







Universidad de la República Facultad de Ciencias PEDECIBA Biología-Biología Celular y Molecular

TESIS DE DOCTORADO

Estudio del rol de canales iónicos en la activación del inflamasoma NLRP3 y su impacto a nivel fisiopatológico

MSc. Sofía Russo Rossi

Laboratorio de Inmunorregulación e Inflamación-Institut Pasteur de Montevideo Departamento de Inmunobiología-Facultad de Medicina-Universidad de la República

Tutor: Dr. Marcelo Hill

Co-Tutor: Dra. Mercedes Segovia

Tribunal:

Presidente: Prof. Dr. Alejandro Chabalgoity

Vocales: Dres. Hugo Peluffo y Álvaro Díaz

Agradecimientos

A los Dres. Alejando Chabalgoity, Hugo Peluffo y Álvaro Díaz por su rol en la Comisión de Admisión y Seguimiento de mi trabajo de doctorado, y por aceptar formar parte del tribunal de esta tesis.

A Marcelo y Mercedes, por su rol fundamental en mi formación, por darme la oportunidad de realizar este trabajo, y por la confianza que me han depositado.

A Mathías y Valentina, por la ayuda esencial en los ensayos *in vivo* y compartir los fin de semana de inyectadas.

A los compañeros del LIRI (y ex-LIRI): Sabina, Valentina, Daniela, Alejandro, Javier, Florencia, Mathías, Maite y Germán por el apoyo y hacer ameno el día a día en el laboratorio.

Al Departamento de Inmunobiología.

A Ignacio Anegón, María Cristina Cuturi, Romina Girotti y Gabriel Rabinovich.

A los integrantes de la Unidad de Animales Transgénicos y de Experimentación.

A la ANII, CSIC, PEDECIBA y FOCIS por el apoyo económico.

A Andrés, Carlis, Mamá y Papá (*equal contribution*) por darme siempre para adelante y por creer en mí. Sin su apoyo y empuje no hubiera llegado hasta acá.

A Matías, abuelos, tíos, Luli y mi familia política.

Tabla de contenido

Agradecimientos	1
Resumen	3
Introducción	5
Inflamasoma	6
Modulación de la respuesta inmune adaptativa por el inflamasoma	13
Rol del inflamasoma en enfermedades	14
Biología del cáncer	16
Inmunidad y Cáncer	22
Inmunoterapias contra el cáncer	28
Bloqueadores de puntos de control inmunológicos	31
Inflamasoma y cáncer	40
Tmem176b como un potencial regulador iónico del inflamasoma	42
Objetivos	47
Objetivos específicos	
Resultados	49
Parte I	49
Parte II	62
Discusión	113
Conclusiones	158
Declaración de Autoría	159
Perspectivas	15960
Referencias	
Anexo	170

Resumen

Actualmente se reconoce que canales iónicos y la homeostasis iónica controlan funciones importantes de las células inmunes, entre las que se encuentra la respuesta inflamatoria. Es claro que la homeostasis iónica es crítica en la activación del inflamasoma NLRP3, habiéndose relacionado con la movilización de K⁺, Ca²⁺ y Cl⁻. A pesar de esto, poco se sabe en cuanto a los canales implicados en estos mecanismos y en cómo esos iones interactúan para activar al inflamasoma. El objetivo de esta tesis fue aportar conocimiento respecto al papel de la homeostasis iónica en la regulación de la activación del inflamasoma NLRP3, y su potencial impacto a nivel fisiopatológico.

Logramos mostrar que los canales $K_{Ca}1.1$ y $K_{Ca}3.1$ promueven la activación del inflamasoma, de esta forma aportando dos canales de K⁺ a los ya relacionados con la activación de NLRP3. A su vez, reportamos un nuevo fármaco para la inhibición de los canales $K_{Ca}1.1$ y $K_{Ca}3.1$, la hidroxicloroquina. La hidroxicloroquina ejercería su efecto anti-inflamatorio, al menos en parte, al inhibir al inflamasoma NLRP3 a través de canales de K⁺ activados por Ca²⁺.

Por otro lado, hemos caracterizado al canal catiónico Tmem176b como un punto de control de la activación del inflamasoma NLRP3 a través de mecanismos iónicos. La deleción de *Tmem176b* se asocia a un aumento de Ca²⁺ intracelular en células dendríticas y activación del inflamasoma *in vitro* e *in vivo*. Este proceso involucra la activación de canales de K⁺ activados por Ca²⁺, probablemente K_{Ca}1.1.

La activación del sistema inmune adaptativo a través del bloqueo de puntos de control fisiológicos en células T ha revolucionado la terapia de una variedad de cánceres. Sin embargo, por razones todavía no comprendidas, solo una pequeña parte de los pacientes tratados logran obtener beneficio clínico. Una de las estrategias propuestas para lograr vencer mecanismos de resistencia primaria y secundaria es la manipulación farmacológica de la respuesta inmune innata. Sin embargo, el papel jugado por la inflamación en el cáncer es complejo y altamente debatido. En este sentido, no existe evidencia que apoye la idea de que el inflamasoma promueva la inmunidad anti-tumoral desencadenada por el bloqueo de punto de control.

En modelos experimentales de cáncer, la ausencia de Tmem176b en el hospedero resultó en un mejor control de la progresión tumoral. Los tumores fueron rechazados en ratones *Tmem176b^{-/-}* a través de mecanismos dependientes de la activación del inflamasoma, de células T CD8⁺ y probablemente de células Th17. De manera interesante, la expresión de TMEM176B se asoció a resistencia a la terapia

anti-PD-1 en pacientes con melanoma metastásico. En acuerdo con esas observaciones, demostramos que la resistencia al bloqueo de puntos de control aumenta en ratones deficientes en componentes clave del inflamasoma.

A su vez, logramos identificar un inhibidor farmacológico de Tmem176b, BayK8644. El tratamiento con BayK8644 logró mejorar la sobrevida de ratones con cáncer de manera dependiente del inflamasoma, así como mejorar la eficacia de los bloqueadores de puntos de control.

En conclusión, aportamos tres nuevos blancos (K_{Ca} 1.1, K_{Ca} 3.1 y Tmem176b) para la modulación del inflamasoma, potencialmente relevantes para el tratamiento de diferentes patologías.

Introducción

El sistema inmune es un complejo conjunto de células y moléculas que mediantes diversos mecanismos son responsables de la homeostasis del organismo con el medio externo. Entre sus funciones lleva a cabo la defensa del hospedero contra patógenos invasores o sustancias dañinas, así como la tolerancia a sustancias propias y extrañas no patógenas.

Clásicamente, el sistema inmune de los vertebrados se ha dividido en dos sistemas: el de la inmunidad innata y el de la inmunidad adaptativa. Entre ambos existen mecanismos de redundancia, complementariedad y colaboración. La inmunidad innata provee la primera línea de defensa. Consiste en mecanismos de defensa celulares y bioquímicos que se encuentran listos incluso antes que se dé una infección, y responden rápidamente frente a la misma. Sus mecanismos efectores se caracterizan por reconocer patrones moleculares asociados a microbios o asociadas a daño tisular o celular. Luego se desarrolla la respuesta inmune adaptativa cuyos mecanismos efectores son específicos de antígeno, y son capaces de incrementar su magnitud, especificidad y capacidades defensivas con cada exposición. Las características distintivas de la inmunidad adaptativa son específicidad exquisita para distintas moléculas, una habilidad de recordar y responder más vigorosamente a exposiciones repetidas (memoria), y especialización.

Es importante destacar que entre la inmunidad innata y a adaptativa existe una estrecha intercomunicación. La inmunidad innata pone en marcha los primeros mecanismos efectores y educa la respuesta inmune adaptativa, influenciando la naturaleza de esta respuesta. A su vez, una vez desarrollada, la respuesta inmune adaptativa potencia o regula los mecanismos de la inmunidad innata, haciéndolos más efectivos o apagándolos. Esta comunicación entre el sistema inmune innato y

adaptativo es fundamental para el correcto funcionamiento de las defensas del hospedero.

Además de su rol fisiológico en la defensa del hospedero contra patógenos, el sistema inmune está implicado en la fisiopatología de enfermedades auto-inmunes y auto-inflamatorias, así como del cáncer y del rechazo a trasplantes.

En este trabajo de tesis se evaluó cómo componentes de la respuesta inmune innata, particularmente el inflamasoma, modulan la respuesta adaptativa en situaciones fisiopatológicas.

Inflamasoma

La activación del inflamasoma es una función clave mediada por el sistema inmune innato. Los inflamasomas son complejos multiproteicos que se ensamblan en el citosol luego de detectar patrones moleculares asociados a patógenos o a daño (PAMPs o DAMPs, respectivamente). Estos complejos multiproteicos están formados por una proteína sensora perteneciente a la familia del receptor AIM2 (ausente en melanoma 2), o a la familia NLR (dominio de unión a nucleótidos conteniendo repetidos ricos en leucina), por la proteína adaptadora ASC (proteína asociada a apoptosis tipo asterisco conteniendo CARD), y un zimógeno inactivo, la Pro-Caspasa-1¹. Hasta el momento varios receptores de reconocimiento de patógenos (PRR), entre ellos NLRP1, NLRP3, NLRC4, y AIM2, han sido confirmados como inductores del ensamblado del inflamasoma en respuesta a infecciones microbianas o a señales de peligro estériles. Estudios más recientes indican que otros miembros de los PRR, como son IFI16, NLRP6, NLRP7 y NLRP12, pueden también formar inflamasomas, pero ni su composición precisa ni su rol fisiológico es del todo clara aún². Los inflamasomas canónicos, entre los que se encuentra el NLRP3, actúan de andamio para el reclutamiento de la Pro-Caspasa-1 inactiva. La oligomerización de Pro-Caspasa-1 induce su clivaje autoproteolítico a la forma activa de la Caspasa-1. La

Caspasa-1 activa es una proteasa dependiente de cisteína que cliva los precursores de las citoquinas Pro-IL-1 β y Pro-IL-18, generando la forma biológicamente activa de estas citoquinas. La forma activa de Caspasa-1 también puede inducir a una forma de muerte celular inflamatoria conocida como piroptosis^{2–4}. En este proceso, la Caspasa-1 cliva a Gasdermina D liberando su dominio N-terminal. Dicho dominio puede formar poros en la membrana, de esta forma induciendo piroptosis, una muerte celular rápida y pro-inflamatoria².

A continuación me centraré en el inflamasoma NLRP3, el cual es el más estudiado debido a su participación en la inmunidad contra una gran variedad de bacterias, virus, hongos, en la inflamación estéril y en enfermedades metabólicas, y en el que se centrará esta tesis. Para poder ser activado, el inflamasoma NLRP3 requiere primero de una señal que active el factor de transcripción NF-κB. De esta forma se da la producción de NLRP3, Pro-IL-1β y Pro-IL-18. La primera señal también induce la desubiquitinación del NLRP3 lo cual es necesario para que pueda ser activado⁴. Como se dijo anteriormente, el inflamasoma NLRP3 es activado por una gran variedad de estímulos, como bacterias Gram-positivas, virus, toxinas formadoras de poros, cristales, ATP, entre otros, los cuales constituyen la segunda señal. Debido a esta gran heterogeneidad en los estímulos activadores, se cree que en lugar de interactuar directamente con NLRP3, estos activadores inducen uno o más eventos celulares o perturbaciones que llevan a la activación del inflamasoma NLRP3. Los mecanismos de activación del NLRP3 sugeridos por varios estudios incluyen el eflujo de potasio, generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) mitocondriales, la traslocación de NLRP3 a la mitocondria, liberación de catepsinas al citosol dada por desestabilización de la membrana fagolisosomal y liberación de ADN mitocondrial o cardiolipina^{1,3}. También se ha reportado que el aumento del calcio intracelular⁵, así como un eflujo de cloruro puede activar al inflamasoma⁶. El mecanismo preciso de activación del inflamasoma NLRP3 todavía es discutido, ya que no todos estos eventos son

inducidos por todos los activadores de NLRP3. Sin embargo, cada vez hay más evidencias de que el disturbio de iones intracelulares, como K⁺, Ca²⁺ y Cl⁻, conectan diferentes eventos de señalización que orquestan la activación del inflamasoma NLRP3². A continuación detallaré evidencias del rol de dichos iones en la activación del inflamasoma NLRP3 (Figura 1).

Es importante destacar que la jerarquía en la cascada de activación de estos iones es un tema debatido². Esta información, junto con los canales que median los transportes iónicos, es crítica para poder desarrollar estrategias farmacológicas de modulación del inflamasoma.



Figura 1. *Mecanismo de activación del inflamasoma NLRP3.* La movilización de iones como K⁺, Ca²⁺ y Cl⁻ se han vinculado a la activación del inflamasoma NLRP3. Diferentes agonistas del NLRP3 inducen el eflujo de K⁺ y/o un influjo de Ca²⁺. Una concentración elevada de Ca²⁺ intracelular puede inducir la liberación de Ca²⁺ del retículo endoplasmático y la sobrecarga de Ca²⁺ en la mitocondria. Tanto el eflujo de K⁺ como la sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial pueden inducir daño mitocondrial que promueve el eflujo de Cl⁻, el cual regula la interacción NEK7-NLRP3 y el ensamblado del inflamasoma. *Tomado de Gong et al, 2018.*

El eflujo de K⁺ es el evento de señalización más aceptado para la activación del inflamasoma NLRP3. Se ha reportado ampliamente que luego del tratamiento de macrófagos con la mayoría de los agonistas de NLRP3 se observa un descenso en la

concentración intracelular de K⁺. A su vez, la activación de NLRP3 por estos estímulos es inhibida por altas concentraciones extracelulares de K⁺. De hecho, la incubación de macrófagos en un medio libre de K⁺ es suficiente para gatillar la activación del inflamasoma NLRP3². El rol del K⁺ en la activación del inflamasoma parecía ser específico al inflamasoma NLRP3, ya que una alta concentración de K⁺ extracelular no es capaz de inhibir la activación del inflamasoma AIM2 ni del NLRC4. Sin embargo, una excepción a esto es el inflamasoma NLRP1b en el cual el eflujo de K⁺ parecería estar implicado en su activación⁷. A su vez, algunas moléculas pequeñas (un ejemplo es el imiquimod) son capaces de activar el inflamasoma NLRP3 de manera independiente del eflujo de K^{+ 8}. Estos antecedentes sugieren que el eflujo de K⁺ es suficiente pero no necesario, ni específico, para la activación del inflamasoma NLRP3. El mecanismo por el cual el eflujo de K⁺ activa al inflamasoma NLRP3 no es del todo claro. Uno de los mecanismos propuestos es que el eflujo de K⁺ es necesario para la unión de la quinasa NEK7 (del inglés "Never In Mitosis A-Related Kinase 7") a NLRP3, el cual es un paso esencial para el ensamblado de dicho inflamasoma⁹. También se ha reportado que el eflujo de K⁺ podría promover la activación de NLRP3 al inducir disfunción de la mitocondria y producción de especies reactivas del oxígeno mitocondriales⁶.

El rol de los iones Ca²⁺ es más controversial. Se ha reportado que el quelado de Ca²⁺ con BAPTA-AM es capaz de inhibir la activación del inflamasoma NLRP3 y la secreción de IL-1β¹⁰. Sin embargo, otros estudios mostraron que BAPTA-AM era capaz de inhibir la activación del inflamasoma NLRP3 por la nigericina en ausencia de Ca²⁺ extracelular, sugiriendo que el mecanismo por el cual BAPTA-AM inhibe al inflamasoma es independiente de Ca²⁺ 11. Se han propuesto dos mecanismos para explicar cómo es que los iones Ca²⁺ regulan la activación del inflamasoma NLRP3. Dado que se ha mostrado que Ca²⁺ puede promover la asociación espontánea de NLRP3-ASC en lisados de macrófagos estimulados con LPS, un mecanismo

propuesto es que los iones Ca²⁺ son capaces de regular la activación del inflamasoma NLRP3 directamente¹². Sin embargo, el mecanismo preciso no es claro. El segundo mecanismo propuesto sostiene que una liberación excesiva de Ca²⁺ desde el retículo endoplasmático causa una sobrecarga de Ca²⁺ mitocondrial y por lo tanto daño mitocondrial. Este daño mitocondrial lleva a la producción de ROS mitocondriales, externalización de cardiolipina y liberación de ADN mitocondrial, lo que promovería la activación del inflamasoma NLRP3². La concentración normal de Ca²⁺ citoplasmático es aproximadamente 100 nM, a su vez los transportadores de Ca²⁺ mitocondriales son de baja afinidad teniendo un umbral de activación de 500 nM. Es posible que muchas condiciones que involucran la movilización de Ca²⁺, la concentración de Ca²⁺ citoplasmático de NLRP3^{2,13}. Pudiendo explicarse así condiciones en donde el Ca²⁺ tiene un rol importante como segundo mensajero pero sin llevar a la activación del inflamasoma NLRP3.

Como se desprende de lo expuesto hasta el momento, no es del todo claro cómo interaccionan los niveles de K⁺ y Ca²⁺ en la activación del inflamasoma NLRP3. Dependiendo del modelo experimental que se utilice difiere el peso adjudicado a estos iones en la activación del inflamasoma. Una posibilidad es que sea solo uno de estos iones el responsable de la activación, mientras que el otro se movilice para balancear las fuerzas iónicas¹⁴.

Por último, el rol del Cl⁻ en la activación del inflamasoma NLRP3 fue evidenciado cuando se sustituyó el cloruro de sodio extracelular por gluconato de sodio, lo cual hace que la concentración de Cl⁻ disminuya de 130 nM a 9 nM. La disminución en el Cl⁻ extracelular resultó en un aumento en la secreción de IL-1β inducido por el ATP¹⁵. A su vez, varios estudios mostraron que la inhibición de canales de Cl⁻ resultaba en la inhibición del inflamasoma NLRP3². El rol del eflujo de Cl⁻ en la activación del inflamasoma NLRP3 es apoyado por resultados que muestran que la 11

incubación de macrófagos en un medio libre de Cl⁻ es suficiente para inducir la activación espontánea del inflamasoma NLRP3⁶. Cabe destacar que el eflujo de Cl⁻ es un evento de señalización corriente abajo tanto del eflujo de K⁺ como de la disfunción mitocondrial, sugiriendo que el eflujo de Cl⁻ sea un evento corriente arriba proximal a la activación del inflamasoma NLRP3^{2,6}. Se ha visto que la inhibición de los canales de cloruro intracelulares, CLIC, suprime interacciones NEK7-NLRP3 y la posterior formación del complejo NLRP3-ASC y oligomerización de ASC, sugiriendo que el eflujo de Cl⁻ a través de CLIC promueve la interacción NEK7-NLRP3 para inducir la activación de NLRP3⁶.

