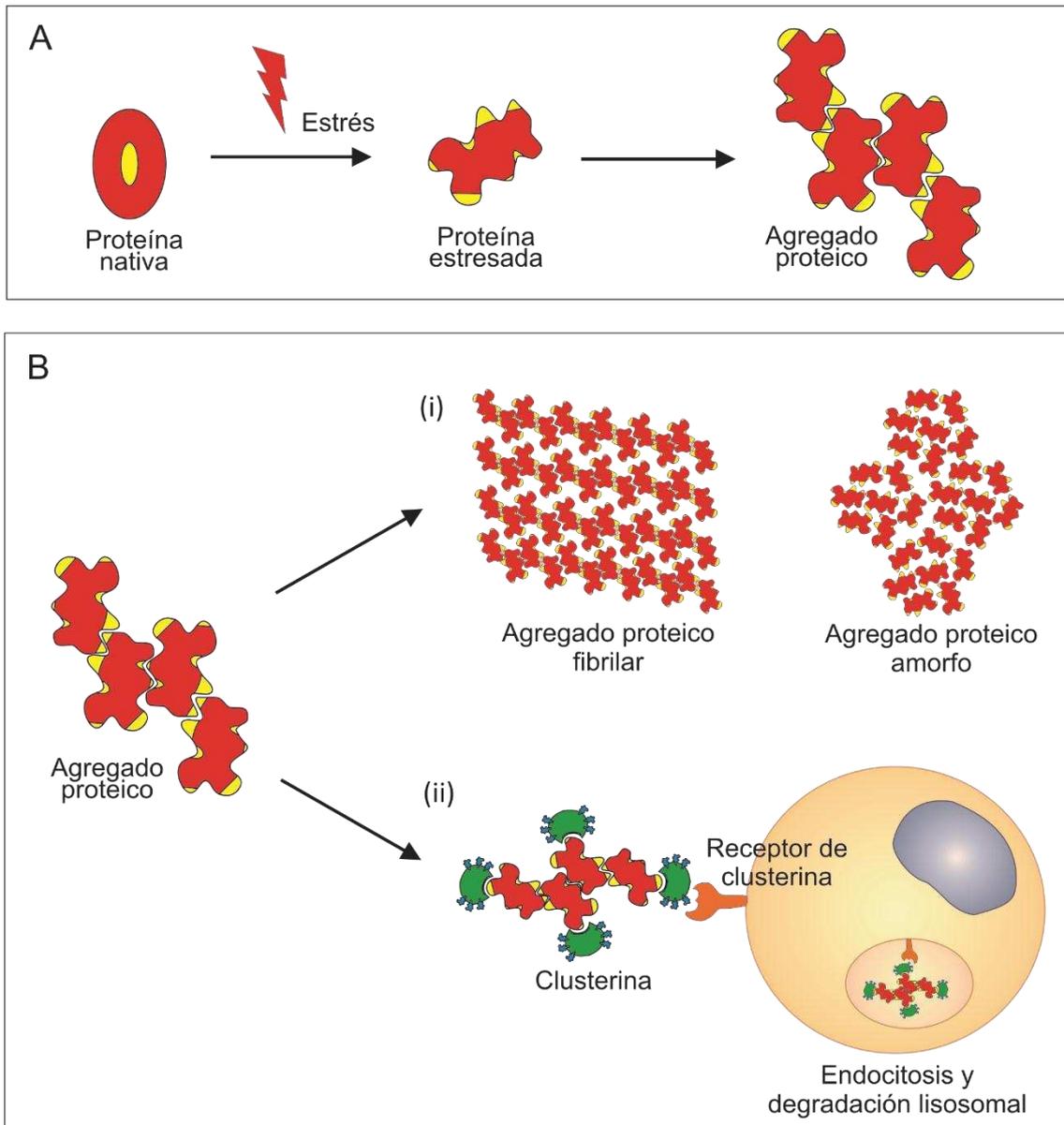


Figura 3 | Representación esquemática del estrés proteico. (A) Cuando las proteínas se estresan exponen regiones hidrofóbicas en su superficie (regiones amarillas) que pueden unirse entre ellas generando agregados proteicos. **(B)** Si no son degradados, los agregados proteicos generan estructuras amorfas o fibrilares de alto peso molecular (i). Las chaperonas extracelulares, como la clusterina, inhiben la agregación y promueven la remoción de las proteínas mal plegadas del espacio extracelular por endocitosis mediada por receptor, seguida de degradación lisosomal (ii).

Numerosos autores concuerdan que la clusterina podría jugar un rol importante en el desarrollo de trastornos asociados al depósito anómalo de proteínas^{23,36,37}. En este sentido, es interesante destacar que la clusterina ha sido encontrada asociada a depósitos proteicos en biopsias o necropsias de numerosas enfermedades generadas

por el depósito de proteínas³⁸⁻⁴⁰. Por ejemplo, Matsubara y col. demostraron que la clusterina es capaz de unirse al péptido A β -amiloide con una alta afinidad⁴¹, siendo este péptido el componente más importante de las placas seniles asociadas a la enfermedad de Alzheimer, ayudando a su remoción a través de la barrera hematoencefálica mediante el receptor de Megalina expresado en tejidos vasculares del sistema nervioso central^{42,43}.

1.1.4. Clusterina Fucosilada, una nueva glicofoma de la clusterina

El patrón de glicosilación de la clusterina sérica fue descrita previamente por Kapron y colaboradores: contiene 6 sitios de N-glicosilación, siendo las más abundantes estructuras mono y bi-antenarias sialiladas, con bajos niveles de fucosa y algunos motivos sialil-Lewis¹⁴ (**Figura 4A**). En el año 2007, nuestro grupo de trabajo demostró la presencia en el plasma seminal humano de un componente capaz de interactuar con alta afinidad con el receptor de reconocimiento de patrones (RRP) DC-SIGN. Esta interacción mostró inhibir notoriamente la capacidad de las células dendríticas (CDs) de reconocer al virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), reconocimiento que es mediado, en gran medida, por el receptor DC-SIGN⁴⁴. Continuando en esta línea temática, en el año 2011 identificamos al componente inhibitorio como clusterina. Estudios de resonancia de plasmón en superficie permitieron definir que la clusterina presente en el plasma seminal, pero no la clusterina sérica, se une a DC-SIGN con alta afinidad. Esta capacidad mostró asociarse a un peculiar patrón de glicosilación, caracterizado por estructuras bi, tri y tetra-antenarias altamente fucosiladas, revelado por estudios de espectrometría de masa (**Figura 4B**). En dicho estudio concluimos que la clusterina seminal, pero no la clusterina sérica, merced a su particular patrón de glicosilación rico en motivos fucosilados de tipo Lewis X y Lewis Y, representa un nuevo ligando endógeno de DC-SIGN⁴⁵. Describimos, de esta manera, una nueva glicofoma de la clusterina presente en el plasma seminal humano, con abundantes residuos fucosilados.

Posteriormente, en un trabajo dirigido a identificar ligandos endógenos de DC-SIGN presentes en el plasma seminal, Clark y colaboradores encontraron a la clusterina como uno de los ligandos mayoritarios en este fluido y demostraron la presencia de abundantes motivos Lewis X y Lewis Y evidenciados por espectrometría de masa⁴⁶. En el mismo sentido, recientemente, Saraswat y colaboradores caracterizaron diversas glicoproteínas presentes en el plasma seminal detallando sus sitios de N-glicosilación junto con la composición y estructuras glucídicas presentes en cada uno de ellos. Los autores señalan a la clusterina como la proteína con mayor número de glicoformas con abundantes estructuras fucosiladas de tipo Lewis en cada uno de ellos⁴⁷. Estos resultados, en consonancia con los observados previamente por nuestro grupo, confirman el hallazgo de una nueva glicoforma fucosilada de clusterina.

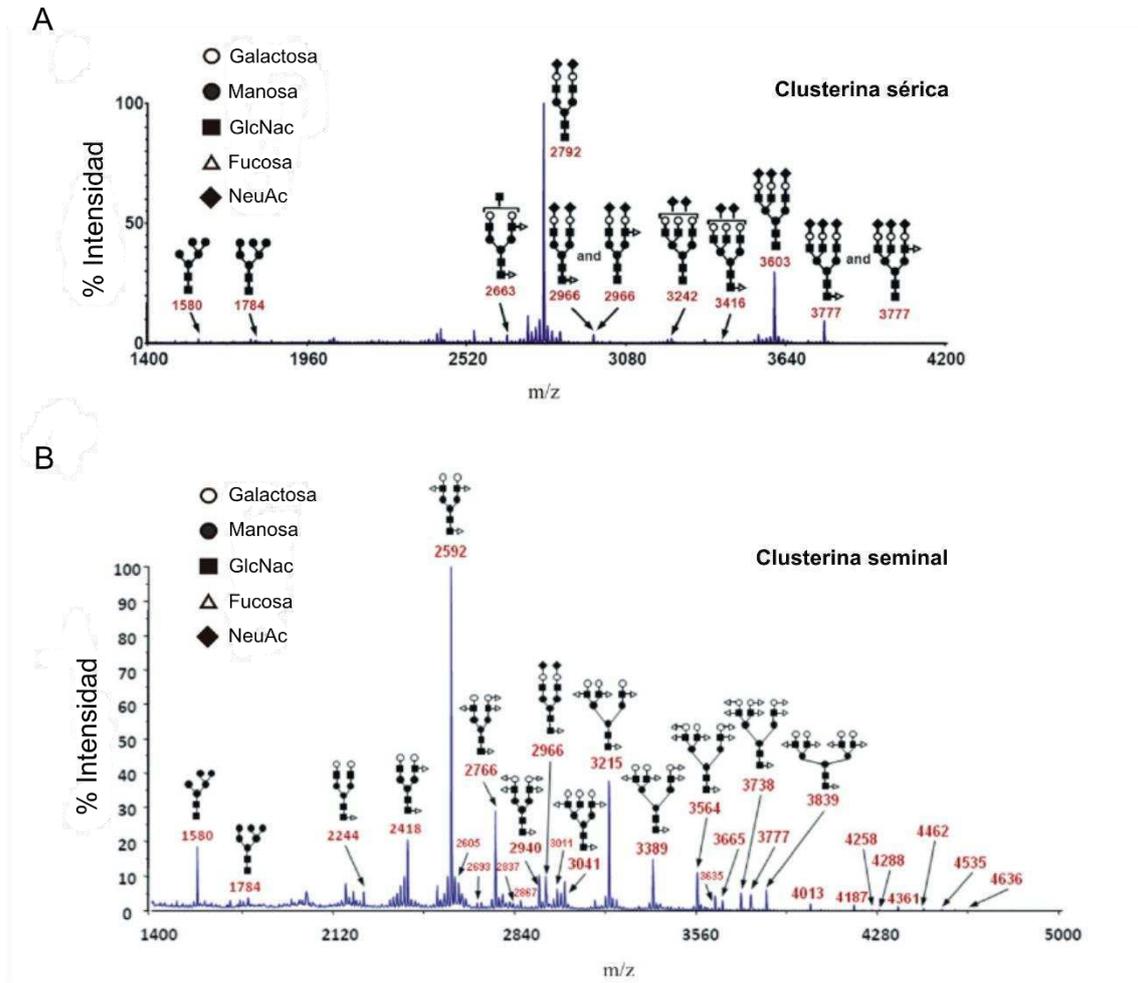


Figura 4 | Análisis de los glicanos de la clusterina. Análisis de espectrometría de masa (MALDI-MS) de los glicanos de la clusterina sérica (A) y la clusterina seminal (B). Las anotaciones están basadas en la información de la composición provista por los pesos moleculares por MALDI, complementado con la secuencia por MALDI TOF/TOF luego del tratamiento con hexoglicosidasas, tratamiento con ácido hidrofúorídrico y análisis de uniones (datos no mostrados). Solo se muestra un patrón de glicosilación para estructuras triatenarias. Galactosa (círculos abiertos), manosa (círculos cerrados), N-acetilglucosamina (cuadrados cerrados), fucosa (triángulos abiertos) y ácido siálico (rombos cerrados). (Figura adaptada de Sabatte⁴⁵)

1.2. CÉLULAS DENDRÍTICAS

Las células dendríticas convencionales o mieloides (CDs) cumplen un papel central en el desarrollo de la inmunidad adaptativa no sólo por su capacidad de activar linfocitos T vírgenes, sino también por su capacidad de orientar la diferenciación de los

linfocitos T CD4+ en diferentes perfiles funcionales. A fin de orquestar una respuesta T adecuada, las CD_s inmaduras presentes en mucosas y piel no sólo endocitan antígenos, sino que censan cuidadosamente las propiedades del proceso infeccioso en la periferia. A tal efecto, cuentan con un complejo sistema de receptores, capaces de reconocer moléculas microbianas, citoquinas, quimiocinas, opsoninas y diversos mediadores biológicos (péptidos y lípidos bioactivos, hormonas, etc.)⁴⁸⁻⁵⁰. Las CD_s son generadas a partir de precursores presentes en la medula ósea que aún no han sido bien caracterizados. Los precursores circulantes de las CD_s, entre ellos los monocitos, se extravasan en tejidos periféricos, fundamentalmente en piel y mucosas, diferenciándose a CD_s inmaduras. Las CD_s inmaduras poseen una gran capacidad para detectar, capturar y procesar antígenos y microorganismos, pero expresan una pobre capacidad para activar linfocitos T vírgenes. La detección de ciertos productos microbianos, citoquinas proinflamatorias, y señales indicativas de estrés o daño celular denominadas colectivamente “danger associated molecular patterns” (DAMPs), suelen conducir a la activación de las CD_s. Al activarse, las CD_s inmaduras experimentan un conjunto notable de cambios: a) disminuyen la expresión de E-cadherina, molécula de adhesión que media su interacción con queratinocitos en la piel y células epiteliales en las mucosas, permitiendo de este modo a las CD_s liberarse de “ataduras” que las mantienen en la periferia; b) aumentan la expresión del receptor de quimiocinas CCR7, lo que permite a las CD_s censar la presencia de las quimiocinas CCL19 y CCL21, producidas en los vasos y ganglios linfáticos, y migrar hacia los mismos siguiendo un gradiente creciente de concentración de estas dos quimiocinas (quimiotaxis); c) disminuyen dramáticamente su capacidad de endocitar antígenos y procesarlos, asegurando de este modo que las CD_s sólo puedan presentar a los linfocitos T vírgenes, en los ganglios linfáticos, antígenos endocitados en la periferia; d) incrementan notoriamente la expresión de moléculas coestimuladoras y moléculas del CMH de clase I y II, de modo de poder activar a los linfocitos T vírgenes en el área paracortical de los ganglios linfáticos^{49,51}. Las CD_s maduras poseen la capacidad única de activar a los linfocitos T

virgenes impartiendoles dos señales: la señal 1 involucra el reconocimiento del péptido antigénico presentado por la molécula del CMH de clase I o II, al receptor T (TCR). La señal 2 involucra el reconocimiento de las moléculas coestimuladoras CD80 y CD86 expresadas por las CDs, por la molécula CD28 expresada por los linfocitos T. La correcta recepción/inducción de las señales 1 y 2 conduce a la activación del linfocito T virgen, y a su expansión clonal^{49,50}. En relación a las células T CD4+, su activación conduce su diferenciación en distintos perfiles dependiendo, fundamentalmente, del patrón de las citoquinas producido por las CDs, y también por otras poblaciones leucocitarias. Estas citoquinas modulan el perfil de activación T CD4+ a través de su interacción con receptores específicos para las mismas, expresados por la célula T CD4+. Algunos autores se refieren a la señal inducida por estas citoquinas como señal 3⁴⁸⁻⁵⁰. En la **Figura 5** se presentan las principales propiedades de las CDs inmaduras y maduras.

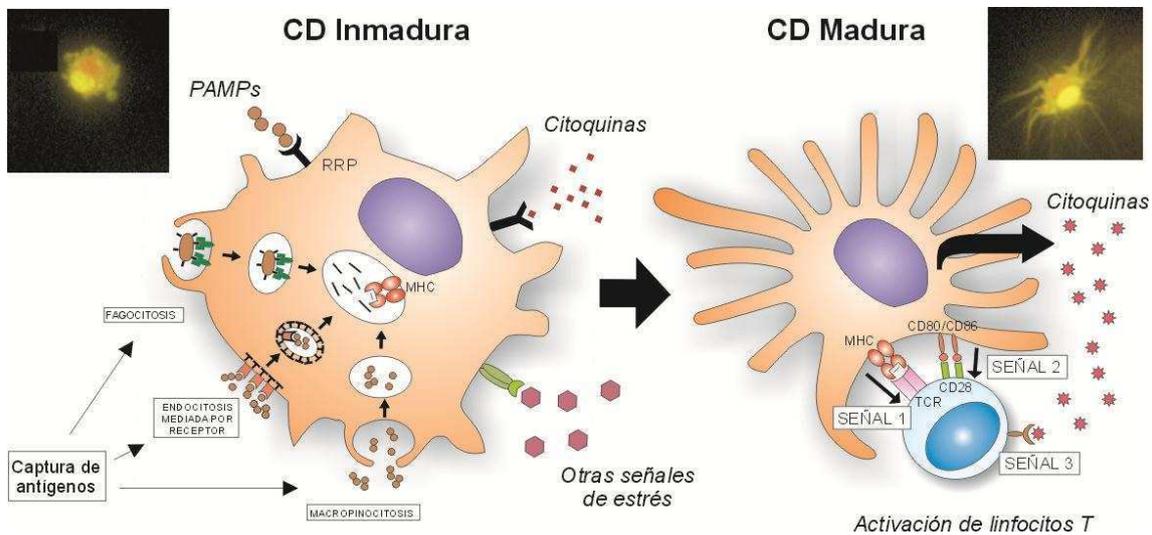


Figura 5 | Maduración de las CDs y activación de linfocitos T. En la izquierda se observa una CD inmadura capaz de endocitar antígenos mediante fagocitosis, endocitosis mediada por receptor y macropinocitosis. Se detallan diferentes señales capaces de activar a las CDs e inducir su maduración. A la derecha se puede observar una CD madura y la naturaleza de las señales aportadas por la CD que median la activación del linfocito T virgen.

La percepción, por parte del linfocito T CD4+ recientemente activado, de diferentes patrones de citoquinas determina, en última instancia, su perfil particular de activación. La **Figura 6** brinda una primera aproximación a este fenómeno. Se indican en la misma los requerimientos de citoquinas asociados a la inducción de los diferentes perfiles T CD4: Th1, Th2, Th17, Tfh y T regulador (Treg). Se indica también el papel de cada uno estos perfiles en la respuesta inmune anti-infecciosa y en los procesos alérgicos y autoinmunes.

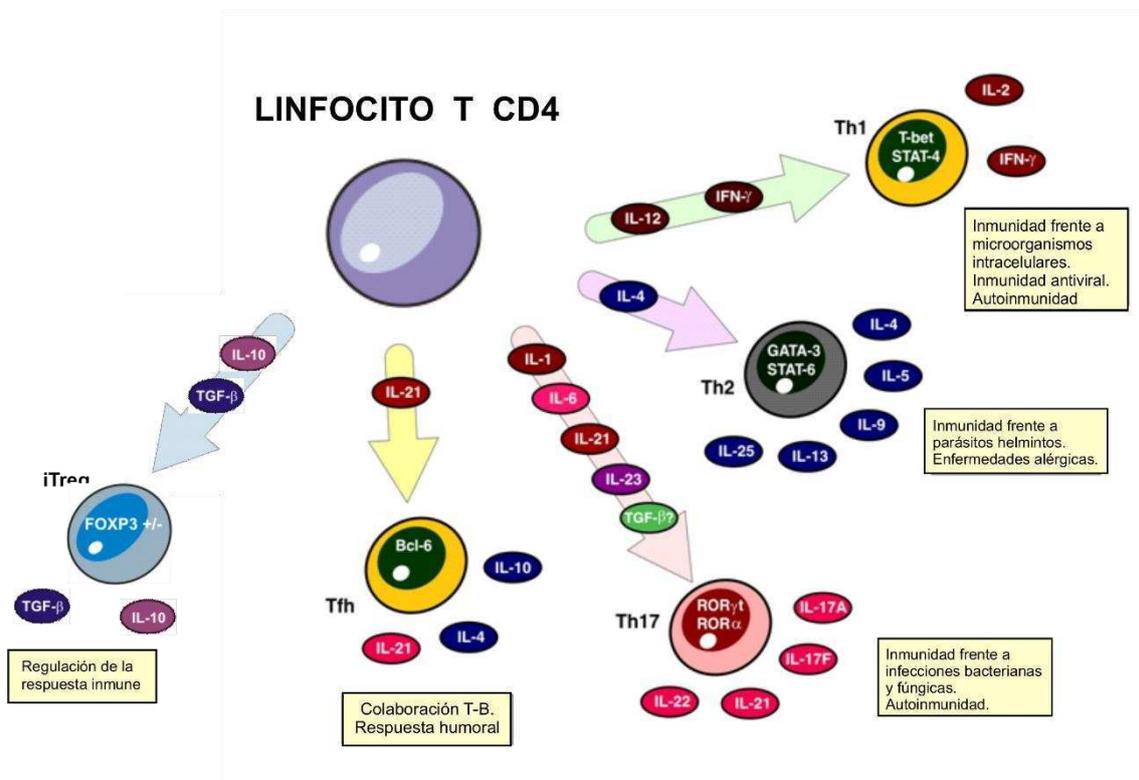


Figura 6 | Inducción de diferentes perfiles efectores en las células T CD4+. Se muestran en la figura las citoquinas involucradas en la diferenciación de los distintos perfiles efectores y las funciones asociadas a cada uno de ellos.

1.2.1 Células dendríticas tolerogénicas

Las CDs no solo son capaces de activar y orientar la respuesta inmune adaptativa, sino que también son capaces de silenciarla. En efecto, las CDs denominadas genéricamente tolerogénicas o regulatorias son capaces de inhibir o

suprimir tanto la respuesta inmune dirigida a antígenos propios, que subyace a los fenómenos de autoinmunidad, como también la respuesta inmune anti-tumoral y anti-infecciosa. Lo que determina el comportamiento tolerogénico de las CDs es la ausencia de citoquinas inflamatorias, en primer lugar la IL-12 y el interferón- γ (IFN- γ), y la presencia de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 y TGF- β como así también la presencia de galectina-1, prostaglandina E2 (PGE2), ácido retinoico, el péptido vasoactivo intestinal (VIP) y la vitamina D3^{49,51-53}. Las CDs tolerogénicas median su actividad principalmente induciendo la diferenciación de linfocitos T CD4 en un perfil regulatorio (Treg) mediante la producción de mediadores anti-inflamatorios y/o supresores. Se destacan entre ellos los siguientes: IL-10, TGF- β , ácido retinoico, galectina-1 y la enzimaIDO (indolamina dioxigenasa)^{49,51,54,55}.

1.3. RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES (RRPS)

Los RRPp comprenden, básicamente, cinco familias de receptores: los receptores de tipo Toll (TLR), los receptores lectina tipo C (RLC), los receptores “scavenger”, los receptores tipo NOD (NLR) (“Nucleotide-binding oligomerization domain-NOD-like receptors”) y la familia de ARN helicasas, familia que comprende a los receptores RIG- 1 (“retinoic acid-inducible gene I”) y MDA5 (“melanoma differentiation-associated gene 5”)⁵⁶⁻⁵⁹. Estos receptores difieren en los ligandos que reconocen y en su distribución celular. Los RRPp reconocen, en primer lugar, ciertas moléculas microbianas llamadas colectivamente “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs), tales como LPS, lipoproteínas, ácido lipoteicoico, peptidoglicano, flagelina, motivos CpG presentes en el ADN microbiano, arreglos de manosa y/o fucosa. Los PAMPs presentan un conjunto de propiedades: a) se expresan en los microorganismos, pero no en las células del hospedadero; b) son esenciales para la viabilidad o patogenicidad de los microorganismos y c) son compartidas por diferentes microorganismos, por ejemplo, el LPS es expresado por todas las bacterias Gram (-),

mientras que la flagelina es expresada por todas las bacterias flageladas. De este modo, mientras que los receptores propios a la inmunidad adaptativa (receptores antigénicos B y T) reconocen a los microorganismos a través de motivos sumamente particulares denominados epítopes antigénicos, empleando para ello centenares de millones de receptores diferentes expresados en forma clonal, los RRP reconocen estructuras conservadas y compartidas, permitiendo de este modo a las células de la inmunidad innata, entre ellas a las propias CDs, reconocer la diversidad de microorganismos a través de un número relativamente reducido de receptores (RRP)⁵⁶. Los RRP constituyen la columna vertebral de los sistemas de reconocimiento propios a la inmunidad innata. Son ellos quienes permiten a las CDs inmaduras presentes en la periferia reconocer procesos infecciosos. La identidad de los RRP que se activen en el tejido infectado determina, en gran medida, la calidad de la respuesta inmune que estas CDs, ya como CDs maduras, ponen en marcha en los órganos linfáticos secundarios^{48,56,60}. Las principales propiedades de las diferentes familias de RRP son presentadas en la **Tabla1**. Algunos RRP, aun siendo capaces de reconocer estructuras microbianas, parecen haber evolucionado de modo de adquirir una notable capacidad: reconocer señales indicativas de estrés o injuria celular (DAMPs)⁶¹.

	TLR	CLR	Scavenger	NLR	ARN Helicasas
Miembros	TLR 1-11	RM (receptor de manosa) DC-SIGN DEC-205 BCDA-2 DECTIN-1 DCIR DCAL-1 C-LEC langerina	CD36 SR-A1 SR-A2 Marco LOX-1	Más de 20 proteínas diferentes	RIG-1 MDA5
Ligandos reconocidos	Peptidoglicano (TLR2) Porinas (TLR2) ARN viral dc (TLR3) LPS (TLR4) Manano (TLR4) HSP 60/70 (TLR4) Flagelina (TLR5) ARN viral sc (TLR7/8) ADN CpG (TLR9)	Diferentes motivos glucídicos presentes principalmente en microorganismos.	LPS, ácido teicoico, CpG DNA, lipoproteínas de baja densidad (LDL)	Productos bacterianos: peptidoglicano, LPS, ARN viral y bacteriano Alarminas o DAMPs: cristales de ácido úrico y ATP	ARN viral
Ubicación	Membrana celular: TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10, 11 Endosomas: TLR 3, 7, 8, 9	Membrana celular	Membrana celular	Citosol	Citosol

Tabla 1 | Principales características de las diferentes familias de RRP.

1.3.1. Células dendríticas y receptores lectina tipo C (RLC)

Las CDs expresan los siguientes miembros de la familia RLC: el receptor de manosa (CD206), DEC205 (CD205), DC-SIGN (CD209), BDCA2, Dectin1, DCIR, DCAL1, CLEC1 y langerina (CD207)⁶². La mayoría de las RLC son proteínas de transmembrana tipo II, a excepción del receptor de manosa y de DEC205, que son proteínas de transmembrana tipo I⁶³. Los RLC suelen expresar un sólo dominio de reconocimiento de carbohidratos (DRC), salvo el receptor de manosa y DEC205, que expresan ocho y diez respectivamente⁵⁹. El reconocimiento de ligandos por parte de estos receptores es dependiente de la presencia de calcio. Todos ellos poseen dos dominios de unión al calcio en un “rulo” que protruye por fuera de la superficie de la

proteína. La mutación de estos sitios provoca que estos receptores pierdan su capacidad de reconocer ligandos⁶⁴. La presencia de la secuencia Glu-Pro-Asn en el DRC explica su especificidad por residuos manosa, mientras que la secuencia GlnPro-Asp explica la unión a galactosa^{65,66}. Es interesante destacar que, aunque DC-SIGN, el receptor de manosa, langerina y BDCA2 reconocen estructuras con residuos de manosa presentes en diferentes posiciones y ramificaciones, todos ellos contienen la secuencia Glu-Pro-Asn en sus DRC⁶³. La principal función de los receptores Lectina tipo C es mediar la endocitosis de microorganismos y componentes microbianos, permitiendo así su posterior procesamiento y presentación a los linfocitos T CD4+ a través de moléculas del CMH de clase II. Los ligandos endocitados a través de DC-SIGN suelen ser conducidos hacia los lisosomas y endosomas tardíos, que ya contienen en su interior moléculas del CMH de clase II⁶⁷.

1.3.2. DC-SIGN: contribuyendo al escape inmune

Al igual que la mayoría de las lectinas tipo C, DC-SIGN es una proteína de transmembrana tipo II que se expresa en CDs presentes en la dermis y en las mucosas de vagina, cérvix, placenta, recto, intestino y pulmones^{62,68}. También se la ha encontrado en CDs presentes en los ganglios linfáticos. Como ocurre con la mayoría de las lectinas tipo C, la expresión de DC-SIGN es alta en CDs⁶⁹. DC-SIGN también es expresado por subpoblaciones de linfocitos B y macrófagos⁷⁰. La región extracelular de DC-SIGN está compuesta por un DRC, el cual presenta dos sitios de unión a calcio. El DRC se encuentra separado del dominio transmembrana mediante una región “cuello” implicada en la formación de oligómeros⁷¹. En efecto, DC-SIGN se expresa en la membrana de las CDs en forma de tetrámero, y se ha comprobado que esta conformación es requerida a efectos de reconocer efectivamente a sus ligandos. Finalmente, el receptor posee una cola citoplasmática, la cual contiene motivos de internalización y motivos relacionados con la transducción de señales⁷². Ensayos de glicómica, en los cuales se analizó la unión de paneles de glicoconjugados a diferentes lectinas, han revelado los motivos

glucídicos reconocidos por diferentes RLC. DC-SIGN presenta alta especificidad por estructuras que contienen residuos de manosa y fucosa. DC-SIGN reconoce residuos de manosa ramificada con un mínimo de tres manosas y residuos de dimanosa terminales, a diferencia del receptor de manosa, que reconoce residuos individuales de manosa o residuos de dimanosa no terminales⁷³. Los residuos fucosilados reconocidos por DC-SIGN corresponden a los motivos Lewis X, Y, A y B, y a los motivos fucosilados de los grupos sanguíneos A y B. Resulta interesante que la sialidación de estas estructuras, como ocurre en el caso del motivo sialil-Lewis X, disminuye notablemente la capacidad de unión a DC-SIGN⁷⁴ (**Figura 7**). Cabe destacar que la clusterina fucosilada interactúa con DC-SIGN a través de motivos Lewis X y Lewis Y.

Los microorganismos patógenos han desarrollado una amplia variedad de mecanismos, no sólo para evadir la respuesta inmune del hospedadero, sino también para cooptarla en su propio beneficio. En este marco conceptual y contrastando con la visión tradicional, que asignaba a los RLC un papel restringido a la mediación de la endocitosis de patógenos y componentes microbianos, observaciones recientes han demostrado que los RLC, particularmente DC-SIGN, al interactuar con sus ligandos, ponen en marcha en las CDs vías de señalización que modulan su funcionalidad. DC-SIGN interactúa con una gran variedad de microorganismos patógenos, tanto intracelulares como extracelulares mediante el reconocimiento de estructuras que contienen manosa y fucosa. Entre ellos se encuentran virus (tales como HIV, Herpes Simplex, Ébola, citomegalovirus, hepatitis C y Dengue), bacterias, parásitos y hongos (*M. tuberculosis*, *Leishmania* y *C. albicans*, respectivamente)^{62,72,76}. Estos microorganismos no solo inducen la activación de DC-SIGN, sino que simultáneamente disparan la señalización de otros RRP. La cooperación entre estas vías es la que promueve las diferentes respuestas inmunes hacia los microorganismos patógenos. De esta manera, aunque el reconocimiento de carbohidratos por DC-SIGN no induce por sí solo la expresión de citoquinas, es capaz de modular las vías de señalización inducidas

por otros RRP.

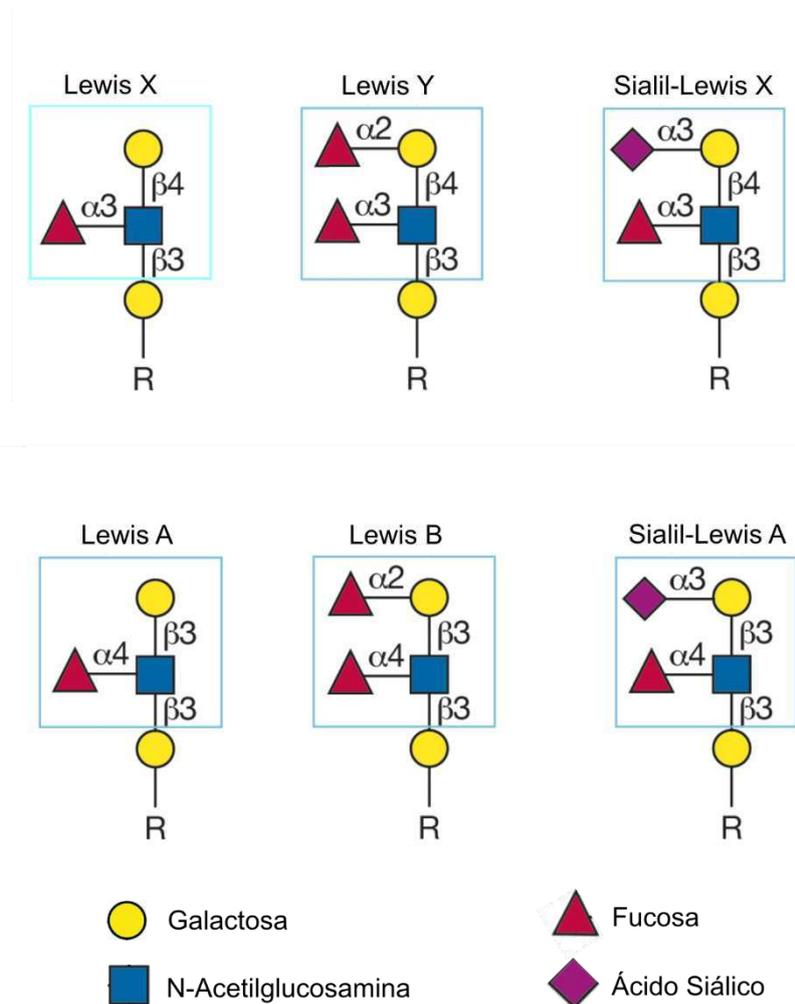


Figura 7 | Esquema de los motivos fucosilados de tipo Lewis. Se representan los motivos fucosilados de tipo Lewis con sus respectivas uniones de la galactosa terminal en β 1-4 (panel superior) o β 1-3 (panel inferior), junto con las uniones de fucosa a la N-acetilglucosamina interna en α 1-3 (panel superior) o α 1-4 (panel inferior). R representa N- u O- glicanos. (Adaptado de Varki⁷⁵).

Llamativamente, el impacto funcional que imponen los ligandos de DC-SIGN a la funcionalidad de las CDs parece depender de su particular patrón de glicosilación; mientras que los ligandos ricos en manosa promueven un fenotipo pro-inflamatorio en las CDs, aquellos ligandos ricos en fucosa promueven un fenotipo anti-inflamatorio o tolerogénico. En este sentido, estudios realizados en el patógeno gástrico *Helicobacter pylori* confirman que las variantes isogénicas que expresan estructuras de tipo Lewis X y Lewis Y en sus lipopolisacáridos inducen tolerancia en la mucosa gástrica humana⁷⁷.

⁷⁹ promoviendo respuestas de tipo Th2⁸⁰, efecto dependiente de la señalización mediada por DC-SIGN a través de estos lipopolisacáridos^{77,81}. Por el contrario, la infección con variantes isogénicas de *H. pylori* que no poseen estructuras terminales de tipo Lewis X y Lewis Y inducen efectos patológicos severos asociados con respuestas de tipo Th1⁷⁷.

El reconocimiento a través de DC-SIGN de motivos que contienen manosa o fucosa activa distintas vías de señalización en las CDs^{82,83}. DC-SIGN se une constitutivamente a RAF1 como parte del llamado RAF1-señaloma. Cuando DC-SIGN reconoce PAMPs conteniendo manosa, la activación simultánea de DC-SIGN y otros RRP's resulta en la activación de RAF1 y la subsecuente fosforilación de la subunidad p65 en Ser276 de NF-κB. Esta fosforilación permite la acetilación de p65, que finalmente resulta en el incremento de la transcripción de IL-12 e IL-6 inducida por TLRs, resultando en una producción incrementada de IL-12p70 promoviendo de este modo una respuesta de tipo Th1⁸⁴. En contraste con lo que pasa con PAMPs que contienen manosa, el reconocimiento de PAMPs fucosilados por DC-SIGN genera cambios conformacionales que desplazan a RAF-1 del señaloma de DC-SIGN. Esto genera una vía de señalización diferente que culmina con la activación y translocación al núcleo de BCL-3, un miembro atípico de la familia de NF-κB, que mediante la formación de complejos proteicos con dímeros de p50 culminan en la represión en la expresión de IL-12p70, desviando la respuesta Th1 hacia una Th2⁸⁵. La señalización específica por fucosa a través de DC-SIGN también puede llevar a la expresión de IL-27, promoviendo la diferenciación a un perfil Tfh⁸⁶. De esta manera los PAMPs que contienen fucosa contribuyen a una fuerte respuesta humoral. Finalmente, es interesante destacar que la señalización por fucosa puede ser muy importante en la tolerancia inmune. Recientemente Conde y colaboradores han demostrado en ratones, que macrófagos que expresan DC-SIGN regulan positivamente la expresión de IL-10 en respuesta a ligandos que contienen fucosa, resultando en la inducción de células T regulatorias⁸⁷.

1.4. RELEVANCIA FISIOLÓGICA DE LA CLUSTERINA FUCOSILADA

Como fue explicado anteriormente, las CD_s cumplen un papel crítico tanto en el desarrollo de la respuesta inmune como en el mantenimiento de la tolerancia. Por otra parte, numerosos trabajos han demostrado que la interacción de DC-SIGN con sus ligandos es capaz de modular el perfil de activación de las CD_s. En este sentido, el descubrimiento de una nueva glicofoma de clusterina capaz de unirse a DC-SIGN en el plasma seminal plantea diferentes interrogantes: en primer lugar, ¿La clusterina, es capaz de modular la funcionalidad de las CD_s? En la primera parte de esta tesis, nos abocaremos al estudio de las propiedades biológicas de la clusterina fucosilada aislada del plasma seminal. En segundo lugar, cabe preguntarnos si la glicofoma fucosilada de clusterina es producida exclusivamente en tracto genital masculino o si se expresa en otros órganos, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas. Teniendo en cuenta que los tumores frecuentemente presentan alteraciones en su glicosilación, y que la clusterina se encuentra sobre-expresada en diferentes tipos de cáncer, en la segunda parte de esta tesis, analizaremos las características de la clusterina expresada en el cáncer de mama.

Parte I

INTRODUCCIÓN – PARTE I

2.1. EL ROL DE LA CLUSTERINA EN LA REPRODUCCIÓN

Como fue mencionado anteriormente, la clusterina fue identificada originalmente como un componente del fluido proveniente del testículo de ratas. En efecto, la clusterina es la principal proteína producida por las células de Sertoli^{29,88,89} y su concentración puede alcanzar hasta los 10mg/ml en el plasma seminal, niveles 100 veces superiores a los encontrados en la sangre. En el tracto genital masculino la expresión de la clusterina ha sido detectada en diferentes órganos²⁹. Mediante inmunohistoquímica es posible detectar grandes cantidades de clusterina en el testículo, principalmente en el citoplasma de células de Sertoli, pero también en la cabeza y cola de espermátides y espermatozoides liberados⁹⁰. La clusterina parece ser endocitada por células de la *rete testis* y los conductos deferentes, mediante el receptor LRP-2 presente en células epiteliales^{91,92}. La clusterina es también encontrada en próstata. Mediante estudios de inmunohistoquímica, Tenniswood y colaboradores detectaron la presencia de clusterina en el citoplasma de células epiteliales en la región proximal del conducto prostático⁹³. De acuerdo a Sensibar y colaboradores, la glicosilación de la clusterina producida en la próstata sería diferente respecto de la presente en la clusterina testicular, atendiendo a su diferente movilidad electroforética en geles de 2 dimensiones⁹⁴. Sin embargo, no hemos definido aún la fuente celular de la clusterina que presenta capacidad de unirse a DC-SIGN.

A pesar de su llamativa concentración en el semen, poco se conoce de la relevancia de la clusterina en la reproducción. En forma similar a lo que ocurre en otros tejidos, se ha reportado que la clusterina posee actividad anti-apoptótica en las células germinales⁹⁵. Tanto su rol en la espermatogénesis como su influencia en la fertilidad son controversiales, y resultados encontrados han sido publicados por diferentes grupos⁹⁶⁻

⁹⁸.

2.2. TOLERANCIA MATERNO-FETAL

Cómo el feto y la placenta logran evitar el rechazo del sistema inmune de la madre constituye uno de los interrogantes más interesantes de la inmunología. En efecto, el embrión semialogéneo crece en el organismo materno sin despertar una respuesta inmunológica agresiva, en contraste con la observada contra los tejidos u órganos trasplantados. Inicialmente, la explicación de esta aparente paradoja recayó en teorías que postulaban la separación anatómica de los tejidos maternos respecto de los tejidos fetales, que el útero representaba un sitio de privilegio inmunológico, o un estado de inmunosupresión que acompaña al embarazo^{99,100}. Actualmente, sabemos que las mujeres son capaces de desarrollar linfocitos T específicos contra aloantígenos fetales¹⁰¹, sin embargo, un conjunto de mecanismos de protección actúan coordinadamente para evitar el rechazo. Por ejemplo, el trofoblasto (el tejido en la interfase entre feto y madre) no expresa MHC clásicos excepto del tipo HLA-C, así como las CD de la decidua no pueden migrar a los ganglios maternos^{102,103}. Adicionalmente, los tejidos de la placenta expresan la enzimaIDO en gran cantidad^{104,105}, están protegidos de la acción del complemento¹⁰⁶ y se caracterizan por presentar HLA-G, un tipo no clásico de MHC de clase I que posee propiedades tolerogénicas^{107,108}. Sin embargo, la tolerancia materno-fetal parecería sostenerse, en primer lugar, en los linfocitos T regulatorios¹⁰⁹.

Si bien la “inactividad” de los linfocitos T específicos hacia aloantígenos paternos se había descrito con anterioridad¹⁰¹, la importancia de los linfocitos T regulatorios fue determinada de manera concluyente con los estudios de Aluvihare *et al.* En estos estudios, utilizando modelos murinos, se estableció que los fetos alogéneos son inviábiles si se eliminan los linfocitos T regulatorios de la madre¹¹⁰. Más adelante, se determinó que la inviabilidad de los fetos alogéneos podía ser revertida por transferencia de linfocitos T regulatorios desde otra ratona preñada¹¹¹. Finalmente, se

demostró que los linfocitos T regulatorios necesarios para la viabilidad del feto no son de origen tímico, sino que son periféricos, y especialmente, son específicos de antígenos paternos¹¹²⁻¹¹⁴. Otras investigaciones respaldan la idea de que un fenómeno similar tiene lugar en seres humanos, donde se ha visto que el embarazo aumenta la cantidad de linfocitos T regulatorios reactivos contra aloantígenos paternos^{115,116}. Por otra parte, numerosos estudios han asociado bajos niveles de linfocitos T CD4+CD25+FoxP3+, fenotipo presente en los linfocitos T regulatorios, con abortos espontáneos recurrentes y otras complicaciones del embarazo como la pre-eclampsia¹¹⁷⁻¹²⁰. Llamativamente, la expansión de los linfocitos T regulatorios debe ocurrir en el período anterior a la implantación, ya que su aparición tardía no alcanza a salvar al feto alogeneico del ataque inmunológico^{110,121,122}. Este requisito temporal explica la aparición de linfocitos T CD4+CD25+FoxP3+ en el útero incluso antes de la concepción, un fenómeno que requiere de la expresión uterina de CCL19 inducida por el plasma seminal^{123,124}.

2.2.1. El semen en la tolerancia materno fetal

El espermatozoides y el plasma seminal actúan en conjunto para completar los varios pasos de la fertilización, mucho de los cuales aún no son comprendidos en su totalidad. El plasma seminal es un fluido biológico muy complejo que contiene una gran diversidad de componentes incluyendo lípidos, carbohidratos, numerosos péptidos y proteínas. Contiene también una gran variedad de citoquinas y quimiocinas. Estos componentes son secretados principalmente por los siguientes órganos: el testículo, el epidídimo y la próstata. La concentración de proteínas en el plasma seminal varía normalmente entre 35 a 55 mg/ml, y estudios de proteómica han revelado la existencia de más de 900 proteínas diferentes en dicho fluido¹²⁵. El rol de las proteínas del plasma seminal en el éxito de la fertilización no es claro y, aunque algunos trabajos en la literatura postulan que la glicosilación de estas proteínas podría jugar un rol importante en este proceso¹²⁶⁻¹²⁸, poco se sabe sobre los glicanos presentes en el plasma seminal, en que proteínas

están presentes y su rol específico en el proceso de fertilización y la tolerancia materno fetal.

La visión predominante en la literatura científica considera al semen un mero reservorio y/o vehículo de transmisión de patógenos, asignándole de este modo un papel simplemente pasivo. Sin embargo, ha sido ya demostrado que el semen es capaz de inducir un conjunto de cambios a nivel de las mucosas receptoras que podrían modular el curso temprano de los procesos infecciosos y la respuesta inmune generada por patógenos transmitidos sexualmente: a) neutraliza el pH de la mucosa vaginal¹²⁹; b) opsoniza microorganismos¹³⁰; c) promueve la quimiotaxis de células de langerhans vía secreción de la quimiocina CCL20 por células del epitelio vaginal¹³¹ y d) estimula la producción de un conjunto de citoquinas y quimiocinas en el ectocervix, con la consecuente inducción de una reacción inflamatoria local, infiltrado leucocitario e inducción de microabrasiones en la mucosa cervical¹³². Más aun, el semen contiene un conjunto de elementos con un alto potencial inmunomodulatorio¹³³⁻¹³⁵. Recientemente, se ha comprobado que esta acción inmunomodulatoria depende, en gran medida, de las altas concentraciones de TGF- β seminal^{136,137}. Sin embargo, la función inmunomodulatoria más relevante del plasma seminal tal vez sea la inducción de una población de linfocitos T regulatorios específicos frente a aloantígenos paternos. A través de una extensa sucesión de trabajos, el grupo de Sarah Robertson ha confirmado la capacidad del plasma seminal de promover la expansión de los linfocitos T CD4+CD25+FoxP3+ reactivos contra aloantígenos paternos en los ganglios linfáticos que drenan el aparato genital femenino y su migración al útero para ejercer funciones tolerogénicas^{124,138-140}.

El mecanismo a través del cual el plasma seminal promueve la expansión de estos linfocitos T regulatorios no ha sido aún definido claramente, aunque algunos detalles han sido revelados en un estudio realizado por Moldenhauer *et al.*¹³⁹. En primer lugar, este estudio demostró que las CDs de origen materno presentes en la mucosa

genital son las responsables de capturar y presentar aloantígenos presentes en el semen. A continuación, utilizando hembras deficientes en los transportadores TAP, se confirmó que la proliferación de linfocitos CD8+ reactivos frente a aloantígenos paternos requiere de la presentación cruzada por parte de estas CDs, sugiriendo que los aloantígenos paternos son endocitados¹³⁹.

HIPÓTESIS I

La clusterina fucosilada presente en el plasma seminal, merced a su actividad de chaperona extracelular, induce la endocitosis de antígenos “estresados” por CDs a través de DC-SIGN. A su vez, la interacción de clusterina con DC-SIGN, modularía el perfil de activación de las CDs y su capacidad de activar linfocitos T.

En este sentido es interesante destacar que:

La posible acción inmunomodulatoria ejercida por la clusterina fucosilada sobre la funcionalidad de las CDs se sustenta, no sólo en su capacidad de interactuar con alta afinidad con DC-SIGN, sino también con las notables acciones biológicas descritas para la clusterina sialidada presente en el suero y que, suponemos, serían también mediadas por la clusterina fucosilada. Aún hoy, 30 años luego de su inicial caracterización, la clusterina es definida como una proteína “enigmática”. Es una proteína altamente conservada expresada por diferentes tejidos, capaz de mediar un conjunto de funciones, entre la cuales se destaca su capacidad de actuar como chaperona extracelular. La clusterina, de un modo similar a las proteínas de shock térmico (HSP), interactúa con regiones hidrofóbicas de una amplia diversidad de proteínas “estresadas”, formando complejos de altos peso molecular e inhibiendo su precipitación^{23,141-144}. Considerando que DC-SIGN media la internalización de sus ligandos, y que el reconocimiento de motivos que contienen fucosa está asociado con la inhibición de respuestas típicamente inflamatorias, es lógico suponer que la clusterina fucosilada pueda modular la capacidad de las CDs de internalizar antígenos presentes en su entorno. Al respecto, es interesante destacar que la clusterina ha mostrado la capacidad de reconocer motivos presentes en la superficie de células propias induciendo su agregación, interactuar con microorganismos y reconocer complejos inmunes formados por anticuerpos IgG^{23,141-144}. Esto sugiere que la clusterina fucosilada podría mediar un efecto “osponizante”, merced a su capacidad de actuar como puente entre las diversas estructuras reconocidas y el

receptor endocítico DC-SIGN. Es decir, la posible actividad inmunomoduladora de la clusterina fucosilada se sustenta, no sólo en su condición de ligando natural de alta afinidad para DC-SIGN, sino también en su actividad de chaperona y su posible actividad “opsonizante”. Cabe mencionar que no existen trabajos en la literatura científica que hayan examinado una posible acción moduladora ejercida por la clusterina sobre la funcionalidad de las CDs.

OBJETIVO GENERAL I

Estudiar las consecuencias funcionales de la interacción entre la clusterina fucosilada y DC-SIGN en las CDs.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Analizar la capacidad de la clusterina fucosilada de actuar como chaperona extracelular.**
- 2. Evaluar la capacidad de la clusterina fucosilada de dirigir proteínas estresadas hacia DC-SIGN.**
- 3. Evaluar la capacidad de CDs de endocitar proteínas estresadas dirigidas hacia DC-SIGN por la clusterina fucosilada.**
- 4. Analizar la acción inmunomodulatoria de la clusterina fucosilada sobre CDs.**
 - Analizar el fenotipo de CDs tratadas con la clusterina fucosilada.
 - Analizar la capacidad de la clusterina fucosilada de modular el fenotipo inducido por el LPS en CDs.
 - Evaluar la capacidad de CDs tratadas con la clusterina fucosilada de expandir linfocitos T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ en un cultivo mixto linfocitario.

RESULTADOS – PARTE I

4.1. La clusterina fucosilada presente en el plasma seminal actúa como chaperona extracelular

La capacidad de la clusterina del suero de evitar la formación de complejos de alto peso molecular actuando como chaperona extracelular ha sido ampliamente estudiada^{18,23,38,144}. Al estresarse, las proteínas exponen regiones hidrofóbicas mediante las cuales pueden establecer interacciones de baja afinidad entre ellas, agregándose y precipitando. Este proceso, en solución, genera un aumento en la turbidez que puede ser medido analizando la absorbancia a 360 nm. Al actuar como chaperona extracelular, la clusterina interactúa con proteínas estresadas evitando la agregación de las mismas.

En primer lugar, evaluamos si la clusterina del plasma seminal, a pesar de presentar un patrón de glicosilación diferente al de la clusterina sérica, posee actividad de chaperona extracelular. Para esto, clusterina fue purificada a partir de muestras de plasma seminal o suero de dadores sanos mediante cromatografía de afinidad, tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Para estos experimentos, como blanco de la actividad de la clusterina, utilizamos diferentes proteínas disponibles comercialmente que fueron utilizadas por otros autores para tales fines: *catalasa*, *glutación S-transferasa* (GST) o *albúmina sérica bovina* (BSA)^{24,28,30-32,145}. Para algunos experimentos utilizamos suero bovino fetal. Como estímulos estresantes utilizamos el tratamiento con calor (60°C) o el tratamiento con sustancias reductoras (ditiotreitól), como fue descrito previamente^{28,31,32,145}. Soluciones de catalasa (200 µg/ml), GST (400 µg/ml) y suero normal (diluido 1 en 10 en PBS) fueron incubadas a 60°C durante 20 minutos, y la absorbancia a 360 nm fue medida cada 1 minuto. Como se observa en la **Figura 8**, cuando este tratamiento fue realizado en presencia de clusterina fucosilada del plasma seminal (100 µg/ml) o clusterina sérica (100 µg/ml) la agregación de las

proteínas fue inhibida y, por lo tanto, la turbidez de las soluciones fue menor en cada punto medido (**Figura 8 A-C y G**, $n=6$, $p<0,01$). Posteriormente, estresamos GST (400 $\mu\text{g/ml}$) y BSA (500 $\mu\text{g/ml}$) en condiciones reductoras con una solución de DTT 20mM durante 120 minutos a 37°C. La absorbancia a 360 nm fue medida cada 8 min. Cuando se estresaron estas proteínas en presencia de clusterina (a 200, 400 o 500 $\mu\text{g/ml}$, para catalasa, GST y BSA respectivamente), nuevamente la turbidez de las soluciones fue menor que los controles (**Figura 8 D-F y H**). Estos resultados indican que, en forma similar a la clusterina sérica, la clusterina fucosilada del plasma seminal inhibe la agregación de las proteínas analizadas ($n=3-6$, $p<0,01$). Estos experimentos nos permiten concluir que la clusterina fucosilada posee actividad de chaperona extracelular.

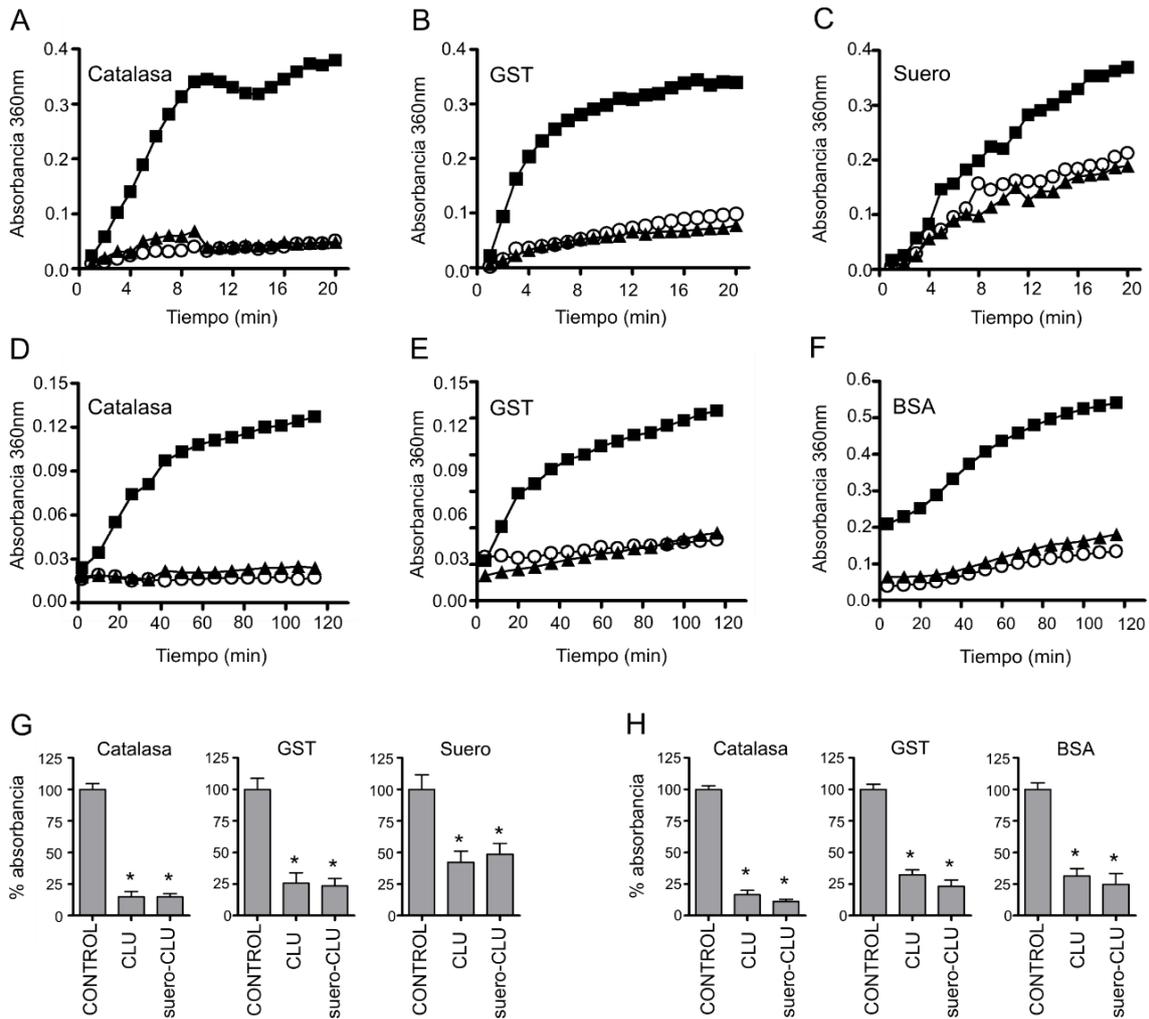


Figura 8 | La clusterina fucosilada tiene actividad de chaperona extracelular. (A-C) Catalasa (200 $\mu\text{g/ml}$), GST (400 $\mu\text{g/ml}$) o suero humano (diluido 1 en 10 en PBS), fueron incubados durante 20 min a 60°C en presencia o ausencia de clusterina fucosilada del plasma seminal (CLU) (100 $\mu\text{g/ml}$) o clusterina sérica (suero-CLU) (100 $\mu\text{g/ml}$). La absorbancia a 360 nm fue medida cada 2 min. **(D-F)** Catalasa (200 $\mu\text{g/ml}$), GST (400 $\mu\text{g/ml}$) o BSA (500 $\mu\text{g/ml}$), fueron incubadas durante 120 min a 37°C en una solución que contiene 20mM de DTT, en presencia o ausencia de CLU o suero-CLU, a las concentraciones de 200, 400 o 500 $\mu\text{g/ml}$ para catalasa, GST y BSA respectivamente. La absorbancia a 360 nm fue medida cada 8 min. Los cuadrados representan controles, los triángulos representan proteínas incubadas con CLU y los círculos representan proteínas incubadas con suero-CLU. Se muestran experimentos representativos ($n = 3-6$). **(G y H)** Los experimentos en (G) y (H) fueron realizados como se describe arriba para (A) – (C) (20 min a 60°C), y (D) – (F) (120 min a 37°C con DTT 20 mM), respectivamente. Los resultados se expresan como la media \pm DS de 3-6 experimentos realizados por duplicado. La absorbancia de las proteínas estresadas incubadas con CLU o suero-CLU es expresada como el porcentaje de absorbancia de proteínas estresadas en ausencia de clusterina (CONTROL). * $p < 0,01$ versus CONTROL.

4.2. La clusterina fucosilada induce la unión de proteínas extracelulares estresadas a DC-SIGN

Teniendo en cuenta que la clusterina fucosilada se une a proteínas estresadas inhibiendo su agregación y, como fue descrito previamente, se une con alta afinidad a DC-SIGN, proponemos que podría inducir la unión de proteínas estresadas a DC-SIGN, promoviendo su endocitosis por CDs. Para verificar esta hipótesis realizamos ensayos de unión de catalasa, GST y BSA biotiniladas a células que expresan el receptor DC-SIGN. En un primer conjunto de experimentos, utilizamos la línea celular Raji (proveniente de un linfoma B) transfectada en forma estable con DC-SIGN. La expresión de DC-SIGN por las células Raji fue evaluada por citometría de flujo y se muestra en la **Figura 9A**. Catalasa biotinilada (200 µg/ml) fue estresada durante 20 minutos a 60°C en presencia o ausencia de clusterina fucosilada (100 µg/ml). Luego, los complejos estresados fueron incubados con células Raji-DC-SIGN positivas durante 1 hora a 4°C para permitir su unión a las células. Finalmente, las células fueron lavadas y teñidas con estreptavidina conjugada con FITC durante 20 minutos a 4°C. La habilidad de la clusterina fucosilada de inducir la unión de catalasa estresada a DC-SIGN fue revelada por citometría de flujo. Como se observa en la **Figura 9B**, la clusterina fucosilada induce la unión de catalasa estresada a las células Raji-DC-SIGN. Esta unión es debida a la capacidad de chaperona de la clusterina fucosilada, ya que este resultado no fue observado cuando la catalasa fue incubada con clusterina durante 20 minutos a 4°C, y por lo tanto no fue estresada (**Figura 9B y E**). Cuando realizamos el mismo ensayo utilizando células Raji que no expresan DC-SIGN, no observamos la unión de catalasa estresada en presencia de clusterina fucosilada a las células (**Figura 9C**). Este resultado demuestra que efectivamente la unión de catalasa en presencia de clusterina fucosilada a las células Raji-DC-SIGN positivas es debida a la expresión de dicho receptor. Más aún, la unión de catalasa estresada a estas células fue completamente inhibida cuando se realizó el ensayo de unión incubando las células previamente con concentraciones

saturantes de manano (1 mg/ml) durante 30 minutos a 4°C. El Manano es un ligando de alta afinidad de DC-SIGN y en consecuencia impide la unión de otro ligando a este receptor (**Figuras 9D y E**). No solo la unión a DC-SIGN de catalasa estresada sino también de GST y BSA fue inducida por clusterina fucosilada (**Figuras 9F y G**). Como fue reportado previamente, la clusterina sérica no interactúa con DC-SIGN⁴⁵ y en consecuencia no induce la unión de proteínas estresadas hacia células Raji-DC-SIGN-positivas (**Figura 9E-G**).

En un segundo conjunto de experimentos, analizamos la capacidad de la clusterina fucosilada de inducir la interacción de proteínas estresadas con células dendríticas que expresan DC-SIGN. Las CDs fueron obtenidas a partir de monocitos cultivados durante 5 días en presencia de IL-4 y GM-CSF tal como se describe en la sección de materiales y métodos. La expresión de DC-SIGN por las CDs se muestra en la **Figura 10A**. En los ensayos de unión realizados con CDs utilizamos catalasa como proteína modelo. Nuevamente, al igual que lo descrito previamente, incubamos catalasa biotinilada (200 µg/ml) durante 20 minutos a 60°C o a 4°C como control negativo de estrés proteico, en presencia o ausencia de clusterina fucosilada del plasma seminal (100 µg/ml) o clusterina sérica (100 µg/ml). Luego, las soluciones fueron enfriadas e incubadas con CDs. Como era esperado, la clusterina del plasma seminal induce la interacción de proteínas estresadas con CDs (**Figura 10B y D**) y el tratamiento previo de las CDs con manano (1 mg/ml) inhibe fuertemente la unión de catalasa estresada en presencia de clusterina del plasma seminal a estas células (**Figuras 10C y D**).

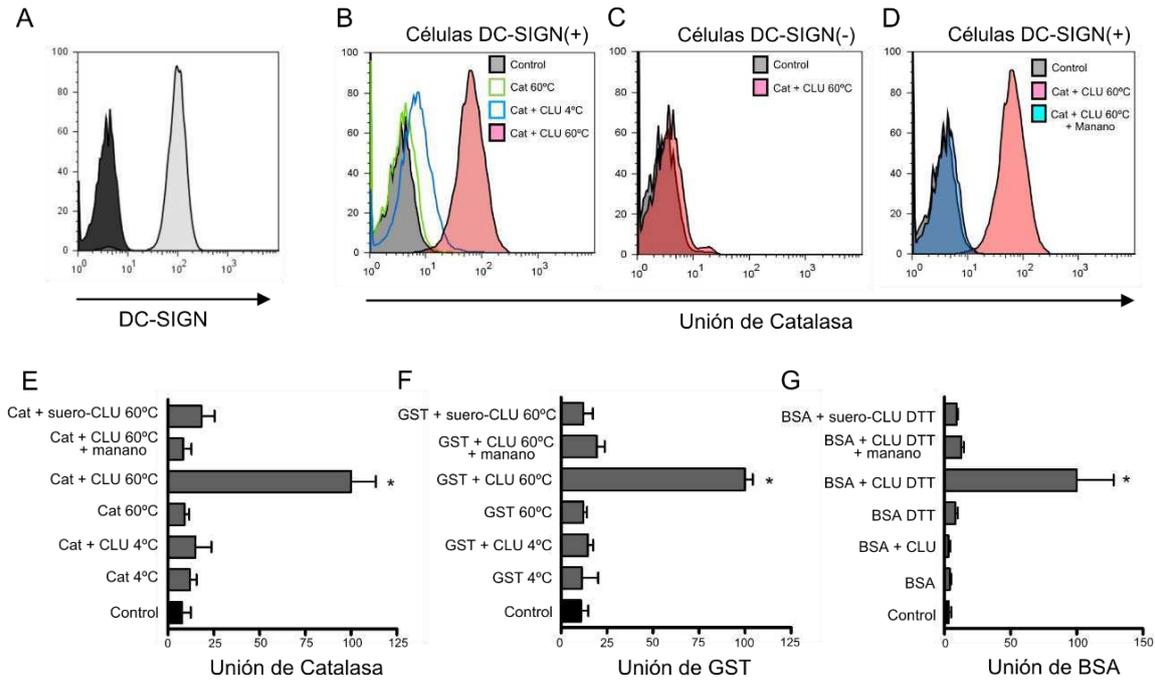


Figura 9 | La clusterina fucosilada dirige proteínas estresadas hacia DC-SIGN. (A) Células Raji-DC-SIGN positivas fueron teñidas con anticuerpos anti-DC-SIGN conjugados a FITC y analizadas por citometría de flujo. El histograma negro representa el control de isotipo. (B-D) Catalasa biotinilada (Cat) (200 $\mu\text{g/ml}$) fue incubada por 20 min a 60°C o 4°C con o sin clusterina fucosilada del plasma seminal (CLU) (100 $\mu\text{g/ml}$). La unión de catalasa a células Raji-DC-SIGN positivas (B) o células Raji-DC-SIGN negativas (C) fue analizada incubando las células con los complejos estresados durante 60 min a 4°C. Luego, las células fueron lavadas y la unión de los complejos estresados fue revelada por citometría de flujo usando estreptavidina-FITC. En (D), células Raji-DC-SIGN positivas fueron pre-tratadas durante 30 min a 4°C con manano (1 mg/ml) para bloquear DC-SIGN. Luego, la unión de los complejos estresados fue analizada como se describe para (B) y (C). Se muestran histogramas representativos ($n = 4$). (E y F) Catalasa (200 $\mu\text{g/ml}$) o GST biotiniladas (400 $\mu\text{g/ml}$) fueron incubadas durante 20 min a 60°C o 4°C en ausencia o presencia de CLU (100 $\mu\text{g/ml}$). Luego, catalasa y GST fueron incubadas durante 60 min a 4°C con células Raji-DC-SIGN positivas, pre-tratadas o no con manano (1 mg/ml). La unión de catalasa o GST biotiniladas fue revelada por citometría de flujo usando estreptavidina-FITC. La unión de catalasa estresada a 60°C en presencia de CLU fue considerada como 100%. Los resultados muestran la media \pm DS de 3 experimentos independientes (* $p < 0,01$). (G) BSA biotinilada (500 $\mu\text{g/ml}$) fue incubada durante 60 min a 37°C con DTT (20 mM) en ausencia o presencia de CLU (500 $\mu\text{g/ml}$). La unión de BSA-biotinilada fue analizada como se describe para (E) y (F). Los resultados se expresan como la media \pm DS de 3 experimentos (* $p < 0,01$).