Como surge de lo expuesto anteriormente, el mecanismo proximal a la activación de NLRP3 no es del todo conocida. Entender el mecanismo detallado de activación del inflamasoma NLRP3 y su regulación es fundamental para el tratamiento de enfermedades inflamatorias relacionadas al inflamasoma NLRP3. Dado el rol cada vez más evidente del inflamasoma NLRP3 para sensar la homeostasis iónica intracelular, los canales iónicos representan interesantes blancos de drogas para el desarrollo de nuevas terapias que busquen modular la función del inflamasoma NLRP3¹⁶. A pesar del rol fuertemente evidenciado del eflujo de K⁺ en la activación del inflamasoma NLRP3, muy pocos canales iónicos o transportadores de K⁺ han sido relacionados con el inflamasoma NLRP3. El receptor purinérgico P2X7 e ionóforos de K⁺ son clásicamente asociados al eflujo de K⁺ activador de NLRP3^{2,16}. Recientemente se ha reportado que la activación del canal de K⁺ K_v1.3 en linfocitos T contribuye a la expresión y activación del inflamasoma NLRP3 en pacientes hipertensos¹⁷. A su vez, también se ha reportado que los canales de K⁺ TWIK2 en macrófagos derivados de la médula ósea de ratones tienen un rol esencial en la activación del inflamasoma¹⁸. En cuanto a los canales de Ca²⁺, se han relacionado a la activación del inflamasoma NLRP3 los canales TRPM2, TRPM7, TRPV2 y receptores acoplados a proteína G (GPCR)^{2,16}. Por último, como se mencionó anteriormente los canales de cloruro

intracelular, CLIC1 y CLIC4, así como canales aniónicos regulados por volumen (VRAC) contribuyen al eflujo de Cl⁻ en la activación del inflamasoma NLRP3².

Modulación de la respuesta inmune adaptativa por el inflamasoma

Los inflamasomas pertenecen al sistema inmune innato, sin embargo, son capaces de modular la respuesta inmune adaptativa. Los productos de la activación del inflamasoma tienen efectos sobre células de la inmunidad adaptativa. La señalización del receptor de IL-1(IL-1R) vía IL-1a o IL-1β puede favorecer la supervivencia de células T naïve, la IL-1 causa una liberación transitoria de la citoquina de supervivencia IL-2 por células T¹⁹. A su vez, la señalización a través de IL-1R induce el aumento en la expresión del receptor de IL-2, aportando señales de supervivencia y proliferación para células T estimuladas. Dicha señalización también prolonga la colaboración de las células T a las células B para la producción de anticuerpos¹⁹. La IL-1β puede promover la inmunidad adaptativa mediada por células T al potenciar la expansión y función efectora de células T CD4⁺ así como T CD8⁺ antígeno específicas²⁰⁻²². La IL-1β favorece la diferenciación de las células Th17, así como la re-programación de las células Treg a células T secretoras de IL-17²³⁻²⁵, y es capaz de estimular la producción de IL-17 por células Tyo¹⁹. Por otro lado, la IL-18 amplifica la producción de IFN-y por las células Th1. La expresión del receptor de la IL-18 en las células T es aumentada luego de la exposición a IL-12, una citoquina que polariza hacia la vía Th1. A su vez, la citoquina IL-18 induce la expresión del receptor de alta afinidad de IL-12, estableciéndose un ciclo de amplificación. La IL-18 en combinación con la IL-12 inducen el incremento en la producción de IFN-y por células Th1 v células NK¹⁹. En cambio, en ausencia de citoquinas que polarizan hacia la vía Th1, la IL-18 puede promover la diferenciación de células de tipo Th2²⁵. Por lo tanto, la IL-1ß e IL-18, generadas por la activación del inflamasoma, son potentes amplificadores de respuestas inmunes adaptativas.

Rol del inflamasoma en enfermedades

Existen evidencias claras de un rol de proteínas relacionadas al inflamasoma enfermedades humanas, abarcando desde enfermedades inflamatorias en monogenéticas hasta desórdenes inmunes y metabólicos más comunes²⁶. La patogénesis de muchas enfermedades comunes que se presentan en edades avanzadas está influenciada por una inflamación crónica, secundaria a la presencia o acumulación de señales de peligro estériles en tejidos. El inflamasoma NLRP3 es el principal sensor de estos tipos de señales inflamatorias estériles, y por lo tanto es un gatillador de reacciones inflamatorias crónicas en una variedad de enfermedades²⁷. El potente poder inflamatorio del inflamasoma NLRP3 se aprecia en pacientes con mutaciones activadoras en el gen NLRP3, que resultan en un grupo de enfermedades auto-inflamatorias conocidas en su conjunto como CAPS (del inglés "Criopyrin-Associated Periodic Syndromes")²⁸. Estas enfermedades se caracterizan por leucocitosis (neutrofilia), fiebre e inflamación tejido específicas en piel, articulaciones y conjuntiva²⁶. Los pacientes con CAPS responden fuertemente al bloqueo de IL-1, lo que sugiere que la producción desregulada de IL-1β por el inflamasoma NLRP3 está asociada a la patología de estas enfermedades²⁸. El inflamasoma NLRP3 también se ha asociado a enfermedades auto-inmunes como por ejemplo el lupus sistémico eritematoso^{29,30}. Si bien la etiología de esta enfermedad aún no es del todo comprendida, se ha implicado un rol crítico del inflamasoma NLRP3 con el desarrollo y la patogénesis del lupus sistémico eritematoso³¹. El inflamasoma se encuentra hiperactivado en macrófagos de pacientes con lupus, y contribuye al desarrollo de la nefritis³². De hecho, se ha reportado un aumento en la expresión de NLRP3 y Caspasa-1 en biopsias de pacientes con nefritis lúpica³⁰. Con respecto a cómo es activado el inflamasoma en este caso, se ha reportado que los inmuno-complejos y las trampas extracelulares de los neutrófilos (NETs), característicos de esta patología, son capaces de activar al inflamasoma³⁰.

El inflamasoma también juega un rol importante en enfermedades neurodegenerativas y metabólicas, las cuales no eran consideradas tradicionalmente como enfermedades inflamatorias, pero actualmente se sabe que tienen un componente inflamatorio que contribuye significativamente al desarrollo de la enfermedad⁴. Entre estos se encuentran la enfermedad de Alzheimer y Parkinson, aterosclerosis, diabetes de tipo 2, obesidad, artritis reumatoide, gota, entre otros^{4,27}. En la iniciación de estas enfermedades, los inflamasomas juegan roles tanto causal como contribuyente, y exacerban la patología en respuesta a factores derivados del hospedero. Los gatilladores de la activación del inflamasoma en estas enfermedades son agregados de proteínas mal plegadas o la acumulación aberrante de ciertos metabolitos que constituyen señales de peligro endógenos⁴. Por ejemplo, en la enfermedad de Alzheimer, se ha mostrado que la acumulación de placas β -amiloides, características de la enfermedad, es un activador del inflamasoma NLRP3⁴. De hecho, en el cerebro de pacientes con Alzheimer se vio una expresión mayor de Caspasa-1 activa que en personas sanas⁴. En el mismo sentido, en la enfermedad de Parkinson la activación del inflamasoma NLRP3 se da por agregados de α-sinucleina⁴. Además de la formación de agregados proteicos, la formación de cristales también lleva a la activación del inflamasoma. La formación de cristales de colesterol y de urato monosódico conduce al desarrollo, mediado por NLRP3, de aterosclerosis y gota, respectivamente^{4,27}. En todos estos casos, la liberación de IL-1β conduce a un influjo de células inmunes y a la progresión de la enfermedad²⁷.

En conclusión, el inflamasoma NLRP3 es capaz de responder a sustancias encontradas en tejidos como consecuencia del envejecimiento, inactividad física, sobre-nutrición o factores ambientales, y por lo tanto es de particular interés como un blanco para la intervención farmacológica de diferentes patologías²⁷. Inhibidores farmacológicos de la vía de NLRP3 presentan un gran potencial terapéutico en una variedad de enfermedades auto-inflamatorias e inflamatorias crónicas, que requieren

de mejores opciones terapéuticas o para las cuales no hay terapias adecuadas existentes. Actualmente ya se encuentran aprobadas terapias que tienen como blanco las citoquinas dependientes del inflamasoma, ejemplos de estos son Anakinra (antagonista del receptor de IL-1), Canakinumab (anticuerpo neutralizante de IL-1 β) y Rilonacept (receptor soluble que se une a IL-1 β e IL-1 α)²⁷. Sin embargo, actualmente no hay antagonistas de NLRP3 aprobados, la inhibición de la activación de este inflamasoma tendría como ventaja que, además de bloquear la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β e IL-18, se inhibe la muerte celular por piroptosis²⁷. Hasta el momento uno de los antagonistas de NLRP3 más aceptado y mejor caracterizado es CP-456,776, el cual fue capaz de inhibir la activación de NLRP3 por todos los estímulos activadores conocidos. Además este compuesto es altamente específico, ya que no fue capaz de inhibir otros inflamasomas ni vías de los receptores tipo Toll (TLR)²⁷. Cabe destacar que ensayos clínicos fase II para el tratamiento de artritis reumatoide con CP-456,776 tuvieron que ser suspendidos por una alta toxicidad hepática²⁷.

El inflamasoma también se ha asociado al cáncer, aunque el rol que juega en la inmunidad anti-tumoral es controvertido. Sin embargo, desde ya puedo adelantar que no se conocen agonistas del inflamasoma NLRP3 que tengan el potencial de aumentar y mejorar la respuesta inmune anti-tumoral. Para poder abordar el rol del inflamasoma en el cáncer, primeramente abordaré generalidades de la biología e inmunología del cáncer, así como inmunoterapias oncológicas.

Biología del cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en el mundo occidental, precedido únicamente por las enfermedades cardiovasculares. Uruguay no es una excepción; las muertes por cáncer constituyen aproximadamente un cuarto de las

muertes registradas, con una incidencia global de 251 casos nuevos por año cada 100.000 personas (cociente estandarizado por edad)³³.

El cáncer constituye un conjunto de enfermedades definidas como una alteración del crecimiento celular desencadenada por una serie de mutaciones adquiridas que afectan a una célula y su progenie. Como se desarrollará más adelante, estas mutaciones llevan a una proliferación excesiva e independiente de las señales fisiológicas de crecimiento. El cáncer presenta características distintivas que son adquiridas de forma secuencial en el desarrollo del mismo^{34,35}. Las características distintivas del cáncer son: 1) señalización de proliferación mantenida, 2) insensibilidad a las señales supresoras del crecimiento, 3) capacidad de invadir y generar metástasis, 4) potencial ilimitado de proliferación, 5) inducción de angiogénesis, 6) resistencia a la muerte celular, 7) evasión al sistema inmune, y 8) alteración del metabolismo celular. A su vez, los tumores presentan dos características que facilitan la adquisición de los rasgos distintivos numerados anteriormente. Estas son la inestabilidad genómica y la inflamación inducida por el tumor, y se denominan características facilitadoras porque fomentan la transformación celular y la progresión tumoral³⁵. A continuación se tratará brevemente cada una de estas características.

Como se mencionó anteriormente, una de las características distintivas de las células tumorales es su capacidad de mantener una proliferación crónica. Las células normales controlan de forma estricta la liberación de señales de crecimiento de forma de asegurar la homeostasis del número celular, y por lo tanto del mantenimiento de la arquitectura y función normal de tejidos³⁵. En cambio, las células tumorales al desregular estas señales pueden proliferar de forma descontrolada. Las células tumorales pueden adquirir la capacidad de mantener señales proliferativas de varias maneras. Pueden ellas mismas producir factores de crecimiento, o estimular a células normales dentro del estroma tumoral a producir varios factores de crecimiento. A su vez, también pueden elevar la expresión de receptores de factores de crecimiento en

la superficie celular, haciendo que respondan más fuertemente a cantidades limitadas de ligandos³⁵.

Además de mantener señales proliferativas, las células tumorales deben de evadir mecanismos supresores del crecimiento celular, constituyendo otro de los rasgos distintivos del cáncer. Las células tumorales presentan deficiencias en moléculas supresoras tumorales, así como falta de inhibición por contacto célulacélula. Dos supresores tumorales prototípicos son las proteínas RB (asociado a retinoblastoma) y p53, que operan como puntos de control centrales de dos circuitos celulares regulatorios complementarios que gobiernan la decisión de una célula de proliferar o, alternativamente, activar programas de senescencia y apoptosis³⁵. La proteína RB integra señales extracelulares e intracelulares y decide si una célula debe progresar en el ciclo de crecimiento y división celular o no. Células tumorales con defectos en la función de la vía de RB tienen ausencia de un punto de control de la progresión del ciclo celular, llevando a la proliferación persistente. Por otro lado, p53 detecta señales de estrés intracelulares como puede ser el daño genómico. Cuando el daño genómico es excesivo, o si los niveles de señales de crecimiento o nutrientes son sub-óptimos, p53 puede detener la entrada al ciclo celular hasta que estas condiciones se normalicen. Alternativamente, si el daño es irreparable p53 puede inducir la muerte por apoptosis³⁵.

Otra característica distintiva de las células tumorales es su capacidad de resistir la muerte celular. Las células tumorales presentan diferentes estrategias para evitar la muerte por apoptosis. La estrategia más común es la pérdida de la función del supresor tumoral p53, de esta forma se pierde un sensor de daño crítico del circuito de inducción de la apoptosis. En otros casos, las células tumorales pueden aumentar la expresión de reguladores anti-apoptóticos como Bcl-2, o disminuir la expresión de reguladores pro-apoptóticos como Bax y Bim³⁵. Además de la clásica apoptosis como

muerte celular programada, varios tipos de muerte celular programada han sido descriptas, teniendo roles importantes en la progresión tumoral^{36,37}.

A su vez, la inmortalidad replicativa, otro rasgo distintivo del cáncer, se logra a través de la protección de los extremos de los cromosomas por telómeros. Las células tumorales expresan telomerasas, ADN polimerasas que extienden los telómeros, manteniendo el ADN telomérico de un largo tal que impide la senescencia o la apoptosis³⁵.

Al igual que los tejidos normales, los tumores requieren del suministro de nutrientes y oxígeno, así como eliminar sus desechos metabólicos y dióxido de carbono. Esto es permitido por la nueva vasculatura que se forma en el proceso de angiogénesis. Durante la progresión tumoral se da un cambio hacia programas de angiogénesis, provocando que broten nuevos vasos de la vasculatura quiescente normal que ayudan a mantener el crecimiento tumoral³⁵.

Algunas células tumorales pueden intravasarse a vasos sanguíneos o linfáticos próximos al tumor, y ser transportadas a través del sistema sanguíneo y linfático. Estas células tumorales pueden luego escapar del vaso sanguíneo y extravasarse al parénquima de tejidos distantes. Allí generan pequeños nódulos de células tumorales que pueden crecer hasta formar tumores macroscópicos. Este proceso, conocido como metástasis, constituye otra característica distintiva del cáncer ³⁵.

La capacidad de evadir al sistema inmune y la alteración del metabolismo celular son las últimas características distintivas del cáncer en ser reconocidas. Las células tumorales presentan una forma característica de metabolismo celular que se caracteriza por una elevada captación de glucosa y una mayor trasformación de glucosa a lactosa por vía glicolítica, incluso en presencia de oxígeno. Este mecanismo se lo denominó glucólisis aeróbica, y es la base de la tomografía por emisión de positrones (PET), en donde se les inyecta a los pacientes ¹⁸F-fluorodesoxiglucosa que

debido a la avidez por la glucosa es captado de forma preferencial por las células tumorales³⁵. La capacidad de evadir el sistema inmune se discutirá detenidamente más adelante, ya que un punto relevante en el desarrollo de este trabajo de tesis.

Todas las características distintivas del cáncer se dan como consecuencia de la inestabilidad genómica de las células tumorales, la cual genera mutaciones aleatorias incluyendo re-arreglos cromosómicos, y del estado inflamatorio de lesiones pre-malignas y malignas generado por células del sistema inmune, algunas de las cuales ayudan a promover la progresión tumoral de varias maneras. La inflamación puede contribuir a la adquisición de características distintivas al proveer de moléculas bioactivas al microambiente tumoral, incluyendo factores de crecimiento, factores de supervivencia, factores pro-angiogénicos, y enzimas que modifican la matriz extracelular de forma de facilitar la angiogénesis, invasión y metástasis. Además, las células inflamatorias pueden liberar productos químicos, como especies reactivas del oxígeno, que son mutagénicos para las células tumorales vecinas, acelerando su evolución genética hacia estados altamente malignos³⁵.

Actualmente es aceptado que la biología tumoral no puede ser comprendida únicamente por las características de las células tumorales, sino que se debe tener en cuenta la contribución del microambiente tumoral en la tumorigénesis.

El microambiente tumoral es un ecosistema funcional de elementos tumorales y estromales que interactúan a través de moléculas señalizadoras ³⁸. El microambiente tumoral está compuesto por una compleja red que incluye células estromales multipotentes, células madres estromales, fibroblastos, vasos sanguíneos, precursores de células endoteliales, células inmunes, factores secretados como pueden ser citoquinas, así como las células tumorales y las células madre tumorales³⁸.

Además de la heterogeneidad de las células tumorales, los tumores presentan otro nivel de heterogeneidad, dada por una subclase de células neoplásicas llamadas células madre tumorales. Las células madre tumorales son un constituyente común de la mayoría, si es que no de todos, los tumores. Estas células madre tumorales son definidas por su capacidad de formar eficientemente nuevos tumores cuando son inoculados a otro hospedero³⁵.

Las células estromales co-evolucionan con las células tumorales, siendo frecuentemente educadas o modificadas por las células tumorales para sintetizar una variedad de citoquinas, factores de crecimiento y proteasas, lo que acelera dramáticamente la progresión de la enfermedad³⁹.

Los fibroblastos asociados al cáncer (CAF) son el tipo celular predominante del estroma, y son responsables de la estructura arquitectónica de la matriz extracelular³⁸. Dado que secretan una variedad de componentes de la matriz extracelular, los fibroblastos asociados al cáncer están implicados en la formación del estroma desmoplástico que caracteriza muchos carcinomas avanzados³⁵. Estas células también juegan un rol importante en la angiogénesis; se ha reportado que la inhibición del factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) secretado por los CAF reduce la angiogénesis ⁴⁰.

La vasculatura estromal está formada por una red capilar de células endoteliales rodeadas de pericitos que proveen de apoyo estructural y fisiológico. En tejidos normales, los pericitos proveen señales parácrinas al endotelio normalmente quiescente. Los pericitos también colaboran con las células endoteliales para sintetizar la membrana vascular que ancla tanto pericitos y células endoteliales, y ayudan a las paredes vasculares a soportar la presión hidrostática del flujo sanguíneo³⁵. Tumores con cobertura pobre de pericitos en su vasculatura serían más propensos a permitir la

intravasación de las células tumorales hacia el sistema circulatorio, permitiendo su diseminación. Esto es debido a que presentan uniones estrechas más permeables ³⁸.

La matriz extracelular constituye el andamio celular del microambiente tumoral proporcionando soporte estructural al endotelio tumoral y a las células estromales. Esta matriz es producida por células mesenquimales, incluyendo fibroblastos, condrocitos y osteoblastos, y consiste en varios componentes incluyendo colágeno, galectinas, proteoglicanos, y glicoproteínas ³⁸. La matriz extracelular provee de un nicho de células madres tumorales y está implicado en la angiogénesis y vías inflamatorias que contribuyen a un microambiente tumoral pro-metastásico ³⁸.

Las células inmunes en el microambiente tumoral tienen tanto efectos anticomo pro-tumorales. Las respuestas producidas por macrófagos M1, células T citotóxicas, células Th1, células presentadoras de antígeno, células NK y células Th9⁴¹ promueven el rechazo tumoral. Por otro lado, macrófagos M2, células T reguladoras permiten la progresión tumoral³⁸. El rol de otras poblaciones celulares en el cáncer es más controvertido, como por ejemplo las células Th17 y las Th2, las cuales tienen reportado roles anti-tumorales como pro-tumorales⁴². La relación entre las células del sistema inmune y el cáncer se desarrollará a continuación.

Inmunidad y Cáncer

En 1909, Paul Ehrlich fue uno de los primeros en proponer el concepto de que el sistema inmune presenta un rol crítico en la protección de un individuo contra el cáncer. Proponía que de otra forma, la incidencia del cáncer sería ampliamente superior ⁴³. En la década del '50, Frank MacFarlane Burnet y Lewis Thomas postularon la hipótesis de la inmunovigilancia del cáncer. Estos autores postularon que las células del sistema inmune pueden detectar y destruir las células tumorales, previniendo la manifestación clínica del tumor. El sistema inmune habría evolucionado, al menos en parte, para controlar el crecimiento desmedido de células malignas^{44,45}. La

participación del sistema inmunológico en la generación de defensas contra el cáncer ha sido evidenciada ampliamente. La mayor incidencia de cáncer en individuos con el sistema inmunitario deprimido es una evidencia fuerte de la existencia de mecanismos inmunológicos anti-tumorales. Ratones con diferentes inmunodeficiencias mostraron una mayor susceptibilidad al desarrollo de tumores, tanto espontáneos como inducidos por carcinógenos, que sus contrapartes inmunocompetentes⁴⁶. Por otro lado, si se inoculaban ratones con células tumorales irradiadas que no podían crecer, estos ratones generaban protección contra posteriores inoculaciones con una dosis normalmente letal de células viables del mismo tumor. Estos efectos protectores no son observados en ratones deficientes de linfocitos T, pero pueden ser conferidos por la transferencia de linfocitos T de otro ratón, demostrando la necesidad de los linfocitos T para mediar todos estos efectos. Estas observaciones indican que los tumores expresan péptidos antigénicos que pueden convertirse en blanco de una respuesta tumor específica mediada por linfocitos T. Estos antígenos de rechazo tumoral son expresados por tumores inducidos experimentalmente en roedores, y son usualmente específicos para un tumor individual. Por lo tanto, la inmunización con células tumorales irradiadas de un tumor protege al ratón contra la invasión por células vivas del mismo tumor, pero no tiene efecto contra células pertenecientes a otro tumor^{47,48}.

El término inmunovigilancia ha evolucionado a un concepto más complejo y amplio, la inmunoedición, introducido por Robert D. Schreiber. La inmunoedición se define por tres eventos claves: eliminación, equilibrio y escape (Figura 2) ^{45,49}.



Figura 2. *Fases del proceso de inmunoedición del cáncer*. La inmunoedición del cáncer procede a través de tres fases: eliminación, equilibrio y escape. a) Durante la fase de eliminación, el sistema inmune innato y adaptativo cooperan para reconocer células transformadas que escaparon mecanismos de supresión tumoral intrínseca y eliminarlas antes de que sean clínicamente detectables. b) Las células tumorales que son capaces de sobrevivir a la fase de eliminación entran en la fase de equilibrio, en donde los tumores son moldeados por el sistema inmune. c) Cuando el sistema inmune falla en controlar el crecimiento tumoral se entra en la fase de escape, este escape se da por una disminución en la inmunogenicidad de las células tumorales así como por la aparición de un ambiente inmunosupresor. *Tomando y modificado de O'Donnell et al, 2018*

La fase de eliminación es la visión contemporánea de la hipótesis original de inmunovigilancia, en donde los sistemas inmunes innato y adaptativo actúan juntos para erradicar el tumor en desarrollo^{50,51}. Aún no se han dilucidado completamente los mecanismos de reconocimiento de las células tumorales, ni cómo es activado el sistema inmune naïve por la transformación. Se cree que la expresión de ligandos inducidos por señales de estrés es uno de los mecanismos gatillados por el ADN dañado que puede alertar a células vecinas de la transformación temprana. Otras señales de peligro, que son liberadas por células recientemente transformadas o por células tumorales moribundas, pueden proveer de señales suficientes para alertar y activar el sistema inmune⁵². Estas señales de peligro pueden ser reconocidas por células de la inmunidad innata como pueden ser células "natural killer" (células NK), macrófagos, y células T "natural killer" (células NKT). En respuesta a las señales de peligro, las células NK y los macrófagos secretan citoquinas inflamatorias, como por ejemplo interferón gamma (IFN-γ) producida por las células NK, generando

mecanismos supresores de tumor. El IFN-y activa procesos anti-proliferativos, proapoptóticos y angiostáticos, que combinados con la acción de otras de las interleuquinas secretadas y de linfocitos citotóxicos, llevan a la muerte de un número significativo de células tumorales. Los macrófagos M1 a través de la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, como la interleuquina 1 (IL-1) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), inhiben la progresión tumoral ³⁸. A través de la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y del nitrógeno por los macrófagos, y de mecanismos dependientes de perforina mediados por células NK, se da la muerte de células tumorales adicionales. De esta forma se generan antígenos tumorales que pueden ser capturados por células dendríticas reclutadas en el tumor. Estas células dendríticas que capturaron antígenos tumorales y se activaron, migran al nódulo linfático que drena el tumor y allí activan a células T CD4⁺ y CD8⁺ naïve. Las células T CD4⁺ y CD8⁺ tumor específicas migran hacia el tumor para eliminar células tumorales viables que expresan dichos antígenos tumorales^{50,51}. Nuevamente la muerte de células tumorales generan antígenos tumorales que pueden ser presentados por células dendríticas a linfocitos T en el nódulo linfático que drena el tumor, de esta forma amplificando y ampliando las respuestas T. Esto se conoce como el ciclo Cáncer-Inmunidad⁵³.

Una vez que las células T están en el microambiente tumoral, el éxito de su acción anti-tumoral es determinada por su habilidad de superar barreras adicionales y defensas que encuentran por parte de las células tumorales, estromales, células T reguladoras, células mieloides supresoras, citoquinas inhibidoras, y otras células en el microambiente tumoral que actúan para mitigar las respuestas inmunes antitumorales⁵⁴. Las células NK y algunas células T, células T γδ, expresan el receptor NKG2D en su superficie. Dicha molécula es un receptor activador, que constituye uno de los mediadores principales para el reconocimiento y eliminación de células transformadas^{51,55}. Los ligandos de NKG2D son proteínas propias que se expresan en

bajos niveles en células normales, pero que aumenta su expresión en células estresadas. En humanos los ligandos de NKG2D incluye MICA y MICB. Las células que expresan estos ligandos pueden ser eliminados por células NK y células Tγδ en un proceso llamado vigilancia linfoide de estrés. Varios estudios sugieren que la expresión de ligandos de NKG2D podría ser directamente inducida por oncogenes. Se ha reportado una correlación entre algunos polimorfismos en NKG2D y la susceptibilidad de desarrollar cáncer de hígado y del cérvix uterino en humanos, sugiriendo un rol protector de NKG2D contra estas enfermedades^{56,57}. La expresión de moléculas endógenas inducidas por estrés es usado por el sistema inmune para reconocer y eliminar células pre-malignas⁵⁵.

Si la eliminación no es completamente exitosa, se entra en la fase de equilibrio, en la cual las células tumorales experimentan cambios o mutaciones que ayudan a su supervivencia como resultado de presiones selectivas impuestas por el sistema inmune (Figura 2)⁵⁸. Durante este proceso, los linfocitos y el IFN-y en el tumor ejercen una potente presión selectiva en las células tumorales, que es capaz de contener el crecimiento tumoral pero no eliminarlo completamente. Los tumores son moldeados por el ambiente inmunológico en el que se forman. Este proceso de moldeado generalmente conduce a la generación de tumores que son capaces de resistir mejor los mecanismos supresores tumorales del sistema inmune, por ejemplo se ha reportado la pérdida de expresión funcional de al menos tres componentes de la vía de señalización del receptor del IFN-y, lo que las hace resistentes al mismo⁴⁵. Por lo tanto, la intensiva interacción entre las células del sistema inmune y células tumorales, eventualmente induce la aparición de células tumorales con inmunogenicidad reducida. Estas células tumorales con inmunogenicidad reducida, son capaces de sobrevivir en un individuo inmunocompetente. Las alteraciones que deben ocurrir en la remodelación inmunológica del tumor en desarrollo son facilitadas por la inestabilidad genética inherente de las células tumorales^{45,51}. Como la fase de equilibrio involucra la

continua erradicación de las células tumorales, y la continua emergencia de variantes resistentes de células tumorales por la presión selectiva inmune, es posible que la fase de equilibrio sea la más larga de los tres procesos de la inmunoedición del cáncer y puede ocurrir por un período de varios años ^{50,52}.

Luego de la pérdida de la mayoría de los mecanismos intrínsecos y extrínsecos supresores tumorales, las células tumorales entran en la fase de escape (Figura 2). El escape de las células tumorales puede ocurrir a través de dos grandes cambios que ocurren a nivel de la célula tumoral per se y/o a nivel del microambiente tumoral. La reducción de la inmunogenicidad de las células tumorales puede disminuir el reconocimiento inmune. Además, las células tumorales pueden adquirir resistencia contra las funciones citotóxicas de las células del sistema inmune, como puede ser la expresión de moléculas anti-apoptóticas (bcl2) que impidan la muerte de las células tumorales. A nivel del microambiente tumoral, el escape puede ocurrir por el surgimiento de una red inmunosupresiva. Varios factores producidos por células tumorales y células del sistema inmune, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), la interleuquina 10 (IL-10) y la prostaglandina E2 y la indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO) contribuyen al establecimiento del microambiente inmunosupresor⁵⁰⁻⁵². Varias células del microambiente tumoral contribuyen al escape de las células tumorales del sistema inmune. Entre estas se encuentran las células T reguladoras, las células mieloides supresoras (MDSCs), macrófagos asociados al tumor de tipo II y células estromales. Los macrófagos asociados al tumor de tipo II afectan drásticamente la tumorigénesis, angiogénesis, intravasación, y pueden impedir el ataque de las células NK y células T durante el desarrollo tumoral³⁹. Las células tumorales que acumularon suficientes mutaciones para evadir el sistema inmune, pueden crecer sin obstáculos hasta ser clínicamente detectables.

El estudio de la relación entre el sistema inmune y el cáncer, y los mecanismos de evasión al sistema inmune utilizado por los tumores, han permitido el desarrollo de una variedad de terapias contra el cáncer que utilizan al sistema inmune del hospedero para generar respuestas contra las células tumorales. Estas terapias, denominadas inmunoterapias, serán desarrolladas a continuación.

Inmunoterapias contra el cáncer

Las terapias convencionales contra el cáncer son la resección quirúrgica, la quimioterapia y la radioterapia. La inmunoterapia, que es considerada la cuarta terapia, ha tomado gran importancia en el tratamiento del cáncer. Por otro lado, para algunos tipos de cáncer, como pueden ser el cáncer de próstata y mama, la hormonoterapia tiene gran uso clínico.

En la quimioterapia se utilizan fármacos que son citotóxicos, matando a células que se dividen rápidamente. Los objetivos de esta terapia es disminuir la masa tumoral por muerte directa así como disminuir la tasa de proliferación celular. Dado que los fármacos citotóxicos utilizados en quimioterapia actúan sobre células que proliferan rápidamente, actuarían también sobre células inmunes proliferantes resultando en inmunosupresión. Además, se pensaba que la muerte celular inducida por la quimioterapia no era inmunogénica. Por estas observaciones, históricamente se pensaba que los beneficios anti-tumorales de la quimioterapia era consecuencia de la citotoxicidad directa o al arresto permanente de la maquinaria del ciclo celular. Sin embargo, actualmente se reconoce que la muerte celular inducida por algunos quimioterapéuticos (antraciclinas y oxiplatino) genera cambios específicos en la superficie celular y la liberación de mediadores solubles que permiten a las células dendríticas reconocer la célula que está muriendo e iniciar una respuesta inmune anti-tumoral⁵⁹. En esta muerte celular inmunogénica se observa una re-localización de la proteína de retículo endoplasmático calreticulina a la membrana celular, la cual actúa

como señal "cómeme" al unirse a CD91 en macrófagos y células dendríticas. La unión de la calreticulina a CD91 en estas células presentadoras de antígeno promueve la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF). También se da la liberación de ATP que es esencial para el reclutamiento de células presentadoras de antígeno y la activación subsecuente del inflamasoma para liberar IL-1 β por células dendríticas. La liberación de ATP por la muerte celular inmunogénica media la activación del inflamasoma NLRP3, creando un vínculo entre respuestas inmune innatas y adaptativas. La activación del inflamasoma en células dendríticas lleva a la liberación de IL-1 β , y al reclutamiento posterior de células T $\gamma\delta$ y el "cebado" de células T CD8⁺ contra antígenos tumorales^{59,60}. Además se observa que en la muerte celular inmunogénica se da una liberación de HMGB1 (del inglés "*highmobility group box 1*") el cual señaliza a través de TLR-4 en las células dendríticas mejorando la presentación de antígenos^{59,61}.

La radioterapia es un tratamiento contra el cáncer altamente efectivo que lleva al control local del tumor y potencialmente a la cura en etapas tempranas del cáncer. Es bien sabido que la irradiación ionizante dirigida causa la muerte directa de células. Sin embargo, la irradiación es capaz de inducir la reducción del tumor en sitios no irradiados, éste fenómeno es conocido como efecto "abscopal" ^{62–64}. El sistema inmune sería el componente clave del efecto "asbcopal" luego de la radioterapia. La radioterapia local, al igual que algunos agentes quimioterapéuticos, induce muerte celular inmunogénica, llevando a respuestas inmunes del hospedero. Como se desarrolló anteriormente, en una muerte celular inmunogénica se da la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMPs) que gatillan la captura de antígenos por las células dendríticas así como la activación de las células presentadoras. Esto resulta en una mejor presentación de antígenos a los linfocitos citotóxicos. Es conocido que la irradiación además altera el fenotipo inmune del tumor al aumentar la expresión de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHC-

I) en la superficie de las células tumorales. Por otro lado, la radioterapia induce un patrón de citoquinas que facilita la migración y función de células T CD8⁺ efectoras ⁶². Sin embargo, los casos reportados de efecto "asbcopal" son pocos, y estudios preclínicos sugieren que este efecto inducido sólo por la radioterapia difícilmente tenga un impacto clínico importante en el control de la enfermedad en un contexto de metástasis⁶².

Por otro lado, las inmunoterapias contra el cáncer tienen como objetivo la utilización del sistema inmune del hospedero para la generación de respuestas de larga vida contra células tumorales⁶⁵. Las inmunoterapias contra el cáncer pueden clasificarse como activas o pasivas, dependiendo de su habilidad de activar (o reactivar) el sistema inmune del hospedero contra células malignas⁶⁶. Un ejemplo de inmunoterapia pasiva es la transferencia adoptiva de células T y la utilización de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el tumor, ya que estas terapias tienen actividad antineoplásica directa⁶⁶. En cambio, las vacunas contra el cáncer y los bloqueadores de puntos de control (BPC) inmunes son ejemplos de inmunoterapias activas, al activar o re-activar el sistema inmune del hospedero contra células es la durabilidad de sus respuestas, probablemente dado a la memoria del sistema inmune adaptativo, lo que se traslada en la sobrevida a largo plazo en un grupo de pacientes⁶⁷.

La primera inmunoterapia en ser aprobada por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA) fue el IFN- α en 1986 para el tratamiento de pacientes con tricoleucemia, y más tarde para otras leucemias y linfomas⁶⁸. Desde ese momento varios agentes han sido aprobados por la FDA así como por otras agencias reguladoras, pero un punto de inflexión en la inmunoterapia fue dado por la aprobación en 2011 del ipilimumab, un bloqueador de punto de control cuyo blanco es el CTLA4 (del inglés "*cytotoxic T lymphocyte-associated protein 4*"), para el tratamiento de melanoma. Más tarde fueron aprobados por la FDA cinco terapias de BPC adicionales,

todas teniendo como blanco el eje PD-1 (de inglés "*programmed cell death 1*") y su ligando PD-L1, para el tratamiento de una variedad de tipos tumorales. A continuación me focalizaré exclusivamente en los bloqueadores de puntos de control, pero cabe destacar que otras inmunoterapias, como puede ser la transferencia de células T autólogas modificadas por ingeniería genética para expresar un receptor antigénico quimérico específico (células CAR T), han mostrado excelentes resultados clínicos⁶⁵.

Bloqueadores de puntos de control inmunológicos

Los puntos de control inmunológicos (CTLA4, PD-1, entre otros) son de extrema importancia al mantener las respuestas inmunes dentro de un rango fisiológico deseado y protegen al hospedero de desarrollar autoinmunidad⁶⁹, sin embargo, son utilizados por los tumores a su favor, suprimiendo de esta forma respuestas inmune. Los bloqueadores de puntos de control inmune eliminan señales inhibitorias para la activación de células T, lo que permite a las células T específicas del tumor superar los mecanismos regulatorios y montar una respuesta anti-tumoral efectiva.

La expresión y función de CTLA4 se relaciona intrínsecamente con la activación de las células T, se induce luego de la activación de células T convencionales CD4⁺FoxP3⁻ y CD8⁺FoxP3⁻, sin embargo se expresa constitutivamente en células T reguladoras CD4⁺FoxP3⁺⁷⁰. La expresión de CTLA4 se ve aumentada inmediatamente luego de la unión del receptor de célula T (TCR) con su péptido específico presentado en moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), con un pico de expresión entre los 2-3 días luego de la activación. CTLA4 disminuye la señalización del TCR al competir con la molécula co-estimuladora CD28 por la unión a los ligandos B7 (B7-1 y B7-2), por los cuales CTLA4 presenta una mayor afinidad y avidez^{69,71}. Además del aumento en la expresión de CTLA4 luego de la activación del linfocito T, vesículas intracelulares que contienen CTLA4 son

movilizadas rápidamente a la sinapsis inmunológica. El grado de reclutamiento de CTLA4 a la sinapsis inmunológica se correlaciona directamente con la fuerza de la señal del TCR⁷⁰. Una vez en la sinapsis inmunológica, CTLA4 es estabilizado por la unión a B7, permitiendo que se acumule y que compita con CD28. A través de este mecanismo, CTLA4 atenúa la señal coestimuladora positiva por CD28 limitando la señalización corriente abajo de CD28, la cual es principalmente mediada por fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y AKT. Esto resulta en una potente regulación de la señalización del TCR, y por lo tanto de la actividad del linfocito T. La función principal de CTLA4 es regular la actividad de células T en el sitio de "cebado", por ejemplo en órganos linfoides secundarios. Sin embargo, CTLA4 también puede atenuar la activación de células T activadas⁶⁹. Dado el rol central de CTLA4 en la regulación de la activación de las células T, la co-inhibición por esta molécula es crítica para la tolerancia a antígenos propios⁶⁹.

Además de las funciones intrínsecas a través de las cuales CTLA4 atenúa la actividad de las células T, CTLA4 también puede modular la activación de estas células a través de mecanismos extrínsecos. La mayor parte de las funciones supresoras extrínsecas de CTLA4 están mediadas por las células T reguladoras (Treg). La expresión de CTLA4 en células Treg podría atenuar la activación de células T de manera extrínseca al limitar la disponibilidad de ligandos B7 para la coestimulación positiva de CD28 de células T efectoras cercanas⁶⁹. Por otro lado, se ha reportado que CTLA4 también puede actuar limitando la disponibilidad de los ligandos B7 a través de trans-endocitosis de B7-1 y B7-2 de células presentadoras de antígeno⁷². Cabe destacar que la expresión de CTLA4 no se restringe a las células T, sino que también se reportó expresada en células B y células dendríticas, pero el significado funcional de dicha expresión aún no es del todo conocida⁷⁰.