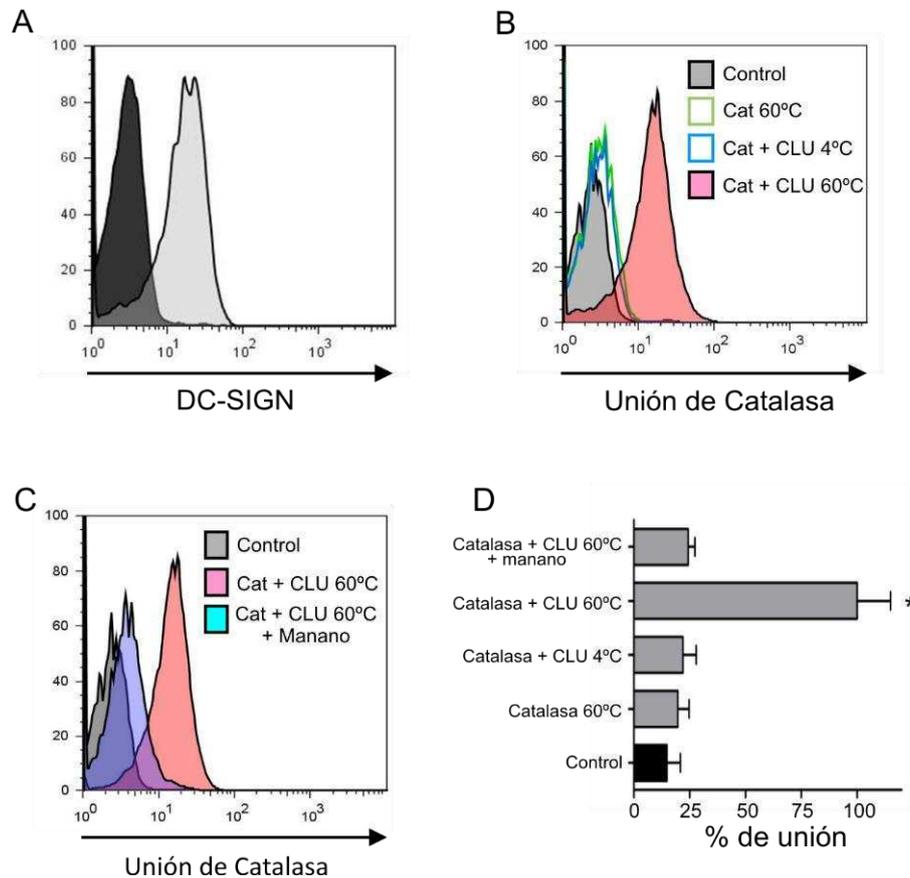


Figura 10 | La clusterina fucosilada transporta proteínas estresadas hacia células dendríticas. (A) Células dendríticas (CDs) fueron teñidas con anticuerpos anti-DC-SIGN conjugados a FITC y analizadas por citometría de flujo. El histograma negro representa el control de isotipo. (B-D) Catalasa biotinilada (Cat) (200 $\mu\text{g/ml}$) fue incubada en presencia o en ausencia de clusterina fucosilada del plasma seminal (CLU) (100 $\mu\text{g/ml}$) durante 20 min a 60°C o 4°C. La unión de catalasa a CDs fue analizada incubando las células con los complejos estresados durante 60 min a 4°C. Luego, las células fueron lavadas y la unión de catalasa-biotinilada a CDs fue analizada por citometría de flujo usando estreptavidina-FITC. En (C), antes de realizar el ensayo detallado anteriormente las CDs fueron pre-tratadas con manano (1 mg/ml) durante 30 min a 4°C para bloquear DC-SIGN. Se muestran histogramas representativos ($n=3-6$) en (B) y (C), y la media \pm DS de 3-6 experimentos independientes en (D) (* $p<0,01$).

A diferencia de las células Raji DC-SIGN positivas, las CDs poseen una amplia variedad de receptores capaces de reconocer glúcidos. La inhibición con Manano observada previamente sugiere que DC-SIGN está involucrado en la unión de catalasa estresada a las CDs. Para confirmar que DC-SIGN es el receptor al cual se une catalasa estresada en presencia de clusterina fucosilada a las CDs, utilizamos 3 anticuerpos bloqueantes de DC-SIGN. Estos anticuerpos reconocen el sitio de unión a carbohidratos de DC-SIGN inhibiendo la unión de sus ligandos. Las CDs fueron incubadas durante 30

min a 4°C con los anticuerpos bloqueantes de DC-SIGN, lavadas y el ensayo de unión con catalasa estresada en presencia de clusterina fucosilada se realizó tal como fue descrito previamente. La unión de catalasa estresada a CDs fue fuertemente inhibida por los anticuerpos bloqueantes de DC-SIGN (**Figura 11A y B**, n=3, p<0,01), confirmando que DC-SIGN es el principal receptor involucrado en este proceso. Finalmente, verificamos que la unión de las proteínas estresadas a las CDs, se debe al contenido de motivos fucosilados presentes en la clusterina del plasma seminal. Para esto, la clusterina fucosilada del plasma seminal fue tratada durante 30 minutos a 37°C con α -1-3,4 fucosidasa (1 mg/ml) o con α -1-2 fucosidasa (1 mg/ml). Estas enzimas cortan los residuos de fucosa contenidos en los motivos Lewis X y Lewis Y presentes en la clusterina fucosilada. Consistente con observaciones previas de nuestro grupo de trabajo que indican que la clusterina fucosilada se une a DC-SIGN a través de motivos glucídicos que contienen residuos de fucosa terminal de tipo Lewis⁴⁵, el tratamiento de la clusterina fucosilada con fucosidas inhibe su habilidad de inducir la interacción de catalasa estresada con CDs (**Figura 11C y D**, n=3, p<0,01). Como era esperado, la clusterina sérica mostró ser completamente incapaz de promover la unión de catalasa estresada hacia DC-SIGN en CDs (**Figura 11E y F**).

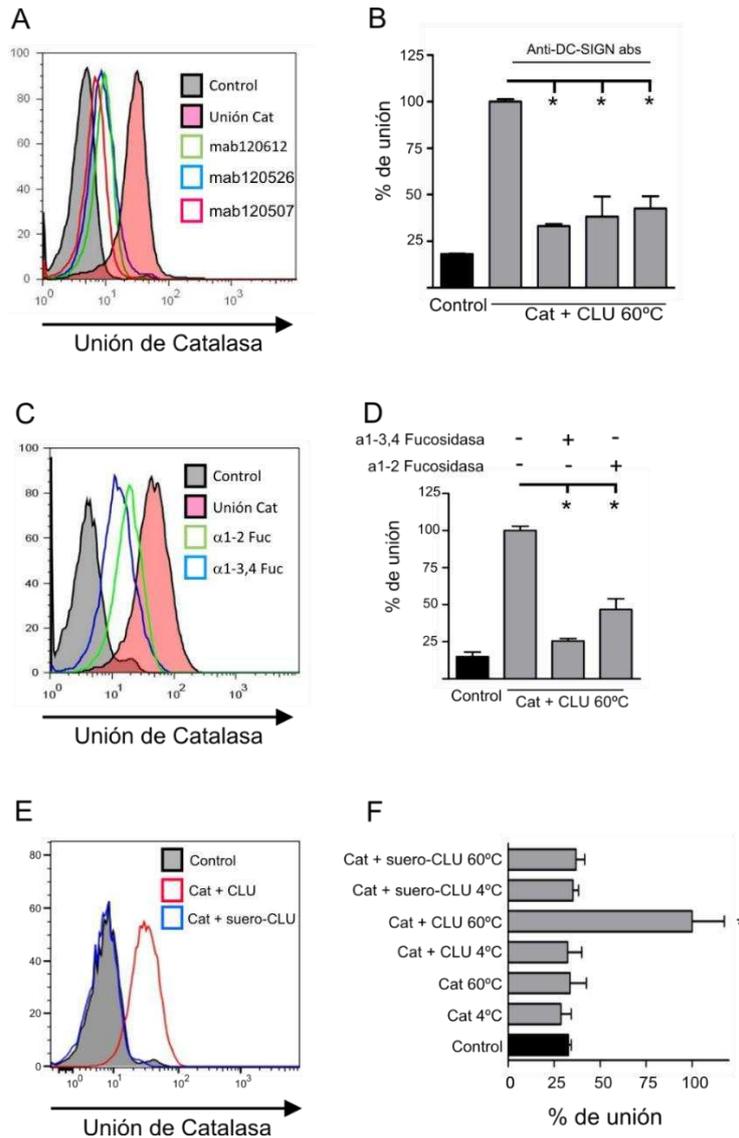


Figura 11 | La clusterina fucosilada dirige proteínas estresadas hacia DC-SIGN en células dendríticas a través de sus motivos fucosilados. (A-D) Catalasa biotinilada (Cat) (200 µg/ml) fue incubada en presencia o en ausencia de clusterina fucosilada del plasma seminal (CLU) (100 µg/ml) durante 20 min a 60°C o 4°C. La unión de catalasa a CDs fue analizada incubando las células con los complejos estresados durante 60 min a 4°C. Luego, las células fueron lavadas y la unión de catalasa-biotinilada a CDs fue analizada por citometría de flujo usando estreptavidina-FITC. En (A) y (B), las CDs fueron pre-tratadas o no, con 3 anticuerpos diferentes que bloquean DC-SIGN (de izquierda a derecha en B: clon 120507, 120526 y 120612). Se muestran histogramas representativos en (A) y en (B) la media ± DS de 3 experimentos independientes (*p < 0,01). En (C) y (D), el ensayo fue realizado usando catalasa-biotinilada (200 µg/ml) estresada en presencia de CLU (100 µg/ml), previamente tratada o no con α-1-3,4 fucosidasa (1 mg/ml) o con α-1-2 fucosidasa (1 mg/ml). En (C) se muestran histogramas representativos (n = 3) y en (D) la media ± DS de tres experimentos independientes (*p<0,01). **(E y F)** Catalasa-biotinilada (200 µg/ml) fue incubada en ausencia (Control) o presencia de CLU (100 µg/ml) o clusterina del suero (suero-CLU) (100 µg/ml) durante 20 min a 60°C. La unión de catalasa a CDs fue analizada incubando las células con los complejos estresados durante 60 min a 4°C. Luego, las células fueron lavadas y analizadas por citometría de flujo usando estreptavidina-FITC. En (E) se muestran histogramas representativos (n=3) y en (F) la media ± DS de tres experimentos independientes (*p<0,01).

4.3. La clusterina fucosilada induce la endocitosis de proteínas estresadas por células dendríticas

Teniendo en cuenta que DC-SIGN es un receptor endocítico^{67,76,146}, decidimos analizar si las proteínas estresadas unidas a clusterina son internalizadas por las CDs. En primer lugar, estresamos catalasa-biotinilada (200 µg/ml) durante 20 min a 60°C en presencia de clusterina fucosilada (100 µg/ml). Incubamos las proteínas estresadas con CDs durante 60 min a 4°C. Luego de este período, las células fueron lavadas y teñidas con estreptavidina conjugada a FITC. Estos pasos fueron realizados a 4°C. Posteriormente las CDs fueron incubadas por un período adicional de 30 minutos a 37°C para permitir la endocitosis o mantenidas a 4°C para impedir este proceso. Finalmente, la endocitosis de los complejos estresados por las CDs fue evaluada por citometría de flujo. Para poder diferenciar los complejos internalizados por las CDs de los que quedan unidos en el exterior de la membrana plasmática aprovechamos la capacidad del colorante azul tripán de enmascarar la fluorescencia de membrana¹⁴⁷ agregándolo en una dilución 1/3 antes de analizar cada muestra por citometría de flujo. De esta manera se enmascara solo la fluorescencia que se encuentra en el exterior de las células, mientras que la fluorescencia que se encuentra en el interior de las mismas es detectada. Cuando las células fueron incubadas a 4°C luego del proceso de unión de los complejos estresados en presencia de clusterina fucosilada, la catalasa no fue internalizada y en consecuencia el colorante azul tripán enmascaró casi completamente la fluorescencia de las células (**Figura 12A**). En cambio, cuando las células fueron incubadas a 37°C el colorante solo enmascaró levemente la fluorescencia de las células, indicando que la mayor parte de la catalasa fue internalizada (**Figura 12B**).

Posteriormente llevamos adelante estudios por microscopía confocal para visualizar la endocitosis de catalasa estresada en presencia de clusterina fucosilada. Realizamos el ensayo descrito anteriormente utilizando CDs adheridas sobre vidrios para microscopía. Las CDs fueron adheridas a lamelas previamente tratadas con poli-

L-lisina como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Catalasa biotinilada fue estresada por 20 min a 60°C en presencia de clusterina fucosilada y luego incubada durante 60 min a 4°C con las CDs adheridas, las células fueron lavadas y teñidas con estreptavidina-Alexa647. Finalmente, las células en las lamelas fueron incubadas durante 15 min a 37°C para permitir el proceso de endocitosis, fijadas y teñidas con anticuerpos anti-clusterina. Se analizó la localización conjunta de clusterina fucosilada y catalasa en las CDs por microscopía confocal. Como se observa en la **Figura 12C**, catalasa y clusterina fucosilada colocalizan dentro de las CDs luego de 15 min de endocitosis. De esta manera pudimos concluir que la clusterina fucosilada induce la endocitosis de proteínas estresadas por CDs.

Luego analizamos los compartimentos a los cuales las proteínas estresadas son dirigidas dentro la CD. Realizando el mismo ensayo de endocitosis descrito anteriormente, estudiamos los compartimentos que contienen los complejos de catalasa y clusterina a diferentes tiempos de internalización. En primer lugar confirmamos, como era esperado, la localización conjunta de catalasa-biotinilada con el receptor DC-SIGN (**Figura 13**). Esta localización conjunta se observa a tiempos tempranos de endocitosis (15 min) pero no a tiempos tardíos (30 min).

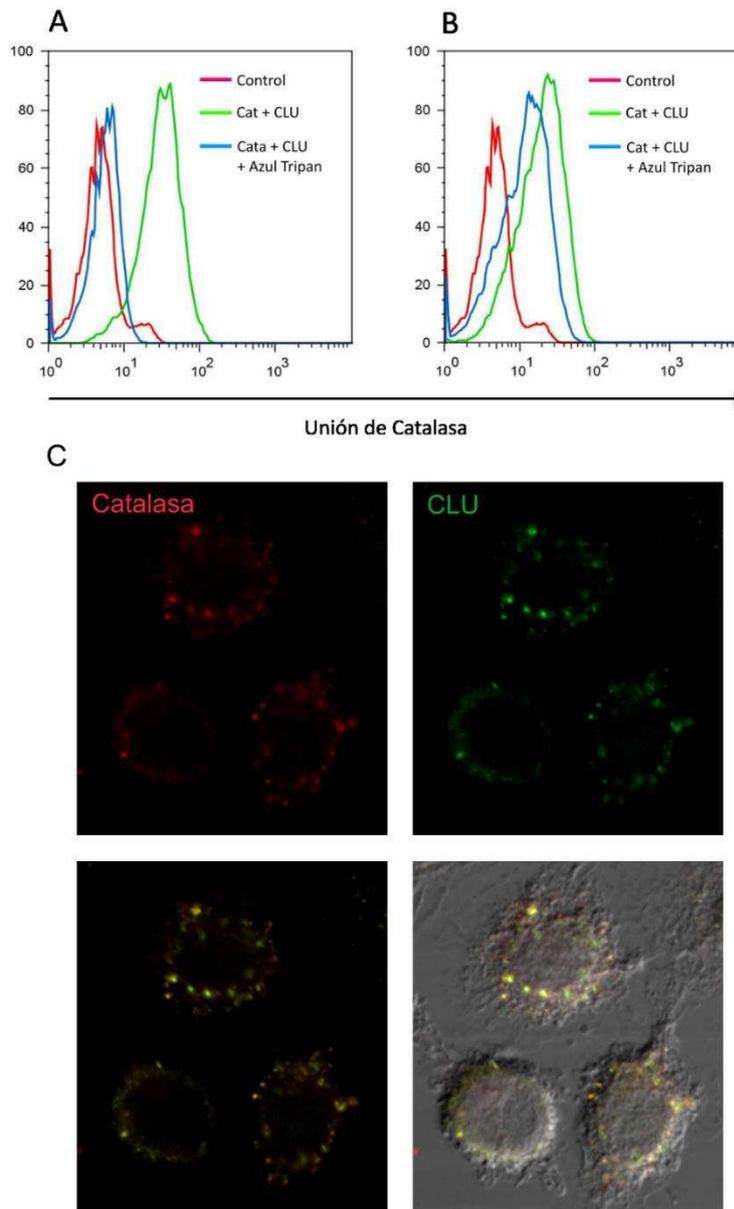


Figura 12 | Endocitosis de proteínas estresadas y clusterina por CD45. Catalasa-biotinilada (200 $\mu\text{g/ml}$) fue incubada durante 20 min a 60°C con clusterina fucosilada del plasma seminal (CLU) (100 $\mu\text{g/ml}$). Luego, esta solución fue enfriada e incubada con CD45 durante 60 min a 4°C. Las células fueron lavadas y teñidas usando estreptavidina-FITC. Luego de lavarlas, las células fueron incubadas por un período adicional de 30 min a 4°C **(A)** (para prevenir la endocitosis) o a 37°C **(B)** (para permitir la endocitosis). Finalmente, las células fueron analizadas por citometría de flujo en presencia o ausencia del colorante azul tripan, que enmascara la fluorescencia de membrana. Se muestran histogramas representativos (n=3). En **(C)**, la endocitosis de catalasa estresada por las CD45 inducida por CLU fue analizada por microscopía confocal. Catalasa-biotinilada (200 $\mu\text{g/ml}$) fue estresada durante 20 min a 60°C en presencia de CLU (100 $\mu\text{g/ml}$). La catalasa estresada fue incubada con CD45, previamente adheridas a cubreobjetos de vidrio, durante 60 min a 4°C. Luego de lavarlas, las células fueron tratadas con estreptavidina-Alexa647 durante 30 min a 4°C. Finalmente, las células fueron lavadas, incubadas por 15 min a 37°C para permitir la endocitosis, fijadas y teñidas usando anticuerpos anti-CLU. La localización conjunta de catalasa y CLU fue analizada por microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas en una magnificación de 300 x (n=5).

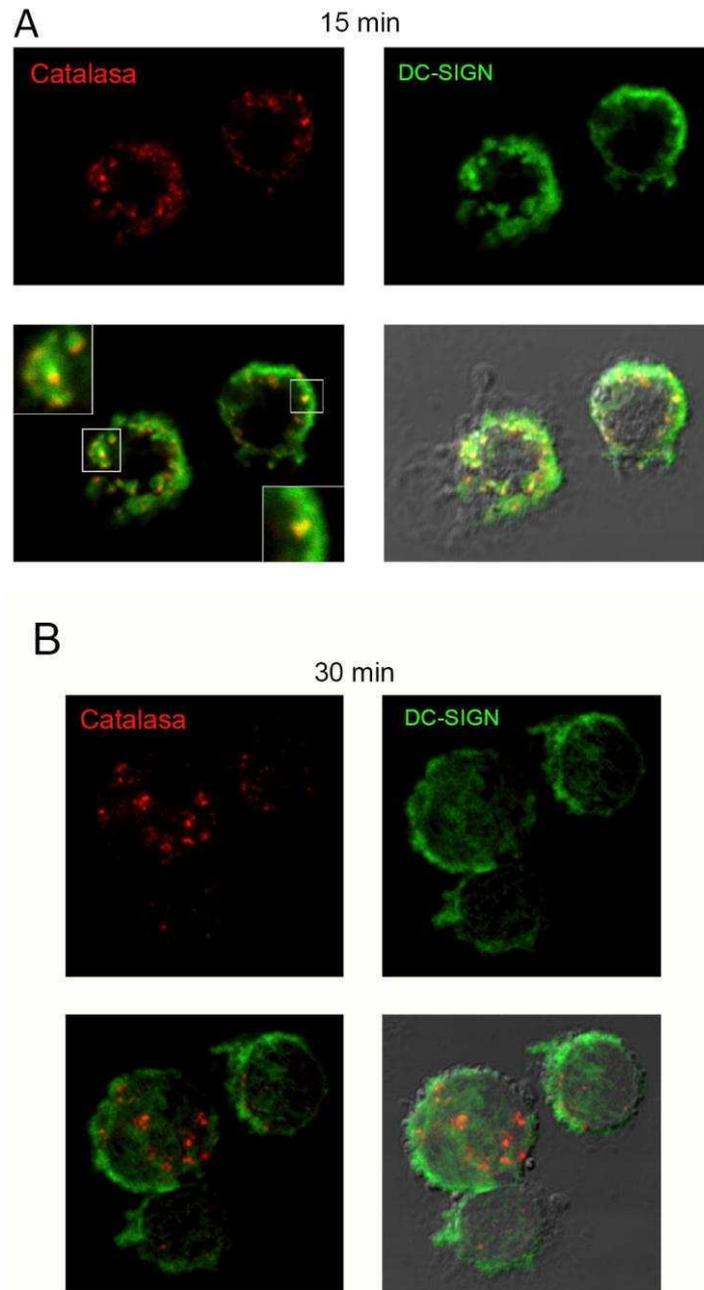


Figura 13 | La clusterina fucosilada induce la endocitosis de catalasa a compartimentos positivos para DC-SIGN. Catalasa-biotinilada (200 $\mu\text{g/ml}$) fue estresada durante 20 min a 60°C con clusterina fucosilada del plasma seminal (CLU) (100 $\mu\text{g/ml}$). Los complejos estresados fueron luego incubados durante 60 min a 4°C con CDs, lavados y teñidos con estreptavidina-FITC. Luego de este período, las células fueron incubadas a 37°C durante 5 min (**A**) o 30 min (**B**) para permitir la endocitosis, fijadas y teñidas usando anticuerpos dirigidos contra DC-SIGN y anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos. La localización conjunta de catalasa biotinilada con DC-SIGN fue analizada por microscopia confocal. Se muestran imágenes representativas en una magnificación de 300x ($n=3$).

Posteriormente analizamos la expresión de marcadores de endosomas tempranos y tardíos, EEA1 y Lamp-1 respectivamente, en las CDs que endocitaron

clusterina y catalasa. La localización conjunta de catalasa con EEA1 fue observada a los 15 minutos de endocitosis y con Lamp-1 a los 30 minutos de endocitosis (**Figura 14A y B**). Estos resultados sugieren que la catalasa, estresada en presencia de clusterina fucosilada, sigue una vía clásica de endocitosis, encontrándose primero en endosomas tempranos y siendo luego llevada a endosomas tardíos para su degradación.

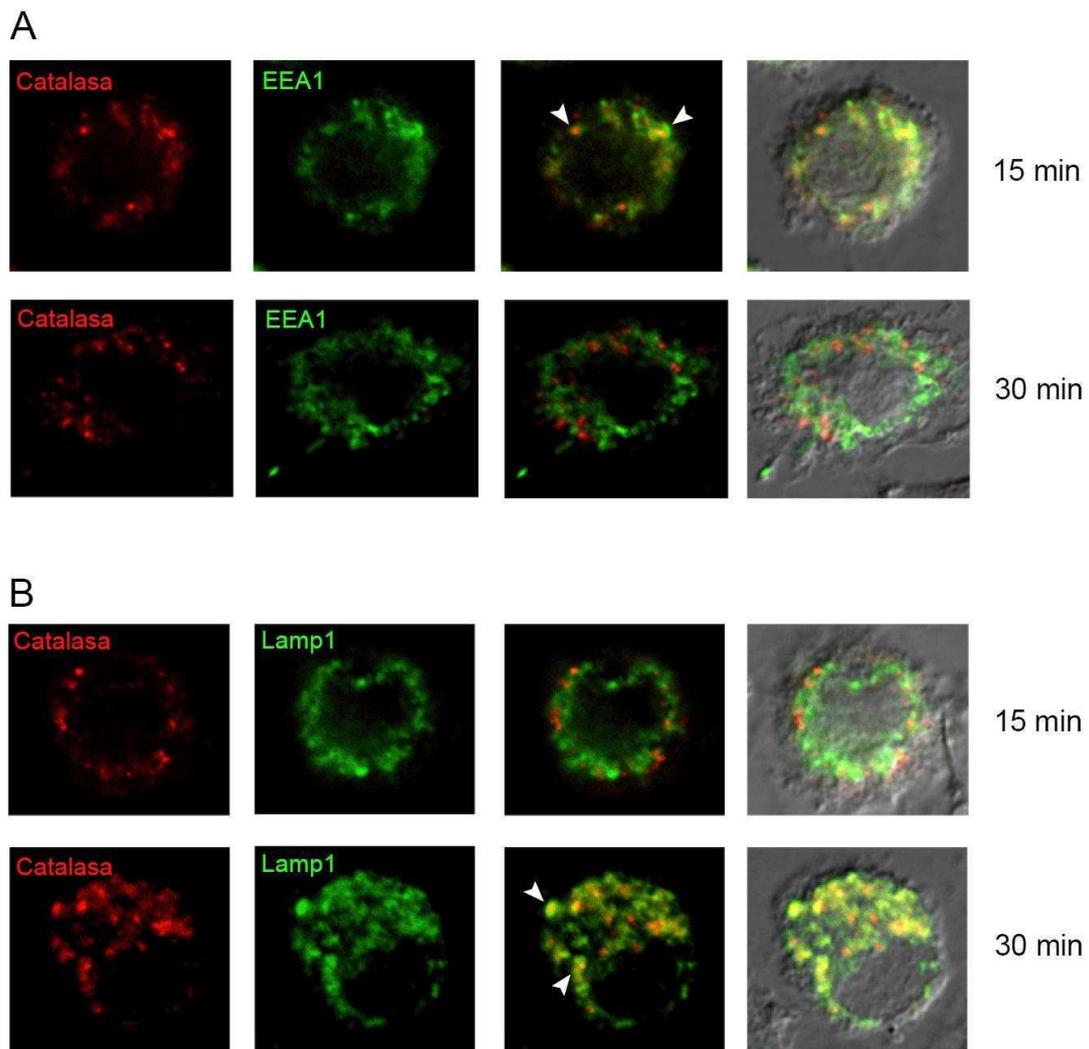


Figura 14 | Análisis de la endocitosis. Catalasa-biotinilada (200 $\mu\text{g/ml}$) fue incubada durante 20 min a 60°C con clusterina fucosilada del plasma seminal (100 $\mu\text{g/ml}$). Los complejos proteicos estresados fueron luego incubados durante 60 min a 4°C con CDs, lavados y teñidos con estreptavidina-FITC. Luego de este período, las células fueron incubadas a 37°C durante 15 min (A y B, panel superior) o 30 min (A y B panel inferior), fijadas y teñidas usando anticuerpos dirigidos contra EEA-1 (**A**) o Lamp-1 (**B**). La localización conjunta de catalasa biotinilada con los diferentes marcadores endosomales fue analizada por microscopía confocal. Se muestran imágenes representativas en una magnificación de 300 x (n = 3).

4.4. La clusterina fucosilada promueve la expansión de células T CD4+FOXP3+CD25+ inducida por CDs

Considerando observaciones previas que indican que la señalización mediada por DC-SIGN, luego del reconocimiento de motivos fucosilados, promueve la diferenciación de CDs en un perfil tolerogénico^{84,148-154}, analizamos si además de inducir la endocitosis de proteínas estresadas, la clusterina fucosilada podría también ser capaz de modular el fenotipo y función de las CDs. En primer lugar, evaluamos la habilidad de la clusterina fucosilada de modular la maduración de CDs inducida por el lipopolisacárido (LPS). Las CDs (1×10^6 /ml) fueron cultivadas durante 24 horas en presencia o ausencia de LPS (10 ng/ml) y clusterina (40 µg/ml). El fenotipo de las CDs fue analizado por citometría de flujo. La **Figura 15** muestra que la clusterina del plasma seminal no modifica la expresión de HLA-DR, CD83, CD80, CD86, CD40 y DC-SIGN tanto en CDs tratadas o no con LPS. Por lo tanto, concluimos en que la clusterina fucosilada no induce la maduración fenotípica de las células dendríticas y tampoco modula la maduración fenotípica inducida por el LPS.

Las células dendríticas son las encargadas de iniciar la respuesta inmune adaptativa interactuando con los linfocitos T vírgenes y diferenciándolos en diferentes perfiles. Considerando datos descriptos previamente en la literatura, que la señalización por DC-SIGN promueve la diferenciación de las CDs en un perfil tolerogénico^{62,82} nos preguntamos si sería capaz de modificar la función de las CDs modulando la expansión de células T regulatorias (células T CD4+FOXP3+CD25+). Para esto, las CDs fueron incubadas con LPS (10 ng/ml) en presencia o ausencia de clusterina fucosilada (40 µg/ml) durante 24 horas, lavadas y co-cultivadas con células T CD4+ alogénicas durante 5 días. Finalmente, la presencia de linfocitos T CD4+CD25+FOXP3+ fue analizada por citometría de flujo. Como se muestra en la **Figura 16**, la clusterina fucosilada estimula la expansión de linfocitos T CD4+CD25+FOXP3+ en el cocultivo alogeneico (n=4, p<0.05). Estos resultados sugieren que la clusterina fucosilada

estimula la expansión de células T CD4+FOXP3+CD25+ por las CD.

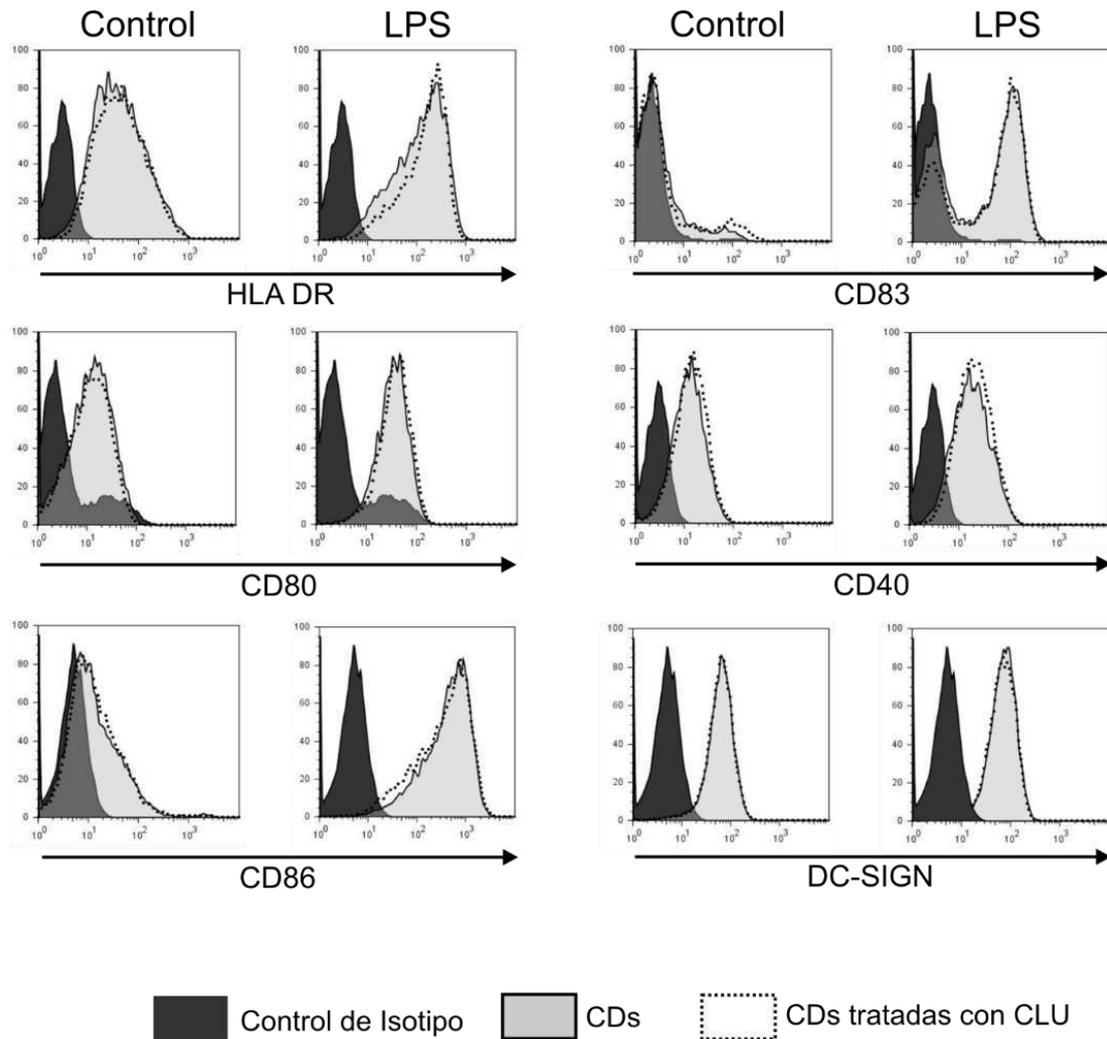


Figura 15 | La clusterina fucosilada no modula la maduración fenotípica de las células dendríticas. CDs (1×10^6 /ml) fueron cultivadas durante 24 h en ausencia (histogramas grises) o presencia de clusterina fucosilada del plasma seminal (CLU) ($40 \mu\text{g/ml}$) (histogramas de línea punteada), con o sin LPS (10 ng/ml). La expresión de HLA-DR, CD80, CD86, CD83, CD40 y DC-SIGN fue analizada por citometría de flujo. Los histogramas negros representan los controles de isotipo. Se muestran histogramas representativos ($n=5$).