Otro punto de control inmunológico es la molécula PD-1. La función biológica primaria de PD-1 es mantener la tolerancia periférica y el mantenimiento de las respuestas de células T dentro de un rango fisiológico. El eje regulatorio PD-1/PD-L1 es uno de los mecanismos normales de tolerancia periférica a ciertos antígenos extraños y frente a antígenos propios. Dado que el eje regulatorio PD-1/PD-L1 es inducido por respuestas inmunes, constituye un mecanismo de retroalimentación negativa para atenuar respuesta de células T y minimizar el daño tisular^{69,71}. PD-1 regula la activación de las células T a través de la interacción con PD-L1 y PD-L2. PD-1 se expresa en células T, NK, NKT, células B, macrófagos y algunas subpoblaciones de células dendríticas durante la activación inmune e inflamación crónica. La señalización a través del TCR y algunas citoquinas (por ejemplo la IL-2 e IFN de tipo I) inducen la expresión de PD-1 en células T⁷⁰. Debido a que los ligandos de PD-1 se expresan ampliamente en tejidos no linfoides, PD-1 actúa principalmente regulando la activación de la célula T en periferia. Mientras que PD-L1 se expresa en una variedad de células hematopoyéticas y no hematopoyéticas, PD-L2 se expresa principalmente en macrófagos y células dendríticas, así como en células no hematopoyéticas en pulmón⁷⁰. La expresión de PD-L1, y en cierta medida también la de PD-L2, es inducida en respuesta a citoquinas inflamatorias como puede ser el IFN-v^{69,70}.

Luego de la unión a sus ligandos, PD-1 transmite una señal co-inhibitoria a través de la tirosina fosfatasa SHP2, atenuando la activación de la célula T. El reclutamiento de SHP2 atenúa directamente la señalización del TCR al desfosforilar elementos de señalización proximales⁶⁹. Recientemente se mostró que CD28 es preferencialmente desfosforilada en respuesta a la activación de PD-1 por PD-L1⁷³. Estos resultados indican que PD-1 suprime la función de las células T principalmente al inhibir la señalización de CD28, por lo que CTLA4 y PD-1 actúan al menos en parte a través del mismo mecanismo^{69,73}.

Generalmente la expresión de PD-1 se utiliza como marcador de célula T exhausta, sin embargo no es suficiente para definir una población funcionalmente exhausta. Las células T exhaustas se definen por la co-expresión de PD-1, LAG3 y TIM3. El agotamiento de las células T es un mecanismo importante que limita la actividad de las mismas en presencia de estimulación antigénica crónica y actúa para preservar clones de linfocitos T que de otra manera sufrirían una muerte celular inducida por activación⁶⁹.

Basados en el conocimiento de cómo actúan CTLA4 y PD-1, se cree que los anticuerpos anti-CTLA4 y anti-PD1 ejercen su función en diferentes etapas del ciclo Cáncer-Inmunidad. El bloqueo de CTLA4 actuaría principalmente en los sitios de "cebado" en donde se encuentra involucrada la co-estimulación positiva por CD28, mientras que el bloqueo de PD-1 actuaría a nivel de tejidos periféricos inflamados⁵³. Sin embargo, resultados publicados recientemente sugieren que los mecanismos de acción del bloqueo de CTLA4 y PD-1 no se encuentran limitados únicamente a estos sitios. Se ha reportado que se requiere de co-estimulación por CD28 para que el bloqueo de PD-1 logre rescatar células T CD8⁺ exhaustas⁷⁴. Por lo tanto, puede que el bloqueo de PD-1 actúe en tejidos periféricos así como en sitios de "cebado".

El mecanismo de acción preciso de las terapias de BPC aún no se encuentra del todo comprendido. Se cree que el bloqueo de CTLA4 induce el rechazo tumoral a través de diferentes mecanismos. El mecanismo principal parece ser el bloqueo directo de la competencia de CTLA4 con CD28 por la unión a B7. De esta manera, el bloqueo de CTLA4 potenciaría la señal co-estimuladora de CD28 y por lo tanto la activación de células T. Esto ocurriría en órganos linfoides secundarios, así como también podría ocurrir en estructuras linfoides terciarias asociadas al tumor. Se ha reportado que el tratamiento con anti-CTLA4 induce la expansión de tipos específicos de células T CD4⁺ efectoras, por lo que el bloqueo de CTLA4 potenciaría la inmunidad anti-tumoral a través de la modulación y expansión de poblaciones de células T

particulares⁶⁹. Además de estos mecanismos, la depleción de células Treg es un mecanismo de acción reportado del tratamiento con anti-CTLA4 en modelos tumorales murinos⁷⁵. La modulación del repertorio de TCR también puede contribuir a los efectos terapéuticos del bloqueo de CTLA4. El tratamiento con ipilimumab conduce a una remodelación y ampliación del repertorio de TCR periféricos, lo cual se ha visto asociado a eventos adversos inmuno-relacionados⁷⁶. La pérdida de CTLA4 bajaría el umbral de ligación del TCR requerido para una activación efectiva de la célula T, dado que normalmente el CTLA4 atenúa la fuerza de la señal del TCR. Al bloquear a CTLA4, antígenos con una fuerza de señal baja, que normalmente no inducirían una señal suficiente para generar una respuesta de célula T, podrían conducir a la activación de células T. Además, por este mecanismo también se podrían potenciar clones anti-tumorales de alta afinidad⁶⁹.

El bloqueo de PD-1 induce el rechazo tumoral al revitalizar a las células T CD8⁺, llevando a un aumento en la actividad funcional y en la frecuencia. El bloqueo de la señalización del eje PD-1 impide la atenuación de la señalización del TCR, permitiendo que se restaure la actividad de células T CD8⁺ exhaustas^{69,71}. Evidencias clínicas sugieren un modelo en el cual el bloqueo de PD-1/PD-L1 es más efectivo en tumores en los cuales respuestas T endógenas ya fueron activadas pero que se encuentran suprimidas por la unión a PD-L1 o PD-L2⁷⁷. El bloqueo de PD-1 principalmente conduce a la expansión de células T CD8⁺, sin embargo las células TCD4 son requeridas para respuestas anti-tumorales efectivas⁷⁸. Qué aspecto específico de la colaboración de las T CD4⁺ es requerido para las respuestas al bloqueo de puntos de control aún no es conocido. Recientemente fue reportado que una respuesta anti-tumoral efectiva luego del tratamiento con anti-PD-1 requiere de la infiltración en el tumor de células dendríticas productoras de IL-12⁷⁹. El tratamiento con anti-PD-1 induce directamente la producción de IFN-γ por células T activadas, el cual va a ser reconocido por células dendríticas intratumorales resultando en la producción
de IL-12. Por su parte, la IL-12 estimula la inmunidad anti-tumoral mediada por células T⁷⁹.

Cuando el bloqueo del eje PD-1/PD-L1 se lleva a cabo con anticuerpos anti-PD-L1 otro mecanismo que puede estar involucrado en el rechazo tumoral es la muerte directa de células tumorales a través de la citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC)⁶⁹.

Comprender el mecanismo por el cual las terapias de BPC funcionan es crítico para combinar eficientemente dichas terapias con otros agentes inmunoterapéuticos o quimioterapéuticos. Por ejemplo, la combinación del bloqueo de CTLA4 y PD-1 presenta una mejor eficacia terapéutica comparada con las monoterapias, pero con un aumento significativo en la toxicidad. Aún no es claro si la eficacia mejorada de la terapia combinada con anti-PD-1 y anti-CTLA4 es debida a una adición de los mecanismos celulares y moleculares de las respectivas monoterapias, o si el mecanismo es distinto al de las monoterapias⁶⁹.

Las inmunoterapias han revolucionado el manejo clínico de muchos cánceres. Sin embargo, solo una fracción (alrededor del 20-40%) de pacientes con cáncer responden al tratamiento con BPC, son de alto precio y generalmente se asocian a una toxicidad no despreciable. Esto hace crítico la identificación de biomarcadores predictivos robustos, que permitan identificar los pacientes que van a responder⁸⁰, así como entender los mecanismos que limitan la respuesta anti-tumoral inducida por las inmunoterapias⁶⁷.

Como se mencionó anteriormente, es fundamental el desarrollo de biomarcadores de respuesta a los BPC, de manera que permitan identificar, antes de comenzar el tratamiento, qué pacientes tienen mayor probabilidad de desarrollar una respuesta clínica. La probabilidad de que un paciente con cáncer obtenga un beneficio clínico de la inmunoterapia depende en su competencia inmunológica global, que

puede ser influenciada por factores relacionados al cáncer y al tratamiento. Dentro de estos factores se incluye variaciones en genes involucrados en la generación, regulación y ejecución de la inmunidad anti-tumoral, infecciones virales o fármacos que resultan en una inmunosupresión sistémica, y la composición de la microbiota intestinal⁸⁰.

El nivel de expresión de PD-L1 en células tumorales ha sido evaluado como un posible biomarcador de respuesta al bloqueo de PD-1. Mientras algunos estudios sugieren que la expresión de PD-L1 por las células tumorales podría ser un biomarcador predictivo de respuesta, algunos pacientes con tumores que no expresan PD-L1 logran tener un beneficio clínico duradero luego del bloqueo de PD-1. Por lo tanto, considerar únicamente el nivel de expresión de PD-L1 por las células tumorales no constituye un buen biomarcador de respuesta⁸¹.

Varios estudios muestran que un mayor infiltrado de linfocitos T en el tumor se asocia con una mejor respuesta y mayor sobrevida en pacientes con diferentes tipos de cáncer. Una mayor infiltración por células T CD8⁺ con alta expresión de PD-1 y CTLA4 ha sido relacionado fuertemente con una respuesta al bloqueo de PD-1⁸¹. Asimismo, la expresión de IFN-γ se ha asociado a una mejor respuesta, así como también una mayor carga mutacional⁸¹. Una marcada eficacia de los BPC se han reportado en pacientes con melanoma y cáncer de pulmón a células no pequeñas, los cuales son los tipos tumorales con mayor carga mutacional. Estas mutaciones en las células tumorales puede resultar en la generación de nuevos antígenos, neoantígenos, que podrían ser reconocidos como antígenos no propios por el sistema inmune, de esta manera potenciando la reactividad de las células T contra el tumor, y facilitando la eficacia de los BPC⁸¹. Por otro lado se han sugerido marcadores en sangre, teniendo como ventaja que es obtenida fácilmente en la práctica clínica y que es compatible con un muestreo seriado durante el tratamiento. Dentro de los marcadores en sangre se

encuentra el nivel de células T CD8⁺CD45RO⁺, un mayor porcentaje de estas células se asocia con respuesta al tratamiento con ipilimumab en pacientes con melanoma⁸¹.

A pesar de las asociaciones con el pronóstico mencionadas anteriormente, no existe consenso en la utilización de biomarcadores para predecir la respuesta a los BPC. Actualmente se está poniendo gran esfuerzo en lograr identificar biomarcadores de respuesta a los BPC que sean robustos. **Cabe destacar que la combinación de múltiples biomarcadores va a conducir a una mejor identificación de los pacientes con mayor probabilidad a responder a los BPC que un único biomarcador⁸².**

La resistencia a las inmunoterapias puede clasificarse clínicamente en primaria y adquirida. Pacientes que presentan resistencia primaria a los BPC no responden a la terapia desde un comienzo. En cambio, una fracción de pacientes responden inicialmente a los BPC pero luego de un tiempo tienen una recaída y el cáncer progresa, lo que se denomina resistencia adquirida⁶⁷. La inmunoedición del cáncer también ocurre en pacientes que reciben inmunoterapias contra el cáncer. Si la inmunoterapia es efectiva, conduce al tumor nuevamente a la fase de eliminación, que se ve reflejado como una respuesta clínica completa. En cambio, si la inmunoterapia no es lo suficientemente efectiva fuerza al tumor a entrar en una fase de equilibrio, lo que se caracteriza por una respuesta parcial. La selección de clones capaces de evadir o suprimir la inmunidad anti-tumoral inducida por la inmunoterapia resulta en un segundo escape, clínicamente caracterizado por una resistencia adquirida al tratamiento⁸³. Los mecanismos de resistencia pueden dividirse en los intrínsecos de la célula tumoral y los extrínsecos de las células tumorales. Dentro de los mecanismos intrínsecos se encuentran la ausencia de proteínas antigénicas (por ejemplo debido a una baja carga mutacional), deficiencia en la presentación antigénica, exclusión genética de las células T o insensibilidad a las células T. Por otro lado, dentro de los mecanismos de resistencia extrínsecos de las células tumorales se encuentran la

ausencia de células T en el microambiente tumoral, expresión de puntos de control inmunes inhibitorios (como pueden ser VISTA, LAG-3 y TIM-3), y presencia de células inmunosupresoras (como pueden ser macrófagos asociados al tumor y células Treg)⁶⁷. Recientemente se ha mostrado que desbalances iónicos a nivel del microambiente tumoral también constituyen un mecanismo de resistencia a las inmunoterapias. Una concentración alta en de K⁺ extracelular en el microambiente tumoral, dada por la necrosis de células tumorales, llevan a un aumento en la concentración intracelular de K⁺ en las células T que infiltran el tumor⁸⁴. Este aumento en el K⁺ intracelular conduce a una inhibición de la señalización del TCR, y por lo tanto a una supresión de la función efectora de células T⁸⁴. Para referirse a estos mecanismos el grupo de Nicholas Restifo ha propuesto el concepto de "puntos de control iónicos". La activación de canales de K⁺ en células T que permiten un eflujo de K⁺, y por lo tanto una disminución de la concentración de K⁺ intracelular, es capaz de restaurar la función de las células T ⁸⁴. Por lo tanto, estos puntos de control iónicos son blancos plausibles de nuevas inmunoterapias.

Comprender los mecanismos de resistencia a las inmunoterapias es importante para el desarrollo de terapias combinadas que logren vencer estos mecanismos, permitiendo de esta forma una mejor respuesta clínica. La mayor parte de las estrategias propuestas para vencer los mecanismos de resistencia primaria y adquirida apuntan a la manipulación del sistema inmune adaptativo, muy pocos encares de inmunoterapias anti-tumorales buscan activar actores moleculares del sistema inmune innato. Recientemente se mostró que la activación de la vía no canónica de NF-κB en células dendríticas intratumorales a través de agonismo de CD40 puede potenciar fuertemente el control tumoral mediado por anti-PD-1⁷⁹. Tratamientos combinados de agonistas de CD40 con bloqueadores de PD-1 se encuentran actualmente en ensayos clínicos. Asimismo, la importancia de la inmunidad innata se evidencia en estudios de biopsias de pacientes con melanoma en donde una mejor respuesta clínica al

tratamiento con BPC se correlaciona con un perfil de interferón de tipo I ⁸⁵. A su vez, la activación farmacológica de la vía de los interferones de tipo I a través de Tmem173 (STING) lleva a la estimulación de inmunidad mediada por linfocitos T CD8⁺ que mejora el efecto anti-tumoral del anti-CTLA4 y anti-PD1^{86,87}. Recientemente se ha reportado que la activación de STING conduce a una muerte celular programada lisosomal que activa al inflamasoma NLRP3⁸⁸. Como se comentó anteriormente, el inflamasoma NLRP3 tiene un rol en el cáncer y dado que, como se verá más adelante, esta tesis tiene como objetivo elucidar el impacto que tiene en la respuesta inmune anti-tumoral, a continuación se tratarán los antecedentes al respecto.

Inflamasoma y cáncer

En cuanto al rol del inflamasoma en el cáncer, el mismo es controvertido, teniendo tanto efectos anti-tumorales como pro-tumorales. Mutaciones en genes codificantes para componentes del inflamasoma usualmente se asocian a susceptibilidad a infecciones, enfermedades autoinflamatorias así como a cáncer en humanos. En el contexto del cáncer, polimorfismos en el gen NLRP3 se asocia con melanoma y cáncer de colon⁸⁹. Estudios en quimeras de médula ósea mostraron que la activación del inflamasoma NLRP3 en células hematopoyéticas, pero no en estromales, es esencial para mediar la protección contra la carcinogénesis asociada a colitis⁹⁰.

Se ha reportado que dos inyecciones en una semana de IL-18 recombinante en ratones potencia el desarrollo de metástasis de tumores B16F10, sin embargo la administración diaria por 5 días reduce el desarrollo tumoral⁹¹. Esto sugiere que la forma en la que es secretada la IL-18, en pulsos cortos o de forma crónica, podría determinar un resultado pro-tumoral o anti-tumoral. Pudiendo explicar de esta forma los resultados contradictorios de la literatura, en los diferentes modelos tumorales

podría activarse el inflamasoma NLRP3 de forma diferente llevando a resultados opuestos.

A su vez, también se han reportado diversos roles pro-tumorales a la IL-1 β . Se ha reportado que ratones deficientes en IL-1R presentan un retardo en la acumulación de MDSCs y una reducción en tumor primario mamario y metástasis^{89,92}. Se ha mostrado que diferentes agentes quimioterapéuticos como la gemcitabina y 5fluorouracilo llevan a la producción de IL-1ß por MDSCs, y esta producción induce la secreción de IL-17 por células T CD4⁺ disminuyendo la eficacia anti-tumoral de dichos quimioterapéuticos⁹³. A su vez, en un modelo de fibrosarcoma inducido por metilcolantreno la IL-1ß suprime la actividad anti-tumoral de las células NK y T, promoviendo de esta forma el desarrollo tumoral⁹⁴. Más recientemente se ha reportado sinérgico con el bloqueo de PD-1⁹⁵, sin embargo se evaluó mediante la inoculación de una única línea tumoral (células 4T1), pudiendo entonces no ser generalizable a otros tumores trasplantables. Un ensayo clínico en humanos, CANTOS, fue diseñado para el evaluar si Canakinumab, un anticuerpo monoclonal contra IL-1ß humana, podía prevenir eventos vasculares en pacientes estables luego de sufrir un infarto de miocardio y con una respuesta pro-inflamatoria persistente. Para entrar en el ensayo clínico, los pacientes no debían presentar diagnóstico previo de cáncer. De este ensayo se desprendió que la inhibición de la IL-1β con Canakinumab se asocia a una disminución en la ocurrencia de cáncer de pulmón en pacientes con aterosclerosis⁹⁶. Cabe destacar que además de la producción de IL-1β por células inmunes que infiltran el tumor, algunos tumores, como pueden ser los de melanoma avanzados, espontáneamente secretan IL-1β. La IL-1β producida por las células malignas gatillan la liberación de IL-6 en el microambiente tumoral, lo cual sugiere que la IL-1 β derivada del tumor puede activar vías de señalización parácrinas en donde las células estromales proveen de soporte trófico a las células tumorales³.

Por otro lado, existen evidencias que muestran que productos de la activación del inflamasoma, particularmente IL-1 β , tienen roles esenciales en la estimulación de respuestas inmunes adaptativas, importantes en las respuestas contra el cáncer. La IL-1 β estimula la secreción de IL-17 por células T $\gamma\delta$ y la polarización de respuestas de células T CD8⁺ hacia IFN- γ . El bloqueo de IL-1R con anakinra o utilizando anticuerpos neutralizantes específicos de IL1- β compromete de forma importante el efecto en la inhibición del crecimiento tumoral por algunos agentes quimioterapéuticos³. Además, como ya se mencionó anteriormente, la IL-1 β puede inducir la re-programación de células T reguladoras a células exTreg con funciones efectoras, y de esta forma favorecer las respuestas anti-tumorales²³.

De los antecedentes aquí expuestos se puede ver que el inflamasoma tiene roles pleiotrópicos y contradictorios en la oncogénesis. Por un lado afecta positivamente vías de muerte celular autónomas y respuestas inmunes antitumorales, sin embargo, también estimula procesos autócrinos y parácrinos que favorecen la inflamación carcinogénica, el crecimiento tumoral, la metástasis y angiogénesis. Por lo tanto, dependiendo del tipo de cáncer y del estadío del mismo, la inhibición del inflamasoma puede ser una opción terapéutica o ser contraindicado³.

Tmem176b como un potencial regulador iónico del inflamasoma

Nuestro equipo ha trabajado en la caracterización biológica de la proteína intracelular Tmem176b como un canal iónico con propiedades inmunorreguladoras. Como se comentó más arriba, el inflamasoma NLRP3 es activamente regulado por el contenido iónico del citosol. Especulamos entonces que Tmem176b podría controlar la activación del inflamasoma a través de mecanismos iónicos. A continuación me focalizaré sobre los aspectos conocidos de nuestra molécula de interés.

Tmem176b/TORID (TOlerance Related and InduceD) y su homólogo Tmem176a (HCA-112), son proteínas intracelulares transmembrana que pertenecen a la familia de proteínas MS4A (del inglés "*membrane-spanning 4-domains subfamily A*")⁹⁷. Ambas proteínas se encuentran expresadas de forma ubicua. Se ha reportado alta expresión de ARNm de Tmem176b en pulmón, riñon, nódulos linfáticos y bazo. El patrón de expresión de Tmem176a es similar, encontrándose alta expresión en pulmón, riñón y bazo ⁹⁸. A nivel la expresión en subtipos de células del sistema inmune, Tmem176b y Tmem176a presentan una alta expresión en células dendríticas derivadas de la médula ósea (BMDCs) y en células dendríticas convencionales. También están expresados en granulocitos, monocitos y en células dendríticas plasmocitoides⁹⁸. Más recientemente se reportó la expresión de Tmem176b y Tmem176a ha sido asociada al estado inmaduro de los monocitos y células dendríticas, disminuyendo su expresión notoriamente luego de la estimulación inflamatoria ⁹⁸.

Tanto Tmem176b como Tmem176a se localizan en la membrana endofagosomal y en la red trans-Golgi^{99,100}. Estudios filogenéticos sugieren que los genes Tmem176 comparten un gen ancestral común con la familia de genes MS4A, pero que divergieron y sufrieron expansión independiente^{97,101}. Estas proteínas presentan cuatro dominios trasmembrana hidrofóbicos interconectados por un "*loop*" intracelular y dos "*loops*" extracelulares con ambos extremos N- y C-terminal hacia el citosol (Figura 3) ¹⁰². Mediante análisis de la secuencia de Tmem176b, Eon Kuek *et al.* predicen que Tmem176b contiene un motivo ITIM (del inglés "*inmunoreceptor tyrosinbased inhibitory motif*")¹⁰², estos motivos clásicamente se asocian con la propagación intracelular de señales inhibidoras. La relevancia fisiológica de esta predicción aún resta ser explorada. TMEM176B y TMEM176A se localizan en el cromosoma 7q36.1 en humanos, en el 4q24 en ratas y en el 6B2.3 en ratones.



Figura 3. Topología predictiva de Tmem176b y de Tmem176a. Tmem176b y Tmem176a son proteínas intracelulares con 4 dominios trasmembrana, con los extremos amino y carboxi-terminal hacia el citosol. Tomado y modificado de Eon Kuek et al. 2015.

Tmem176b y Tmem176a interaccionan físicamente posiblemente formando multímeros 98,103.

Previamente se había reportado un aumento en la expresión de Tmem176b en corazones aloinjertados tolerados en comparación con los rechazados o los injertos singénicos⁹⁷. La función de esta proteína era desconocida al momento de este hallazgo. Nuestro grupo ha reportado que Tmem176b regula el pH fagosomal en BMDCs y de esa manera controla el procesamiento de antígenos exógenos para ser cargados en el MHC de clase I (vía de la presentación cruzada)¹⁰⁰. Estudios en oocitos de Xenopus en complemento de estudios en BMDCs demostraron que Tmem176b es un canal/transportador iónico, que en la membrana de fagosomas regula el pasaje de cationes lo que impacta directamente en la actividad V-ATPasa y de esa manera en el pH fagosomal¹⁰⁰. En un modelo de trasplante, se demostró in vivo que Tmem176b promueve el procesamiento de antígenos del órgano trasplantado a través de la presentación cruzada en BMDC tolerógenas. Esa presentación cruzada dependiente de Tmem176b conduce a la generación de células Treg CD8⁺CD11c⁺ específicas de los antígenos del donante en el ganglio que drena el órgano trasplantado¹⁰⁰. En ese trabajo, nuestro equipo demostró también de forma directa que las Treg CD8⁺CD11c⁺ inhiben el rechazo del trasplante.

A su vez, otros grupos han encontrado a Tmem176b sobre-expresado en células dendríticas migradoras que inhiben la respuesta inmune a vacunas¹⁰⁴, así como en células dendríticas involucradas en la diferenciación de las células Th2 ¹⁰⁵.

TMEM176B y TMEM176A han sido asociados con el cáncer. TMEM176A fue inicialmente identificado en una búsqueda de antígenos asociados a tumor en carcinoma hepatocelular¹⁰⁶. A su vez, también ha sido reportado una acumulación anormal de TMEM176B y de TMEM176A en determinados tipos de cáncer¹⁰³. Cuajungco et al observaron una mayor expresión de TMEM176A en carcinoma de pulmón con respecto a tejido normal, así como un aumento en la expresión de TMEM176B y TMEM176A en linfoma. A su vez, vieron que la relación entre la expresión de TMEM176B y TMEM176A cambiaba significativamente en pacientes con cáncer de mama, de hígado, de tejido linfoide y de piel, con respecto a pacientes normales ¹⁰³. Por otro lado, se ha reportado una sobre-expresión de TMEM176B en células endoteliales tumorales, estando involucrada en la migración de estas células¹⁰⁷. Recientemente se reportó niveles aumentados del ARNm de TMEM176B y TMEM176A en tejidos de cáncer gástrico comparado con tejido gástrico normal¹⁰⁸. En dicho trabajo, Sun et al también mostraron que los niveles de ARNm tanto de TMEM176B como de TMEM176A tenían valores pronóstico en cáncer gástrico. Mayores niveles de ARNm de TMEM176B y TMEM176A se asocia con una peor sobrevida de los pacientes con cáncer gástrico¹⁰⁸. Cabe destacar que en todos estos casos se evaluó la expresión de TMEM176B y TMEM176A a nivel del tejido tumoral, no diferenciando el infiltrado.

Los elementos planteados en la introducción nos han llevado a plantear la siguiente hipótesis de trabajo: **Tmem176B al ser un canal iónico, podría modular la activación del inflamasoma NLRP3 al influir en la homeostasis iónica, y de esta forma tener un rol en la respuesta inmune anti-tumoral.**

Objetivos

El objetivo general de esta tesis fue aportar conocimiento respecto al papel de la homeostasis iónica en la regulación de la activación del inflamasoma NLRP3, y su potencial impacto a nivel fisiopatológico.

Parte I

Como se mencionó anteriormente, el mecanismo preciso por el cual se activa el inflamasoma NLRP3 aún es controvertido. Sin embargo, la homeostasis iónica parece ser un factor determinante. A pesar del rol fuertemente evidenciado del eflujo de K⁺ en la activación del inflamasoma NLRP3, muy pocos canales iónicos o transportadores de K⁺ han sido relacionados con dicho inflamasoma.

El objetivo general de esta parte es evaluar la participación de canales de K⁺ en la activación del inflamasoma NLRP3.

Parte II

Teniendo en cuenta los antecedentes de nuestro equipo y de otros investigadores, Tmem176b emerge como una nueva molécula inmunorreguladora. Nuestra hipótesis de trabajo es que Tmem176b podría inhibir las respuestas inmunes anti-tumorales y de esta manera favorecer el crecimiento tumoral, probablemente a través de la regulación de la activación del inflamasoma.

El objetivo general de esta parte es profundizar la caracterización de Tmem176b como blanco de inmunorregulación en el cáncer.

Objetivos específicos

Parte I

Evaluación de la participación de canales de potasio activados por calcio $(K_{Ca}1.1 \text{ y } K_{Ca}3.1)$ en la activación del inflamasoma NLRP3.

Parte II

- 1- Estudio del mecanismo por el cual Tmem176b inhibe la activación del inflamasoma NLRP3.
- 2- Estudio de la importancia de la vía caspasa-1/IL-1β en la inmunidad antitumoral desarrollada en ratones deficientes en Tmem176b.
- 3- Identificación de inhibidores de Tmem176b.
- 4- Caracterización biológica del fármaco inhibidor de Tmem176b.
- Evaluación del rol del inflamasoma en las terapias con bloqueadores de puntos de control.

Resultados

Parte I

Publicación 1

Pro-inflammatory Ca⁺⁺-activated K⁺ channels are inhibited by hidroxychloroquine

María Eugenia Schroeder*, Sofía Russo*, Carlos Costa, Juliana Hori, Inés Tiscornia, Mariela Bollati-Fogolín, Darío S. Zamboni, Gonzalo Ferreira, Ernesto Cairoli & Marcelo Hill

Resumen

Uno de los procesos en donde los canales iónicos tienen un rol es en la activación del inflamasoma NLRP3. Los niveles de K⁺ y Ca²⁺ intracelular se cree que controlan la activación del inflamasoma, sin embargo muy pocos canales iónicos se han relacionado con dicha activación. En este sentido, los canales de potasio K_{Ca}1.1 y K_{Ca}3.1 que son activados por Ca²⁺ citosólico no habían sido hasta el momento relacionados al inflamasoma. Un activador conocido del inflamasoma NLRP3 es el ATP, que induce a través de P2X7R la movilización de K⁺ y Ca²⁺. En este artículo mostramos que los canales K_{Ca}1.1 están involucrados en la activación del inflamasoma por el ATP. A su vez, la activación farmacológica de K_{Ca}1.1 y K_{Ca}3.1 conduce a la activación del inflamasoma. La inhibición de estos canales por la hidroxicloroquina (HCQ) llevó a una inhibición en la activación del inflamasoma por el ATP tanto *in vitro* como *in vivo*.

Resultados

 Mediante ensayos de electrofisiología en macrófagos THP-1 mostramos que la HCQ es un inhibidor de los canales de potasio operados por calcio K_{Ca}1.1 y K_{Ca}3.1. En dichos ensayos se eliminaron las corrientes generadas por otros canales iónicos de K⁺, quedando únicamente la corriente a través de canales de K⁺ operados por Ca²⁺. La adición de HCQ en estas condiciones indujo una inhibición de la corriente de manera dosis dependiente.

- Realizamos ensayos de estimulación *in vitro* del inflamasoma NLRP3 en macrófagos THP-1. La inhibición farmacológica de los canales K_{Ca}1.1 con iberiotoxina conduce a la inhibición de la activación del inflamasoma por el ATP, evaluado por producción de IL-1β. A su vez, la HCQ también fue capaz de inhibir la activación del inflamasoma inducido por el ATP, evaluado tanto por producción de IL-1β como por la presencia de Caspasa-1 activa.
- La activación farmacológica de los canales K_{Ca}1.1 y K_{Ca}3.1 (con NS1619 y NS309, respectivamente) en macrófagos THP-1 previamente estimulados con LPS conduce a la producción de IL-1β. La activación del inflamasoma inducida por NS1619 y NS309 puede ser inhibida por la HCQ así como por otros inhibidores conocidos para estos canales (iberiotoxina para K_{Ca}1.1 y clotrimazol para K_{Ca}3.1).
- Se evaluó la capacidad de la HCQ en inhibir la activación del inflamasoma *in vivo*. Para eso se realizó un ensayo de reclutamiento de neutrófilos al peritoneo por inyección intraperitoneal de ATP. Previamente se trataron los ratones todos los días con HCQ, o control, por una semana. El reclutamiento de neutrófilos al peritoneo luego de la inyección del ATP fue menor en el grupo que fue tratado previamente con HCQ. Por lo tanto, la activación del inflamasoma *in vivo* por el ATP es inhibido por el pre-tratamiento de los ratones con HCQ.

Conclusiones

Logramos mostrar que los canales $K_{Ca}1.1$ y $K_{Ca}3.1$ promueven la activación del inflamasoma, de esta forma aportando dos canales de K⁺ a los ya relacionados con la activación de NLRP3. A su vez, reportamos un nuevo fármaco para la inhibición de los canales $K_{Ca}1.1$ y $K_{Ca}3.1$, la hidroxicloroquina. La hidroxicloroquina ejercería su efecto

anti-inflamatorio al menos en parte al inhibir al inflamasoma NLRP3 a través de canales de K⁺ activados por Ca²⁺.

SCIENTIFIC **Reports**

Received: 22 January 2017 Accepted: 4 April 2017 Published online: 15 May 2017

OPEN Pro-inflammatory Ca⁺⁺-activated K⁺ channels are inhibited by hydroxychloroquine

María Eugenia Schroeder 61, Sofía Russo^{1,2}, Carlos Costa³, Juliana Hori⁴, Inés Tiscornia⁵, Mariela Bollati-Fogolín⁵, Darío S. Zamboni⁴, Gonzalo Ferreira³, Ernesto Cairoli⁶ & Marcelo Hill^{1,2}

Antimalarials have demonstrated beneficial effects in Systemic Lupus Erithematosus and Rheumatoid Arthritis. However, the mechanisms and the molecular players targeted by these drugs remain obscure. Although hydroxychloroquine (HCQ) is a known ion channel inhibitor, this property has not been linked to its anti-inflammatory effects. We aimed to study whether HCQ inhibits pro-inflammatory ion channels. Electrophysiology experiments demonstrated that HCQ inhibited Ca++-activated K+ conductance in THP-1 macrophages in a dose-dependent manner. In macrophages, ATP-induced K⁺ efflux plays a key role in activating the NLRP3 inflammasome. ATP-induced IL-1beta secretion was controlled by the KCa1.1 inhibitor iberiotoxin. NS1619 and NS309 (KCa1.1 and KCa3.1 activators respectively) induced the secretion of IL-1beta. This effect was inhibited by HCQ and also by iberiotoxin and clotrimazol (KCa3.1 inhibitor), arguing against off-target effect. In vitro, HCQ inhibited IL-1beta and caspase 1 activation induced by ATP in a dose-dependent manner. HCQ impaired K⁺ efflux induced by ATP. In vivo, HCQ inhibited caspase 1-dependent ATP-induced neutrophil recruitment. Our results show that HCQ inhibits Ca⁺⁺-activated K⁺ channels. This effect may lead to impaired inflammasome activation. These results are the basis for i) a novel anti-inflammatory mechanism for HCQ and ii) a new strategy to target pro-rheumatic Ca++-activated K+ channels.

Antimalarials have demonstrated beneficial effects in Systemic Lupus Erithematosus (SLE) and Rheumatoid Arthritis (RA). In SLE management, hydroxychloroquine (HCQ) is considered as the "gold standard" therapy¹. However, the mechanisms by which HCQ helps to control pathogenic inflammation as well as molecular targets controlled by the drug are poorly understood². Additional knowledge in this field may certainly help to rationalize its clinical use. HCQ is a derivative of quinine, which is a well-known $\mathrm{K^+}$ channel inhibitor. HCQ has also been described to inhibit ion channels³. Ion channels are key regulators of innate and adaptive immune responses⁴. However, to our knowledge, the anti-inflammatory properties of HCQ have not been attributed to its ability to block ion channels. We therefore aimed to study whether HCQ inhibits pro-inflammatory ion channels.

Among others, the Ca++-activated K+ channels KCa1.1 and KCa3.1 have been involved in autoimmunity as well as cardiovascular disease⁵⁻⁹. KCa1.1 (SLO1, BKCa) are high conductance K⁺ channels activated both by membrane depolarization and cytosolic Ca⁺⁺. KCa1.1 are homotetramers of 4 pore-forming α -subunits, whose topology resembles that of voltage-gated K⁺ (K_v) channels. The C-terminus appears to confer ion sensitivity since Ca⁺⁺ binding sites and regulatory domains have been identified in this region of the KCa1.1 α subunit. In some but not all tissues, auxiliary β -subunits interact with KCa1.1 α -subunits to provide functional diversity. The intermediate-conductance Ca⁺⁺-activated K⁺ channel is composed of 4 KCa3.1 subunits and 4 calmodulin molecules. Unlike KCa1.1, KCa3.1 activation is voltage independent.

¹Laboratory of Immunoregulation and Inflammation, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay. ²lmmunobiology Department, Montevideo Faculty of Medicine, University of the Republic, Montevideo, Uruguay. ³Ion Channels Laboratory, Biophysics Department, Montevideo Faculty of Medicine, University of the Republic, Montevideo, Uruguay. ⁴Department of Cell Biology, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, FMRP/USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil. ⁵Laboratorio de Biotecnología, Facultad de Ingeniería-Universidad ORT Uruguay, Cuareim 1451, 11100, Montevideo, Uruguay. ⁶Unit of Systemic Autoimmune Diseases, "C" Medical Clinic Prof. Dr. Juan Alonso Bao, Hospital of Clinics, Montevideo Faculty of Medicine, University of the Republic, Montevideo, Uruguay. María Eugenia Schroeder and Sofía Russo contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to M.H. (email: mhill@pasteur.edu.uy)



Figure 1. HCQ inhibits Ca⁺⁺-activated K⁺ channels. Electrophysiology registers expressed as current density obtained through the whole cell path clamp technique using THP-1 cells. TEA is a K⁺ channel inhibitor, BAPTA AM is an intracellular Ca⁺⁺ chelator. Symbols are averaged normalized currents \pm SEM (n = 5, p < 0.05).

KCa1.1 channels are expressed in fibroblast-like synoviocytes (FLS) from Rheumatoid Arthritis patients⁹ and from rats with pristane-induced arthritis⁷. Its pharmacologic inhibition controls FLS proliferation, invasion as well as secretion of pro-inflammatory mediators^{8, 9}. As for KCa3.1, this channel is expressed by T cells¹⁰⁻¹³, macrophahes⁵ as well as DCs¹⁴. It has recently been reported that KCa3.1^{-/-} mice do not develop collagen-induced arthritis⁶. In agreement with this, KCa3.1 inhibition leads to controlled proliferation and secretion of pro-inflammatory molecules in RA FLS⁷. KCa1.1 and KCa3.1 have therefore been proposed as a molecular targets to control RA⁴.

One of the processes in which pro-inflammatory ion channels play a role is the activation of inflammasomes. Inflammasomes are cytosolic multiprotein complexes formed by a receptor, an adaptor molecule and caspase 1¹⁵. Canonical inflammasome assembly leads to the activation of pro-caspase 1 that then proteolitically activates the pro-inflammatory cytokines IL-1beta and IL-18. Inflammasomes are believed to play a role in lupus predisposition and pathogenesis^{16,17} as well as in RA^{18,19}. Intracellular Ca⁺⁺ and K⁺ levels are believed to control inflammasome activation, although the role played by Ca⁺⁺ is a matter of debate in this field¹⁵.