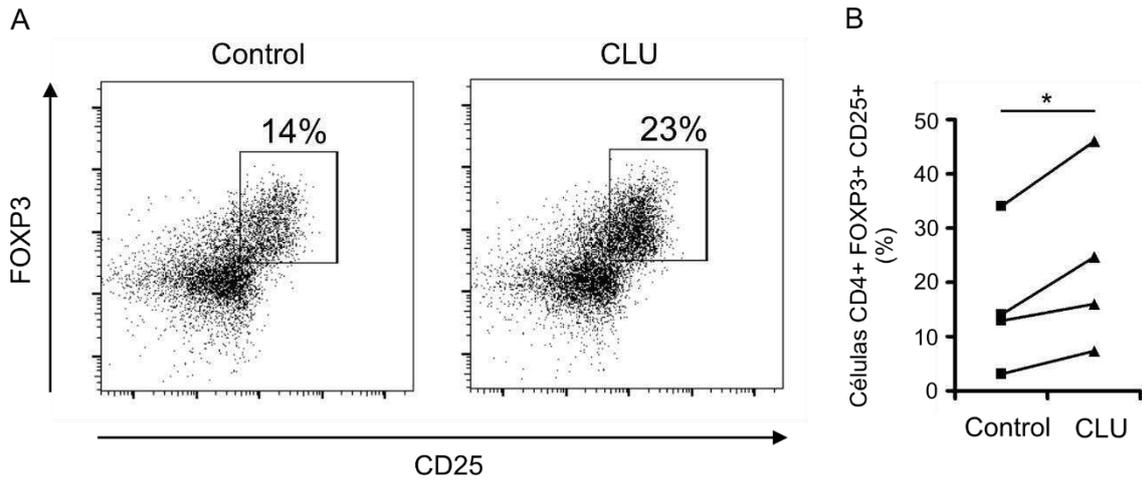


Figura 16 | La clusterina fucosilada estimula la habilidad de las CD4 de expandir células T CD4+CD25+FOXP3+. CD4 (5 x 10⁴/100 μ l) fueron incubadas con LPS (10 ng/ml) en presencia o ausencia de clusterina fucosilada del plasma seminal (CLU) (40 μ g/ml) durante 24 h, lavadas y cultivadas con células T alogeneicas (relación CD:célulasT = 1:4), como se describe en la sección de materiales métodos. Luego de 5 días el porcentaje de células T CD4+CD25+FOXP3+ fue determinado por citometría de flujo. En **(A)**, se muestra un diagrama de puntos representativo. En **(B)**, se muestran los resultados de 4 experimentos independientes usando diferentes dadores de células (*=p< 0,05).

Parte II

INTRODUCCIÓN – PARTE II

5.1. INMUNIDAD Y CÁNCER: ELIMINACIÓN, EQUILIBRIO Y ESCAPE TUMORAL

En 1909 Paul Ehrlich propuso por primera vez la idea de que el sistema inmune podía protegernos frente al cáncer¹⁵⁵. Posteriormente Burnet y Thomas propusieron la hipótesis de la inmunovigilancia, de acuerdo a la cual, el sistema inmunitario sería capaz de detectar y eliminar células transformadas antes de que el tumor pueda crecer lo suficiente y evidenciarse clínicamente^{156,157}. Décadas luego de los pioneros experimentos de Ehrlich, nuevas herramientas permitieron generar numerosas evidencias experimentales y clínicas que demostraron la importancia del sistema inmune para prevenir y limitar el crecimiento neoplásico¹⁵⁸.

Actualmente sabemos que el sistema inmune establece un diálogo dinámico con el tumor, en el cual la presión ejercida por la inmunidad puede seleccionar células tumorales poco inmunogénicas, capaces de evadir la respuesta inmune. Esta interacción dinámica entre sistema inmune y tumor constituye el fundamento de la teoría de la “inmunoedición”. La teoría de la “inmunoedición” propone tres fases en la interacción sistema inmune – tumor: la fase de “eliminación”, durante la cual el sistema inmune reconoce y destruye células tumorales; la fase de “equilibrio”, durante la cual el sistema inmune ejerce su presión de selección sobre la población de células tumorales; y finalmente la fase de “escape” en la cual las variantes tumorales capaces de escapar eficientemente a la respuesta inmune emergen y continúan su crecimiento en presencia de un sistema inmune incapaz de eliminarlas¹⁵⁹ (**Figura 17**).

De acuerdo a la teoría de la inmunoedición, cuando los tumores se hacen clínicamente evidentes ya han superado las fases de eliminación y equilibrio, y han logrado desarrollar una serie de mecanismos que le permiten evadir con eficiencia la respuesta inmune. En esta etapa es posible detectar linfocitos T específicos contra

antígenos tumorales. Sin embargo, estos linfocitos T se encuentran en un estado de anergia, y son incapaces de eliminar las células neoplásicas^{160,161}. Estudios recientes han permitido observar que una fracción importante de los linfocitos T específicos contra antígenos tumorales poseen un fenotipo regulador y secretan citoquinas inmunomoduladoras capaces de inhibir la respuesta inmune¹⁵⁸.

Numerosos trabajos se han abocado al análisis de los mecanismos a través de los cuales las células tumorales logran modular la actividad de los linfocitos T a fin de evadir la respuesta inmune. En este sentido, se ha demostrado que los tumores modulan la activación de linfocitos T actuando sobre las CD, células encargadas de la activación de los linfocitos T vírgenes en los ganglios linfáticos^{158,162}. Las CD expresan la capacidad no sólo de activar linfocitos T vírgenes, sino también de imponerles un particular perfil de activación, e incluso de generar anergia clonal. La actividad pro-inflamatoria o tolerogénica de las CD se encuentra determinada principalmente por la influencia que generan sobre éstas diferentes estímulos provenientes del microambiente donde endocitan los antígenos, en este caso el microambiente tumoral. Diferentes compuestos producidos por tumores, tales como el VEGF, IL-10, PGE2, y la galectina-1, son capaces de comprometer la capacidad inmunoestimuladora de las células dendríticas, promoviendo el escape tumoral^{51,55,158}.

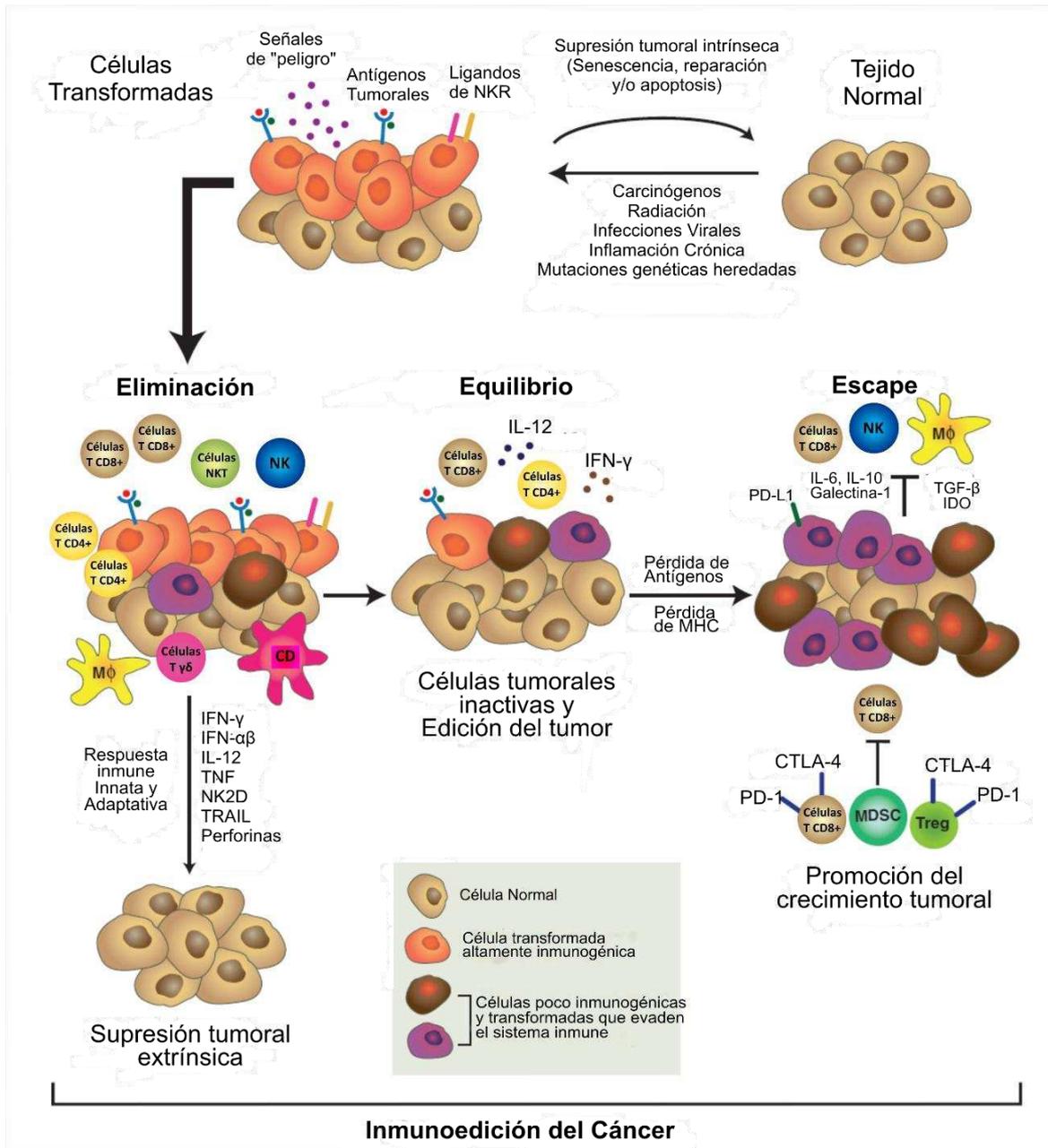


Figura 17 | Inmunoedición en cáncer. La inmunoedición del cáncer consiste en tres fases secuenciales: eliminación, equilibrio y escape. En la fase de **eliminación** la respuesta inmune innata y adaptativa trabajan en conjunto para eliminar tumores en desarrollo antes de que sean clínicamente evidentes. Si esta fase se completa, el hospedador permanece libre de cáncer y la fase de eliminación representa entonces todo el proceso de inmunoedición en su extensión. Si alguna variante tumoral no es eliminada en esta primera etapa, comienza la fase de **equilibrio**, en donde el crecimiento es prevenido por mecanismos inmunogénicos que dependen únicamente de la inmunidad adaptativa. Es en esta etapa se produce la edición de la inmunogenicidad del tumor y puede prolongarse hasta por toda la vida del hospedador. Como consecuencia de la presión de selección inmune en esta fase, pueden aparecer variantes que (i) ya no son reconocidas por la respuesta inmune adaptativa por la pérdida de antígenos, (ii) se convierten insensibles a los mecanismos inmunes efectores, o (iii) inducen un microambiente inmunosupresor. Estas variantes tumorales entran en la fase de **escape** donde su crecimiento ya no es bloqueado por el sistema inmune, causando finalmente el cáncer como enfermedad clínicamente evidente. (Adaptado de Schreiber¹⁶³).

5.2. EL CÁNCER DE MAMA:

El cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común en el mundo y el más frecuente entre mujeres, con un número estimado de 1,67 millones de nuevos diagnósticos en el 2012 (correspondientes al 25% de todos los tipos de tumores) (<http://globocan.iarc.fr/>). En la Argentina, el cáncer de mama es el de mayor incidencia y mortalidad en mujeres, con una tasa de 71 casos por cada 100.000 mujeres (<http://www.msal.gob.ar>).

Los tumores de mama invasivos constituyen un grupo heterogéneo de lesiones que difieren tanto en su comportamiento biológico, como en sus características patológicas y su presentación clínica. Existen una serie de **marcadores pronósticos**, los cuales brindan información sobre la evolución clínica que tendrá el paciente (sobrevida global, supervivencia libre de enfermedad, etc.), independientemente del tratamiento dado. Dentro de éstos marcadores se encuentran: (i) el **tamaño tumoral**^{164,165}; (ii) el **estado de los ganglios linfáticos**^{166,167}; (iii) el **grado histológico**, que representa el grado de pérdida de diferenciación celular del tumor y correlaciona con mayor agresividad^{168,169}; (iv) la expresión de **receptores hormonales** de estrógenos y progesterona, debido a que correlacionan con una mayor supervivencia libre de enfermedad^{170,171}; (v) el **índice de proliferación**, medido por marcación inmunohistoquímica de la molécula Ki67¹⁷²; (vi) la **sobre-expresión de HER-2**, correspondiente a un protooncogen que codifica una proteína de membrana que tiene función de receptor de factores de crecimiento y representa un factor de riesgo de recurrencia de la enfermedad^{173,174}; y (vii) la **edad del paciente**, debido a que las observaciones indican que pacientes con CM jóvenes (35 años o menos) tienen peor pronóstico que pacientes mayores, tendiendo a ser de mayor grado, con menor frecuencia de receptores hormonales positivos y mayor probabilidad de tener invasión de ganglios linfáticos^{175,176}.

Históricamente, los tumores se han clasificado sobre la base de dos criterios: su localización (lugar de ocurrencia) y su apariencia (histología). Estos criterios también se utilizan actualmente como determinantes primarios de pronóstico y para establecer los mejores tratamientos. En las últimas décadas, el término “*perfiles de expresión génica*” se ha introducido en la literatura clínica dado que comenzó a ser posible evaluar la expresión de múltiples genes en una muestra tumoral reflejando, por ejemplo, la expresión de diferentes genes junto con las alteraciones en el ADN y así predecir el comportamiento del tumor.

Los destacados trabajos de los grupos de los Dres. Perou y Sorlie fueron los primeros en clasificar subtipos de cáncer de mama sobre la base de patrones de expresión génica utilizando un análisis de agrupamiento jerárquico que denominaron “*retratos moleculares*” del cáncer de mama^{177,178}. Entre las categorías que definieron se encuentran los tipos de tumores **luminal A y B** (típicamente de RH positivos), tumores **gen HER-2-amplificado**, y una clase recientemente reconocida denominada **tipo-basal** debido a la expresión de citoqueratinas (CK) basales, también conocida como **triple negativa**, ya que la mayor parte de los casos no expresan receptores hormonales ni HER2. La definición exacta de los subtipos moleculares es un área de debate activo, sin embargo, está claro que estos subtipos son reproducibles en varios conjuntos de datos no relacionados, validándose su impacto pronóstico en estos entornos¹⁷⁹.

Si bien la clasificación molecular implica el estudio de la expresión de numerosos genes, con el uso de marcadores tumorales de rutina se puede hacer una aproximación y ubicar a los tumores en los diversos subtipos moleculares mediante inmunohistoquímica (**Figura 18**). En esta tesis utilizamos muestras de tumores de tipo Luminal A, el grupo más frecuente de estos tumores.

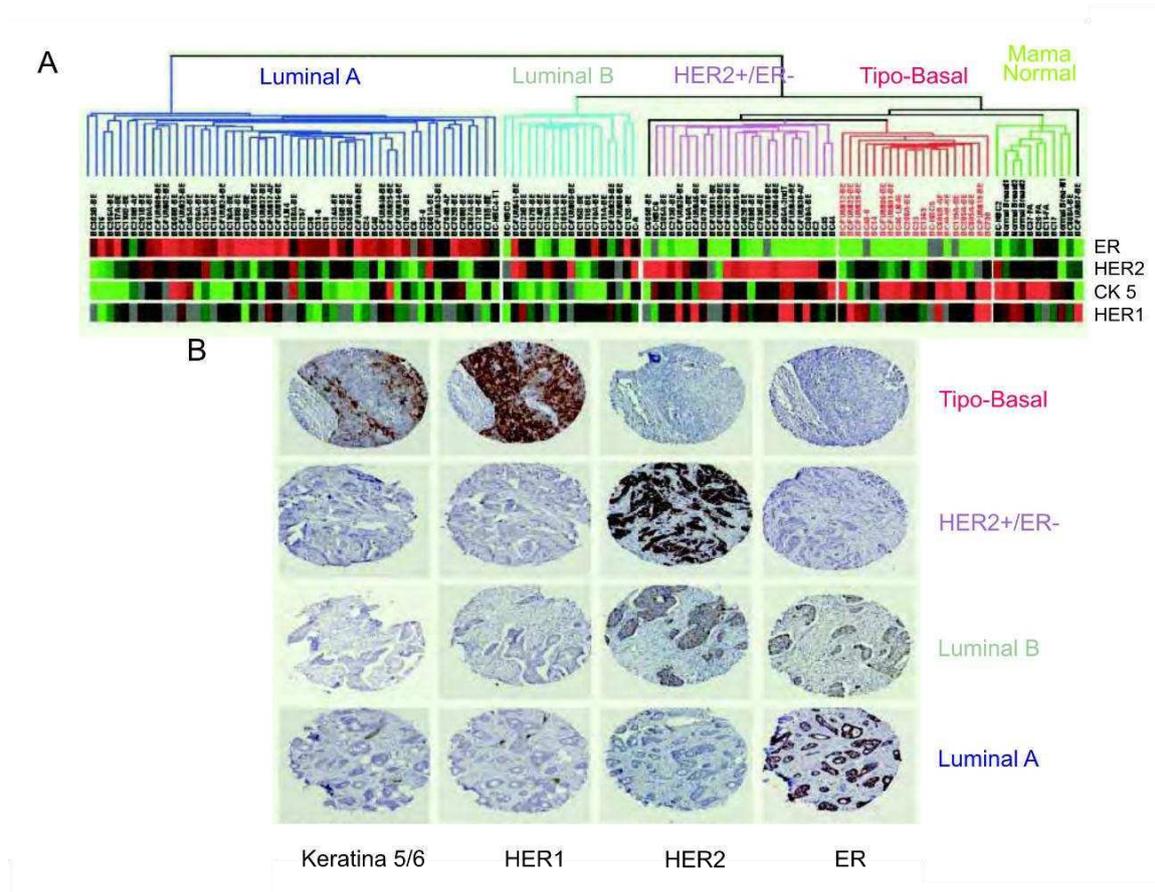


Figura 18 | Perfil de marcadores que permite distinguir entre los distintos subtipos moleculares de cáncer de mama. (A) Dendrograma del agrupamiento jerárquico codificado con color por subtipo de cáncer de mama donde se muestran los 4 genes/proteínas utilizados en la clasificación inmunohistoquímica. **(B)** Microarreglo de tejidos donde se muestran imágenes de inmunohistoquímica representativas de los distintos subtipos. (Adaptado de Schneider¹⁸⁰).

5.3. LA CLUSTERINA Y CÁNCER: SU RELACIÓN CON EL CÁNCER DE MAMA

La síntesis de clusterina se encuentra alterada en numerosos tipos de cáncer en humanos, como el cáncer de próstata, mama, pulmón, colon, melanoma, hígado y vejiga entre otros^{6,181-184}. Más aun, se ha demostrado que la producción de clusterina en su forma citoplasmática y/o secretoria, se encuentra incrementada en estadios avanzados de diferentes tipos de cáncer incluyendo próstata, riñón, vejiga, mama, ovario, colon, pancreático, hepatocarcinomas, melanoma y linfomas, en donde parece jugar un papel en la progresión del crecimiento tumoral y la generación de metástasis¹⁸⁵⁻¹⁹². Por otro

lado, se ha demostrado que la expresión de clusterina está relacionada con la resistencia a drogas quimioterapéuticas como el docetaxel, doxorubicina, cisplatino, etoposido y campotecina^{16,193}. En particular, en cáncer de próstata se ha reportado una relación entre la sobreexpresión de clusterina y la resistencia al tratamiento por ablación de andrógenos^{22,194}, radioterapia y quimioterapia¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. En cáncer de mama, se ha demostrado que la clusterina es una molécula clave en la inducción de resistencia hacia terapias adyuvantes y su sobreexpresión ha sido asociada con la resistencia a trastuzumab o paclitaxel¹⁹⁸⁻²⁰⁰.

La expresión de clusterina ha sido estudiada *in-vitro* e *in-vivo* en el cáncer de mama con el objetivo de identificar nuevos marcadores pronósticos en la recurrencia del cáncer y en el desarrollo de nuevas terapias. Llamativamente, la sobreexpresión de clusterina en cáncer de mama ha sido asociada con marcadores de agresividad, como la ausencia de receptores hormonales^{187,199}. Numerosos estudios histopatológicos de biopsias humanas han descrito la presencia de clusterina en tumores de mama por inmunohistoquímica, asociándose la expresión de clusterina con la tumorigénesis y progresión tumoral^{199,201,202}. Además, se demostró que la clusterina está expresada en el epitelio maligno mamario desde estadios tempranos hasta tardíos. En el estudio de una cohorte de cáncer de mama, por ejemplo, solo el 19% de las lesiones benignas presentaron una tinción positiva para clusterina. En cambio, la frecuencia de muestras clusterina-positivas incrementó en hiperplasias atípicas (47%), carcinomas intraductales (49%), y carcinomas invasivos (53%)¹⁸⁷. Por otro lado, ha sido reportada una menor supervivencia en pacientes con alta expresión de clusterina en biopsias de cáncer de mama, en comparación con aquellos con expresión de clusterina no detectable^{201,202}. En suero, la clusterina se encontró significativamente más elevada en pacientes con cáncer de mama que en pacientes sanos²⁰³. Flanagan y colaboradores han reportado que la línea celular MCF7, derivada de un carcinoma mamario de tipo Luminal A, adquieren una mayor capacidad proliferativa y de generar metástasis cuando se sobreexpresa

clusterina²⁰⁴.

Teniendo en cuenta que la forma nuclear de clusterina tiene funciones pro-apoptóticas y la forma citoplasmática anti-apoptóticas, se ha propuesto que durante la progresión tumoral ocurre una relocalización de la clusterina desde el núcleo hacia el citoplasma. Recientemente, Zhou y colaboradores han descrito un mecanismo por el cual la clusterina citoplasmática estaría involucrada en la generación de resistencia hacia drogas quimioterapéuticas²⁰⁵. En particular, demostraron que la proteína nuclear HMGB1, liberada durante la apoptosis generada por tratamiento de células de cáncer de próstata con docetaxel, actúa como un DAMP activando el sistema inmune²⁰⁶⁻²¹². HMGB1 es un ligando de TLR4 que no solo se expresa en células inmunes, sino que también puede expresarse en células tumorales, y la unión a este receptor induce la expresión de clusterina citoplasmática que finalmente inhibe la apoptosis celular, promoviendo la sobrevida y la resistencia hacia el tratamiento quimioterapéutico²⁰⁵.

Es interesante destacar que la inhibición de la actividad anti-apoptótica de la clusterina ha sido la base de ensayos clínicos actualmente en fase I y II, dirigidos al tratamiento de tumores de próstata, pulmón, colon y mama²¹³. Estos ensayos se basan en la utilización de un ARN antisentido dirigido contra clusterina denominado OGX-011. El mismo presentó propiedades farmacocinéticas favorables y actividad biológica clínicamente demostrable cuando fue combinado con dosis estándares de docetaxel en pacientes con cáncer de próstata, pulmón y mama²¹⁴. Luego, en un ensayo en fase II, aunque se observó actividad clínica en pacientes con cáncer de mama metastático, las respuestas no alcanzaron el criterio necesario para continuar con una segunda etapa del estudio²¹⁵.

A pesar de estas numerosas evidencias en relación a la expresión de clusterina en el cáncer de mama, la comprensión del rol de la clusterina en la carcinogénesis, la progresión tumoral y la generación de metástasis, así también como su asociación a

una mayor agresividad tumoral y peor pronóstico, no resulta claro aún. Se considera que tanto la forma citoplasmática como secretoria juegan un rol en promover la tumorigenesis y progresión del cáncer de mama, aunque su utilidad clínica como un factor pronóstico de sobrevida aún debe ser confirmado. La presencia de muchas formas de la proteína con funciones opuestas y diversas constituye un obstáculo para definir mejor la utilidad de la clusterina como un biomarcador o un blanco posible para el cáncer de mama.

HIPÓTESIS II

La clusterina producida por tumores de mama, en forma similar a los que ocurre con la clusterina del plasma seminal, expresa un patrón de glicosilación rico en motivos fucosilados que le permite interactuar con las CDs a través de DC-SIGN.

En este sentido es necesario destacar que:

Si bien la clusterina se expresa en alta frecuencia en diferentes tipos de tumores, su actividad biológica ha sido pobremente caracterizada y no hay trabajos que estudien el rol de la clusterina en el espacio extracelular o como afecta el microambiente tumoral. Más aun, el patrón de glicosilación de la clusterina secretada por células tumorales no ha sido estudiado. Teniendo en cuenta las observaciones en tumores donde se incrementa la expresión de antígenos fucosilados de tipo Lewis X y Lewis Y, cabe suponer que la clusterina secretada por los tumores cambia también su patrón de glicosilación, pudiendo adquirir uno similar al expresado por la clusterina del plasma seminal que le permita interactuar con DC-SIGN en CDs inhibiendo la respuesta inmune montada contra antígenos tumorales. Más aun, hemos demostrado que la capacidad de unirse a DC-SIGN de la clusterina del plasma seminal no es compartida por su contraparte sérica, resultados que demuestran que la clusterina puede presentar diferentes patrones de glicosilación de acuerdo al tejido donde es sintetizada.

Teniendo en cuenta los resultados presentados en la primera parte de esta tesis, donde demostramos que la clusterina fucosilada presenta actividad de chaperona, promoviendo la endocitosis de proteínas estresadas por DC-SIGN²¹⁶, sumada a su capacidad de promover la expansión de células T regulatorias, es posible pensar que la clusterina tumoral también podría actuar como chaperona extracelular, uniéndose a antígenos mal plegados en el microambiente tumoral promoviendo su endocitosis por CDs DC-SIGN positivas, montando en consecuencia una respuesta tolerogénica hacia

los mismos.

OBJETIVO GENERAL II

Analizar las propiedades de la clusterina producida por tumores de mama en el humano y estudiar su posible participación en el universo de los mecanismos que permiten a los tumores evadir la respuesta inmune.

6.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar la expresión de la clusterina en tumores de mama.

- Evaluar la presencia de la clusterina en tumores de mama de tipo Luminal A por inmunohistoquímica y ELISA.

2. Analizar el patrón de glicosilación de la clusterina producida por tumores de mama

- Analizar la presencia de motivos fucosilados la clusterina aislada de muestras de tumores de mama de tipo Luminal A y de tejido sano mediante ELISA.
- Analizar la capacidad de la clusterina tumoral de unirse a DC-SIGN.

3. Analizar expresión de DC-SIGN en muestras de tumores de mama

- Analizar la presencia de células mieloides DC-SIGN positivas en muestras de cáncer de mama de tipo Luminal A.

RESULTADOS – PARTE II

7.1. Expresión de clusterina en muestras de tumores de mama

En esta segunda parte de la tesis nos propusimos estudiar las propiedades de la clusterina expresada en el cáncer de mama. Con ese fin, utilizamos un conjunto de muestras biológicas humanas de tumores de mama de tipo Luminal A, obtenidas luego de la resección quirúrgica realizada como parte del tratamiento de dicha enfermedad. La cohorte de pacientes fue reclutada en el Hospital Marie Curie de París, Francia, teniendo en cuenta las recomendaciones de salvaguarda ética vigentes en dicho país. Los pacientes estudiados no recibieron tratamiento quimioterápico previo a la cirugía. De cada paciente se obtuvo una muestra de tejido tumoral y, como control, una muestra de tejido no invadido obtenido de los márgenes de resección de la pieza, que llamaremos tejido yuxtatumoral.

En primer lugar, analizamos la expresión de clusterina por inmunohistoquímica en cortes histológicos de muestras de tumores de mama de tipo Luminal A conservados en tacos de parafina. La inmunomarcación, los cortes histológicos y el análisis de los mismos se realizaron en colaboración con el servicio de Patología Experimental del Hospital Marie Curie. Los cortes fueron teñidos con anticuerpos primarios anti-clusterina seguido de anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa. Los núcleos fueron teñidos con hematoxilina. En los cortes analizados observamos un patrón heterogéneo de expresión de clusterina, incluso dentro de las mismas muestras. En la **Figura 19** se muestran dos imágenes representativas de los patrones de expresión de clusterina en los tumores: en la **Figura 19 A**, la clusterina se encuentra expresada en el estroma tumoral, mientras que en la **Figura 19 B** la clusterina se encuentra expresada principalmente en el citoplasma de las células tumorales.

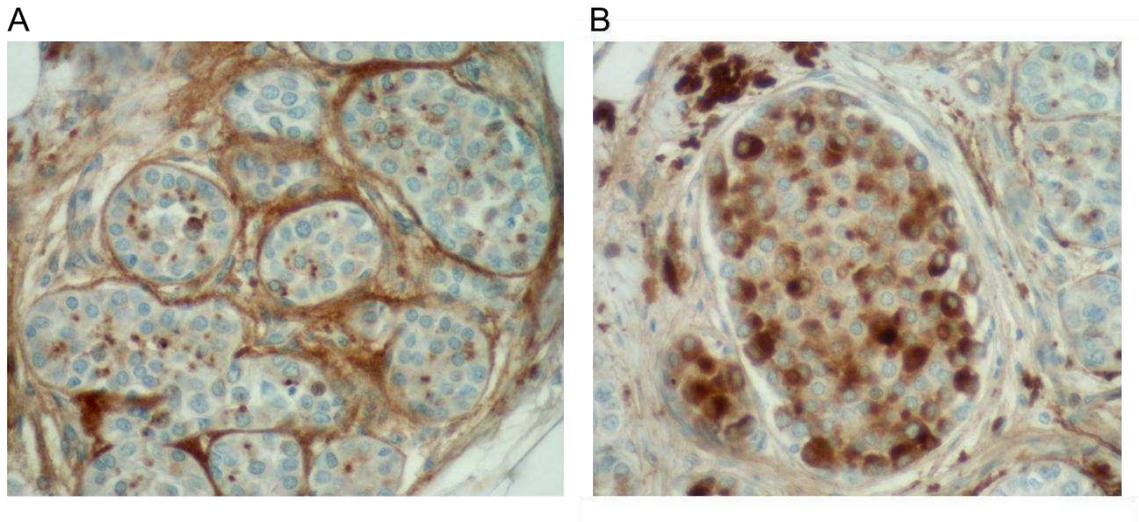


Figura 19 | Expresión de clusterina en muestras de tumores de mama de tipo Luminal A. Se analizó la expresión de clusterina por inmunohistoquímica en secciones de tejido correspondientes a muestras tumorales conservadas en bloques de parafina. La tinción se realizó como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Los cortes fueron teñidos con anticuerpos anti-CLU y luego con anticuerpos secundarios conjugados a biotina. DAB fue usado como cromógeno y se realizó tinción con hematoxilina para marcar los núcleos. En **(A)** se muestra una imagen donde la clusterina se expresa principalmente en el estroma tumoral. En **(B)** se muestra una imagen donde la clusterina se expresa principalmente en el citoplasma de las células tumorales. Las imágenes mostradas corresponden a dos sectores de una misma sección de tejido. Magnificación 40X (n = 3).

Posteriormente cuantificamos la expresión de clusterina en las muestras de tejido tumoral y yuxtatumoral, luego de procesarlas tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos, determinando la concentración de clusterina total mediante ELISA y la concentración de proteínas totales. En la **Figura 20** se muestra la cantidad de clusterina, en relación a la cantidad de proteínas totales, de cada muestra (μg de clusterina /mg de proteínas totales). No se encontraron diferencias significativas en la expresión de clusterina entre el tejido tumoral y el tejido yuxtatumoral ($p=0.3105$, $n = 21$).

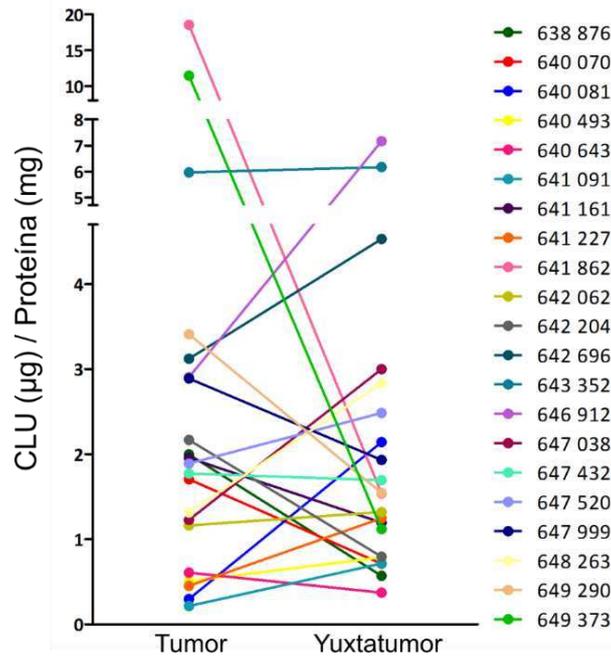


Figura 20 | Cuantificación de clusterina en muestras de tumores de mama de tipo Luminal A. La expresión de clusterina (CLU) en las muestras tumorales y yuxtatumorales se cuantificó mediante un ensayo de ELISA. La concentración de clusterina fue normalizada a la expresión de proteína total en cada muestra. No se observan diferencias significativas entre el tumor y tejido sano ($p = 0.3105$, $n = 21$).

7.2. Expresión de clusterina con motivos fucosilados en muestras de tumores de mama

En el siguiente paso evaluamos si la clusterina presente en las muestras tumorales presentaba una glicosilación con motivos fucosilados, en forma similar a lo que ocurre con la clusterina presente en el plasma seminal. Para esto desarrollamos un ensayo de ELISA, el cual se detalla en la sección de Materiales y Métodos, donde utilizamos la habilidad de la lectina *Ulex-europaeus* de unirse a residuos de fucosa terminal²¹⁷. Como control positivo y para realizar una curva de calibración utilizamos clusterina del plasma seminal y clusterina sérica como control negativo. En la **Figura 21 A** se expresa la cantidad de clusterina fucosilada, reconocida por la lectina *Ulex europaeus*, relativa a la cantidad de proteínas totales de cada muestra y en la **Figura 21 B** se muestra la cantidad de clusterina fucosilada relativa a la cantidad de clusterina

total en cada muestra. Cada muestra tumoral fue analizada en relación a su control pareado de tejido yuxtatumoral. Como se observa en la **Figura 21**, las muestras tumorales expresan mayor cantidad de clusterina fucosilada que sus controles. Este resultado se observa tanto en relación a la cantidad de proteína total ($p=0,0071$, $n=21$) como en relación a la cantidad de clusterina total ($p=0,0274$, $n=21$).