Since the ion channel inhibitor HCQ is a widely used anti-rheumatic drug and Ca^{++} -activated K⁺ channels promote autoimmunity, we speculated that HCQ may inhibit those conductances. Here we show that HCQ inhibits Ca^{++} -activated K⁺ channels probably leading to impaired inflammasome activation. These results are the basis for i) a novel anti-inflammatory mechanism for HCQ and ii) a new strategy to target pro-rheumatic Ca^{++} -activated K⁺ channels.

Results

We hypothesized that HCQ may inhibit the pro-rheumatic Ca^{++} -activated K⁺ channels. To directly address this question, we performed electrophysiology experiments in THP-1 macrophages. THP-1 macrophages are known to express Ca^{++} -activated K⁺ channels KCa1.1 and KCa3.1²⁰. We were able to record outward currents triggered by depolarizations starting at -20 mV and that were inhibited by TEA, BAPTA AM and IBTX (Fig. 1A–C) getting rid of other likely K⁺ conductances as described in "Methods". When adding 10 uM clotrimazole to the extracellular solution containing IBTX 50 nM, a very small current (about 5% of the total current) remained, especially at positive potentials (Fig. 1C). Thus, most of the calcium-activated potassium conductance was blocked by the combination of IBTX and clotrimazole. These results strongly suggest that calcium-activated potassium conductance is almost exclusively mediated by KCa3.1 and KCa1.1 in THP-1 macrophages. We then studied whether these currents could be inhibited by HCQ. In agreement with our hypothesis, we observed a dose-dependent inhibition which was maximal at 30 μ M (Fig. 1D).

We then wished to understand the mechanisms by which these channels may have pro-inflammatoy properties in human macrophages that would be relevant in rheumatic diseases. It is well known that K⁺ efflux plays a key role in ATP/P2X7R-induced inflammasome activation. Although a role for cytosolic Ca⁺⁺ has been proposed



Figure 2. KCa1.1 and KCa3.1 may be involved in inflammasome activation. IL-1beta secretion by THP-1 cells under the indicated treatments. NS1619 ($25 \,\mu$ M) and Ibtx ($50 \,n$ M) are KCa1.1 activator and inhibitor respectively. NS309 ($10 \,\mu$ M) and clotrimazole ($10 \,\mu$ M) are KCa3.1 activator and inhibitor respectively. DMSO was used as vehicle control. One experiment representative of three is shown. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

in this pathway, its importance is a matter of debate. To study this issue we treated LPS-primed THP-1 cells with

ATP and quantified IL-1beta by ELISA. We modulated KCa1.1 and KCa3.1 with specific pharmacologic activators and inhibitors. Interestingly, IL-1beta secretion induced by ATP was controlled by a KCa1.1 inhibitor like IBTX at 50 nM (Fig. 2A). However, ATP-induced IL-1beta secretion was not inhibited by a KCa3.1 inhibitor (Fig. 2B). KCa1.1 is known to be activated by depolarization and Ca⁺⁺, whereas KCa3.1 is voltage-independent⁴. Thus, the Ca⁺⁺ increase triggered by ATP might not be enough to activate KCa3.1. However, Ca⁺⁺ increase in the context of strong depolarization triggered by ATP may activate KCa1.1. We then activated KCa1.1 and KCa3.1 by using NS1619 and NS309, respectively. Interestingly, both drugs separately induced IL-1beta secretion in the absence of ATP (Fig. 2C,D). These observations are unlikely due to off-target effects since they were blocked by the inhibitors iberiotoxin (KCa1.1) and clotrimazole (KCa3.1) (Fig. 2C,D). Importantly, HCQ was also able to inhibit NS1619 and NS309-induced IL-1beta secretion. (Fig. 2C,D). Thus, our results suggest that KCa1.1 and KCa3.1 may promote inflammasome activation. Moreover, our results also suggest that HCQ could be an inflammasome inhibitor. We were then interested in studying this hypothesis.

We cultured human and mouse macrophages and dendritic cells (DCs) in which NLRP3 inflammasome was activated by ATP or nigericin, in the presence or not of HCQ. ATP is known to act on P2X7 ionotropic receptors leading to K^+ and Ca^{++} mobilization and inflammasome activation. In contrast to particulate stimuli, ATP does not induce the acidification of endolysosomes²¹. Thus, a potential effect of HCQ in this system should not be explained by its lysosomotropic activity. Nigericin is an ionophore that mediates K⁺ efflux. We observed that HCQ inhibited ATP-induced IL-1 beta secretion in a dose-dependent manner in all the cell types studied (Fig. 3Ai and Supplementary Figure 1). Chloroquine (CQ) also inhibited ATP-induced IL-1beta secretion in THP-1 macrophages (Supplementary Figure 2). However, it was not able to inhibit nigericin-induced IL-1beta secretion (Fig. 3Aii). Western blot studies showed that HCQ treatment impaired the secretion of mature IL-1beta but did not modify the levels of pro-IL-1beta in the cell lysate when stimulated with ATP (Fig. 3B). Caspase 1 activation was also inhibited by HCQ in a dose-dependent manner. Again, HCQ could not inhibit IL-1beta nor caspase 1 activation triggered by nigericin (Fig. 3B). In agreement with our hypothesis, HCQ inhibited ATP (Fig. 3Ci) but not nigericin-induced K⁺ efflux in THP-1 macrophages (Fig. 3Cii). Our results from Fig. 3A-C suggest that HCQ does not seem to inhibit a process downstream the nigericin-triggered K⁺ efflux. This observation is in agreement with the fact that HCQ may inhibit endogenous K⁺ channels. We then induced inflammasome activation by promoting K⁺ efflux. We cultured cells in buffer without K⁺. As expected, this condition induced IL-1beta secretion.

www.nature.com/scientificreports



Figure 3. HCQ inhibits ATP-induced inflammasome activation. *In vitro* experiments were carried out with PMA-differentiated THP-1 macrophages. (A) Cells were primed with 0.25 μ M LPS for 3 hours and then washed. When HCQ was used, it was added at this step during 15 minutes. Without further washing, cells were then treated for 45 minutes with 5 mM ATP or 2.5 μ M nigericin, in the presence or not of HCQ. Culture supernatant was harvested and IL-1beta was quantified by ELISA. One experiment representative of five is shown. (B) Western blot analyses of culture supernatant of THP-1 cells treated with the indicated compounds. One experiment representative of five is shown. (C) K⁺ efflux was studied by quantifying intracellular K by spectroscopy under the indicated treatments. A pool of three independent experiments is shown. (D) Western blots studying IL-1beta maturation in cells cultured during 45 minutes with physiological buffer or without K⁺. One experiment representative of two is shown. (E) WT or caspase-1^{-/-} C57Bl/6 mice were injected with 20 mg/kg ATP. 4 hs later, peritoneal lavage was performed and cells were stained with anti-CD11b and Ly6G antibodies. In HCQ-treated animals, 1 mg/kg of the drug was injected i/p daily 7 days before ATP injection. i) Representative dot plots are shown. ii) Neutrophil quantification from two independent experiments. *p < 0.05; **p < 0.01; ***p < 0.001.

However, IL-1beta secretion was not inhibited by HCQ (Fig. 1D). Thus, HCQ might inhibit K⁺ channels that are actively regulated by other ion and/or second messenger. Along this line, HCQ did not impair cytosolic Ca⁺⁺ increases induced by ATP (Supplementary Figure 3). These evidences support the hypothesis that HCQ controls inflammasome activation and that this effect is achieved through the inhibition of Ca⁺⁺-activated K⁺ channels.

We then wished to determine whether HCQ inhibits inflammasome activation *in vivo*. To study this issue, we injected ATP i/p in WT and caspase $1-11^{-/-}$ mice. Intraperitoneal injection of ATP is known to recruit neutrophils in a caspase-1-dependent manner. HCQ treatment inhibited ATP-induced neutrophil recruitment, phenocopying the caspase $1-11^{-/-}$ mice (Fig. 1E). These results suggest that HCQ inhibits inflammasome activation *in vivo*.

Taken together, our results show that HCQ inhibits Ca^{++} -activated K^+ channels probably leading to impaired inflammasome activation.

Discussion

Here we showed that HCQ can have anti-inflammatory properties through the inhibition of ion channels. This is a novel anti-inflammatory mechanism for antimalarials. Electrophysiology experiments directly showed that KCa1.1 and probably KCa3.1 channels are inhibited by HCQ. But which is the biological consequence of such inhibition? Our pharmacologic evidence suggests that these channels may be involved in inflammasome activation. We believe that the results showing that KCa1.1 and KCa3.1 activators promote IL-1beta secretion are not due to off-target effects. Those observations were in fact completely blocked by specific inhibitors of those channels. On the other hand, the fact that clotrimazole controls NS309-triggered IL-1beta also argues against off-target effects of the inhibitor. Thus, the inhibition of Ca⁺⁺-activated K⁺ channels by HCQ may lead to impaired inflammasome activation. We showed *in vitro* that HCQ inhibits ATP-induced caspase 1 activation and secretion of the mature form of IL-1beta in a dose dependent manner in human and mouse macrophages and dendritic cells. The following evidence support the interpretation that this effect is achieved through the inhibition of Ca⁺⁺-activated K⁺ channels: i) HCQ inhibits ATP but not nigericin or low extracellular K⁺-induced inflammasome activation. ii) HCQ does not inhibit cytosolic Ca⁺⁺. iii) HCQ impairs K⁺ efflux induced by ATP but not by nigericine.

We therefore believe that HCQ inhibits inflammasome activation *in vitro* and *in vivo*, probably through the inhibition of Ca⁺⁺-activated K⁺ channels. Inhibited neutrophil recruitment obtained by HCQ treatment phenocopies caspase $1^{-/-}$ mice upon ATP injection (Fig. 3E). Within the context of our results shown in Figs 2 and 3A–D, our interpretation was that data on Fig. 3E could be explained because HCQ inhibits neutrophil recruitment through the inhibition of inflammasome activation. However, it is also possible that HCQ inhibits neutrophil recruitment through the control of migration by directly inhibiting KCa3.1 on those phagocytes²².

Ion channels are considered key determinants in the leukocyte biology. Among others, the Ca⁺⁺-activated K⁺ channels KCa1.1 and KCa3.1 are believed to promote pathogenic inflammation. The discovery of inhibitors of these channels may be useful in chronic diseases. Along this line, recent papers have suggested that KCa1.1⁸ and KCa3.1^{6,7} may play a pathogenic role in RA.

In SLE management, hydroxychloroquine (HCQ) is considered as the "gold standard" therapy¹. Its withdrawn has been associated to increased lupus flares. Moreover, HCQ is believed to increase long-term survival of lupus patients. A key determinant of survival in SLE is cardiovascular disease. Carotid plaque is more prevalent and develops earlier in SLE patients as compared to healthy controls²³. Along this line, HCQ improves the lipid and glucose metabolic profiles. We have shown that a short-term (3 months) treatment with HCQ led to decreased total cholesterol and LDL in SLE patients²⁴. Metabolic syndrome has been associated to increase cardiovascular risk as well as cumulative organ damage in SLE patients²⁵. Importantly, HCQ use might be a protective factor for cardiovascular disease in SLE²⁵. Furthermore, NLRP3 inflammasome activation has been shown to play a key role in promoting atherosclerosis as well as type II diabetes¹⁵. Thus, inflammasome inhibition by HCQ might also explain the metabolic protective effects of the drug. Our results showing that HCQ inhibits inflammasome activation add a new mechanism by which HCQ can control autoimmunity and coronary disease.

In conclusion, our results show that HCQ inhibits Ca^{++} -activated K⁺ channels. This effect may lead to impaired inflammasome activation. These results are the basis for i) a novel anti-inflammatory mechanism for HCQ and ii) a new strategy to target pro-rheumatic Ca^{++} -activated K⁺ channels.

Methods

Whole cell patch-clamp. THP-1 macrophages were patched following standard procedures. Corning 7052 glass pipettes were pulled using a P-2000 micropette puller (Sutter Ins. Co.), to yield 3–5 MOhms pipettes filled with basic internal and external/bath solutions. The basic external/bath solution contained (mM): 140 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl2, 1 MgCl2, 10 glucose, 10 Hepes (pH 7.4). The basic intracellular solution contained (in mM): 140 KCl, 10 NaCl, 1–2 EGTA, 3 Mg-ATP, 10 Hepes (pH 7.2); CaCl2 was added to bring free [Ca⁺⁺] to the desired concentrations (100–300 nM), using maxchelator with affinity constants for Mg²⁺ and EGTA, obtained from Martell and Smith, 1977. Several K⁺ channels have been described in THP-1 cells. To get rid of IDR Kv channels, we applied 100 uM 4-aminopyridine (4-AP) to the bath. To get rid of IKr, we applied a P/12 protocol as control. Currents were recorded using a Model 2400 AM patch amplifier at 10 KHz, previously filtered at 2 KHz. (AM Systems Inc.), using pClamp (Molecular Devices). To evaluate a possible contribution of chloride currents, initial experiments were performed with Gluconate substitution by Chloride. No significant differences were obtained with the Chloride containing solutions (data not shown). Data was analyzed using Clampft (Molecular Devices) and Sigmaplot 11 (Jandel Scientific). When evaluating a possible role of HCQ in the remaining Ca⁺⁺ activated K⁺ currents, HCQ was added to the bath at a concentration range varying between 1–30 µM.

Cell lines and primary cultures. Mouse BMDC and human monocyte-derived DCs were generated *in vitro* as previously described²⁶. THP-1 cells (ATCC[®] TIB-202TM) were differentiated to macrophages by treating them with 0.1 μ M PMA during 48 hs.

Reagents. HCQ, LPS, nigericin, ATP, NS169, NS309, clotrimazol, IBTX, TEA and BAPTA-AM were from Sigma (St Louis). Anti-IL-1beta and anti-caspase 1 were from Santa Cruz Biotechnologies. Human IL-1beta ELISAs were from BD.

In vivo inflammasome activation. Animal experimentation protocol (004–15) was approved by the Animal Ethics Committee from Institut Pasteur de Montevideo. All methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations. 6–10 weeks old C57BL6/NJ WT and caspase $1-11^{-/-}$ from Jackson Laboratories were used. 20 mg/kg ATP was injected i/p to saline or HCQ (1 mg/kg) i/p treated animals. HCQ was done daily since day -7.4 hs after ATP injection, peritoneal lavage was done. Neutrophils were quantified by FACS using anti-CD11b and anti-Ly6G antibodies.

Flow cytometry. Peritoneal lavage was recovered and cells were stained with anti-CD11b-APC (BD, clone M1710, dilution 1/500), anti-Ly6G-PE (BD, clone 1A8, dilution 1/200) and anti-Ly6C-FITC (BD, clone AL-21, dilution 1/200) for 20 minutes at 4 °C in PBS-0.2% SBF-0.1% sodium azide (PSA). Cells were wash 2 times with PSA and then analyzed using BD Accuri C6 (BD Bioscience) or CyAn ADP (Beckman Coulter) flow cytometer. Data analysis was performed with FlowJo software. Between 8 and 5 million cells were recovered from the peritoneal lavage, and at least 20000 single cell events were recorded.

Statistical analysis. One-way anova analysis was performed to compare three or more groups using Tukey's comparison.

References

- Costedoat-Chalumeau, N., Dunogué, B., Morel, N., Le Guern, V. & Guettrot-Imbert, G. Hydroxychloroquine: A multifaceted treatment in lupus. Presse Médicale 43, e167–e180 (2014).
- Rainsford, K. D., Parke, A. L., Clifford-Rashotte, M. & Kean, W. F. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology* 23, 231–269 (2015).
- 3. Capel, R. A. *et al.* Hydroxychloroquine reduces heart rate by modulating the hyperpolarization-activated current If: Novel electrophysiological insights and therapeutic potential. *Heart Rhythm* **12**, 2186–2194 (2015).
- 4. Feske, S., Wulff, H. & Skolnik, E. Y. Ion Channels in Innate and Adaptive Immunity. Annu. Rev. Immunol. 33, 291–353 (2015).
- Toyama, K. et al. The intermediate-conductance calcium-activated potassium channel KCa3.1 contributes to atherogenesis in mice and humans. J. Clin. Invest. 118, 3025–3037 (2008).
- Raychaudhuri, S. K., Wulff, H. & Raychaudhuri, S. P. KCa3.1^{-/-} Mice Do Not Develop CIA: Regulatory Role for KCa3.1 in Autoimmune Arthritis: KCa3.1^{-/-} MICE DO NOT DEVELOP CIA. J. Cell. Physiol. 231, 2313–2314 (2016).
- Friebel, K., Schönherr, R., Kinne, R. W. & Kunisch, E. Functional role of the KCa3.1 potassium channel in synovial fibroblasts from rheumatoid arthritis patients: FUNCTION OF KCa3.1 IN SYNOVIAL FIBROBLASTS. J. Cell. Physiol. 230, 1677–1688 (2015).
 Tanner, M. R. et al. KCa1.1 Inhibition Attenuates Fibroblast-like Synoviocyte Invasiveness and Ameliorates Disease in Rat Models
- of Rheumatoid Arthritis: Targeting KCa1.1 Channels in Animal Models of RA. Arthritis Rheumatol 67, 96–106 (2015).
- 9. Hu, X. *et al.* KCa1.1 Potassium Channels Regulate Key Proinflammatory and Invasive Properties of Fibroblast-like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis. *J. Biol. Chem.* **287**, 4014–4022 (2012).
- Eil, R. *et al.* Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. *Nature* 537, 539–543 (2016).
 Cahalan, M. D. & Chandy, K. G. The functional network of ion channels in T lymphocytes. *Immunol. Rev* 231, 59–87 (2009).
- Chi, V. et al. Development of a sea anemone toxin as an immunomodulator for therapy of autoimmune diseases. *Toxicon Off. J. Int. Soc. Toxinology* 59, 529–546 (2012).
- Panyi, G., Beeton, C. & Felipe, A. Ion channels and anti-cancer immunity. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci* 369, 20130106 (2014).
 Shao, Z., Makinde, T. O. & Agrawal, D. K. Calcium-Activated Potassium Channel KCa3.1 in Lung Dendritic Cell Migration. *Am. J.*
- Respir. Cell Mol. Biol. 45, 962–968 (2011). 15. Rathinam, V. A. K. & Fitzgerald, K. A. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. Cell 165, 792–800
- (2016).
- Pontillo, A. et al. Polimorphisms in Inflammasome Genes Are Involved in the Predisposition to Systemic Lupus Erythematosus. Autoimmunity 45, 271–278 (2012).
- Kahlenberg, J. M. & Kaplan, M. J. The inflammasome and lupus: another innate immune mechanism contributing to disease pathogenesis? Curr. Opin. Rheumatol. 26, 475-481 (2014).
- Mathews, R. J. et al. Evidence of NLRP3-inflammasome activation in rheumatoid arthritis (RA); genetic variants within the NLRP3inflammasome complex in relation to susceptibility to RA and response to anti-TNF treatment. Ann. Rheum. Dis. 73, 1202–1210 (2014).
- Walle, L. V. et al. Negative regulation of the NLRP3 inflammasome by A20 protects against arthritis. Nature, doi:10.1038/ nature13322 (2014).
- DeCoursey, T. E., Kim, S. Y., Silver, M. R. & Quandt, F. N. Ion channel expression in PMA-differentiated human THP-1 macrophages. J. Membr. Biol. 152, 141–157 (1996).
- Hornung, V. et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. Nat. Immunol. 9, 847–856 (2008).
- Henríquez, C. et al. The calcium-activated potassium channel KCa3.1 plays a central role in the chemotactic response of mammalian neutrophils. Acta Physiol. Oxf. Engl 216, 132–145 (2016).
- Roman, M. J. et al. Prevalence and Correlates of Accelerated Atherosclerosis in Systemic Lupus Erythematosus. N. Engl. J. Med. 349, 2399–2406 (2003).
- Cairoli, E., Rebella, M., Danese, N., Garra, V. & Borba, E. Hydroxychloroquine reduces low-density lipoprotein cholesterol levels in systemic lupus erythematosus: a longitudinal evaluation of the lipid-lowering effect. *Lupus* 21, 1178–1182 (2012).
 Demir, S. *et al.* Metabolic syndrome is not only a risk factor for cardiovascular diseases in systemic lupus erythematosus but is also
- Denni, S. et al. Microbiolity into the short only a first factor for cardiovascian discassion in system inputs (c) international out is also associated with cumulative organ damage: a cross-sectional analysis of 311 patients. *Lupus* 25, 177–184 (2016).
 Segovia, M. *et al.* Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation.
- Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg 14, 1021–1031 (2014).

Acknowledgements

We are grateful to Mercedes Segovia and Pablo Oppezzo for critically reading the manuscript. This work was supported by CABBIO, Uruguay INNOVA 2 and Fondo Maria Viñas from ANII as well as grants from PEDECIBA, Ecossud and FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Fund), COF 03/11 to MH. PEDECIBA, ANII and CSIC p944,p146 to GF. We are grateful to Philippe Hulin and the MicroPICell core facility (Nantes University) for excellent assistance in Ca⁺⁺ imaging.

Author Contributions

M.E.S. and S.R. contributed equally to this work. M.E.S. and S.R. performed cell culture and ELISA. M.E.S. performed western blot studies. S.R. did *in vivo* experiments. C.C. and G.F. did electrophysiology experiments. I.T., M.B.-F., J.H. and D.S.Z. contributed cell types. E.C. and M.H. designed and supervised research. M.H. wrote the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-01836-8

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/.

© The Author(s) 2017

Supplementary Figure 1. HCQ inhibits ATP-induced IL-1beta secretion

Human monocyte-derived DCs (A), mouse BMDCs (B) and murine immortalized macrophages (C) were treated with the indicated compounds.

In all the cases LPS was used at 0,25mg/ml during 3 hours. Cells were washed and then ATP was added at 2 mM (DCs) or 5mM murine macrophages for 45 minutes. When indicated, HCQ was added during ATP treatment at 3 (+) or 30 µM (++).

One experiment representative of at least three is shown. *=p<0,05; **=p<0,01; ***=p<0,001



+

-

ATP HCQ

++

+

+

Supplementary Figure 2. Chloroquine (CQ) inhibits ATP-induced IL-1beta secretion THP-1 macrophages were treated with LPS at 0,25mg/ml during 3 hours. Cells were washed and then ATP was added at 5mM for 45 minutes. When indicated, CQ was added during ATP treatment at 1 (+) or 10 µM (++).

One experiment representative of three is shown. *=p<0,05; **=p<0,01;



Supplementary Figure 3. HCQ does not inhibit ATP-induced liberation of cytosolic Ca**.

Cells were loaded with Fura-2. 340/380 emission fluorescence was registered through videomicropscopy. At "time 0" 5 mMATP was added to the culture. Cells were left untreated or treated with 10µM HCQ 30 minutes before the registration. One experiment representative of three is shown.



Parte II

Publicación 2

Targeting Tmem176B enhances antitumor immunity and augments the efficacy of immune checkpoint blockers by unleashing inflammasome activation

Mercedes Segovia*, Sofía Russo*, Mathias Jeldres, Yamil D. Mahmoud, Valentina Pérez, Maite Duhalde, Florencia Veigas, Cédric Louvet, Bernard Vanhove, R. Andrés Floto, Ignacio Anegon, Maria C. Cuturi, M. Romina Girotti, Gabriel A. Rabinovich & Marcelo Hill

Resumen

El papel jugado por el inflamasoma en el cáncer es altamente controvertido, reportándose roles tanto pro- como anti-tumorales. Nosotros especulábamos que Tmem176b, un canal catiónico inmunorregulador, podría inhibir al inflamasoma y de esa manera afectar la inmunidad anti-tumoral. En este artículo mostramos que la disrupción de Tmem176b contribuye al rechazo tumoral al desinhibir al inflamasoma. Las inmunoterapias con bloqueadores de puntos de control (BPC) han revolucionado el manejo clínico de muchos tipos de cáncer. Sin embargo, solo una fracción (~20-40%) de los pacientes tratados con BPC responden al tratamiento, lo que hace sumamente relevante el estudio de mecanismos de resistencia y de biomarcadores predictivos de respuesta. En este sentido, logramos mostrar que la ausencia o el bloqueo farmacológico de Tmem176b mejora la eficacia de los BPC a través de la desinhibición del inflamasoma. A su vez, mostramos que los pacientes que responden al tratamiento con BPC presentan un aumento en la expresión de genes asociados al inflamasoma. Por lo tanto, este trabajo relaciona la activación del inflamasoma con respuestas anti-tumorales inducidas por los BPC, y plantea un nuevo blanco molecular (Tmem176b) para potenciar el efecto anti-tumoral de los BPC.

Resultados

- Encontramos que Tmem176b inhibe la activación del inflamasoma NLRP3 tanto *in vivo* como *in vitro*. Para los ensayos *in vivo* se inyectó ATP intraperitonealmente a ratones WT, *Tmem176b^{-/-} y Tmem176b^{-/-}Caspasa-1^{-/-}*. La deficiencia en Tmem176b llevó a un mayor reclutamiento de neutrófilos al peritoneo que en los WT, y esto fue dependiente de la activación del inflamasoma ya que se perdió en los ratones doblemente deficiente en Tmem176b y Caspasa-1. Mediante ensayos *in vitro* en BMDCs WT o *Tmem176b^{-/-}* mostramos que luego de su estimulación con diferentes activadores del inflamasoma NLRP3 las BMDCs *Tmem176b^{-/-}* producían significativamente más IL-1β que las BMDCs WT, lo mismo fue cierto para la Caspasa-1 activa.
- La inhibición del inflamasoma por Tmem176b se da a través del control de la concentración de Ca²⁺ citosólico. El estímulo con ATP en BMDCs *Tmem176b^{-/-}* resultó en un aumento mayor en la concentración del Ca²⁺ intracelular que en BMDCs WT. Mostramos que la activación del inflamasoma en las BMDCs *Tmem176b^{-/-}* era dependiente del calcio intracelular así como del eflujo de K⁺. La inhibición de los canales de K⁺ operados por Ca²⁺ con iberiotoxina e HCQ llevó a una inhibición más pronunciada en la secreción de IL-1β por las BMDCs *Tmem176b^{-/-}* que por las BMDCs WT. Nuestros resultados sugieren que Tmem176b inhibe la acumulación de Ca²⁺ citosólico inducido por el ATP, impidiendo de esta forma la activación del inflamasoma por los canales de K⁺ activados por Ca²⁺.
- La deficiencia en Tmem176b potencia respuestas inmunes anti-tumorales de manera dependiente de las células T CD8⁺, IL-1β y Caspasa-1. Ratones *Tmem176b^{-/-}* inoculados con células tumorales (EG7, MC38 o LL/2) mostraron un menor crecimiento tumoral y una mejor sobrevida que ratones WT.

Evaluando el mecanismo de esta diferencia, encontramos una mayor activación de Caspasa-1 en células dendríticas convencionales tipo 2 residentes (cDC2) del ganglio que drena el tumor de los ratones *Tmem176b*^{-/-} comparados con los WT. A su vez, a nivel del microambiente tumoral evidenciamos un mayor infiltrado por células T CD8⁺ tanto totales como específicas del tumor en los ratones *Tmem176b*^{-/-} comparados con los WT. Si a los ratones *Tmem176b*^{-/-} con cáncer se les depletaban las células T CD8⁺, se neutralizaba la IL-1 β , o eran también deficientes en Caspasa-1, el efecto protector observado por la deficiencia en Tmem176b se perdía.

- La activación del inflamasoma potencia la respuesta anti-tumoral por las terapias de bloqueo de puntos de control. Encontramos que el tratamiento con anti-CTLA4 en ratones *Tmem176b^{-/-}* era más eficaz que en ratones WT. Este aumento en el efecto anti-tumoral del bloqueo de CTLA4 en ratones *Tmem176b^{-/-}* fue dependiente del inflamasoma, dado que se perdía el efecto en los ratones deficientes en Tmem176b y Caspasa-1. A su vez, mostramos que el efecto del bloqueo de los puntos de control CTLA4 y PD-1 son dependientes del inflamasoma, la deficiencia en Caspasa-1/11 o en NLRP3 llevan a la pérdida del efecto anti-tumoral del tratamiento.
- Mostramos que en pacientes con melanoma, la sensibilidad a los BPC se asocia con un patrón de genes relacionados a la activación del inflamasoma. Analizamos los perfiles de expresión génica a partir de biopsias de dos cohortes independientes de pacientes con melanoma tratados con anti-PD-1. Nuestros resultados muestran que los pacientes que responden al tratamiento presentan durante el mismo un aumento en la expresión de genes relacionados al inflamasoma.
- La inhibición farmacológica de Tmem176b con BayK8644 induce una respuesta anti-tumoral dependiente de inflamasoma y mejora la eficacia de los

BPC. Mediante un paneo de diferentes inhibidores de canales iónicos encontramos un inhibidor de Tmem176b, BayK8644. El tratamiento de ratones WT con BayK8644 resultó en una mejor sobrevida que los ratones tratados con el control. Este efecto anti-tumoral fue dependiente de las células T CD8⁺ y de Caspasa-1. A su vez, la combinación de BayK8644 con anti-CTLA4 o anti-PD-1 resultó en una mejora de eficacia de los BPC.

Conclusiones

En este artículo mostramos que Tmem176b inhibe al inflamasoma NLRP3 al controlar los niveles de Ca²⁺ citosólico. Confirmamos nuestra hipótesis de que Tmem176b disminuye respuestas anti-tumorales, ya que la deficiencia de Tmem176b potencia respuestas anti-tumorales de manera dependiente de la activación del inflamasoma. Logramos identificar un inhibidor de Tmem176b, BayK8644, que logra prolongar la vida de ratones con cáncer de manera dependiente de células T CD8⁺ y de Caspasa-1. Por otro lado, también mostramos que el inflamasoma tiene un rol en promover la inmunidad anti-tumoral gatillada por los bloqueadores de puntos de control. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la desinhibición del inflamasoma en el tratamiento con bloqueadores de puntos de control de pacientes con cáncer podría mejorar la eficacia de dicho tratamiento.

Targeting TMEM176B enhances antitumor immunity and augments the efficacy of immune checkpoint blockers by unleashing inflammasome activation.

Mercedes Segovia^{1,2,3,10}, Sofia Russo^{1,2,3,10}, Mathias Jeldres^{1,3}, Yamil D. Mahmoud⁴, Valentina Perez^{1,3}, Maite Duhalde^{1,3}, Pierre Charnet⁵, Matthieu Rousset⁵, Sabina Victoria^{1,3}, Florencia Veigas⁴, Cédric Louvet⁶, Bernard Vanhove^{6,7}, R. Andrés Floto⁸, Ignacio Anegon⁶, Maria C. Cuturi^{6,11,*}, M. Romina Girotti^{4,11}, Gabriel A. Rabinovich^{4,9,11} and Marcelo Hill^{1, 2, 3,11,12*}.

- 1. Laboratory of Immunoregulation and Inflammation, Institut Pasteur de Montevideo; 11400, Montevideo, Uruguay.
- 2. Immunobiology Department, Faculty of Medicine, University of the Republic; 11800, Montevideo, Uruguay.
- Center for Translational Immunology, FOCIS Center of Excellence, Montevideo Faculty of Medicine, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay.
- Laboratory of Immunopathology and Laboratory of Translational Immuno-Oncology, Institute of Biology and Experimental Medicine (IBYME), National Council of Scientific and Technical Investigations (CONICET), C1428 Buenos Aires, Argentina.
- 5. Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), UMR 5247, CNRS ENSCM, Université de Montpellier. 34093 Montpellier, France.
- INSERM UMR 1064, Center for Research in Transplantation and Immunology; Université de Nantes; CHU Nantes, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN); 44093 Nantes, France.
- 7. Xenothera. 44093 Nantes, France.
- 8. Molecular Immunity Unit, Department of Medicine, University of Cambridge. CB2 0QH Cambridge, UK.
- 9. Department of Biological Chemistry, School of Exact and Natural Sciences, University of Buenos Aires, C1428 Buenos Aires, Argentina.
- 10. Equal contribution.
- 11. Co-senior authors
- 12. Lead contact

* Correspondence: mhill@pasteur.edu.uy; ccuturi@nantes.inserm.fr.

SUMMARY

Although immune checkpoint blockers have yielded significant clinical benefits in patients with different malignancies, the efficacy of these therapies is still limited. Here, we show that disruption of Transmembrane Protein 176b (Tmem176b)/Tolerance-Related and Induced cation transporter (Torid) contributes to CD8⁺ T cell-mediated tumor growth inhibition by unleashing inflammasome activation. Lack of *Tmem176b* enhances the antitumor activity of anti-CTLA-4 antibodies through mechanisms involving Caspase-1/IL-1β activation. Accordingly, patients responding to checkpoint blockade therapies display an activated inflammasome signature. Finally, we identify BayK8644 as a potent Tmem176b inhibitor that promotes CD8⁺ T cell-mediated tumor control and reinforces the antitumor activity of both anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies. Thus, pharmacologic de-repression of the inflammasome by targeting TMEM176B may enhance the therapeutic efficacy of immune checkpoint blockers.

SIGNIFICANCE

Therapies targeting immune checkpoint pathways have revolutionized treatment of several cancers. However, innate and adaptive mechanisms may limit the clinical efficacy of this immunotherapeutic modality. Here, we identify the Transmembrane Protein 176B (Tmem176b) as an innate immune checkpoint that curtails CD8⁺ T cell mediated immunity by repressing inflammasome activation. Genetic disruption or pharmacologic inhibition of Tmem176b potentiates antitumor immunity and enhances the efficacy of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies in mice by unleashing inflammasome activation. Accordingly, an activated inflammasome signature delineates favorable clinical responses in patients receiving immune checkpoint blockers. Thus, targeting TMEM176B may influence antitumor effector mechanisms by de-repressing inflammasome activation.

INTRODUCTION

Stimulation of adaptive antitumor responses has revolutionized the therapeutic management of a variety of cancers (Baumeister et al., 2016; Sharma and Allison, 2015; Topalian et al., 2015, 2016). Immune checkpoint blockers unleash antitumor Tcell responses by interrupting co-inhibitory signals that normally hold effector T cells in check. Blockade of immune checkpoints, including the cytotoxic T lymphocyteassociated protein (CTLA)-4 and the programmed cell death-1 (PD-1)/PD ligand-1 (PD-L1) pathway, have increased overall survival and progression-free survival of cancer patients. However, only a restricted number of patients show clinical benefits (Syn et al., 2017), suggesting that other immune inhibitory mechanisms may limit the efficacy of these treatments. Thus, identification of novel targets and biomarkers of response to treatment are necessary to develop novel immunotherapeutic drug combinations (Binnewies et al., 2018; Krieg et al., 2018; Pitt et al., 2016; Sharma et al., 2017). In this regard, an ionic disbalance within the tumor microenvironment has been shown to hinder the efficacy of immunotherapeutic strategies. High intratumoral K⁺ led to T-cell dysfunction by inhibiting voltage and Ca⁺⁺-dependent K⁺ channels expressed in antitumoral T lymphocytes (Eil et al., 2016), suggesting a role for ionic channels as emerging regulatory checkpoints and therapeutic targets to reinforce anti-tumor immunity.

A number of innate immune players can shape antitumor immunity and influence cancer immunotherapeutic strategies by positively or negatively controlling T-cell activation, differentiation, expansion and survival (Berraondo et al., 2016). Recognition of immunogenic tumors by innate immune sensors including the Tmem173 (STING) type I interferon (IFN) pathway leads to stimulation of CD8⁺ T cell-mediated immunity and potentiation of CTLA-4- and PD-1-targeted therapies (Corrales et al., 2015; Demaria et al., 2015; Woo et al., 2014). Moreover, a type-I IFN signature is associated with ipilimumab sensitivity in melanoma patients (Chiappinelli et al., 2015).

Furthermore, STING controls the NLRP3 inflammasome within the human myeloid cell compartment (Gaidt et al., 2017).

The inflammasome is a cytosolic multiprotein complex which, once activated, cleaves Caspase-1 which then processes pro-IL-1β and pro-IL-18 to give the active and secreted forms of these pro-inflammatory cytokines (Rathinam and Fitzgerald, 2016). Altered levels of cytosolic cations have been shown to control secretion of active IL-1β through modulation of inflammasome activation (Gong et al., 2018; Muñoz-Planillo et al., 2013; Murakami et al., 2012). Interestingly, activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells (DCs) following chemotherapy triggers vigorous CD8⁺ T cell-mediated antitumor responses (Ghiringhelli et al., 2009) and immunogenic chemotherapy sensitizes tumors to immune checkpoint blockers (Pfirschke et al., 2016). However, the role of the NLRP3 inflammasome in modulating checkpoint blockade therapies has not yet been explored.

Transmembrane Protein 176B (TMEM176B)/Tolerance-related and induced (TORID) has been recently identified as an immunoregulatory cation channel (Anandasabapathy et al., 2014; Condamine et al., 2010; Drujont et al., 2016; Louvet et al., 2005; Segovia et al., 2014). This ubiquitously expressed intracellular protein is composed by four transmembrane domains containing an ITIM motif in its C-terminal (Condamine et al., 2010; Eon Kuek et al., 2016; Louvet et al., 2005). Tmem176a and its homologous Tmem176b are members of the CD20-like MS4A family of proteins (Eon Kuek et al., 2016; Louvet et al., 2005) and are highly expressed in monocytes, macrophages and CD11b⁺ DCs (Condamine et al., 2010; Louvet et al., 2005). Here we explored the role of Tmem176b in inflammasome-dependent Caspase-1/IL-1 β activation, T-cell-dependent antitumor immunity and response to immune checkpoint blockade therapies.

RESULTS

TMEM176B inhibits activation of the NLRP3 inflammasome.