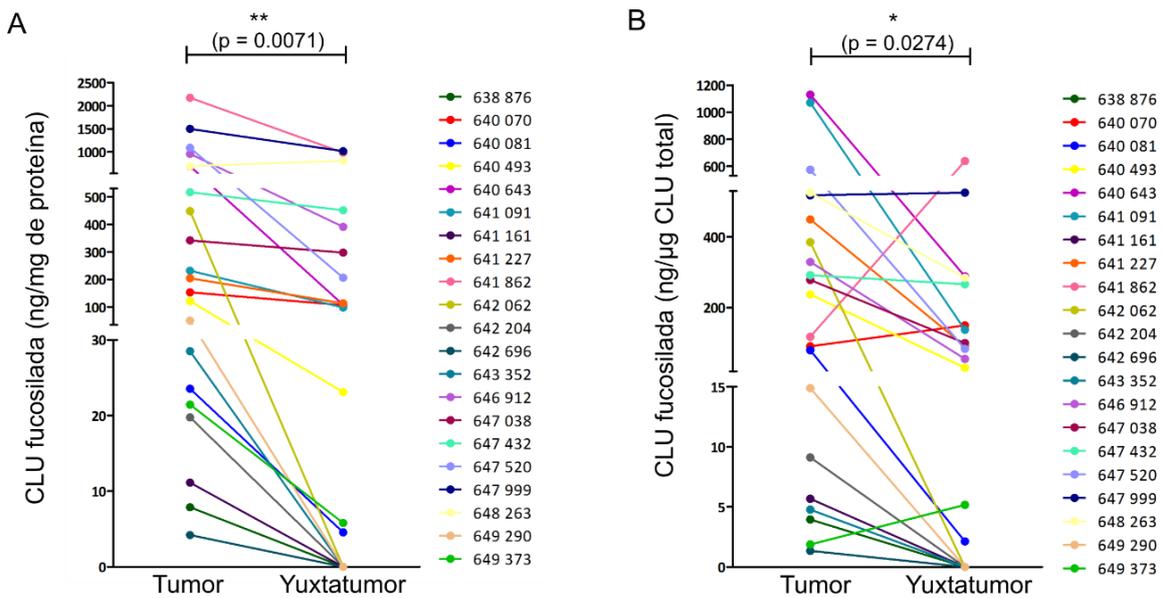


Figura 21 | Expresión de clusterina fucosilada en muestras de tumores de mama de tipo Luminal A. La expresión y cuantificación de clusterina (CLU) fucosilada en las muestras tumorales y yuxtatumorales se analizó por un ensayo de ELISA, como se describe en la sección de Materiales y Métodos, donde se utilizó la lectina *Ulex Europaeus* biotinilada que reconoce motivos terminales de fucosa. La concentración de CLU fucosilada fue normalizada en cada muestra a la expresión de proteínas totales (**A**) o a la expresión de CLU total (**B**). Se observan diferencias significativas en la expresión de CLU fucosilada en los tejidos tumorales respecto a los yuxtatumorales, tanto en relación a la cantidad de proteínas totales ($P=0,0071$ $n=21$) como en relación a la cantidad de CLU total ($P=0,0274$ $n=21$).

Luego decidimos analizar la expresión de clusterina y de motivos fucosilados en células tumorales. Con este fin, células tumorales fueron aisladas de las muestras de acuerdo a la expresión de la molécula de superficie Epcam-1, mediante separación celular por citometría de flujo^{218,219}. Estas células fueron cultivadas y teñidas con anticuerpos anti-clusterina y anticuerpos dirigidos contra el motivo fucosilado Lewis X,

fuertemente expresado por la clusterina fucosilada aislada del plasma seminal, de acuerdo a nuestros estudios de glicómica previos⁴⁵. Las células fueron analizadas mediante microscopía confocal. Como se observa en la **Figura 22**, la clusterina y los motivos fucosilados colocalizan fuertemente en el citoplasma de algunas células. Estos resultados sugieren que las células tumorales podrían ser la fuente de clusterina fucosilada presente en el microambiente tumoral.

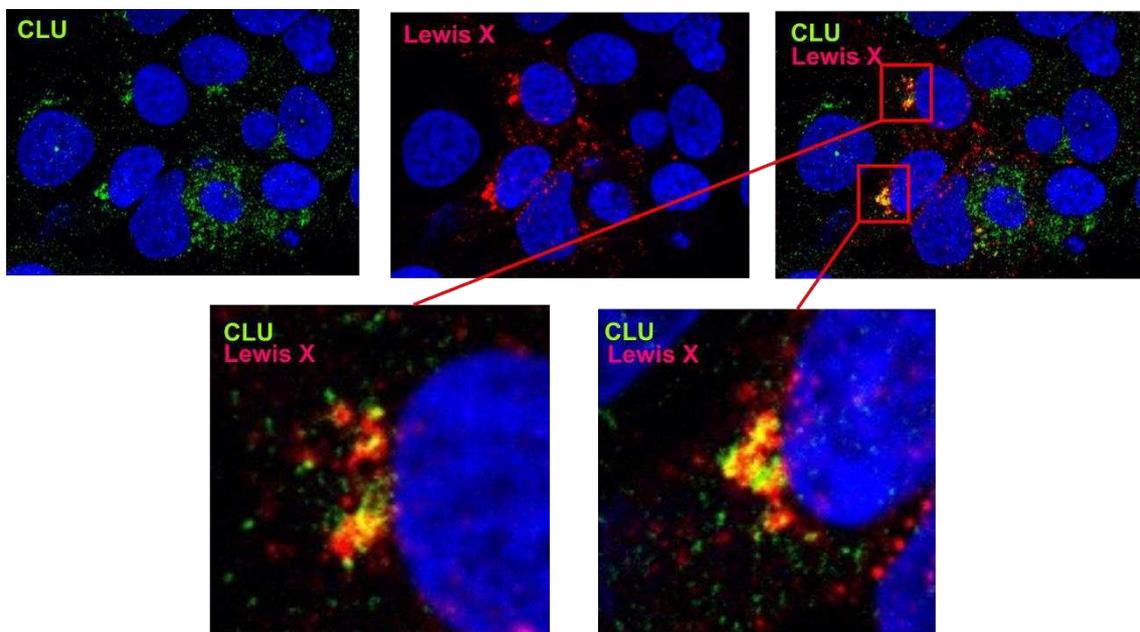


Figura 22 | Expresión de clusterina fucosilada en células derivadas de un tumor de mama de tipo Luminal A. Se evaluó por microscopía confocal la localización conjunta de clusterina (CLU) y motivos Lewis X en células tumorales aisladas de una muestra de cáncer de mama de tipo Luminal A. Las células fueron crecidas sobre portaobjetos de vidrio, fijadas y teñidas con anticuerpos primarios anti-CLU y anti-Lewis X. Luego fueron lavadas y teñidas con anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos. Los núcleos se marcaron con el colorante DAPI. Se muestra una imagen representativa. Magnificación de 60X (n=5).

7.3. La clusterina fucosilada presente en tumores de mama de tipo Luminal A se une a DC-SIGN

Evaluamos la capacidad de la clusterina presente en las muestras tumorales y sus controles de unirse a DC-SIGN mediante ensayos de western blot, utilizando a la

molécula quimérica DC-SIGN/fc, compuesta por el receptor DC-SIGN acoplado a la porción fc de la inmunoglobulina G. Tres pares de muestras, de tumor y tejido yuxtatumoral, fueron analizadas, sembrando la misma cantidad de clusterina para cada par. La membrana fue revelada en primer lugar con la molécula quimérica DC-SIGN/fc y en segundo lugar con anticuerpos anti-clusterina. Como controles positivo y negativo de unión a DC-SIGN se utilizaron clusterina fucosilada del plasma seminal y clusterina sérica respectivamente.

En el panel inferior de la **Figura 23** se observa que sólo la clusterina presente en el tumor, y no la clusterina presente en el tejido yuxtatumoral, es capaz de unirse a DC-SIGN. En el panel superior, la membrana fue revelada con anticuerpos anti-clusterina, podemos observar que las cantidades analizadas eran equivalentes en cada par de muestras.

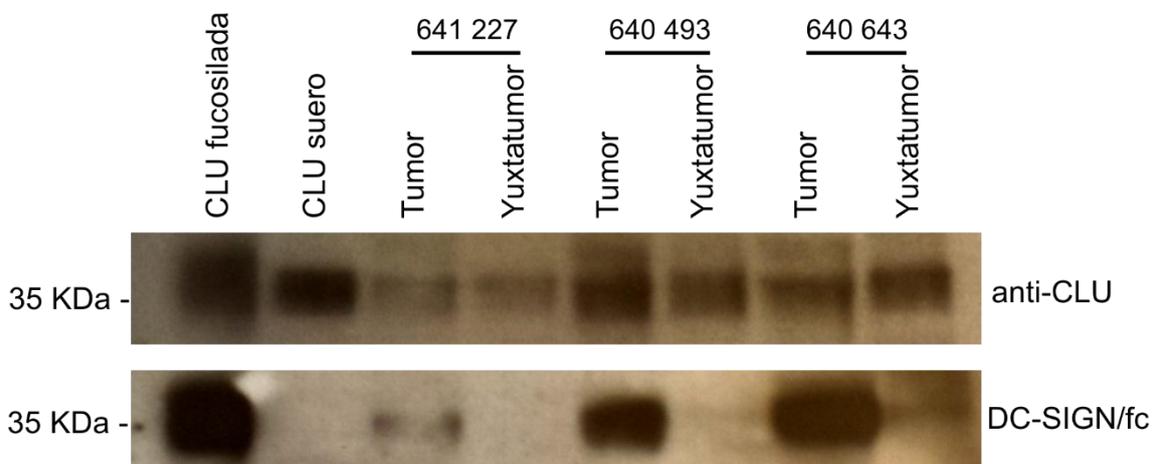


Figura 23 | La clusterina fucosilada se une a DC-SIGN. La habilidad de unirse a DC-SIGN de la clusterina (CLU) expresada por las muestras tumorales y yuxtatumorales fue analizada mediante western-blot. Se analizaron 3 pares de muestras sembrando la misma cantidad de clusterina total para cada par. La membrana fue revelada en primer lugar con la molécula DC-SIGN/fc (panel inferior) y posteriormente con anticuerpos anti-clusterina (anti-CLU) (panel superior). Se utilizaron CLU fucosilada del plasma seminal y CLU del suero como control positivo y negativo de unión a DC-SIGN respectivamente.

7.4. Análisis de la expresión de DC-SIGN en muestras de tumores de mama de tipo Luminal A

La hipótesis central de la segunda parte de esta tesis consiste en que la clusterina secretada por células tumorales interacciona con DC-SIGN en células mieloides, favoreciendo un perfil tolerogénico y contribuyendo al escape tumoral a la respuesta inmune. La presencia de DC-SIGN en células dendríticas intratumorales ha sido descrita en diversos tipos de cáncer²²⁰⁻²²³. En este sentido, nos propusimos analizar la expresión de DC-SIGN en células dendríticas y macrófagos intratumorales en las muestras de cáncer de mama Luminal A, mediante citometría de flujo.

En la **Figura 24A** se muestra la estrategia utilizada para diferenciar las subpoblaciones de células. Luego de eliminar del análisis los dobletes y las células muertas, en primer lugar, seleccionamos a los leucocitos utilizando el marcador CD45. Luego seleccionamos la población CD19/CD56/CD3 negativa para excluir del análisis linfocitos y células NK. Utilizando los marcadores HLA-DR, CD11c, CD123, CD14 y BDCA1 identificamos las poblaciones de CDs plasmacitoides (pCDs, CD123+), CDs inflamatorias (HLADR+ BDCA1+ CD14+), CDs “clásicas” (HLADR+ BDCA+ CD14-), CDs cross-presentadoras (HLADR+ BDCA1- CD14-) y macrófagos (HLADR+ BDCA1- CD14+), según las descripciones de Segura y colaboradores²²⁴⁻²²⁶. Finalmente, analizamos la expresión de DC-SIGN en cada una de estas poblaciones celulares. Como puede observarse en la **Figura 24B**, en las muestras analizadas, la expresión de DC-SIGN se encuentra restringida a la población de macrófagos, tanto en el tejido tumoral como en el yuxtatumoral. Se muestra una imagen representativa (n=5).

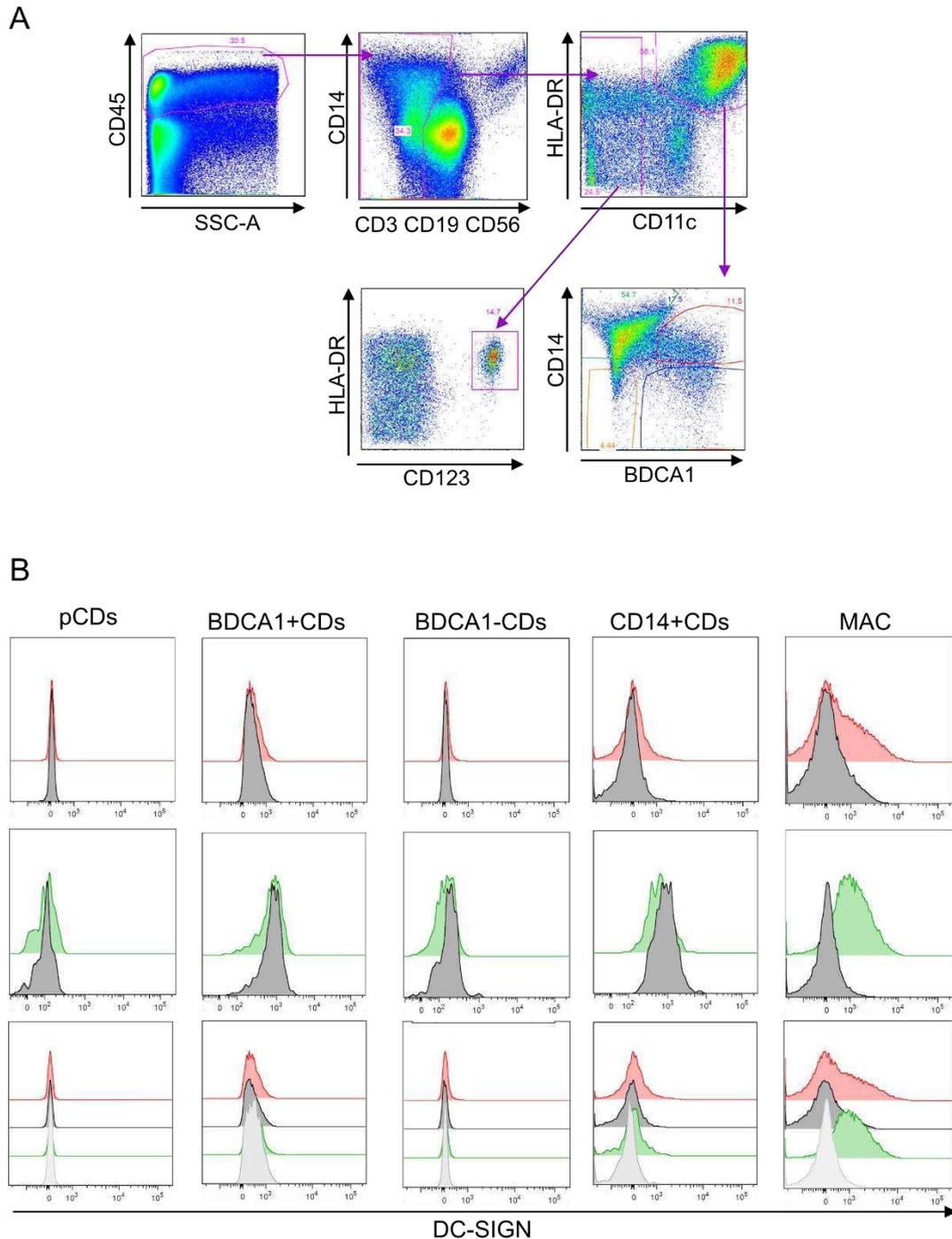


Figura 24 | Presencia de células DC-SIGN positivas en tumores de mama de tipo Luminal

A. Muestras de tumores de mama y sus correspondientes controles fueron disgregados como se describe en la sección de Materiales y Métodos. La expresión de DC-SIGN fue analizada por citometría de flujo en las subpoblaciones de CDs y macrófagos. En **(A)** se muestra la estrategia de separación de las subpoblaciones celulares. En **(B)** se observa la expresión de DC-SIGN en las subpoblaciones de células dendríticas y macrófagos. pCDs: CDs plasmacitoides (HLA-DR+ CD123+); BDCA1+ CDs: CDs “clásicas” (HLA-DR+ BDCA1+ CD14); las BDCA1- CDs: CDs cross-presentadoras (HLA-DR+ BDCA1- CD14-); CD14+ CDs: CDs inflamatorias (HLA-DR+ BDCA1+ CD14+) y MAC: macrófagos (HLA-DR+ BDCA1- CD14+). Los histogramas grises representan el control de isotipo, los histogramas rojos corresponden a los tejidos tumorales y los histogramas verdes tejidos yuxtatumorales. Se muestra un dador representativo (n=5).

Materiales y Métodos

8.1. Reactivos y medios de cultivo

Para los cultivos celulares utilizamos RPMI-1640 (Invitrogen) o DMEM (Invitrogen) suplementados con 50 U/ml penicilina (Invitrogen), 50 µg/ml estreptomicina (Invitrogen) y 10% v/v de suero fetal bovino inactivado (Gibco) (medio completo). La cuantificación de proteínas fue determinada mediante un test colorimétrico (Thermo Scientific). Los siguientes reactivos fueron obtenidos de SIGMA-Aldrich: LPS de *Escherichia coli*, manano, Catalasa, GST y BSA. Los anticuerpos anti-DC-SIGN fueron obtenidos del *AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, MD, USA* (clone 120612). Los anticuerpos policlonales anti-clusterina, el ELISA de clusterina, la molécula quimérica DC-SIGN/fc y la clusterina recombinante fueron obtenidos de R&D System (USA).

8.2. Purificación de Anticuerpos anti-clusterina

Los anticuerpos monoclonales IgG1 anti-clusterina fueron obtenidos a partir de un hibridoma desarrollado en ratón cedido gentilmente por el Dr. Ives Charnay (División de Neuropsiquiatría, Departamento de Psiquiatría, Hospitales Universitarios de Geneva, Suiza)¹⁴³. Las células fueron cultivadas a 37°C en medio RPMI-1640 completo suplementado con 1 mM de piruvato de sodio y glutaMax (Sigma Aldrich). El sobrenadante del cultivo fue recolectado bajo condiciones de esterilidad cada 48 hs hasta obtener un litro. Luego, fue recirculado durante 24 h a 4°C por una columna de proteína G unida a sefarosa (volumen 5 ml, GE Healthcare) ajustando el flujo a una velocidad de 1 ml/min. La columna fue lavada con 100 ml de PBS y el material retenido fue eluído utilizando una solución de glicina 0,1M pH 2,8. El material eluído fue recolectado en un total de 15 fracciones de 1 ml cada una, sobre 80 µl de una solución de Tris 1M pH 9. Se determinó la concentración total de proteínas en cada fracción, se concentraron las fracciones de mayor concentración a 1mg/ml y se dializaron contra 1

litro de PBS. La pureza de los anticuerpos purificados fue evaluada mediante electroforesis en gel de poliacrilamida teñido con Coomassie Blue, y la identidad de los mismos fue confirmada por Western Blot usando anticuerpos dirigidos contra la porción Fc de la IgG de ratón conjugados a peroxidasa.

8.3. Muestras de Plasma Seminal

Las muestras de plasma seminal fueron colectadas a partir de dadores sanos, reclutados en el Instituto Médico Halitus de Buenos Aires, como se describió previamente⁴⁴. El Consentimiento informado fue obtenido de cada paciente antes de la colección de la muestra. Los eyaculados fueron obtenidos por masturbación bajo condiciones higiénicas luego de un período de 2-4 días de abstinencia sexual en contenedores estériles. Las muestras fueron incubadas durante 30 min a 37°C para permitir su licuefacción. El plasma seminal fue separado de la fracción celular por centrifugación (15000 x g, 30 min a 4°C), el sobrenadante fue filtrado en un filtro con un poro de 0.22 µm (Millipore, Holanda) y conservados a -80°C hasta su uso.

8.4. Purificación de clusterina a partir del Plasma Seminal

La purificación de clusterina fue realizada mediante cromatografía de afinidad utilizando un total de 10 mg de anticuerpos monoclonales anti-clusterina purificados a partir del hibridoma, los cuales fueron acoplados a una columna "HiTrap" activada con N-hidroxisuccinimida (GE Healthcare), según las instrucciones de la empresa. Brevemente, 10 mg de anticuerpos anti-clusterina fueron dializados contra un litro de una solución de NaHCO₃ 0,2M y NaCl 0,5M a pH 8,3 (solución de acoplamiento). Los anticuerpos fueron luego cargados en la columna utilizando una bomba peristáltica (Gilson) e incubados durante 4 horas a 4°C. Los anticuerpos no ligados fueron lavados y la columna desactivada realizando 8 lavados utilizando alternadamente una solución alcalina (etanolamina 0,5M y NaCl 0,5M a pH 8,3) y una solución ácida (acetato 0,1M y

NaCl 0,5M a pH 4.0). Finalmente, la columna fue lavada con 100 ml de PBS para estabilizar el pH y guardada con una solución de PBS suplementada con 0,1% de NaN₃ hasta su uso.

Para la purificación de clusterina, la columna fue equilibrada con 50 ml de PBS a una velocidad de 0,2 ml/min a 4°C. Luego, 5 ml de plasma seminal obtenidos a partir de 5 dadores diferentes fueron diluidos en 50 ml de PBS suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas libres de EDTA (Roche), 50 U/ml penicilina (Invitrogen) y 50 µg/ml estreptomina (Invitrogen), fueron cargados en la columna cromatográfica recirculando la muestra durante 16 hs, con un flujo de 0,2 ml/min a 4°C. Luego, la columna fue lavada primero con 100 ml de PBS y posteriormente con 50 ml de PBS conteniendo ClNa 1M. El material retenido fue eluído a 4°C utilizando una solución de glicina 0,1M a pH 2,8 y recolectado en 15 fracciones de 0.5 ml cada una sobre 40 µl de una solución de Tris 1M pH 9. Se determinó la concentración de proteína total en cada fracción eluída y se juntaron las de mayor concentración. Posteriormente, estas fracciones fueron concentradas y dializadas dos veces contra 1 litro de PBS durante 16 hs a 4°C. La pureza de la muestra fue evaluada mediante separación por electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con Coomassie Blue (LabSafe Gel blue; G-Bioscience, USA) en condiciones reductoras. La identidad de la proteína purificada y su capacidad de unirse a DC-SIGN fue confirmada mediante western blot, utilizando anticuerpos policlonales anti-clusterina y la molécula quimérica DC-SIGN-Fc (**Figura 25**). La concentración del stock obtenido fue cuantificada mediante ELISA. El stock de clusterina fue centrifugado durante 30 min a 15000 g a 4°C, filtrado con un filtro de 0.22 µm y alicuotado en condiciones de esterilidad conservándolo a -20°C hasta su uso.

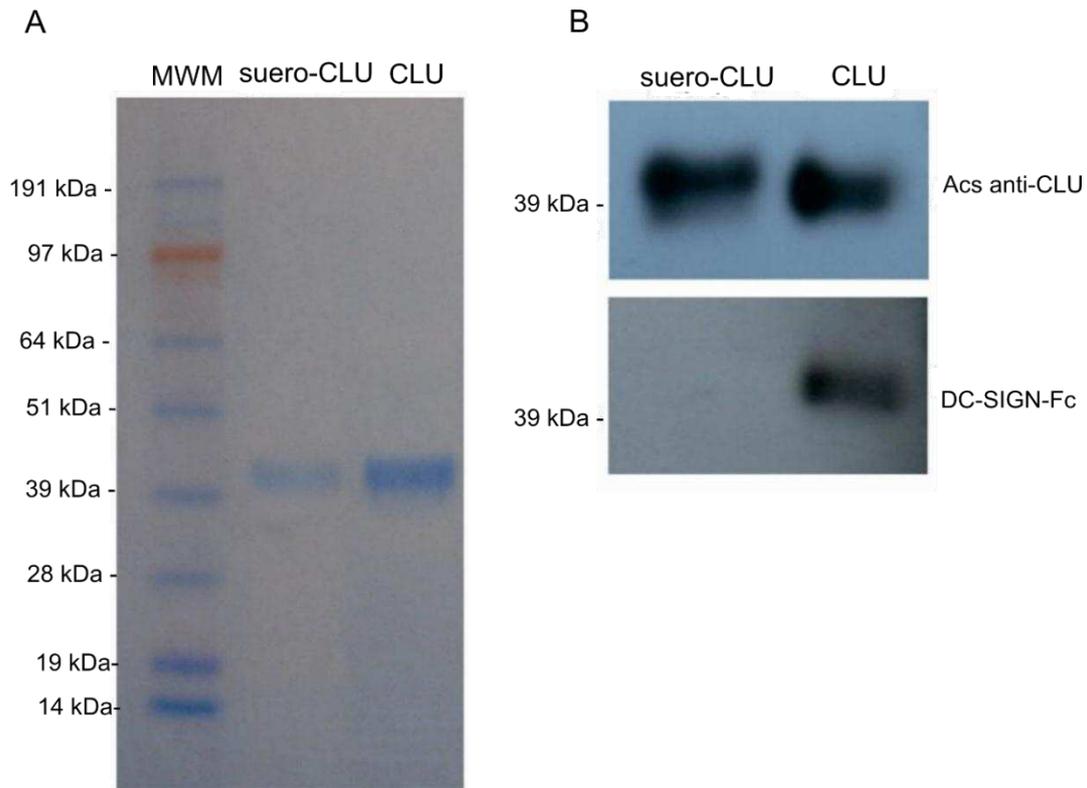


Figura 25 | Caracterización de la clusterina fucosilada purificada a partir del plasma seminal mediante cromatografía de afinidad. (A) Clusterina fucosilada del plasma seminal (CLU) y clusterina del suero fueron separadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras y teñidas utilizando el colorante *Coomassie Blue*. En (B), CLU y clusterina del suero, luego de la separación electroforética, fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa y la misma fue revelada en primer lugar con la molécula quimérica DC-SIGN-Fc y anticuerpos secundarios dirigidos contra la porción Fc de la IgG humana conjugados a peroxidasa (panel inferior) y, en segundo lugar, con anticuerpos policlonales dirigidos contra clusterina y anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (panel superior).

8.5. Análisis de la actividad de chaperona de la clusterina

Para evaluar la actividad de chaperona de clusterina, soluciones de catalasa (200 $\mu\text{g/ml}$), GST (400 $\mu\text{g/ml}$) y suero humano (diluido 1/10 en PBS) fueron preparadas en PBS, colocadas en cubetas plásticas y calentadas a 60°C solas o en presencia o ausencia de clusterina fucosilada del plasma seminal o clusterina sérica (100 $\mu\text{g/ml}$). La absorbancia a 360 nm (medida de la turbidez de la solución) fue medida cada 2 min en un espectrofotómetro Bio Rad SmartSpectra 3000 (USA) por un período total de 20 min. Catalasa (200 $\mu\text{g/ml}$), GST (400 $\mu\text{g/ml}$) o BSA (500 $\mu\text{g/ml}$), fueron incubados a 37°C durante 120 min en PBS conteniendo DTT (concentración final 20 mM), en

ausencia o presencia de clusterina fucosilada del plasma seminal o clusterina sérica (en concentraciones de 200, 400 o 500 µg/ml, para catalasa, GST y BSA, respectivamente). La absorbancia de las soluciones fue medida a 360 nm cada 8 min por un período total de 120 min.

8.6. Líneas celulares

La línea celular humana Raji, derivada de un linfoma de Burkitt Epstein Barr positivo, y la línea Raji que expresa DC-SIGN (células Raji transfectadas en forma estable con DC-SIGN)²²⁷, fueron obtenidas del *AIDS Research and Reference Reagent Program, Division of AIDS, NIH*, y crecidas en medio RPMI-1640 completo. La expresión de DC-SIGN fue corroborada mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos anti-DC-SIGN.

8.7. Línea celular primaria

La línea celular primaria derivada de un carcinoma mamario de tipo Luminal A fue generada en el laboratorio de la Dra. Eliane Piaggio del Instituto Curie de París, Francia. Brevemente, se disgregó una muestra tumoral de cáncer de mama de tipo Luminal A mediante digestión enzimática del tejido, por tratamiento durante 20 min a T.A. con 0,1 mg/ml de Liberasa TL (Roche) en presencia de 0,1 mg/ml de DNasa (Roche). Luego, las células separadas fueron recolectadas por filtración a través de una membrana con poro de 0,45 µm, lavadas y marcadas con anticuerpos dirigidos contra el marcador epitelial EpCAM y CD45. Finalmente, se seleccionaron y separaron las células EpCAM+CD45- por citometría de flujo, como la población correspondiente a las células tumorales de origen epitelial. La población separada fue cultivada y expandida en medio completo.

8.8 Cultivos Primarios

8.8.1. Obtención de células mononucleares de sangre periférica (CMSPs)

La purificación de células de la sangre para cultivos primarios fue realizada a

partir de muestras de 500 ml de sangre obtenidas de donantes sanos con su consentimiento. La sangre extraída fue anticoagulada con el aditivo CPDA (citrato fosfato dextrosa adenina) y centrifugada (15 min a 1000 g) para separar 50 ml de la fracción media (*buffy coat*), enriquecida en leucocitos. Todos los procedimientos posteriores se realizaron en cabina de flujo laminar y respetando las técnicas de trabajo en esterilidad.

La fracción de la sangre enriquecida en leucocitos fue lavada 2 veces por centrifugación (10 min a 1000 g) con solución isotónica de NaCl (solución fisiológica). El pellet celular fue resuspendido en solución fisiológica hasta un volumen de 30 ml. Dicho volumen fue sembrado suavemente sobre 12,5 ml de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Sweden) (densidad 1,077 g/ml) y centrifugado (20 min a 2000 g a T.A.). Al término de la centrifugación, se recogieron las CMSPs, que quedan en la interfase entre el Ficoll-Hypaque y la solución fisiológica. Las CMSPs obtenidas fueron lavadas 2 veces por centrifugación (10 min a 1000 g) con solución fisiológica y resuspendidas a 50×10^6 células/ml en medio RPMI-1640 completo.

8.8.2. Purificación de Monocitos

Los monocitos fueron purificados a partir de las CMSPs a través de dos metodologías diferentes: por centrifugación en gradiente de densidad y por selección con anticuerpos monoclonales específicos unidos a perlas magnéticas (*microbeads*).

Para separar monocitos de linfocitos por centrifugación en gradiente de densidad, las CMSPs fueron resuspendidas a 15×10^6 células/ml en RPMI completo suplementado con 10% de SFB. Utilizando tubos cónicos de 15 ml, se colocaron gentilmente alícuotas de 5 ml de las CMSPs sobre 4 ml de una solución isotónica de Percoll al 50% (densidad 1,062). Estas preparaciones fueron centrifugadas (40 min a 400 g a 21°C) sin freno en una centrífuga de rotor oscilante. Al término de la centrifugación, se recogieron los monocitos, que quedan en la interfase entre la solución

de Percoll y el RPMI. Los monocitos fueron lavados 2 veces por centrifugación (10 min a 1000 g) con solución fisiológica y resuspendidas en 10 ml en medio RPMI-1640 completo. La pureza de los monocitos fue verificada por citometría de flujo. Se utilizaron solamente preparaciones de monocitos con pureza superior a 80%.

Alternativamente, las CMSPs fueron resuspendidas a una densidad de 10×10^6 células/ml en buffer para separación con *microbeads* magnéticas. El buffer de separación consistió en PBS suplementado con EDTA (2 mM) y BSA (0,5%). La suspensión de CMSPs fue incubada con 150 μ l de *microbeads* cubiertas con anticuerpo monoclonal anti-CD14 (Miltenyi Biotec, Germany) durante 15 min a 4°C. Al término de la incubación, las células junto con las *microbeads* fueron lavadas en el buffer de separación por centrifugación (5 min a 300 g). El pellet obtenido fue resuspendido en 3 ml de buffer de separación y sembrado en una columna sobre un imán. Durante este proceso las células CD14+ fueron retenidas por la columna imantada mientras que las CD14- eluyeron libremente. Luego de la elución de la suspensión de CMSPs, la columna fue lavada con 2 ml de buffer de separación. Finalmente, las células CD14+ fueron eluidas al retirar la columna del imán. Los monocitos fueron lavados 2 veces por centrifugación (10 min a 1000 g) con solución fisiológica y resuspendidos en 10 ml en medio RPMI-1640 completo. La pureza de los preparados fue verificada por citometría de flujo. En todos los casos se obtuvieron preparaciones de monocitos con pureza superior a 95%.

8.8.3. Purificación de linfocitos T CD4+

Los linfocitos T CD4+ fueron purificados a partir de las CMSPs utilizando *microbeads* magnéticas “CD4+ T Cell Isolation Kit human” (Miltenyi Biotec) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 10×10^6 células fueron resuspendidas en 40 μ l buffer para separación con *microbeads* magnéticas. La suspensión se incubó en primer lugar 15 min a 4°C con 10 μ l de anticuerpos anti-biotina, y posteriormente se agregaron 30 μ l de buffer y 20 μ l de *microbeads Cocktail*. Luego de incubar la solución

durante 10 min a 4°C, se procedió a la separación magnética sembrando las células en una columna imantada donde las células T CD4+ se eluyeron libremente dejando retenidas en la columna el resto de las poblaciones celulares. Finalmente, luego de la elución y de lavar la columna con 1.5 ml de buffer de separación, los linfocitos T CD4+ fueron lavados por centrifugación (10 min a 1000 g) con solución fisiológica, contados y resuspendidos en medio RPMI-1640 completo para su uso.

8.8.4. Diferenciación de Células Dendríticas

Para obtener células dendríticas, los monocitos purificados fueron cultivados durante 5 días a una densidad de 1×10^6 células/ml en RPMI-1640 completo suplementado con 20 ng/ml de IL-4 (Miltenyi) y 20 ng/ml de GM-CSF (Miltenyi)²²⁸. En el día 5 de cultivo, el resultado de la diferenciación fue evaluado midiendo la expresión de CD1a y CD14 por citometría de flujo (**Figura 26**).

8.9. Tratamiento de las CDs y análisis de su fenotipo

Las CDs (1×10^6 /ml) fueron cultivadas en placas de 96 pocillos en medio completo suplementado con 20 ng/ml de IL-4 y 20 ng/ml de GM-CSF, en presencia o ausencia de LPS (10 ng/ml), clusterina fucosilada (40 µg/ml) o la combinación de ambos. Luego de 24h, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en 50 µl de medio completo conteniendo anticuerpos acoplados a diferentes fluorocromos dirigidos contra CD1a, DC-SIGN, HLA-DR, CD80, CD83, CD86 o CD40 (BD Biosciences) e incubadas durante 30 min a 4°C. Finalmente, las células fueron lavadas con PBS conteniendo 1% de SBF y resuspendidas en Isoflow (BD Biosciences). La intensidad de fluorescencia fue analizada sobre 20.000 células en cada muestra, mediante citometría de flujo. En cada caso, se utilizaron los correspondientes controles de isotipo.

8.10. Tratamiento enzimático aplicado a la clusterina

La clusterina purificada del plasma seminal (3-10 µg) fue dializada contra 1 L de buffer sodio fosfato 50 mM a pH 5 durante 24 h a 4°C. Luego, fue tratada con 1 mg/ml

de la enzima α -1-3,4 fucosidasa o α -1-2 fucosidasa (Calbiochem, USA) durante 3h a 37°C. Posteriormente las muestras fueron dializadas contra 1 L de PBS a pH 7 y analizadas mediante western blot con la molécula quimérica DC-SIGN-Fc.

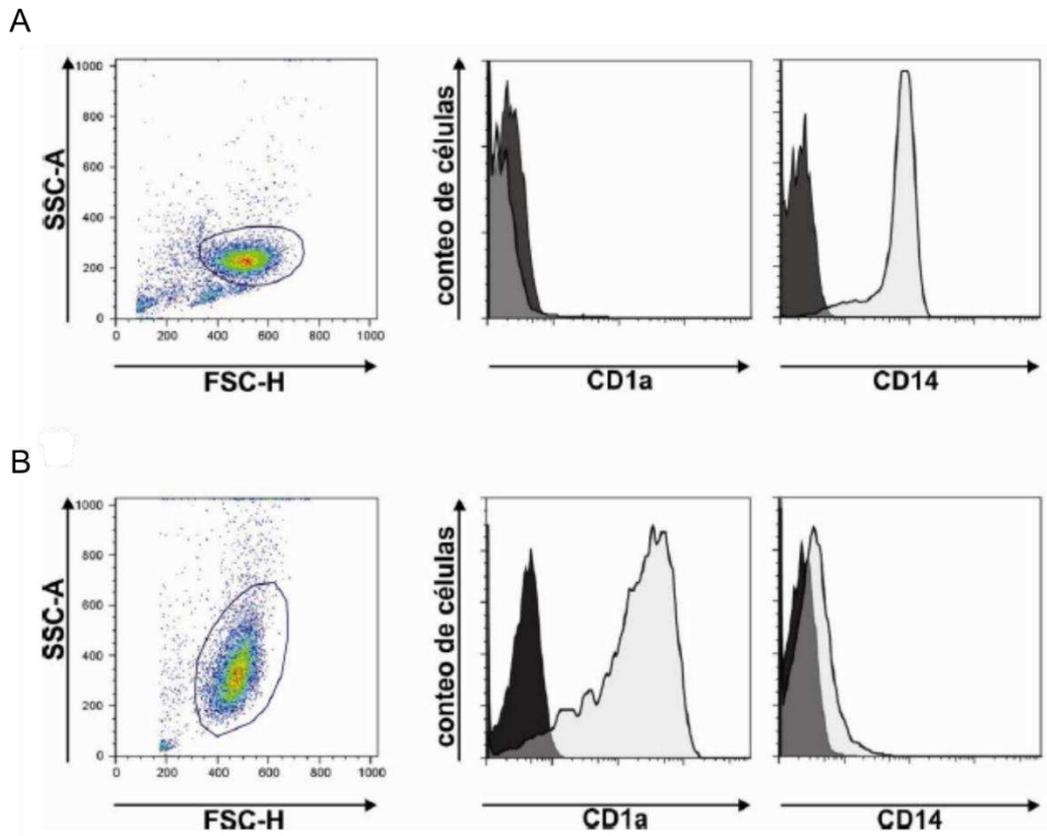


Figura 26 | Diferenciación de células dendríticas a partir de monocitos. Los monocitos fueron diferenciados a CDs por tratamiento con IL-4 y GM-CSF durante 5 días. Su fenotipo fue caracterizado por citometría de flujo. Se observa la población seleccionada para el análisis, tomando en cuenta su distribución de acuerdo a los parámetros FSC-H y SSC-A. Los histogramas muestran la expresión de CD1a y CD14 en monocitos (A) y en CDs ya diferenciadas como tales (B). Los histogramas negros corresponden al control de isotipo.

8.11. Citometría de Flujo

Todas las mediciones de la “Parte A” de esta tesis se realizaron en un citómetro de flujo FACS Canto II (BD Biosciences, San Jose, CA). La expresión de células DC-SIGN positivas en muestras tumorales fue analizada utilizando un citómetro de flujo LSR Fortessa (BD Biosciences, San Jose, CA). En todos los casos los datos fueron

adquiridos con el software FACS Diva (BD Biosciences). Las células analizadas fueron seleccionadas mediante exclusión de células muertas y dupletes celulares. Los datos se expresan como media de fluorescencia o porcentaje de células positivas según se indica en cada figura.

8.12. Biotinilización de proteínas

Soluciones de Catalasa, GST o BSA fueron preparadas a 1 mg/ml en PBS. Luego estas soluciones fueron incubadas durante 30 min a T.A. con una solución conteniendo NHS-Biotina 1 mg/ml en una relación 1/100 (mg de proteína/mg de biotina). Luego, las diferentes soluciones biotiniladas fueron dializadas contra 1L de PBS durante 24 h. Finalmente las muestras fueron recolectadas, se determinó la concentración final de proteínas fue determinado mediante el método de Bradford y fueron conservadas a 4°C hasta su uso.

8.13. Unión de proteínas estresadas a DC-SIGN expresado en células Raji y CDs

Los experimentos de unión de proteínas estresadas a células que expresan DC-SIGN fueron realizados de la siguiente manera: catalasa (200 µg/ml) o GST (400 µg/ml) biotiniladas y mezclas de las mismas con clusterina fucosilada (100 µg/ml) o clusterina sérica (100 µg/ml), fueron incubadas en agitación durante 20 minutos a 60°C (condición de estrés) o incubadas a 4°C (condición control). Luego, las soluciones fueron enfriadas y 20 µl de cada solución fue añadida a células Raji, células Raji que expresan DC-SIGN o CDs (5×10^5 células en 40 µl de medio completo) e incubadas durante 60 minutos a 4°C. Luego de este período de incubación, las células fueron lavadas dos veces con medio completo frío, teñidas con estreptavidina conjugada a FITC y analizada por citometría de flujo. Este ensayo de unión también fue realizado con una solución de BSA biotinilada (500 µg/ml) estresada por calor a 37°C durante 150 minutos con DTT (20 mM), en presencia o ausencia de clusterina fucosilada del plasma seminal (500 µg/ml) o clusterina sérica (100 µg/ml). Alternativamente, la unión de proteínas estresadas a DC-SIGN fue realizada tratando previamente a las células durante 30 minutos a 4°C

con manano (1 mg/ml), anticuerpos bloqueantes de DC-SIGN (10 µg/ml) o inmunoglobulina G de ratón como control.

8.14. Ensayos de Endocitosis

Para los ensayos de endocitosis se estresó catalasa biotinilada (200 µg/ml) en presencia de clusterina fucosilada (100 µg/ml) durante 20 min a 60°C. Luego, 20 µl de estas soluciones fueron agregadas a CDs (5 x 10⁵ células en 40 µl de medio completo) e incubadas durante 60 min a 4°C. Las células fueron lavadas dos veces usando medio completo frío y teñidas con estreptavidina conjugada a FITC durante 15 min a 4°C. Posteriormente, las células fueron incubadas durante 30 min a 37°C para permitir el proceso de endocitosis o a 4°C para impedirlo. Finalmente, las células fueron analizadas por citometría de flujo en presencia del colorante Azul Tripan (20% v/v) el cual fue agregado antes de analizar cada condición.

8.15. Microscopía confocal

8.15.1. Análisis de la endocitosis de complejos proteína-clusterina estresada

Las CDs (1x10⁵) fueron colocadas en cubreobjetos de vidrio (12mm), los cuales fueron tratados previamente con poly-L-lisina durante 30 min a TA. Los experimentos de unión se realizaron del siguiente modo: catalasa biotinilada (200 µg/ml) fue calentada durante 20 min a 60°C en presencia de clusterina fucosilada (100 µg/ml), la solución fue enfriada y 100 µl de la misma fue agregada a las CDs adheridas a los cubreobjetos e incubada durante 60 min a 4°C. Luego de este período de incubación, las células fueron lavadas tres veces con medio completo frío y los cubreobjetos fueron cubiertos con medio completo e incubado a 37°C durante 15 min o 30 min, para permitir el proceso de endocitosis. Las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído al 4% durante 15 min a 4°C. Finalmente, las células fueron tratadas con 0.1 mM de glicina en PBS (30 min, T.A.) e incubadas durante 1 h con mAbs dirigidos contra el antígeno endosomal temprano 1 (EEA1), proteína de membrana asociada a

lisosomas 1 (LAMP-1), clusterina o DC-SIGN. Luego de lavar los anticuerpos primarios, las células fueron teñidas con anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos durante 30 min (Jackson Immuno Research, USA). Los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos de vidrio usando Fluoromont G. Las imágenes fueron adquiridas con un FluoView FV1000 confocal microscope (Olympus, USA) usando un objetivo de inmersión Planapo 60x 1.42 NA.

8.15.2. Análisis de la expresión de clusterina fucosilada en una línea primaria de cáncer de mama

La línea celular primaria derivada de un carcinoma mamario de tipo Luminal A, fue cultivada y crecida en medio completo sobre cubreobjetos de vidrio estériles (12 mm de diámetro) colocados en placas de cultivo de 12 pocillos. Luego de alcanzar una confluencia del 80%, las células fueron lavadas 2 veces con PBS y fijadas en paraformaldehído al 4% (15 min a 4°C). Los cubreobjetos fueron retirados de la placa, las células fueron tratadas con 0.1 mM de glicina en PBS (30 min T.A.) e incubadas durante 1 h con anticuerpos primarios dirigidos contra clusterina o Lewis X (BioLegend). Finalmente, las células fueron lavadas y tenidas con anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos durante 30 min (Jackson Immuno Research, USA). Los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos de vidrio usando Fluoromont G con DAPI. Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio confocal Nikon TiE con un software Zeiss LSM510, un objetivo de inmersión 60X y 1.42 NA.

8.16. Análisis de la expansión de células T FOXP3+ por CDs

Se cultivaron CDs (5 x 10⁴/100 µl) en presencia de clusterina fucosilada (40 µg/ml) o PBS, durante 24h en medio completo suplementado con 20 ng/ml de IL-4 y 20 ng/ml de GM-CSF. Posteriormente, las CDs fueron lavadas y cultivadas con linfocitos T CD4+ alogeneicos (2 x 10⁵/100 µl) durante 5 días adicionales en medio completo en placas fondo en U. Luego de este período de incubación, las células fueron teñidas usando anticuerpos contra CD4, CD25 y FOXP3, siguiendo las instrucciones del

fabricante (BD Biosciences, USA) y analizadas por citometría de flujo.

8.17. Inmunohistoquímica

El proceso de obtención, tinción de las muestras y la adquisición de las imágenes fue realizado en colaboración con la división de Patología Experimental (PathEX) del Instituto Curie de París, Francia. Brevemente, se cortaron los bloques de parafina conteniendo muestras de tumores de mama de tipo Luminal A en secciones de 4 µm de espesor. Posteriormente, las secciones fueron desparafinadas y la peroxidasa endógena fue bloqueada con 3% de H₂O₂. Luego los cortes fueron marcados con anticuerpos monoclonales anti clusterina (clone B-5, dilución 1:200) durante 1 h a pH 6. Los cortes fueron lavados con PBS-Tween, incubadas con anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa y finalmente con el complejo avidina-biotina estreptavidina-peroxidasa (Vectastain Elite ABC kit; Vector Laboratories, Burlingame, CA). 3,3'-diaminobenzidina tetrahydrocloridrico fue usado como cromógeno y se aplicó la tinción de hematoxilina de Mayer para teñir los núcleos celulares.

8.18. Muestras de tumores de mama

Las muestras tumorales corresponden a muestras de tumores de mama de tipo Luminal A, obtenidas luego de la resección quirúrgica realizada como parte del tratamiento de dicha enfermedad. La cohorte de pacientes fue reclutada de pacientes del Hospital Marie Curie de Paris, Francia. Los pacientes estudiados no recibieron tratamiento quimioterapéutico previo a la cirugía; de cada uno de ellos se obtuvo una muestra de tejido tumoral y una muestra de tejido adyacente al tumor (yuxtatumor) proveniente de los márgenes de resección de la pieza. Todas las muestras fueron adquiridas bajo consentimiento informado siguiendo las reglas éticas francesas y europeas para el uso de muestras humanas, aplicadas bajo la supervisión de la unidad de manejo de estudios clínicos del Instituto Curie.

8.19. Procesamiento de muestras tumorales

Las muestras tumorales y sus correspondientes tejidos yuxtatumorales fueron

recibidas luego de la cirugía en medio RPMI sin suplementos adicionales. Inmediatamente fueron homogenizadas con tijera sobre placas de Petri en 0,5-1 ml de PBS conteniendo inhibidores de proteasas libres de EDTA (Roche). Las muestras procesadas fueron colocadas en tubos cónicos e incubadas en agitación durante 40 min a 4°C. Luego de este período de incubación, fueron centrifugadas a 12000 rpm durante 20 min a 4°C. Los sobrenadantes fueron recolectados, alicuotados y conservados a -20°C hasta su uso.

8.20. Cuantificación de clusterina total y fucosilada en muestras tumorales

La concentración de clusterina total fue determinada mediante ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems). La clusterina fucosilada fue detectada y cuantificada en los sobrenadantes de las muestras tumorales mediante un ensayo de ELISA desarrollado en el laboratorio. Para realizar este ensayo, en primer lugar, se trataron placas de 96 pocillos durante 18 hs a T.A. con anticuerpos anti-clusterina. Estos anticuerpos corresponden a los anticuerpos de captura utilizados para la determinación de clusterina total. Luego de este período de incubación, las placas fueron lavadas con PBS-Tween 0,05% y bloqueadas durante 1h con una solución de PBS conteniendo BSA al 3%. Esta solución de bloqueo fue usada como solución diluyente en el resto del ensayo. Seguido al paso de bloqueo, se incubaron durante 1h las muestras de los sobrenadantes de tumorales o yuxtatumorales. Los pocillos fueron lavados, e incubados durante 30 min con 1mg/ml de la lectina *Ulex europaeus* conjugada a biotina (Vector Laboratories). Finalmente, los pocillos fueron lavados e incubados durante 20 min con estreptavidina-HRP (BD, Biosciences, USA). El ensayo fue revelado utilizando el sustrato TMB (BD, Biosciences, USA). Para realizar una curva de calibración y como control positivo de unión a la lectina se utilizó clusterina fucosilada purificada del plasma seminal mediante cromatografía de afinidad. Clusterina sérica (50 ng/ml) fue utilizada como control negativo de unión a la lectina. En la Figura 27 se muestra un esquema del ensayo.

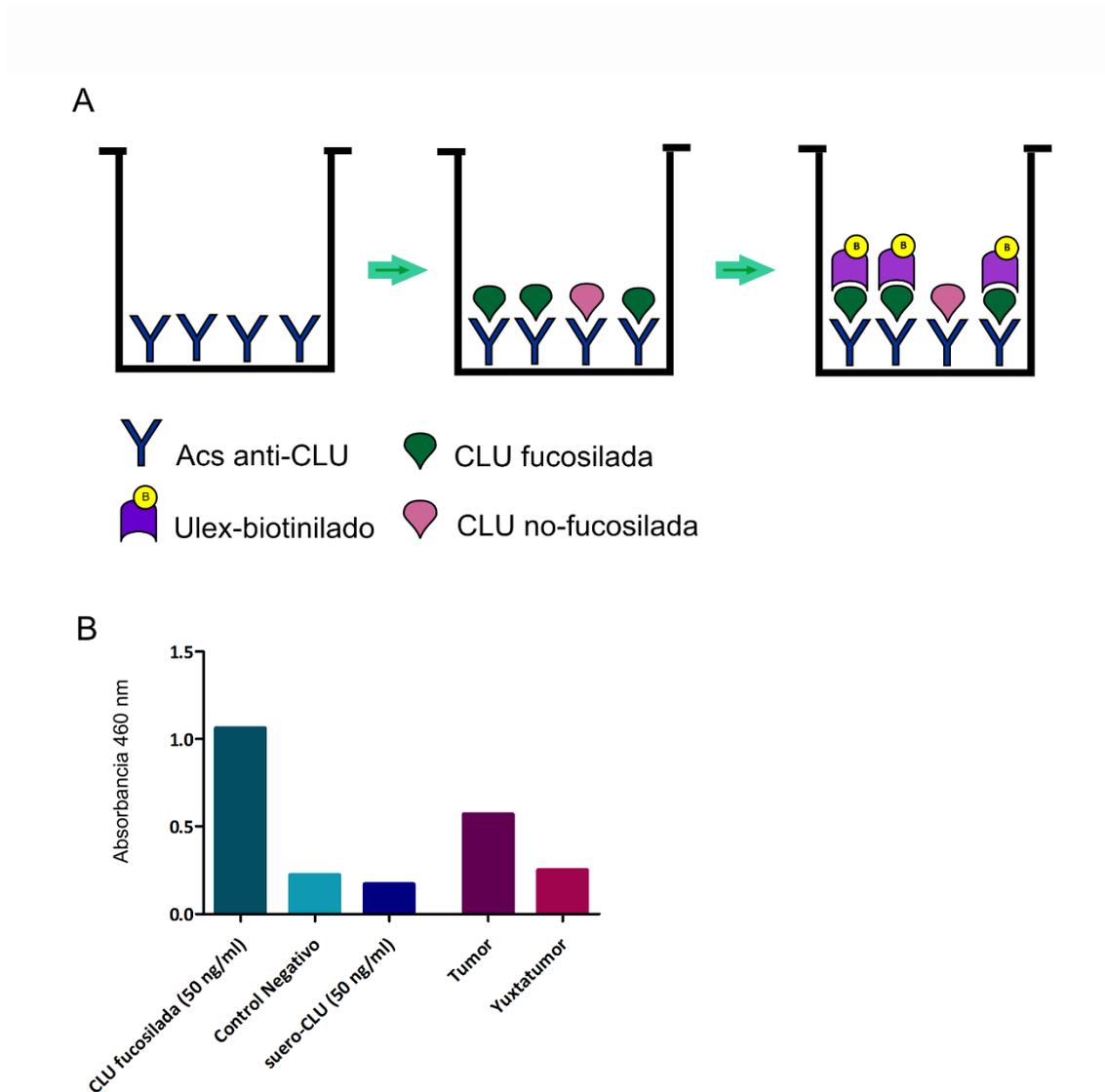


Figura 27 | Esquema del ensayo de ELISA. (A) La clusterina (CLU) total fue capturada en las muestras tumorales con anticuerpos monoclonales anti-CLU y la presencia de CLU fucosilada fue revelada con la lectina *Ulex europaeus*-biotinilada. En **(B)** se muestra un resultado representativo del ensayo con los correspondientes controles y un ejemplo de un sobrenadante de una muestra de tumor y su correspondiente tejido yuxtatumoral.

8.21. Análisis de la unión a DC-SIGN de la clusterina tumoral

La capacidad de la clusterina de unirse a DC-SIGN presente en las muestras tumorales fue analizada por western-blot. Para la realización de los ensayos de western blot las muestras de clusterina purificada de plasma seminal, clusterina del suero, muestras de tumores y yuxtatumores fueron separadas en geles de poliacrilamida al 10% y transferidas a membranas de PVDF (Hybond ECL, Amersham Biosciences)

previamente activadas con metanol. La transferencia fue realizada utilizando un sistema semi-seco durante 40 minutos a 200 A. Luego, las membranas fueron bloqueadas durante 1 h con una solución conteniendo Tris 50 mM, NaCl 150 mM a pH 7,6 (TBS) suplementada con 3% de BSA y 0,05% de Tween-20. Luego las membranas fueron reveladas en primer lugar con la molécula quimérica DC-SIGN/Fc y posteriormente con anticuerpos policlonales anti-clusterina.

DC-SIGN-Fc quimérico (R&D Systems)²²⁹ es una proteína recombinante disponible comercialmente, compuesta por la porción extracelular de DC-SIGN (Lys62 – Ala404) acoplada al fragmento Fc de la IgG1 humana (Pro100 – Lys330). Esta estructura le permite unirse a ligandos de DC-SIGN, con la posibilidad de revelar esta unión mediante anticuerpos secundarios dirigidos contra la porción Fc de la IgG humana. Luego de bloquearlas, las membranas fueron tratadas con 1 µg/ml de la proteína quimérica DC-SIGN/Fc, en una solución conteniendo TRIS 20mM, NaCl 150mM, CaCl₂ 1mM y MgCl₂ 2mM (TSM), durante 4 horas a 4°C. Finalmente, las membranas fueron lavadas con TSM suplementado con 0,05% de Tween-20 y reveladas mediante la incubación con anticuerpos secundarios anti-porción Fc de la IgG humana conjugados con peroxidasa (Jackson Immuno Research, USA), mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham Biosciences) y placas Kodak BioMax.

Una vez finalizado el revelado con DC-SIGN/fc, las membranas fueron tratadas durante 40 min a 56°C con una solución de Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 conteniendo 10 % de SDS y 0.2% de β-mercaptoetanol, para remover los anticuerpos previamente unidos. Luego de este período de incubación, las membranas fueron lavadas exhaustivamente con TBS suplementado con 0,05% de Tween-20 (TBS-Tween) y bloqueadas nuevamente durante 1 h con una solución de TBS-Tween suplementado con 3% BSA. Finalmente, las membranas fueron tratadas con 1 µg/ml de anticuerpos policlonales anti-clusterina hechos en cabra (R&D Systems) durante 60 minutos a temperatura ambiente, lavadas con TBS-Tween e incubadas durante 1h con anticuerpos policlonales

anti-IgG de cabra conjugados a peroxidasa (Jackson Immuno Research, USA). Finalmente, la membrana fue lavada y revelada mediante quimioluminiscencia (ECL, Amersham Biosciences) utilizando placas Kodak BioMax.

8.22. Análisis de las subpoblaciones de células mieloides en tumores de mama

Para analizar las subpoblaciones de células mieloides, se separaron las células tumorales por disgregación enzimática de las muestras. En primer lugar, las muestras de tumores y yuxtatumores fueron cortadas mecánicamente en fragmentos pequeños sobre placas de Petri. Luego, fueron colocadas en tubos cónicos conteniendo 5-10 ml de RPMI suplementado con colagenasa (2 mg/ml), hyaluronidasa (2 mg/ml) y DNasa (25 µg/ml), e incubadas en agitación durante 50 min a 37°C. Posteriormente, las muestras fueron filtradas utilizando una malla con un poro de 0.45 µm recuperando las células disgregadas. Finalmente, las células recuperadas fueron lavadas, contadas y resuspendidas en 100 µl de una solución conteniendo anticuerpos conjugados a diferentes fluorocromos contra CD45, CD14, CD3, CD19, CD56, HLA-DR, CD11c, CD123, BDCA1 y DC-SIGN. Las diferentes subpoblaciones fueron analizadas por citometría de flujo. La población de células a estudiar, fue definida en el análisis excluyendo los dobletes celulares y las células no viables DAPI positivas.

8.23. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue realizado usando el software GraphPad Prism (La Jolla, CA, USA). Las comparaciones estadísticas entre dos grupos fueron realizadas utilizando en test *t de student*. Las comparaciones estadísticas entre grupos fueron realizadas usando análisis de varianza seguido del post test de Bonferroni para comparaciones múltiples. Los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente positivos.

Conclusiones y Discusión

CONCLUSIONES

En la primera parte de esta tesis demostramos que la clusterina fucosilada presente en el plasma seminal, merced a su actividad como chaperona, es capaz de promover la unión de proteínas estresadas a DC-SIGN, unión que se observa utilizando concentraciones de clusterina entre 50 a 100 veces menores a las normalmente encontradas en el semen²³⁰. Demostramos que las CD_s endocitan los complejos clusterina-proteína estresada, los cuales son llevados a fagosomas tardíos. Demostramos que la clusterina fucosilada, si bien no modula la expresión de marcadores de maduración en la membrana de las CD_s, incrementa la capacidad de las mismas de inducir la expansión de linfocitos T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺.

En la segunda parte de este trabajo de tesis demostramos que la forma fucosilada de clusterina no es una glicofoma exclusiva del plasma seminal, sino que también se expresa en tumores de mama de tipo Luminal. Demostramos que la clusterina producida por tumores mamarios es capaz de unirse a DC-SIGN. Finalmente, analizamos la expresión de DC-SIGN en las células mieloides que infiltran los tumores mamarios y encontramos que los macrófagos y no las CD_s intratumorales expresan dicho receptor.

Discutiremos, en primer lugar, los resultados relacionados a la actividad de chaperona extracelular de clusterina fucosilada y sus propiedades inmunomodulatorias en el plasma seminal, y luego los resultados relacionados con la presencia de clusterina fucosilada en los tumores de mama.

DISCUSIÓN

9.1. La clusterina y su rol como chaperona extracelular en el plasma seminal

Las chaperonas extracelulares promueven la depuración de proteínas mal plegadas induciendo su unión a receptores celulares específicos para su endocitosis y posterior degradación^{25,26}. Mediante este proceso se previene la formación de agregados insolubles generados por el depósito de proteínas mal plegadas^{25,26} y sus efectos tóxicos, los cuales subyacen a la patogenia de numerosas enfermedades tales como la enfermedad de Alzheimer, la Aterosclerosis, la Enfermedad de Creutzfeldt–Jakob y la Amiloidosis entre otras²³. La clusterina sérica fue la primera chaperona extracelular descrita¹⁴⁵ y sus receptores identificados son: *Megalina*, el *Receptor de ApoE* y el *Receptor de VLDL*³³⁻³⁵. Recientemente, nuestro grupo de investigación ha descrito a DC-SIGN como un nuevo receptor de la glicofoma fucosilada de clusterina presente en el plasma seminal⁴⁵.

Al igual que la clusterina sérica, la clusterina fucosilada posee actividad de chaperona siendo capaz de inhibir *in-vitro* la agregación de proteínas estresadas como BSA, catalasa, glutatión S-transferasa y suero humano. Por otra parte, gracias a su peculiar patrón de glicosilación, la clusterina fucosilada adquiere la capacidad de “dirigir” estas proteínas estresadas a DC-SIGN y de promover, a través del mismo, su endocitosis por CDs. Las proteínas internalizadas siguen la vía clásica de endocitosis, encontrándose en tiempos tardíos en compartimentos fagolisosomales. Este proceso adquiere particular importancia en el caso de las células dendríticas, ya que dichas células procesan y presentan los péptidos provenientes de proteínas endocitadas a linfocitos T, disparando de esta manera la respuesta inmune adaptativa. En el transcurso de esta tesis no hemos logrado poner a punto un ensayo que nos permita evidenciar la activación de linfocitos T específicos contra antígenos endocitados a través de clusterina y DC-SIGN. Sin embargo, la presencia de los complejos clusterina-proteína estresada

junto con Lamp-1, un marcador de los compartimentos involucrados en la presentación antigénica en CDs²³¹, sugiere que la clusterina podría actuar como una molécula capaz de “marcar” antígenos para su posterior presentación a linfocitos T.

9.2. Clusterina fucosilada, ¿una glicoproteína tolerogénica?

La actividad tolerogénica y supresora de las CDs se sustenta, principalmente, en su capacidad de presentar constantemente antígenos propios en condiciones que inducen la activación de linfocitos T CD4+ en un perfil regulatorio⁵¹ promoviendo el silenciamiento de la respuesta inmune²³². Los linfocitos T regulatorios ejercen su actividad supresora tanto en los órganos linfáticos secundarios, como también en los tejidos periféricos, inhibiendo la expansión de células T efectoras y/o modulando su tenor de actividad²³². La diferenciación de las CDs en un perfil regulatorio no solo cumple un papel relevante en el silenciamiento de la respuesta inmune dirigida a antígenos propios, sino que también cumple un papel destacado como mecanismo de evasión a la inmunidad adaptativa en la respuesta frente a células tumorales y agentes infecciosos⁵¹. En este sentido, existe una variedad de mecanismos utilizados tanto por los tumores como por microorganismos patógenos para generar, en última instancia, CDs tolerogénicas^{51,233}.

Tradicionalmente, la relevancia de los receptores lectinas tipo C estaba dada por su capacidad de inducir la endocitosis de sus ligandos. Sin embargo, en los últimos años, numerosos autores han demostrado que estos receptores son capaces de modular el perfil de activación de las CDs. En este sentido, diferentes autores han propuesto un rol para DC-SIGN en el mantenimiento de un ambiente inmunosupresor en los tejidos²³⁴. La interacción de DC-SIGN con ligandos tan diversos, como el virus del sarampión²³⁵, *Helicobacter pylori*⁸⁴, antígenos tumorales^{236 237}, la mielina²³⁸ o preparaciones terapéuticas de gamaglobulina intravenosa²³⁹, promueven la adquisición de un perfil tolerogénico por las CDs.

En nuestros ensayos, la clusterina fucosilada no modificó el fenotipo de las CD8 ni modula la maduración fenotípica inducida por el LPS. Sin embargo, en cultivos alogeneicos, estimula la habilidad de las CD8 de expandir linfocitos T CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺, fenotipo, si bien no exclusivo, asociado a las células T regulatorias²⁴⁰. Estos experimentos sugieren que las CD8 activadas en presencia de clusterina fucosilada podrían ser orientadas hacia un perfil tolerogénico. Estos resultados son similares a los publicados por otros grupos de investigación, utilizando diferentes ligandos de DC-SIGN^{148-153,241}.

9.3. La clusterina del plasma seminal como promotora de la tolerancia materno-fetal

Considerando el éxito de los procedimientos de inseminación artificial llevados a cabo con espermatozoides purificados o inseminación intrauterina, resulta claro que el contacto con plasma seminal no constituye un requisito indispensable para el desarrollo de un embarazo. Sin embargo, distintos estudios indican una mejora en la tasa de embarazos logrados por inseminación artificial cuando las mujeres han tenido contacto con plasma seminal intra-vaginalmente²⁴²⁻²⁴⁴. En el mismo sentido, la falta de contacto con el semen se ha correlacionado con un aumento en la probabilidad de sufrir pre-eclampsia, una enfermedad del embarazo de base inflamatoria^{245,246}. El plasma seminal, además de ser un vehículo para los espermatozoides, es capaz de inducir fuertes efectos inmunomodulatorios en el tracto genital femenino. Robertson y colaboradores han demostrado que la exposición de la mucosa del tracto genital femenino al semen, promueve la expansión de células T regulatorias FOXP3⁺ en los ganglios linfáticos drenantes del útero, favoreciendo la tolerancia hacia aloantígenos masculinos en ratones^{109,124}. Más interesante aun, es que esta respuesta es inducida aun en ausencia de concepción, sugiriendo un rol importante para el semen como inductor de células T regulatorias¹³⁹.

Los trabajos de Moldenhauer y col. demostraron que antígenos presentes en el fluido seminal inducen, en el receptor del semen, una efectiva respuesta T, tanto CD4+ como CD8+, indicando que los antígenos seminales alcanzan a tomar contacto con las CDs presentes en la mucosa receptora, que son quienes ponen en marcha la respuesta inmune adaptativa¹³⁹. Existen dos formas posibles por las que las proteínas presentes en el semen podrían tomar contacto con las CDs allí presentes; una de ellas es mediante las microabrasiones generadas en las mucosas tanto luego de las relaciones sexuales, como en el curso de procesos infecciosos; otra forma es mediante las proyecciones emitidas por las CDs (dendritas) que alcanzan el lumen²⁴⁷. En este sentido, la clusterina fucosilada en el plasma seminal, mediante su actividad de chaperona, podría favorecer la endocitosis de antígenos seminales por CDs DC-SIGN+ presentes en la mucosa receptora. Ensayos de inmunización *in-vivo* podrían comprobar esta hipótesis, sin embargo, el modelo ratón presenta algunas dificultades a la hora de trasladar los resultados que involucran al receptor DC-SIGN. En efecto, existen al menos ocho homólogos de DC-SIGN en el ratón agrupados en una misma región del genoma (SIGNR1-8), mientras que en el humano la familia de DC-SIGN está representada tan sólo por dos receptores (DC-SIGN y L-SIGN). De los ocho homólogos murinos, los cuales poseen diferente distribución y especificidad de unión de glicanos, ninguno reproduce claramente las características de DC-SIGN²⁴⁸.

El conjunto de estos resultados sugiere que la clusterina fucosilada podría participar en la generación de células T regulatorias en los ganglios drenantes de la mucosa receptora del semen. Sin embargo, Las propiedades tolerogénicas del semen no están relacionadas solamente con la presencia de clusterina y otros ligandos de DC-SIGN. El semen contiene altas concentraciones de agentes inductores de células T regulatorias como el TGF- β y las prostaglandinas^{249,250}. La cantidad de TGF- β latente o inactivo en el semen es mucho mayor que la encontrada en otros fluidos corporales (~ 80 ng/ml). Este TGF- β puede ser activado tanto por los valores extremadamente bajos

de pH (~ pH 4.5-5.0) que caracterizan a las secreciones vaginales como también por la acción de diferentes proteasas presentes en estas secreciones. La concentración en el plasma seminal de un segundo agente inmunosupresor, la PgE₂, alcanza también concentraciones sorprendentemente elevadas, en el orden de los 100 µg/ml^{135,249}. Las acciones inmunosupresoras mediadas por TGF-β y PgE₂ involucran un conjunto de mecanismos que afectan a diferentes poblaciones leucocitarias: inhiben la activación de los neutrófilos, células “Natural Killer” y macrófagos y, además, inducen la diferenciación de las células dendríticas convencionales o mieloides en un perfil regulatorio, promoviendo así el desarrollo de respuestas T supresoras^{251,252}.

Además de CLU, el plasma seminal humano contiene otros ligandos de DC-SIGN: la proteína de unión a galectina-3, proteína C inhibitoria⁴⁶, y mucina 6²⁵³, entre otros. Aunque ninguno de estos ligandos posee actividad de chaperona extracelular, todos ellos podrían promover la diferenciación de CD_s en un perfil tolerogénico al interactuar con DC-SIGN. La adquisición de un perfil tolerogénico por las CD_s inducido por ligandos de DC-SIGN podría ser importante tanto en el tracto genital femenino como el masculino. En el tracto genital femenino podría promover la tolerancia materno fetal hacia aloantígenos masculinos, así como también afectar el curso de la respuesta inmune anti-infecciosa desarrollada contra patógenos presentes en el semen. En el tracto genital masculino se generan neoantígenos en el semen durante la pubertad, mucho después de que se establezca la tolerancia sistémica hacia antígenos propios²⁵⁴. Sin embargo, la respuesta inmune contra estos neoantígenos no es desarrollada²⁵⁵. Considerando que en el tracto genital de los mamíferos la clusterina no es producida solamente por el epidídimo, vesículas seminales y la próstata, sino también por los testículos^{91,256,257}, especulamos que podría promover la adquisición de un perfil tolerogénico por las CD_s contribuyendo a generar un sitio inmunológicamente privilegiado en el testículo.

¿Podría estar presente la forma fucosilada de clusterina en otros sitios inmunológicamente privilegiados? En el sistema nervioso central, la clusterina parece jugar un papel relevante en la remoción de proteínas mal plegadas y juega un papel protector en enfermedades vinculadas con el depósito de proteínas, como la enfermedad de Alzheimer^{23,142}. Es interesante destacar que DC-SIGN se expresa en el cerebro, principalmente en células microgliales y células endoteliales de la barrera hematoencefálica²⁵⁸. Más aun, la abundante presencia de glicanos fucosilados del tipo Lewis X y Lewis Y en ese órgano, sugieren que la clusterina podría presentar en el cerebro un patrón de glicosilación similar al encontrado en el semen. La clusterina se expresa también en el ojo, otro sitio inmunológicamente privilegiado, donde jugaría un rol protector en diferentes patologías como el ojo seco. Cabe destacar que la glicosilación de la clusterina, tanto en sistema nervioso central como en el ojo, no ha sido estudiada aún.

9.4. Expresión de clusterina en cáncer de mama

La expresión de clusterina se encuentra alterada en diferentes tipos de cáncer. Más aun, ha sido postulado que alteraciones en la producción de clusterina podrían jugar un papel relevante en la progresión del crecimiento tumoral^{22,259}. Diferentes autores han reportado la sobreexpresión de clusterina en tumores de mama^{187,199,201,202}. Sin embargo, en los tumores analizados en este trabajo no encontramos diferencias en la expresión de clusterina entre los tejidos tumorales y sanos. Esta disparidad entre nuestros resultados y la bibliografía podría explicarse por diferencias metodológicas; mientras que en los estudios reportados en la literatura evalúan la expresión de clusterina por inmunohistoquímica en muestras fijadas en parafina, en este trabajo cuantificamos la expresión de clusterina por ELISA en sobrenadantes obtenidos luego del procesamiento de tumores frescos. Cabe mencionar que, en los cortes evaluados por inmunohistoquímica en este trabajo de tesis, solo realizamos un análisis cualitativo

detectando la expresión de clusterina tanto en el citoplasma celular como en secciones correspondientes al estroma tumoral.

Los tumores son más que una masa proliferante de células, se comportan como tejidos complejos con diferentes tipos celulares que interactúan unos con otros y con el microambiente tumoral para poder sobrevivir. El microambiente ejerce profundos efectos tanto sobre las propias células tumorales como también sobre las células del sistema inmune, tendientes a favorecer el escape del tumor a la respuesta inmune. Aunque la clusterina secretoria representa uno de los numerosos factores que median la información entre las células y el microambiente tumoral que las rodea, el rol específico de la clusterina secretoria y el impacto de su glicosilación han sido pobremente estudiados hasta el momento. En la literatura la sobreexpresión de clusterina ha sido largamente asociada a la resistencia al tratamiento quimioterapéutico^{22,193-197,205,260}, efecto mediado, al menos parcialmente, a través de un incremento en la forma citoplasmática de clusterina, la que mediaría un efecto anti-apoptótico. La evidencia acumulada hasta ahora se enfoca en la importancia entre este balance en la expresión de sus formas nuclear (pro-apoptótica) y citoplasmática (anti-apoptótica), balance que parece depender de la interacción con el microambiente tumoral^{22,232}. Las muestras utilizadas en este trabajo corresponden a pacientes sin tratamiento quimioterapéutico adyuvante previo a la resección quirúrgica del tumor. Sería interesante evaluar en futuros proyectos, la expresión de clusterina en muestras de pacientes que si recibieron tratamiento quimioterapéutico adyuvante para poder comparar los resultados de expresión de clusterina con los obtenidos en este trabajo.

En esta tesis demostramos, mediante la unión de lectinas y anticuerpos anti-LewisX, que la clusterina expresada en tumores de mama presenta motivos fucosilados, en forma similar a lo que ocurre en el plasma seminal. En experimentos futuros intentaremos purificar clusterina tumoral a fin de poder realizar un análisis detallado de su glicosilación. La baja concentración de clusterina en las muestras y el escaso material

que recibimos constituye una de las limitantes más importantes para avanzar en este sentido. De todas formas, hemos logrado analizar mediante western blot tres muestras tumorales, y pudimos determinar que la clusterina tumoral es capaz de unirse a DC-SIGN, mientras que la clusterina expresada en el tejido yuxtatumoral no comparte esta actividad. Estos resultados nos permiten especular que, mediante la unión a DC-SIGN, la clusterina tumoral pudiera inducir la endocitosis de proteínas tumorales por CDs o macrófagos en un contexto tolerogénico, determinado por la clusterina y otros componentes del microambiente tumoral, favoreciendo el escape tumoral a la respuesta inmune. Experimentos adicionales están en marcha en nuestro laboratorio para testear estas hipótesis.

9.5. Glicosilación, clusterina fucosilada y cáncer

Los glicanos median una amplia variedad de funciones biológicas que incluyen muchos de los procesos críticos en el desarrollo y la homeostasis de la respuesta inmune. Tanto los glicanos presentes en las glicoproteínas secretadas como los que recubren la superficie celular, son generados gracias una maquinaria coordinada de glicosiltransferasas y glicosidasas presentes en retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. La expresión de estas enzimas se encuentra altamente regulada y puede variar notablemente en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos o patológicos. Eventos cruciales de la respuesta inmune tales como la activación y diferenciación de linfocitos T o la maduración de las células dendríticas imponen extensos cambios en la expresión de estas enzimas y, consecuentemente, en el patrón de glicanos expresados por las estas células²⁶¹. En esta tesis hemos señalado que la glicosilación de la clusterina modula sus propiedades biológicas. En este sentido, podemos especular que el patrón de glicosilación y la función de la clusterina en diferentes órganos, no solo en los tumores, podría modificarse en función del influjo de señales inflamatorias o tolerogénicas.

La aparición de motivos que contienen fucosa, en particular los motivos Lewis X y Lewis Y, ha sido asociada en muchos trabajos con el desarrollo del cáncer y con una mayor agresividad tumoral. En este sentido, hallazgos recientes han demostrado que las glicoproteínas MUC-1, Mac2 y el antígeno carcinoembrionario, cuando son producidas por tumores, presentan un patrón de glicosilación que les permite unirse a DC-SIGN, promoviendo una respuesta de tipo Th2, ineficiente para eliminar el tumor^{234,261}. Los resultados presentados en esta tesis sugieren que, al igual que la clusterina del plasma seminal, la clusterina fucosilada producida por tumores podría interactuar con las CDs a través de DC-SIGN favoreciendo el escape tumoral de la respuesta inmune. En esta tesis no hemos podido purificar una cantidad suficiente de clusterina a partir de muestras tumorales a fin de realizar experimentos funcionales que nos permitan analizar su actividad biológica. Esperamos que, en el futuro, el reclutamiento de más pacientes o la obtención de muestras de mayor tamaño nos permitan sortear esta dificultad.

Otro aspecto interesante, que aún no hemos estudiado, es el papel que podría jugar la actividad de chaperona de la clusterina en el microambiente tumoral. Especulamos que la clusterina fucosilada secretada por los tumores también podría actuar como chaperona extracelular, dirigiendo proteínas estresadas presentes en el microambiente tumoral hacia DC-SIGN en CDs para su posterior presentación en un contexto tolerogénico. La generación de neoantígenos es un proceso sumamente importante para el reconocimiento del tumor por el sistema inmune y numerosos trabajos han reportado la existencia de linfocitos citotóxicos específicos contra ellos^{236,237}. Para generar una respuesta inmune efectiva contra los neoantígenos tumorales, es necesario un ambiente inflamatorio y no uno supresor de la respuesta inmune. En este contexto, la clusterina fucosilada presente en el microambiente tumoral, actuando en consonancia con otros agentes inmunomoduladores, podría contribuir a la tolerancia inmunológica hacia los neoantígenos tumorales.

9.6. Presencia de macrófagos DC-SIGN positivos en tumores de mama

La expresión de DC-SIGN en CD45 o macrófagos ha sido descrita en diferentes tumores, tales como el carcinoma de colon, pulmón, estómago, ovario o mama entre otros^{220-222,234,262}. Jubb y cols. analizaron mediante inmunohistoquímica la expresión de diferentes marcadores “inflamatorios” en muestras de adenocarcinoma mamario. De todos los marcadores analizados, solamente DC-SIGN y CD68 resultaron asociados con una menor supervivencia²²⁰. Posteriormente Dominguez-Soto y colaboradores detectaron la expresión de DC-SIGN en tumores gástricos, de mama, pancreáticos y de ovario. Estos autores, mediante citometría de flujo en muestras de ascitis de paciente con cáncer de ovario, analizaron la naturaleza de células que expresan DC-SIGN. La co-expresión de CD68 y CD163 llevó a los autores a sugerir que las células DC-SIGN positivas presentes en el líquido ascítico corresponden a macrófagos²⁶². En esta tesis, analizando 12 parámetros en forma simultánea, identificamos a los macrófagos como las células que expresan DC-SIGN dentro de las muestras de tumores de mama, descartando la presencia de este receptor en CD45 mieloides y plasmacitoides.

Los macrófagos asociados a tumores (TAMs, de sus siglas en inglés) son un componente importante de la masa celular del tejido tumoral^{263,264}. Estudios en ratones han demostrado que los TAMs promueven pasos importantes en la progresión tumoral incluyendo la angiogénesis, la invasión, las metástasis y la supresión de la respuesta inmune adaptativa anti-tumoral²⁶⁵. A su vez, los TAMs también limitan la eficiencia de varias formas de terapias anti-tumorales²⁶⁶. Diferentes estudios clínicos han demostrado la asociación entre un alto infiltrado de TAMs en tumores y un peor pronóstico en hepatocarcinoma, cáncer de ovario y de cáncer de mama, entre otros^{262,267-271}.

Un conjunto de sustancias producidas tanto por las células tumorales como por el estroma actúan sobre los monocitos induciendo su diferenciación a TAMs, los cuales son “utilizados” por el tumor para evadir a la respuesta inmune adaptativa, evitando la destrucción de las células malignas. Entre estas sustancias podemos destacar a las

citoquinas anti-inflamatorias IL-4, IL-10, IL-13, y TGF- β , glucocorticoides, componentes de la matriz extracelular y complejos inmunes. ¿Podría la clusterina fucosilada, mediante su interacción con DC-SIGN, promover la diferenciación de monocitos a macrófagos capaces de promover el crecimiento y la supervivencia tumoral? Este es uno de los interrogantes que intentaremos responder con los próximos experimentos en nuestro laboratorio.

Referencias

- 1 Blaschuk, O., Burdzy, K. & Fritz, I. B. Purification and characterization of a cell-aggregating factor (clusterin), the major glycoprotein in ram rete testis fluid. *The Journal of biological chemistry* **258**, 7714-7720 (1983).
- 2 Fritz, I. B., Burdzy, K., Setchell, B. & Blaschuk, O. Ram rete testis fluid contains a protein (clusterin) which influences cell-cell interactions in vitro. *Biology of reproduction* **28**, 1173-1188 (1983).
- 3 Jones, S. E. & Jomary, C. Clusterin. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 427-431 (2002).
- 4 de Silva, H. V. *et al.* A 70-kDa apolipoprotein designated ApoJ is a marker for subclasses of human plasma high density lipoproteins. *The Journal of biological chemistry* **265**, 13240-13247 (1990).
- 5 Aronow, B. J., Lund, S. D., Brown, T. L., Harmony, J. A. & Witte, D. P. Apolipoprotein J expression at fluid-tissue interfaces: potential role in barrier cytoprotection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **90**, 725-729 (1993).
- 6 Rizzi, F. & Bettuzzi, S. The clusterin paradigm in prostate and breast carcinogenesis. *Endocr Relat Cancer* **17**, R1-17 (2010).
- 7 Andersen, C. L. *et al.* Clusterin expression in normal mucosa and colorectal cancer. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **6**, 1039-1048, doi:10.1074/mcp.M600261-MCP200 (2007).
- 8 de Silva, H. V. *et al.* Purification and characterization of apolipoprotein J. *The Journal of biological chemistry* **265**, 14292-14297 (1990).
- 9 de Silva, H. V., Harmony, J. A., Stuart, W. D., Gil, C. M. & Robbins, J. Apolipoprotein J: structure and tissue distribution. *Biochemistry* **29**, 5380-5389 (1990).
- 10 Burkey, B. F., deSilva, H. V. & Harmony, J. A. Intracellular processing of apolipoprotein J precursor to the mature heterodimer. *J Lipid Res* **32**, 1039-1048 (1991).
- 11 Choi-Miura, N. H., Takahashi, Y., Nakano, Y., Tobe, T. & Tomita, M. Identification of the disulfide bonds in human plasma protein SP-40,40 (apolipoprotein-J). *J Biochem* **112**, 557-561 (1992).
- 12 Reddy, K. B., Jin, G., Karode, M. C., Harmony, J. A. & Howe, P. H. Transforming growth factor beta (TGF beta)-induced nuclear localization of apolipoprotein

- J/clusterin in epithelial cells. *Biochemistry* **35**, 6157-6163 (1996).
- 13 Wong, P. *et al.* Clusterin protein diversity in the primate eye. *Mol Vis* **6**, 184-191 (2000).
- 14 Kapron, J. T. *et al.* Identification and characterization of glycosylation sites in human serum clusterin. *Protein Sci* **6**, 2120-2133 (1997).
- 15 Tschopp, J. & French, L. E. Clusterin: modulation of complement function. *Clin Exp Immunol* **97 Suppl 2**, 11-14 (1994).
- 16 Zhang, H. *et al.* Clusterin inhibits apoptosis by interacting with activated Bax. *Nat Cell Biol* **7**, 909-915 (2005).
- 17 Kim, N. *et al.* Human nuclear clusterin mediates apoptosis by interacting with Bcl-XL through C-terminal coiled coil domain. *J Cell Physiol* **227**, 1157-1167, doi:10.1002/jcp.22836 (2012).
- 18 Wilson, M. R. & Easterbrook-Smith, S. B. Clusterin is a secreted mammalian chaperone. *Trends Biochem Sci* **25**, 95-98 (2000).
- 19 Murphy, B. F., Kirszbaum, L., Walker, I. D. & d'Apice, A. J. SP-40,40, a newly identified normal human serum protein found in the SC5b-9 complex of complement and in the immune deposits in glomerulonephritis. *The Journal of clinical investigation* **81**, 1858-1864, doi:10.1172/JCI113531 (1988).
- 20 Tschopp, J., Chonn, A., Hertig, S. & French, L. E. Clusterin, the human apolipoprotein and complement inhibitor, binds to complement C7, C8 beta, and the b domain of C9. *Journal of immunology* **151**, 2159-2165 (1993).
- 21 Leskov, K. S., Klokov, D. Y., Li, J., Kinsella, T. J. & Boothman, D. A. Synthesis and functional analyses of nuclear clusterin, a cell death protein. *The Journal of biological chemistry* **278**, 11590-11600 (2003).
- 22 Trougakos, I. P., Djeu, J. Y., Gonos, E. S. & Boothman, D. A. Advances and challenges in basic and translational research on clusterin. *Cancer Res* **69**, 403-406 (2009).
- 23 Wyatt, A., Yerbury, J., Poon, S., Dabbs, R. & Wilson, M. Chapter 6: The chaperone action of Clusterin and its putative role in quality control of extracellular protein folding. *Advances in cancer research* **104**, 89-114 (2009).
- 24 Wyatt, A. R., Yerbury, J. J. & Wilson, M. R. Structural characterization of clusterin-chaperone client protein complexes. *The Journal of biological chemistry* **284**,

- 21920-21927 (2009).
- 25 Wyatt, A. R., Yerbury, J. J., Ecroyd, H. & Wilson, M. R. Extracellular chaperones and proteostasis. *Annu Rev Biochem* **82**, 295-322 (2013).
- 26 Wyatt, A. R., Zammit, N. W. & Wilson, M. R. Acute phase proteins are major clients for the chaperone action of alpha(2)-macroglobulin in human plasma. *Cell Stress Chaperones* **18**, 161-170 (2013).
- 27 Yerbury, J. J., Rybchyn, M. S., Easterbrook-Smith, S. B., Henriques, C. & Wilson, M. R. The acute phase protein haptoglobin is a mammalian extracellular chaperone with an action similar to clusterin. *Biochemistry* **44**, 10914-10925 (2005).
- 28 Poon, S., Easterbrook-Smith, S. B., Rybchyn, M. S., Carver, J. A. & Wilson, M. R. Clusterin is an ATP-independent chaperone with very broad substrate specificity that stabilizes stressed proteins in a folding-competent state. *Biochemistry* **39**, 15953-15960 (2000).
- 29 Bailey, R. & Griswold, M. D. Clusterin in the male reproductive system: localization and possible function. *Mol Cell Endocrinol* **151**, 17-23 (1999).
- 30 Humphreys, D., Hochgrebe, T. T., Easterbrook-Smith, S. B., Tenniswood, M. P. & Wilson, M. R. Effects of clusterin overexpression on TNFalpha- and TGFbeta-mediated death of L929 cells. *Biochemistry* **36**, 15233-15243 (1997).
- 31 Poon, S. *et al.* Mildly acidic pH activates the extracellular molecular chaperone clusterin. *The Journal of biological chemistry* **277**, 39532-39540 (2002).
- 32 Poon, S., Treweek, T. M., Wilson, M. R., Easterbrook-Smith, S. B. & Carver, J. A. Clusterin is an extracellular chaperone that specifically interacts with slowly aggregating proteins on their off-folding pathway. *FEBS Lett* **513**, 259-266 (2002).
- 33 Bajari, T. M., Strasser, V., Nimpf, J. & Schneider, W. J. A model for modulation of leptin activity by association with clusterin. *Faseb J* **17**, 1505-1507 (2003).
- 34 Hammad, S. M., Ranganathan, S., Loukinova, E., Twal, W. O. & Argraves, W. S. Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide. *The Journal of biological chemistry* **272**, 18644-18649 (1997).
- 35 Kounnas, M. Z. *et al.* Identification of glycoprotein 330 as an endocytic receptor for apolipoprotein J/clusterin. *The Journal of biological chemistry* **270**, 13070-13075 (1995).

- 36 Lambert, J. C. & Amouyel, P. Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? *Curr Opin Genet Dev* **21**, 295-301 (2011).
- 37 Wilson, M. R., Yerbury, J. J. & Poon, S. Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity. *Mol Biosyst* **4**, 42-52 (2008).
- 38 Yerbury, J. J. *et al.* The extracellular chaperone clusterin influences amyloid formation and toxicity by interacting with prefibrillar structures. *Faseb J* **21**, 2312-2322 (2007).
- 39 McHattie, S. & Edington, N. Clusterin prevents aggregation of neuropeptide 106-126 in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **259**, 336-340 (1999).
- 40 Hatters, D. M., Wilson, M. R., Easterbrook-Smith, S. B. & Howlett, G. J. Suppression of apolipoprotein C-II amyloid formation by the extracellular chaperone, clusterin. *Eur J Biochem* **269**, 2789-2794 (2002).
- 41 Matsubara, E., Soto, C., Governale, S., Frangione, B. & Ghiso, J. Apolipoprotein J and Alzheimer's amyloid beta solubility. *Biochem J* **316 (Pt 2)**, 671-679 (1996).
- 42 Klock, G., Baiersdorfer, M. & Koch-Brandt, C. Chapter 7: Cell protective functions of secretory Clusterin (sCLU). *Advances in cancer research* **104**, 115-138, doi:10.1016/S0065-230X(09)04007-X (2009).
- 43 Pucci, S. & Bettuzzi, S. Chapter 3: The shifting balance between CLU forms during tumor progression. *Advances in cancer research* **104**, 25-32, doi:10.1016/S0065-230X(09)04003-2 (2009).
- 44 Sabatte, J. *et al.* Human seminal plasma abrogates the capture and transmission of human immunodeficiency virus type 1 to CD4+ T cells mediated by DC-SIGN. *J Virol* **81**, 13723-13734 (2007).
- 45 Sabatte, J. *et al.* Semen clusterin is a novel DC-SIGN ligand. *Journal of immunology* **187**, 5299-5309 (2011).
- 46 Clark, G. F. *et al.* Tumor biomarker glycoproteins in the seminal plasma of healthy human males are endogenous ligands for DC-SIGN. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **11**, M111 008730 (2012).
- 47 Saraswat, M. *et al.* N-Glycoproteomics of Human Seminal Plasma Glycoproteins. *J Proteome Res* **15**, 991-1001, doi:10.1021/acs.jproteome.5b01069 (2016).
- 48 Reis e Sousa, C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* **6**, 476-483

- (2006).
- 49 Guernonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. & Amigorena, S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annual review of immunology* **20**, 621-667 (2002).
 - 50 Mellman, I. & Steinman, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* **106**, 255-258 (2001).
 - 51 Steinman, R. M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M. C. Tolerogenic dendritic cells. *Annual review of immunology* **21**, 685-711 (2003).
 - 52 Delgado, M., Gonzalez-Rey, E. & Ganea, D. The neuropeptide vasoactive intestinal peptide generates tolerogenic dendritic cells. *Journal of immunology* **175**, 7311-7324 (2005).
 - 53 Ferreira, G. B. *et al.* Differential Protein Pathways in 1,25-Dihydroxyvitamin D(3) and Dexamethasone Modulated Tolerogenic Human Dendritic Cells. *J Proteome Res* (2012).
 - 54 Cools, N. *et al.* Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4+ regulatory T cells. *J Cell Mol Med* **12**, 690-700 (2008).
 - 55 Ilarregui, J. M. *et al.* Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nature immunology* **10**, 981-991 (2009).
 - 56 Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. Innate immune recognition. *Annual review of immunology* **20**, 197-216 (2002).
 - 57 Shaw, M. H., Reimer, T., Kim, Y. G. & Nunez, G. NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. *Current opinion in immunology* **20**, 377-382 (2008).
 - 58 Takeuchi, O. & Akira, S. MDA5/RIG-I and virus recognition. *Current opinion in immunology* **20**, 17-22 (2008).
 - 59 Weis, W. I., Taylor, M. E. & Drickamer, K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunological reviews* **163**, 19-34 (1998).
 - 60 Sabatte, J. *et al.* Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine & growth factor reviews* **18**, 5-17 (2007).

- 61 Carta, S. *et al.* DAMPs and inflammatory processes: the role of redox in the different outcomes. *Journal of leukocyte biology* **86**, 549-555 (2009).
- 62 van Kooyk, Y. & Geijtenbeek, T. B. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol* **3**, 697-709 (2003).
- 63 Figdor, C. G., van Kooyk, Y. & Adema, G. J. C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells. *Nat Rev Immunol* **2**, 77-84 (2002).
- 64 Geijtenbeek, T. B. *et al.* Identification of different binding sites in the dendritic cell-specific receptor DC-SIGN for intercellular adhesion molecule 3 and HIV-1. *The Journal of biological chemistry* **277**, 11314-11320 (2002).
- 65 Higashi, N. *et al.* The macrophage C-type lectin specific for galactose/N-acetylgalactosamine is an endocytic receptor expressed on monocyte-derived immature dendritic cells. *The Journal of biological chemistry* **277**, 20686-20693 (2002).
- 66 Higashi, N. *et al.* Human macrophage lectin specific for galactose/N-acetylgalactosamine is a marker for cells at an intermediate stage in their differentiation from monocytes into macrophages. *Int Immunol* **14**, 545-554 (2002).
- 67 Engering, A. *et al.* The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *Journal of immunology* **168**, 2118-2126 (2002).
- 68 Kammerer, U. *et al.* Unique appearance of proliferating antigen-presenting cells expressing DC-SIGN (CD209) in the decidua of early human pregnancy. *The American journal of pathology* **162**, 887-896 (2003).
- 69 Relloso, M. *et al.* DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *Journal of immunology* **168**, 2634-2643 (2002).
- 70 Granelli-Piperno, A. *et al.* Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin/CD209 is abundant on macrophages in the normal human lymph node and is not required for dendritic cell stimulation of the mixed leukocyte reaction. *Journal of immunology* **175**, 4265-4273 (2005).
- 71 Mitchell, D. A., Fadden, A. J. & Drickamer, K. A novel mechanism of carbohydrate recognition by the C-type lectins DC-SIGN and DC-SIGNR. Subunit organization and binding to multivalent ligands. *The Journal of biological chemistry* **276**, 28939-28945 (2001).

- 72 Kwon, D. S., Gregorio, G., Bitton, N., Hendrickson, W. A. & Littman, D. R. DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection. *Immunity* **16**, 135-144 (2002).
- 73 Reina, J. J. R., J. . Glycodendritic structures: tools to interact with DC-SIGN. *Braz. J. Pharm* **49**, 109-124 (2013).
- 74 Guo, Y. *et al.* Structural basis for distinct ligand-binding and targeting properties of the receptors DC-SIGN and DC-SIGNR. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 591-598 (2004).
- 75 Varki A, C. R., Esko JD. Essentials of Glycobiology. 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press* (2009).
- 76 Geijtenbeek, T. B. & van Kooyk, Y. Pathogens target DC-SIGN to influence their fate DC-SIGN functions as a pathogen receptor with broad specificity. *Apmis* **111**, 698-714 (2003).
- 77 Bergman, M. P. *et al.* Helicobacter pylori modulates the T helper cell 1/T helper cell 2 balance through phase-variable interaction between lipopolysaccharide and DC-SIGN. *The Journal of experimental medicine* **200**, 979-990, doi:10.1084/jem.20041061 (2004).
- 78 Moran, A. P. Relevance of fucosylation and Lewis antigen expression in the bacterial gastroduodenal pathogen Helicobacter pylori. *Carbohydr Res* **343**, 1952-1965, doi:10.1016/j.carres.2007.12.012 (2008).
- 79 Bergman, M., Del Prete, G., van Kooyk, Y. & Appelmelk, B. Helicobacter pylori phase variation, immune modulation and gastric autoimmunity. *Nat Rev Microbiol* **4**, 151-159, doi:10.1038/nrmicro1344 (2006).
- 80 Yoshida, K. I. *et al.* Serial lectin affinity chromatography with concavalin A and wheat germ agglutinin demonstrates altered asparagine-linked sugar-chain structures of prostatic acid phosphatase in human prostate carcinoma. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* **695**, 439-443 (1997).
- 81 den Dunnen, J., Gringhuis, S. I. & Geijtenbeek, T. B. Innate signaling by the C-type lectin DC-SIGN dictates immune responses. *Cancer Immunol Immunother* **58**, 1149-1157, doi:10.1007/s00262-008-0615-1 (2009).
- 82 Sancho, D. & Reis e Sousa, C. Signaling by myeloid C-type lectin receptors in immunity and homeostasis. *Annual review of immunology* **30**, 491-529, doi:10.1146/annurev-immunol-031210-101352 (2012).
- 83 Geijtenbeek, T. B. & Gringhuis, S. I. C-type lectin receptors in the control of T

- helper cell differentiation. *Nat Rev Immunol* **16**, 433-448, doi:10.1038/nri.2016.55 (2016).
- 84 Gringhuis, S. I., den Dunnen, J., Litjens, M., van der Vlist, M. & Geijtenbeek, T. B. Carbohydrate-specific signaling through the DC-SIGN signalosome tailors immunity to *Mycobacterium tuberculosis*, HIV-1 and *Helicobacter pylori*. *Nature immunology* **10**, 1081-1088 (2009).
- 85 Gringhuis, S. I., Kaptein, T. M., Wevers, B. A., Mesman, A. W. & Geijtenbeek, T. B. Fucose-specific DC-SIGN signalling directs T helper cell type-2 responses via I κ B ϵ - and CYLD-dependent Bcl3 activation. *Nature communications* **5**, 3898, doi:10.1038/ncomms4898 (2014).
- 86 Gringhuis, S. I. *et al.* Fucose-based PAMPs prime dendritic cells for follicular T helper cell polarization via DC-SIGN-dependent IL-27 production. *Nature communications* **5**, 5074 (2014).
- 87 Conde, P. *et al.* DC-SIGN(+) Macrophages Control the Induction of Transplantation Tolerance. *Immunity* **42**, 1143-1158, doi:10.1016/j.immuni.2015.05.009 (2015).
- 88 Ibrahim, N. M., Foster, D. N. & Crabo, B. G. Localization of clusterin on freeze-preserved bull spermatozoa before and after glass wool-sephadex filtration. *Journal of andrology* **22**, 891-902 (2001).
- 89 Han, Z. *et al.* Presence, localization, and origin of clusterin in normal human spermatozoa. *Journal of assisted reproduction and genetics* **29**, 751-757, doi:10.1007/s10815-012-9779-x (2012).
- 90 Sylvester, S. R., Skinner, M. K. & Griswold, M. D. A sulfated glycoprotein synthesized by Sertoli cells and by epididymal cells is a component of the sperm membrane. *Biology of reproduction* **31**, 1087-1101 (1984).
- 91 Sylvester, S. R., Morales, C., Oko, R. & Griswold, M. D. Localization of sulfated glycoprotein-2 (clusterin) on spermatozoa and in the reproductive tract of the male rat. *Biology of reproduction* **45**, 195-207 (1991).
- 92 Veeramachaneni, D. N. & Amann, R. P. Endocytosis of androgen-binding protein, clusterin, and transferrin in the efferent ducts and epididymis of the ram. *Journal of andrology* **12**, 288-294 (1991).
- 93 Leger, J. G., Montpetit, M. L. & Tenniswood, M. P. Characterization and cloning of androgen-repressed mRNAs from rat ventral prostate. *Biochem Biophys Res Commun* **147**, 196-203 (1987).

- 94 Sensibar, J. A. *et al.* Prostatic ductal system in rats: regional variation in localization of an androgen-repressed gene product, sulfated glycoprotein-2. *Endocrinology* **128**, 2091-2102, doi:10.1210/endo-128-4-2091 (1991).
- 95 Matsushita, K., Miyake, H., Chiba, K. & Fujisawa, M. Clusterin produced by Sertoli cells inhibits heat stress-induced apoptosis in the rat testis. *Andrologia* **48**, 11-19, doi:10.1111/and.12404 (2016).
- 96 Zalata, A. *et al.* Seminal clusterin gene expression associated with seminal variables in fertile and infertile men. *The Journal of urology* **188**, 1260-1264, doi:10.1016/j.juro.2012.06.012 (2012).
- 97 Salehi, M. *et al.* Correlation between human clusterin in seminal plasma with sperm protamine deficiency and DNA fragmentation. *Molecular reproduction and development* **80**, 718-724, doi:10.1002/mrd.22202 (2013).
- 98 Fukuda, T., Miyake, H., Enatsu, N., Matsushita, K. & Fujisawa, M. Seminal level of clusterin in infertile men as a significant biomarker reflecting spermatogenesis. *Andrologia* **48**, 1188-1194, doi:10.1111/and.12558 (2016).
- 99 Billingham, R. E., Brent, L. & Medawar, P. B. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature* **172**, 603-606 (1953).
- 100 Zenclussen, A. C. Adaptive immune responses during pregnancy. *American journal of reproductive immunology* **69**, 291-303, doi:10.1111/aji.12097 (2013).
- 101 Tafuri, A., Alferink, J., Moller, P., Hammerling, G. J. & Arnold, B. T cell awareness of paternal alloantigens during pregnancy. *Science* **270**, 630-633 (1995).
- 102 Mattsson, R. The non-expression of MHC class II in trophoblast cells. *American journal of reproductive immunology* **40**, 383-384 (1998).
- 103 Collins, M. K., Tay, C. S. & Erlebacher, A. Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice. *The Journal of clinical investigation* **119**, 2062-2073, doi:10.1172/JCI38714 (2009).
- 104 Kamimura, S., Eguchi, K., Yonezawa, M. & Sekiba, K. Localization and developmental change of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the human placenta. *Acta medica Okayama* **45**, 135-139 (1991).
- 105 Munn, D. H. *et al.* Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* **281**, 1191-1193 (1998).

- 106 Xu, C. *et al.* A critical role for murine complement regulator crry in fetomaternal tolerance. *Science* **287**, 498-501 (2000).
- 107 Kovats, S. *et al.* A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* **248**, 220-223 (1990).
- 108 Munoz-Suano, A., Hamilton, A. B. & Betz, A. G. Gimme shelter: the immune system during pregnancy. *Immunological reviews* **241**, 20-38, doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01002.x (2011).
- 109 Robertson, S. A., Prins, J. R., Sharkey, D. J. & Moldenhauer, L. M. Seminal fluid and the generation of regulatory T cells for embryo implantation. *American journal of reproductive immunology* **69**, 315-330, doi:10.1111/aji.12107 (2013).
- 110 Aluvihare, V. R., Kallikourdis, M. & Betz, A. G. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nature immunology* **5**, 266-271, doi:10.1038/ni1037 (2004).
- 111 Zenclussen, A. C. *et al.* Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *European journal of immunology* **36**, 82-94, doi:10.1002/eji.200535428 (2006).
- 112 Tilburgs, T. *et al.* Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4⁺CD25^{bright} regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. *Journal of immunology* **180**, 5737-5745 (2008).
- 113 Rowe, J. H., Ertelt, J. M., Xin, L. & Way, S. S. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature* **490**, 102-106, doi:10.1038/nature11462 (2012).
- 114 Samstein, R. M., Josefowicz, S. Z., Arvey, A., Treuting, P. M. & Rudensky, A. Y. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell* **150**, 29-38, doi:10.1016/j.cell.2012.05.031 (2012).
- 115 Ernerudh, J., Berg, G. & Mjosberg, J. Regulatory T helper cells in pregnancy and their roles in systemic versus local immune tolerance. *American journal of reproductive immunology* **66 Suppl 1**, 31-43, doi:10.1111/j.1600-0897.2011.01049.x (2011).
- 116 Winger, E. E. & Reed, J. L. Low circulating CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ T regulatory cell levels predict miscarriage risk in newly pregnant women with a history of failure. *American journal of reproductive immunology* **66**, 320-328, doi:10.1111/j.1600-0897.2011.00992.x (2011).
- 117 Sasaki, Y. *et al.* Decidual and peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in

- early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Molecular human reproduction* **10**, 347-353, doi:10.1093/molehr/gah044 (2004).
- 118 Somerset, D. A., Zheng, Y., Kilby, M. D., Sansom, D. M. & Drayson, M. T. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25+ CD4+ regulatory T-cell subset. *Immunology* **112**, 38-43, doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01869.x (2004).
- 119 Saito, S., Sasaki, Y. & Sakai, M. CD4(+)CD25high regulatory T cells in human pregnancy. *Journal of reproductive immunology* **65**, 111-120, doi:10.1016/j.jri.2005.01.004 (2005).
- 120 Jin, L. P., Chen, Q. Y., Zhang, T., Guo, P. F. & Li, D. J. The CD4+CD25 bright regulatory T cells and CTLA-4 expression in peripheral and decidual lymphocytes are down-regulated in human miscarriage. *Clinical immunology* **133**, 402-410, doi:10.1016/j.clim.2009.08.009 (2009).
- 121 Zenclussen, A. C. *et al.* Abnormal T-cell reactivity against paternal antigens in spontaneous abortion: adoptive transfer of pregnancy-induced CD4+CD25+ T regulatory cells prevents fetal rejection in a murine abortion model. *The American journal of pathology* **166**, 811-822, doi:10.1016/S0002-9440(10)62302-4 (2005).
- 122 Shima, T. *et al.* Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice. *Journal of reproductive immunology* **85**, 121-129, doi:10.1016/j.jri.2010.02.006 (2010).
- 123 Kallikourdis, M., Andersen, K. G., Welch, K. A. & Betz, A. G. Alloantigen-enhanced accumulation of CCR5+ 'effector' regulatory T cells in the gravid uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 594-599, doi:10.1073/pnas.0604268104 (2007).
- 124 Guerin, L. R. *et al.* Seminal fluid regulates accumulation of FOXP3+ regulatory T cells in the preimplantation mouse uterus through expanding the FOXP3+ cell pool and CCL19-mediated recruitment. *Biology of reproduction* **85**, 397-408 (2011).
- 125 Fung, K. Y., Glode, L. M., Green, S. & Duncan, M. W. A comprehensive characterization of the peptide and protein constituents of human seminal fluid. *Prostate* **61**, 171-181 (2004).
- 126 Katnik-Prastowska, I., Kratz, E. M., Faundez, R. & Chelmonska-Soyta, A. Lower expression of the alpha2,3-sialylated fibronectin glycoform and appearance of the asialo-fibronectin glycoform are associated with high concentrations of fibronectin in human seminal plasma with abnormal semen parameters. *Clinical chemistry and laboratory medicine* **44**, 1119-1125, doi:10.1515/CCLM.2006.193 (2006).

- 127 Kratz, E. M., Faundez, R. & Katnik-Prastowska, I. Fucose and sialic acid expressions in human seminal fibronectin and alpha{1} -acid glycoprotein associated with leukocytospermia of infertile men. *Disease markers* **31**, 317-325, doi:10.3233/DMA-2011-0846 (2011).
- 128 Olejnik, B., Kratz, E. M., Zimmer, M. & Ferens-Sieczkowska, M. Glycoprotein fucosylation is increased in seminal plasma of subfertile men. *Asian journal of andrology* **17**, 274-280, doi:10.4103/1008-682X.138187 (2015).
- 129 Bouvet, J. P., Gresenguet, G. & Belec, L. Vaginal pH neutralization by semen as a cofactor of HIV transmission. *Clin Microbiol Infect* **3**, 19-23 (1997).
- 130 Bouhlal, H. *et al.* Opsonization of HIV-1 by semen complement enhances infection of human epithelial cells. *Journal of immunology* **169**, 3301-3306 (2002).
- 131 Berlier, W. *et al.* Seminal plasma promotes the attraction of Langerhans cells via the secretion of CCL20 by vaginal epithelial cells: involvement in the sexual transmission of HIV. *Human reproduction* **21**, 1135-1142 (2006).
- 132 Sharkey, D. J., Macpherson, A. M., Tremellen, K. P. & Robertson, S. A. Seminal plasma differentially regulates inflammatory cytokine gene expression in human cervical and vaginal epithelial cells. *Molecular human reproduction* **13**, 491-501 (2007).
- 133 Kelly, R. W. Immunosuppressive mechanisms in semen: implications for contraception. *Human reproduction* **10**, 1686-1693 (1995).
- 134 Kelly, R. W. Immunomodulators in human seminal plasma: a vital protection for spermatozoa in the presence of infection? *Int J Androl* **22**, 2-12 (1999).
- 135 Kelly, R. W., Carr, G. G. & Critchley, H. O. A cytokine switch induced by human seminal plasma: an immune modulation with implications for sexually transmitted disease. *Human reproduction* **12**, 677-681 (1997).
- 136 Sharkey, D. J. *et al.* TGF-beta mediates proinflammatory seminal fluid signaling in human cervical epithelial cells. *Journal of immunology* **189**, 1024-1035, doi:10.4049/jimmunol.1200005 (2012).
- 137 Sharkey, D. J., Tremellen, K. P., Jasper, M. J., Gemzell-Danielsson, K. & Robertson, S. A. Seminal fluid induces leukocyte recruitment and cytokine and chemokine mRNA expression in the human cervix after coitus. *Journal of immunology* **188**, 2445-2454 (2012).
- 138 Johansson, M., Bromfield, J. J., Jasper, M. J. & Robertson, S. A. Semen activates the female immune response during early pregnancy in mice. *Immunology* **112**,

- 290-300 (2004).
- 139 Moldenhauer, L. M. *et al.* Cross-presentation of male seminal fluid antigens elicits T cell activation to initiate the female immune response to pregnancy. *Journal of immunology* **182**, 8080-8093 (2009).
- 140 Robertson, S. A. *et al.* Seminal fluid drives expansion of the CD4+CD25+ T regulatory cell pool and induces tolerance to paternal alloantigens in mice. *Biology of reproduction* **80**, 1036-1045 (2009).
- 141 Carver, J. A., Rekas, A., Thorn, D. C. & Wilson, M. R. Small heat-shock proteins and clusterin: intra- and extracellular molecular chaperones with a common mechanism of action and function? *IUBMB Life* **55**, 661-668 (2003).
- 142 Falgarone, G. & Chiocchia, G. Chapter 8: Clusterin: A multifacet protein at the crossroad of inflammation and autoimmunity. *Advances in cancer research* **104**, 139-170 (2009).
- 143 Wilson, M. R. & Easterbrook-Smith, S. B. Clusterin binds by a multivalent mechanism to the Fc and Fab regions of IgG. *Biochim Biophys Acta* **1159**, 319-326 (1992).
- 144 Wyatt, A. R. & Wilson, M. R. Identification of human plasma proteins as major clients for the extracellular chaperone clusterin. *The Journal of biological chemistry* **285**, 3532-3539 (2010).
- 145 Humphreys, D. T., Carver, J. A., Easterbrook-Smith, S. B. & Wilson, M. R. Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *The Journal of biological chemistry* **274**, 6875-6881 (1999).
- 146 Cambi, A., Beeren, I., Joosten, B., Fransen, J. A. & Figdor, C. G. The C-type lectin DC-SIGN internalizes soluble antigens and HIV-1 virions via a clathrin-dependent mechanism. *European journal of immunology* **39**, 1923-1928 (2009).
- 147 Sahlin, S., Hed, J. & Rundquist, I. Differentiation between attached and ingested immune complexes by a fluorescence quenching cytofluorometric assay. *J Immunol Methods* **60**, 115-124 (1983).
- 148 Huang, H. J., Lin, Y. L., Liu, C. F., Kao, H. F. & Wang, J. Y. Mite allergen decreases DC-SIGN expression and modulates human dendritic cell differentiation and function in allergic asthma. *Mucosal immunology* **4**, 519-527, doi:10.1038/mi.2011.17 (2011).
- 149 Hovius, J. W. *et al.* Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by

- impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS pathogens* **4**, e31, doi:10.1371/journal.ppat.0040031 (2008).
- 150 Smits, H. H. *et al.* Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *The Journal of allergy and clinical immunology* **115**, 1260-1267, doi:10.1016/j.jaci.2005.03.036 (2005).
- 151 Hsu, S. C. *et al.* Functional interaction of common allergens and a C-type lectin receptor, dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN), on human dendritic cells. *The Journal of biological chemistry* **285**, 7903-7910, doi:10.1074/jbc.M109.058370 (2010).
- 152 Chao, P. Z. *et al.* Dendritic cells respond to nasopharyngeal carcinoma cells through annexin A2-recognizing DC-SIGN. *Oncotarget* **6**, 159-170, doi:10.18632/oncotarget.2700 (2015).
- 153 Cai, M. *et al.* A Lectin-EGF antibody promotes regulatory T cells and attenuates nephrotoxic nephritis via DC-SIGN on dendritic cells. *Journal of translational medicine* **11**, 103, doi:10.1186/1479-5876-11-103 (2013).
- 154 Gringhuis, S. I. *et al.* C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* **26**, 605-616 (2007).
- 155 Ehrlich, P. Ueber den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* **5**, 273-290 (1909).
- 156 Burnet, M. Cancer; a biological approach. I. The processes of control. *British medical journal* **1**, 779-786 (1957).
- 157 Thomas, L. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States. *H. Lawrence, Ed.* (1959).
- 158 Rabinovich, G. A., Gabilovich, D. & Sotomayor, E. M. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annual review of immunology* **25**, 267-296 (2007).
- 159 Dunn, G. P., Old, L. J. & Schreiber, R. D. The three Es of cancer immunoediting. *Annual review of immunology* **22**, 329-360 (2004).
- 160 Bogen, B. Peripheral T cell tolerance as a tumor escape mechanism: deletion of CD4+ T cells specific for a monoclonal immunoglobulin idiotype secreted by a plasmacytoma. *European journal of immunology* **26**, 2671-2679 (1996).

- 161 Lee, P. P. *et al.* Characterization of circulating T cells specific for tumor-associated antigens in melanoma patients. *Nature medicine* **5**, 677-685 (1999).
- 162 Cuenca, A. *et al.* Extra-lymphatic solid tumor growth is not immunologically ignored and results in early induction of antigen-specific T-cell anergy: dominant role of cross-tolerance to tumor antigens. *Cancer Res* **63**, 9007-9015 (2003).
- 163 Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331**, 1565-1570, doi:10.1126/science.1203486 (2011).
- 164 Koscielny, S. *et al.* Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. *Br J Cancer* **49**, 709-715 (1984).
- 165 Carter, C. L., Allen, C. & Henson, D. E. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* **63**, 181-187 (1989).
- 166 Fisher, B. *et al.* Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer* **52**, 1551-1557 (1983).
- 167 Albertini, J. J. *et al.* Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in the patient with breast cancer. *JAMA* **276**, 1818-1822 (1996).
- 168 Bloom, H. J. & Richardson, W. W. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer* **11**, 359-377 (1957).
- 169 Elston, E. W. & Ellis, I. O. Method for grading breast cancer. *J Clin Pathol* **46**, 189-190 (1993).
- 170 McGuire, W. L. Steroid receptors in human breast cancer. *Cancer Res* **38**, 4289-4291 (1978).
- 171 Gapinski, P. V. & Donegan, W. L. Estrogen receptors and breast cancer: prognostic and therapeutic implications. *Surgery* **88**, 386-393 (1980).
- 172 Cheang, M. C. *et al.* Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst* **101**, 736-750, doi:10.1093/jnci/djp082 (2009).
- 173 Slamon, D. J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235**, 177-182 (1987).

- 174 Schroeter, C. A., De Potter, C. R., Rathsmann, K., Willighagen, R. G. & Greep, J. C. c-erbB-2 positive breast tumours behave more aggressively in the first years after diagnosis. *Br J Cancer* **66**, 728-734 (1992).
- 175 Nixon, A. J. *et al.* Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* **12**, 888-894, doi:10.1200/JCO.1994.12.5.888 (1994).
- 176 Kollias, J., Elston, C. W., Ellis, I. O., Robertson, J. F. & Blamey, R. W. Early-onset breast cancer--histopathological and prognostic considerations. *Br J Cancer* **75**, 1318-1323 (1997).
- 177 Perou, C. M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **406**, 747-752, doi:10.1038/35021093 (2000).
- 178 Sorlie, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10869-10874, doi:10.1073/pnas.191367098 (2001).
- 179 Sorlie, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 8418-8423, doi:10.1073/pnas.0932692100 (2003).
- 180 Schneider, B. P. *et al.* Triple-negative breast cancer: risk factors to potential targets. *Clin Cancer Res* **14**, 8010-8018, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1208 (2008).
- 181 Sala, A. *et al.* Regulation of CLU gene expression by oncogenes and epigenetic factors implications for tumorigenesis. *Advances in cancer research* **105**, 115-132, doi:10.1016/S0065-230X(09)05007-6 (2009).
- 182 Panico, F., Rizzi, F., Fabbri, L. M., Bettuzzi, S. & Luppi, F. Clusterin (CLU) and lung cancer. *Advances in cancer research* **105**, 63-76 (2009).
- 183 Mazzarelli, P., Pucci, S. & Spagnoli, L. G. CLU and colon cancer. The dual face of CLU: from normal to malignant phenotype. *Advances in cancer research* **105**, 45-61 (2009).
- 184 Rizzi, F. & Bettuzzi, S. Clusterin (CLU) and prostate cancer. *Advances in cancer research* **105**, 1-19 (2009).
- 185 Parczyk, K., Pilarsky, C., Rachel, U. & Koch-Brandt, C. Gp80 (clusterin; TRPM-2) mRNA level is enhanced in human renal clear cell carcinomas. *J Cancer Res*

- Clin Oncol* **120**, 186-188 (1994).
- 186 Steinberg, J. *et al.* Intracellular levels of SGP-2 (Clusterin) correlate with tumor grade in prostate cancer. *Clin Cancer Res* **3**, 1707-1711 (1997).
- 187 Redondo, M. *et al.* Overexpression of clusterin in human breast carcinoma. *The American journal of pathology* **157**, 393-399, doi:10.1016/S0002-9440(10)64552-X (2000).
- 188 Xie, D. *et al.* Up-regulated expression of cytoplasmic clusterin in human ovarian carcinoma. *Cancer* **103**, 277-283, doi:10.1002/cncr.20765 (2005).
- 189 Pucci, S., Bonanno, E., Pichiorri, F., Angeloni, C. & Spagnoli, L. G. Modulation of different clusterin isoforms in human colon tumorigenesis. *Oncogene* **23**, 2298-2304, doi:10.1038/sj.onc.1207404 (2004).
- 190 Watari, H. *et al.* Clusterin expression predicts survival of invasive cervical cancer patients treated with radical hysterectomy and systematic lymphadenectomy. *Gynecol Oncol* **108**, 527-532, doi:10.1016/j.ygyno.2007.11.026 (2008).
- 191 Mourra, N., Couvelard, A., Tiret, E., Olschwang, S. & Flejou, J. F. Clusterin is highly expressed in pancreatic endocrine tumours but not in solid pseudopapillary tumours. *Histopathology* **50**, 331-337, doi:10.1111/j.1365-2559.2007.02608.x (2007).
- 192 Lau, S. H. *et al.* Clusterin plays an important role in hepatocellular carcinoma metastasis. *Oncogene* **25**, 1242-1250, doi:10.1038/sj.onc.1209141 (2006).
- 193 Lourda, M., Trougakos, I. P. & Gonos, E. S. Development of resistance to chemotherapeutic drugs in human osteosarcoma cell lines largely depends on up-regulation of Clusterin/Apolipoprotein J. *Int J Cancer* **120**, 611-622, doi:10.1002/ijc.22327 (2007).
- 194 Gleave, M. & Miyake, H. Use of antisense oligonucleotides targeting the cytoprotective gene, clusterin, to enhance androgen- and chemo-sensitivity in prostate cancer. *World journal of urology* **23**, 38-46, doi:10.1007/s00345-004-0474-0 (2005).
- 195 Zellweger, T. *et al.* Overexpression of the cytoprotective protein clusterin decreases radiosensitivity in the human LNCaP prostate tumour model. *BJU international* **92**, 463-469 (2003).
- 196 Patterson, S. G. *et al.* Novel role of Stat1 in the development of docetaxel resistance in prostate tumor cells. *Oncogene* **25**, 6113-6122, doi:10.1038/sj.onc.1209632 (2006).

- 197 Zhong, B. *et al.* Induction of clusterin by AKT--role in cytoprotection against docetaxel in prostate tumor cells. *Mol Cancer Ther* **9**, 1831-1841, doi:10.1158/1535-7163.MCT-09-0880 (2010).
- 198 Biroccio, A., D'Angelo, C., Jansen, B., Gleave, M. E. & Zupi, G. Antisense clusterin oligodeoxynucleotides increase the response of HER-2 gene amplified breast cancer cells to Trastuzumab. *J Cell Physiol* **204**, 463-469, doi:10.1002/jcp.20295 (2005).
- 199 Redondo, M. *et al.* Anticlusterin treatment of breast cancer cells increases the sensitivities of chemotherapy and tamoxifen and counteracts the inhibitory action of dexamethasone on chemotherapy-induced cytotoxicity. *Breast Cancer Res* **9**, R86, doi:10.1186/bcr1835 (2007).
- 200 So, A., Sinnemann, S., Huntsman, D., Fazli, L. & Gleave, M. Knockdown of the cytoprotective chaperone, clusterin, chemosensitizes human breast cancer cells both in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther* **4**, 1837-1849, doi:10.1158/1535-7163.MCT-05-0178 (2005).
- 201 Kruger, S., Ola, V., Fischer, D., Feller, A. C. & Friedrich, M. Prognostic significance of clusterin immunoreactivity in breast cancer. *Neoplasma* **54**, 46-50 (2007).
- 202 Zhang, S. *et al.* Clusterin expression and univariate analysis of overall survival in human breast cancer. *Technol Cancer Res Treat* **5**, 573-578, doi:10.1177/153303460600500604 (2006).
- 203 Doustjalali, S. R. *et al.* Aberrant expression of acute-phase reactant proteins in sera and breast lesions of patients with malignant and benign breast tumors. *Electrophoresis* **25**, 2392-2401, doi:10.1002/elps.200305950 (2004).
- 204 Flanagan, L., Whyte, L., Chatterjee, N. & Tenniswood, M. Effects of clusterin over-expression on metastatic progression and therapy in breast cancer. *BMC Cancer* **10**, 107, doi:10.1186/1471-2407-10-107 (2010).
- 205 Zhou, J. *et al.* HMGB1 induction of clusterin creates a chemoresistant niche in human prostate tumor cells. *Sci Rep* **5**, 15085, doi:10.1038/srep15085 (2015).
- 206 Bustin, M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins. *Mol Cell Biol* **19**, 5237-5246 (1999).
- 207 Ueda, T. & Yoshida, M. HMGB proteins and transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta* **1799**, 114-118, doi:10.1016/j.bbagr.2009.11.005 (2010).
- 208 Scaffidi, P., Misteli, T. & Bianchi, M. E. Release of chromatin protein HMGB1 by

- necrotic cells triggers inflammation. *Nature* **418**, 191-195, doi:10.1038/nature00858 (2002).
- 209 Yang, H. *et al.* A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 11942-11947, doi:10.1073/pnas.1003893107 (2010).
- 210 Sha, Y., Zmijewski, J., Xu, Z. & Abraham, E. HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *Journal of immunology* **180**, 2531-2537 (2008).
- 211 Urbonaviciute, V. *et al.* Induction of inflammatory and immune responses by HMGB1-nucleosome complexes: implications for the pathogenesis of SLE. *The Journal of experimental medicine* **205**, 3007-3018, doi:10.1084/jem.20081165 (2008).
- 212 Tian, J. *et al.* Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE. *Nature immunology* **8**, 487-496, doi:10.1038/ni1457 (2007).
- 213 Schmitz, G. Drug evaluation: OGX-011, a clusterin-inhibiting antisense oligonucleotide. *Curr Opin Mol Ther* **8**, 547-554 (2006).
- 214 Chi, K. N. *et al.* A phase I study of OGX-011, a 2'-methoxyethyl phosphorothioate antisense to clusterin, in combination with docetaxel in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* **14**, 833-839 (2008).
- 215 Chia, S. *et al.* Phase II trial of OGX-011 in combination with docetaxel in metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 708-713, doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-1159 (2009).
- 216 Merlotti, A. *et al.* Fucosylated clusterin in semen promotes the uptake of stress-damaged proteins by dendritic cells via DC-SIGN. *Human reproduction* **30**, 1545-1556 (2015).
- 217 Lis-Kuberka, J., Katnik-Prastowska, I., Berghausen-Mazur, M. & Orczyk-Pawilowicz, M. Lectin-based analysis of fucosylated glycoproteins of human skim milk during 47 days of lactation. *Glycoconjugate journal* **32**, 665-674, doi:10.1007/s10719-015-9615-5 (2015).
- 218 Chan, J. K. *et al.* Enhanced killing of primary ovarian cancer by retargeting autologous cytokine-induced killer cells with bispecific antibodies: a preclinical study. *Clin Cancer Res* **12**, 1859-1867, doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2019 (2006).

- 219 Moldenhauer, G., Momburg, F., Moller, P., Schwartz, R. & Hammerling, G. J. Epithelium-specific surface glycoprotein of Mr 34,000 is a widely distributed human carcinoma marker. *Br J Cancer* **56**, 714-721 (1987).
- 220 Jubb, A. M. *et al.* Expression of vascular notch ligand delta-like 4 and inflammatory markers in breast cancer. *The American journal of pathology* **176**, 2019-2028, doi:10.2353/ajpath.2010.090908 (2010).
- 221 Nonaka, M. *et al.* Glycosylation-dependent interactions of C-type lectin DC-SIGN with colorectal tumor-associated Lewis glycans impair the function and differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *Journal of immunology* **180**, 3347-3356 (2008).
- 222 Nonaka, M. *et al.* Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) recognizes a novel ligand, Mac-2-binding protein, characteristically expressed on human colorectal carcinomas. *The Journal of biological chemistry* **286**, 22403-22413, doi:10.1074/jbc.M110.215301 (2011).
- 223 Sorrentino, C. & Di Carlo, E. Expression of IL-32 in human lung cancer is related to the histotype and metastatic phenotype. *Am J Respir Crit Care Med* **180**, 769-779, doi:10.1164/rccm.200903-0400OC (2009).
- 224 Segura, E. *et al.* Characterization of resident and migratory dendritic cells in human lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* **209**, 653-660, doi:10.1084/jem.20111457 (2012).
- 225 Segura, E. & Amigorena, S. Cross-presentation by human dendritic cell subsets. *Immunol Lett* **158**, 73-78, doi:10.1016/j.imlet.2013.12.001 (2014).
- 226 Segura, E. & Amigorena, S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans. *Trends Immunol* **34**, 440-445, doi:10.1016/j.it.2013.06.001 (2013).
- 227 Wu, L., Martin, T. D., Carrington, M. & KewalRamani, V. N. Raji B cells, misidentified as THP-1 cells, stimulate DC-SIGN-mediated HIV transmission. *Virology* **318**, 17-23 (2004).
- 228 Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. 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. *The Journal of experimental medicine* **179**, 1109-1118 (1994).
- 229 van Gisbergen, K. P., Sanchez-Hernandez, M., Geijtenbeek, T. B. & van Kooyk, Y. Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN. *The Journal of experimental medicine* **201**, 1281-1292 (2005).

- 230 Choi, N. H., Tobe, T., Hara, K., Yoshida, H. & Tomita, M. Sandwich ELISA assay for quantitative measurement of SP-40,40 in seminal plasma and serum. *J Immunol Methods* **131**, 159-163 (1990).
- 231 Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *The Journal of experimental medicine* **182**, 389-400 (1995).
- 232 Zhang, N. *et al.* Regulatory T cells sequentially migrate from inflamed tissues to draining lymph nodes to suppress the alloimmune response. *Immunity* **30**, 458-469 (2009).
- 233 Gabrilovich, D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat Rev Immunol* **4**, 941-952 (2004).
- 234 van Gisbergen, K. P., Aarnoudse, C. A., Meijer, G. A., Geijtenbeek, T. B. & van Kooyk, Y. Dendritic cells recognize tumor-specific glycosylation of carcinoembryonic antigen on colorectal cancer cells through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin. *Cancer Res* **65**, 5935-5944 (2005).
- 235 Mesman, A. W. *et al.* Measles virus suppresses RIG-I-like receptor activation in dendritic cells via DC-SIGN-mediated inhibition of PP1 phosphatases. *Cell Host Microbe* **16**, 31-42 (2014).
- 236 Schumacher, T. N. & Hacohen, N. Neoantigens encoded in the cancer genome. *Current opinion in immunology* **41**, 98-103, doi:10.1016/j.coi.2016.07.005 (2016).
- 237 Schumacher, T. N. & Schreiber, R. D. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* **348**, 69-74, doi:10.1126/science.aaa4971 (2015).
- 238 Garcia-Vallejo, J. J. *et al.* CNS myelin induces regulatory functions of DC-SIGN-expressing, antigen-presenting cells via cognate interaction with MOG. *The Journal of experimental medicine* **211**, 1465-1483 (2014).
- 239 Anthony, R. M., Kobayashi, T., Wermeling, F. & Ravetch, J. V. Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. *Nature* **475**, 110-113 (2011).
- 240 Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C. M. & Hafler, D. A. FOXP3⁺ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* **10**, 490-500 (2010).
- 241 van Kooyk, Y., Unger, W. W., Fehres, C. M., Kalay, H. & Garcia-Vallejo, J. J.

- Glycan-based DC-SIGN targeting vaccines to enhance antigen cross-presentation. *Mol Immunol* **55**, 143-145 (2013).
- 242 Coulam, C. B. & Stern, J. J. Effect of seminal plasma on implantation rates. *Early pregnancy : biology and medicine : the official journal of the Society for the Investigation of Early Pregnancy* **1**, 33-36 (1995).
- 243 Tremellen, K. P. *et al.* The effect of intercourse on pregnancy rates during assisted human reproduction. *Human reproduction* **15**, 2653-2658 (2000).
- 244 von Wolff, M., Nowak, O., Pinheiro, R. M. & Strowitzki, T. Seminal plasma--immunomodulatory potential in men with normal and abnormal sperm count. *European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology* **134**, 73-78, doi:10.1016/j.ejogrb.2007.01.009 (2007).
- 245 Robertson, S. A., Bromfield, J. J. & Tremellen, K. P. Seminal 'priming' for protection from pre-eclampsia--a unifying hypothesis. *Journal of reproductive immunology* **59**, 253-265 (2003).
- 246 Kho, E. M. *et al.* Duration of sexual relationship and its effect on preeclampsia and small for gestational age perinatal outcome. *Journal of reproductive immunology* **82**, 66-73, doi:10.1016/j.jri.2009.04.011 (2009).
- 247 Rescigno, M. *et al.* Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature immunology* **2**, 361-367 (2001).
- 248 Garcia-Vallejo, J. J., Unger, W. W., Kalay, H. & van Kooyk, Y. Glycan-based DC-SIGN targeting to enhance antigen cross-presentation in anticancer vaccines. *Oncoimmunology* **2**, e23040 (2013).
- 249 Robertson, S. A., Ingman, W. V., O'Leary, S., Sharkey, D. J. & Tremellen, K. P. Transforming growth factor beta--a mediator of immune deviation in seminal plasma. *Journal of reproductive immunology* **57**, 109-128 (2002).
- 250 Remes Lenicov, F., Varese, A., Merlotti, A., Geffner, J. & Ceballos, A. Prostaglandins in semen compromise the immune response against sexually transmitted pathogens. *Med Hypotheses* **83**, 208-210 (2014).
- 251 Baratelli, F. *et al.* Prostaglandin E2 induces FOXP3 gene expression and T regulatory cell function in human CD4+ T cells. *Journal of immunology* **175**, 1483-1490 (2005).
- 252 Chen, W. *et al.* Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor

- Foxp3. *The Journal of experimental medicine* **198**, 1875-1886 (2003).
- 253 Stax, M. J. *et al.* Mucin 6 in seminal plasma binds DC-SIGN and potently blocks dendritic cell mediated transfer of HIV-1 to CD4(+) T-lymphocytes. *Virology* **391**, 203-211 (2009).
- 254 Kourilsky, P. & Claverie, J. M. MHC restriction, alloreactivity, and thymic education: a common link? *Cell* **56**, 327-329 (1989).
- 255 Fijak, M. & Meinhardt, A. The testis in immune privilege. *Immunological reviews* **213**, 66-81 (2006).
- 256 O'Bryan, M. K., Mallidis, C., Murphy, B. F. & Baker, H. W. Immunohistological localization of clusterin in the male genital tract in humans and marmosets. *Biology of reproduction* **50**, 502-509 (1994).
- 257 Ahuja, H. S., Tenniswood, M. & Zakeri, Z. F. Differential expression of clusterin in the testis and epididymis of postnatal and germ cell deficient mice. *Journal of andrology* **17**, 491-501 (1996).
- 258 Mukhtar, M. *et al.* Primary isolated human brain microvascular endothelial cells express diverse HIV/SIV-associated chemokine coreceptors and DC-SIGN and L-SIGN. *Virology* **297**, 78-88 (2002).
- 259 Shannan, B. *et al.* Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ* **13**, 12-19 (2006).
- 260 Djeu, J. Y. & Wei, S. Clusterin and chemoresistance. *Advances in cancer research* **105**, 77-92, doi:10.1016/S0065-230X(09)05005-2 (2009).
- 261 van Kooyk, Y. & Rabinovich, G. A. Protein-glycan interactions in the control of innate and adaptive immune responses. *Nature immunology* **9**, 593-601 (2008).
- 262 Dominguez-Soto, A. *et al.* Dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin expression on M2-polarized and tumor-associated macrophages is macrophage-CSF dependent and enhanced by tumor-derived IL-6 and IL-10. *Journal of immunology* **186**, 2192-2200, doi:10.4049/jimmunol.1000475 (2011).
- 263 Porta, C. *et al.* Tumor promotion by tumor-associated macrophages. *Advances in experimental medicine and biology* **604**, 67-86 (2007).
- 264 Lewis, C. E. & Pollard, J. W. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res* **66**, 605-612, doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4005 (2006).

-
- 265 Noy, R. & Pollard, J. W. Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy. *Immunity* **41**, 49-61, doi:10.1016/j.immuni.2014.06.010 (2014).
- 266 De Palma, M. & Lewis, C. E. Macrophage regulation of tumor responses to anticancer therapies. *Cancer cell* **23**, 277-286, doi:10.1016/j.ccr.2013.02.013 (2013).
- 267 Tariq, M. *et al.* Macrophage Polarization: Anti-cancer Strategies to Target Tumor-associated Macrophage in Breast Cancer. *Journal of cellular biochemistry*, doi:10.1002/jcb.25895 (2017).
- 268 Biswas, S. K., Allavena, P. & Mantovani, A. Tumor-associated macrophages: functional diversity, clinical significance, and open questions. *Seminars in immunopathology* **35**, 585-600, doi:10.1007/s00281-013-0367-7 (2013).
- 269 Chanmee, T., Ontong, P., Konno, K. & Itano, N. Tumor-associated macrophages as major players in the tumor microenvironment. *Cancers* **6**, 1670-1690, doi:10.3390/cancers6031670 (2014).
- 270 Qian, B. Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39-51, doi:10.1016/j.cell.2010.03.014 (2010).
- 271 Caux, C., Ramos, R. N., Prendergast, G. C., Bendriss-Vermare, N. & Menetrier-Caux, C. A Milestone Review on How Macrophages Affect Tumor Growth. *Cancer Res* **76**, 6439-6442, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2631 (2016).