To investigate whether TMEM176B regulates inflammasome activation and antitumor immunity through the control of ion homeostasis, we first conducted in vivo experiments by injecting ATP in WT or Tmem176b^{-/-} mice (Figure 1A). In this model, neutrophil recruitment to the peritoneal cavity relies on Caspase-1/11 activation (Schroeder et al., 2017; Xiang et al., 2013). We observed that Tmem176b^{-/-} mice recruited significantly more neutrophils than WT animals. To determine whether increased neutrophil recruitment upon ATP injection was dependent on inflammasome activation, we generated *Tmem176b^{-/-}Casp1^{-/-}* double KO mice (Figure S1A). Peritoneal neutrophil recruitment was almost completely inhibited in Tmem176b^{-/-}Casp1^{-/-} as compared to *Tmem176b^{-/-}* animals (Figure 1A). ATP-induced neutrophil recruitment in Tmem176b^{-/-} mice was also interrupted by injection of a Caspase-1 inhibitor (Figure S1B). We then stimulated WT and *Tmem176b*^{-/-} bone marrow-derived DCs (BMDCs) with the well-established NLRP3 activators ATP and nigericin and determined IL-1ß in culture supernatants as a readout of inflammasome activation. We observed that for both stimuli, *Tmem176b^{-/-}* BMDCs secreted significantly higher levels of IL-1 β than WT DCs in a dose and time-dependent manner (Figures 1B-C). Similar findings were observed when we stimulated BMDCs with aluminum particles (Figure S1C). Western blot studies confirmed that the mature (cleaved) form of IL-1ß was more abundant in culture supernatants from Tmem176b^{-/-} BMDCs as compared to those obtained from WT cells (Figure 1D). Moreover, we observed increased mature Caspase-1 in supernatants from Tmem176b^{-/-} BMDCs compared to WT cells when stimulated with ATP (Figure 1D). Although lower doses (2.5 µM) of nigericin induced expression of mature Caspase-1 in culture supernatants from Tmem176b^{-/-} but not WT BMDCs (Figure 1D), higher doses of this NLRP3 activator (5 µM) induced cleavage of

Caspase-1 in WT DCs whereas LPS alone did not (Figure S1D). In agreement with this observation, flow cytometry studies using the FLICA1 reagent revealed higher Caspase-1 activation in *Tmem176b^{-/-}* BMDCs (Figure 1E). These results suggest that increased Caspase-1 activation contributes to higher secretion of mature IL-1 β in Tmem176b^{-/-} BMDCs. To confirm these findings, we then induced inflammasome activation in WT and Tmem176b^{-/-} BMDCs in the presence or absence of a Caspase-1 inhibitor. Remarkably, IL-1 β secretion was completely inhibited in WT and Tmem176b^{-/-} BMDCs when Caspase-1 activation was interrupted (Figure 1F). Moreover, IL-1ß secretion was completely abrogated in *Tmem176b^{-/-}Casp1^{-/-}* BMDCs (Figure 1G). Thus, increased IL-1 β secretion observed as a result of *Tmem176b^{-/-}* deficiency requires intact Caspase-1 activity. Moreover, Tmem176b^{-/-} BMDCs also secreted higher amounts of IL-18 as compared to WT cells in a Caspase-1-dependent manner (Figure 1H). We then speculated that TMEM176B overexpression may impair IL-1β secretion in cells in which the inflammasome was activated. To address this issue, THP-1 differentiated macrophages were transfected with TMEM176B/GFP or GFP alone (Figure S1E) and then treated with LPS and nigericin. TMEM176B over-expression impaired IL-1 β secretion as compared to GFP-transfected cells (Figure 1I). This effect was not associated with increased cell death as compared to GFP-transfected cells (Figure S1F). Thus, cation channel TMEM176B inhibits activation of the NLRP3 inflammasome.

TMEM176B inhibits the inflammasome through the control of cytosolic Ca⁺⁺

TMEM176B is an endophagosomal non-selective monovalent cation channel (Segovia et al., 2014). Because the NLRP3 inflammasome is tightly regulated by cytosolic K⁺ (Muñoz-Planillo et al., 2013) and Ca⁺⁺ (Murakami et al., 2012) levels, we speculated that TMEM176B may inhibit inflammasome activation through the
regulation of ion homeostasis. To address this question, we first determined cytosolic Ca⁺⁺ levels using the ratiometric Ca⁺⁺-sensitive probe Fura-2 in WT and *Tmem176b*^{-/-} BMDCs stimulated with ATP. BMDCs lacking *Tmem176b* showed greater cytosolic Ca⁺⁺ as compared to WT BMDCs (Figure 1J). Interestingly, intracellular Ca⁺⁺ chelation using BAPTA-AM completely blocked IL-1 β secretion in WT and *Tmem176b*^{-/-} BMDCs (Figure 1K). This effect was also dependent on K⁺ efflux in WT and *Tmem176b*^{-/-} BMDCs (Figure 1L).

We recently proposed that Ca⁺⁺-activated K⁺ channels are involved in ATPtriggered inflammasome activation (Schroeder et al., 2017). We therefore inhibited Ca⁺⁺-activated K⁺ channels in ATP-treated WT and *Tmem176b^{-/-}* BMDCs and determined the amounts of IL-1 β in culture supernatants. Inhibition of channel function using iberiotoxin or hydroxychloroquine (Schroeder et al., 2017) led to dose-dependent reduction in IL-1 β secretion by WT BMDCs. Interestingly, IL-1 β secretion by *Tmem176b^{-/-}* BMDCs was completely abrogated by both inhibitors at doses that partially inhibited IL-1 β secretion in WT BMDCs (Figure 1M-N). Thus, heightened inflammasome activation in *Tmem176b^{-/-}*BMDCs is highly dependent on Ca⁺⁺-activated K⁺ channels. These results suggest that TMEM176B impairs ATP-induced cytosolic Ca⁺⁺ accumulation, preventing Ca⁺⁺-dependent K⁺ channel-driven inflammasome activation.

Lack of *Tmem176b* restrains tumor growth in an IL-1 β - and Caspase-1-dependent manner

To investigate whether TMEM176B-mediated regulation of inflammasome activation may influence anti-tumor immunity, we first examined the association of TMEM176B expression in human cancer. High stromal TMEM176B expression was associated with significantly lower overall survival in colon cancer patients (n=90; p=0.0194; Log-rank Mantel-Cox test) (Figure S2A-B). Moreover, we detected a striking negative correlation between *TMEM176B* and *NLRP3/IL1B* expression from single cell RNA-seq analysis in macrophages infiltrating human melanoma [data analyzed from (Jerby-Arnon et al., 2018)], suggesting a role for this axis in the tumor microenvironment (Figure S2C). Accordingly, *Tmem176b*^{-/-} mice inoculated with MC38 (colon), LL/2 (LLC1; lung) or EG7 (thymic lymphoma) cell lines showed higher survival (Figure 2A) and reduced tumor growth (Figure S2D) compared to WT mice. Although Tmem176b is expressed by the three tumor cell lines studied (Figure S2E), immune cells from tumor-bearing *Tmem176b*^{-/-} animals did not show enhanced *in vivo* cytotoxicity against WT cells as compared to tumor-bearing *Tmem176b*^{+/+} mice (Figure S2F), suggesting that tumor-associated Tmem176b is not immunogenic in *Tmem176b*^{-/-}

To investigate the mechanisms underlying TMEM176B contribution to tumor growth, we then studied inflammasome activation in tumors developed in WT and *Tmem176b*^{-/-} mice. We found no differences in Caspase-1 activation when comparing those tumors lysates (Figure S2G). However, we found increased Caspase-1 activation in tumor-draining lymph nodes (TDLN) from *Tmem176b*^{-/-} mice compared to WT animals as shown by Western blot (Figure 2B-C) and immunofluorescence staining (Figure 2D-E). Moreover, flow cytometry analysis revealed augmented Caspase-1 activation in resident CD11c^{hi} MHCII⁺ CD11b⁺ classical DCs (cDCs) in *Tmem176b*^{-/-} versus WT TDLN from tumor-bearing mice (Figure 2F-G and Figure S2H). Migratory and resident DCs were discriminated based on CD11c and MHCII expression (Figure S2H) as described (Kissenpfennig et al., 2005; Laoui et al., 2016). Interestingly, CD11c^{hi} MHCII⁺ CD11b⁺ cDCs expressed considerable amounts of Tmem176b (Crozat et al., 2011) and TDLN contained higher frequency of CD11b⁺ Tmem176b⁺ cells compared to lymph nodes from naïve animals (Figure S2I).

Since CD11b⁺ cDCs induce differentiation of Th17 cells (Durai and Murphy, 2016), we then speculated that this CD4⁺ T-cell subset may augment in TDLN from *Tmem176b*^{-/-} mice. We observed increased frequency of $TCR\beta^+CD4^+ROR\gamma t^+$ cells in TDLN from *Tmem176b^{-/-}* animals as compared to WΤ and anti-IL-1βtreated *Tmem176b^{-/-}* mice (Figure S2J). Moreover, *in vitro* re-stimulation of TDLN cells with OVA showed increased proportion of IL-17⁺ CD4⁺ T cells in Tmem176b^{-/-} as compared to WT mice (Figure S2K) and in vivo IL-17A blockade showed a clear trend toward suppression of the antitumor effect in tumor-bearing *Tmem176b^{-/-}* mice (Figure S2L). Thus, Tmem176b deficiency is associated with an enhanced frequency of functional TCR β^+ CD4⁺ ROR γ t⁺ IL-17⁺ T cells in an inflammasome-dependent manner.

To study whether increased inflammasome activation could be responsible of tumor control in mice lacking *Tmem176b*, we blocked IL-1 β and studied EG7 tumor development. Whereas *Tmem176b*^{-/-} mice showed reduced tumor growth and increased mice survival when treated with control IgG, this effect was eliminated when mice were treated with anti-IL-1 β neutralizing antibodies (Figure 2H). Thus, *Tmem176b* deletion inhibits development of syngeneic tumors in an IL-1 β -dependent fashion. Tumor growth control was also rescued in *Tmem176b*^{-/-} Casp1^{-/-} double knockout mice (Figure 2I), suggesting that the diminished tumor growth observed in *Tmem176b*^{-/-} mice was dependent on inflammasome activation

To further examine the cellular effectors involved in tumor growth inhibition in *Tmem176b*^{-/-} mice, we then analyzed a panel of immunological mediators by quantitative RT-PCR. Notably, no differences were found between tumors grown in WT or *Tmem176b*^{-/-} mice (Figure S3A left panel). Moreover, we did not find significant changes in the percentage or absolute numbers of infiltrating myeloid, B, NK, NKT or CD4⁺ $\alpha\beta$ T cells between WT and *Tmem176b*^{-/-} tumors (Figure S3B). However, the percentage of total CD8⁺TCR β ⁺ cells within the tumor infiltrate as well as the absolute

number of total and tumor-specific CD8⁺T cells were considerably increased in tumors grown in *Tmem176b^{-/-}* mice compared to those developed in WT mice (Figure S4A-B). Notably, although increased absolute numbers of CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T (Treg) cells were found within tumors developed in Tmem176b^{-/-} as compared to WT animals (Figure S4C), an increased Teff (CD8) / Treg (Foxp3) ratio was apparent (Figure S4C). Moreover, tumor-infiltrating CD8⁺ T cells from *Tmem176b^{-/-}* mice showed greater proliferation compared to those obtained from WT animals when re-stimulated in vitro with OVA MHC-I peptide (Figure S4D). Interestingly, we found downregulation of the Treg-related molecules Foxp3, CTLA-4, CCL5, CCL19 and CCL22 in TDLN from Tmem176b^{-/-} versus WT mice (Figure S3A right panel). Moreover, decreased percentages but not absolute numbers of TCR β^+ CD4⁺ Foxp3⁺ Treg cells were observed in TDLN from Tmem176b^{-/-} versus WT mice (Figure S5A-B). Moreover, the CD8/Treg ratio in TDLN was significantly increased in mice lacking Tmem176b (Figure S5B). In vivo, MHC I-dependent CD8⁺ T-cell mediated cytotoxicity against the tumorassociated OVA antigen was increased in tumor-bearing Tmem176b^{-/-} compared to WT mice (Figure 2J and Figure S4E). This effect was prevented in Tmem176b^{-/-} animals treated with anti-IL-1 β antibodies (Figure 2K) as well as in Tmem176b^{-/-}Casp1^{-/-} animals (Figure 2L). Within the tumor microenvironment, CTLs from Tmem176b^{-/-} Casp1^{-/-} showed lower expression of the degranulation marker CD107a as compared to *Tmem176b^{-/-}* mice (Figure S4F). Interestingly, depletion of CTLs in *Tmem176b^{-/-}* mice using an anti-CD8 monoclonal antibody rescued tumor growth to similar levels as those observed in WT mice (Figure 2M). Thus, Tmem176b deletion enhances CTL-mediatedtumor control through mechanisms involving the Caspase-1-IL-1ß pathway. This mechanism is associated with inflammasome-dependent induction of TCRB⁺ CD4⁺ ROR γ t⁺ cells. Altogether, these results support a role for TMEM176B as an emerging immune checkpoint that interrupts inflammasome activation and links innate and adaptive antitumor responses.

Inflammasome activation reinforces immune checkpoint blockade therapies

Given the influence of Tmem176b deletion in antitumor immunity, we investigated whether targeting this ion channel might control the efficacy of checkpoint blockade therapies. Remarkably, we found greatly diminished tumor growth when anti-CTLA-4 antibodies were inoculated in Tmem176b^{-/-} as compared to WT mice. Improved survival observed in anti-CTLA-4-treated *Tmem176b^{-/-}* mice was dependent on inflammasome activation as this effect was abrogated in Tmem176b^{-/-}Casp1^{-/-} animals (Figure 3A). To investigate this further, we injected anti-CTLA-4 or anti-PD-1 mAb in EG7 tumor-bearing Casp1/11^{-/-} or NIrp3^{-/-}mice. Genetic deficiency of Casp1/11 eliminated the anti-tumor effects triggered by CTLA-4 or PD-1 blockade (Figure 3B). Although the experiments performed in *NIrp3^{-/-}* mice did not reach statistical significance, there was a clear tendency towards lower survival in those mice when treated with anti-CTLA-4 or anti-PD-1 mAb (Figure 3C). Moreover, we found no differences in tumor growth in mice lacking inflammasome components under control conditions (Figure 3B-C) in agreement with previous reports (Ghiringhelli et al., 2009). These results highlight the importance of triggering inflammasome activation to improve the efficacy of checkpoint blockade therapies.

Sensitivity to immune checkpoint blockers is associated with an 'inflammasome activated' signature in cancer patients

To further understand the clinical relevance of our findings, we then investigated whether inflammasome-related genes might be associated with clinical responses in patients treated with immune checkpoint blockers. We first analyzed data obtained from whole-exome sequencing and transcriptomics of a published cohort of melanoma patients treated with checkpoint inhibitors (Riaz et al., 2017). These studies focused on pretreatment and on treatment tumor biopsies from patients that progressed to anti-CTLA-4 therapy and were further treated with anti-PD-1 antibodies (IPI-progressing) 76

and patients treated with anti-PD-1 antibodies who had not received anti-CTLA-4 antibodies (IPI-naïve). Strikingly, in the IPI-naïve population of non-responder patients, only two inflammasome-related genes were significantly up-regulated during treatment as compared to the pre-treatment stage. These genes were *TMEM176A and TMEM176B* (Figure 4A and Table S1). These observations emphasize the role of TMEM176 ionic channels as potential mediators of resistance to checkpoint blockade therapies.

Interestingly, when comparing patients responding or not to anti-PD-1 at the pre-treatment stage, we found no significant differences in inflammasome-related genes either in the bulk population (Table S2), IPI-naïve (Table S3) or IPI-progressed (Table S4) groups. However, 8 inflammasome-related genes were significantly up-regulated in responders versus non-responder patients in the bulk population during anti-PD-1 treatment (Figure 4B). *TMEM176A* and *TMEM176B* were two of the inflammasome-related genes that were significantly upregulated in patients responding to anti-PD-1, suggesting that they could function as a counter-regulatory mechanism in response to treatment. Similar findings were observed in the IPI-naïve population (Table S5). We then performed a paired analysis comparing pre-treatment and on anti-PD-1 treatment tumor biopsies from responder patients. In this case, we found 11 inflammasome-related genes that were significantly up-regulated during anti-PD-1 therapy as compared to the pre-treatment biopsies (Figure 4C). Similar results were found when analyzing the IPI-naïve population (Table S6).

We then analyzed transcriptomic datasets from patient biopsies to estimate the diversity of leukocyte populations infiltrating tumors using the CIBERSORT method (Newman et al., 2015). We observed increased relative frequencies of CD8⁺ T cells and activated memory CD4⁺ T cells during anti-PD-1 treatment versus the pre-treatment stage in responders but not in progressor patients (Figure 4D). Absolute total number of leukocytes, CD8⁺ T cells and activated memory CD4⁺ T cells were also

increased (Figure 4E). In patients responding to anti PD-1 therapy, the total number of leukocytes as well as the frequency of CD8⁺ T cells and activated memory CD4⁺ T cells were positively associated with the expression of NLRP3 during ongoing treatment (Figure 4F). These observations reinforce the concept that inflammasome activation controls T-cell immunity in patients treated with immune checkpoint blockers.

To validate further these observations, we analyzed the inflammasome gene expression profile in longitudinal tumor biopsies from melanoma patients treated sequentially with anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies (Chen et al., 2016). These authors studied gene expression profiling (GEP) via a custom 795-gene NanoString panel composed of immune and cancer-related genes. Of note, TMEM176A and TMEM176B were not included in the NanoString panel used by Chen et al. The authors found no significant differences in GEP when comparing responders versus progressors at baseline (before CTLA-4 or PD-1 blockade) or following anti-CTLA-4 or anti-PD-1 therapy. Consistently, we found no significant expression of inflammasomerelated genes at these stages (Figures S6A-B and S7A-B). These results are in agreement with our findings from the analysis from the Riaz et al cohort at the pretreatment stage (Tables S1-4). However, the authors found 411 genes that were significantly regulated (mostly up-regulated) in responding versus progressing patients following early PD-1 blockade. In those patients, 15/16 inflammasome-related genes were significantly upregulated in responders compared to progressors (Figure 5A). We then performed a paired analysis of the 16 inflammasome-related genes in biopsies of 5 responding patients and 7 progressors comparing gene expression prior and during anti-PD-1 therapy. All these patients had progressed to anti-CTLA-4 therapy. Critically, 5/5 patients responding to anti-PD-1 showed a significant up-regulation of inflammasome-related genes during anti-PD-1 treatment (Figure 5B). Moreover, 4/7 patients who did not respond to anti-PD-1 therapy significantly downregulated the inflammasome signature during PD-1 blockade (Figure 5B). Thus, gene expression

profiles from biopsies of two independent cohorts of melanoma patients treated with immune checkpoint blockers revealed strong association between inflammasome activation and clinical responses. These findings support the notion that inflammasome activation contributes to antitumor responses triggered by immune checkpoint blockers and highlights the potential role of an 'inflammasome activation' signature as a biomarker of response to immune checkpoint blockade.

Pharmacologic inhibition of Tmem176b triggers inflammasome-dependent tumor control and improves the efficacy of immune checkpoint blockers

The up-regulation of inflammasome-related genes in patients responding to immune checkpoint blockers (Figures 4 and 5), the contribution of Caspase-1/11 to the success of anti-CTLA-4 and anti-PD-1 therapies (Figure 3) and the central role of TMEM176B as a potent inflammasome inhibitor (Figure 1), suggested the possibility of targeting this pathway to improve the efficacy of immune checkpoint blockers. To identify drugs capable of inhibiting Tmem176b-dependent ion flux and triggering inflammasome activation, we set up an in vitro assay. Briefly, CHO-7 cells were transfected with Tmem176b and Tmem176a-mCherry. Cells were then loaded with the Na⁺-sensitive fluorescent dye Asante NaTRIUM Green 2 (ANG-2). We observed increased ANG-2 MFI in mCherry⁺ compared to mCherry⁻ cells. We then screened a compound library known to modulate ion channels activity (Supplementary Dataset 1). We found that both enantiomers (+) and (-) of BayK8644 potently inhibited Tmem176ba-dependent Na⁺ influx, while minimally affected Tmem176b-a negative cells (Figure 6A-B and Figure S8A). Therefore, we decided to focus on these compounds also because they are members of the dihydropyridin family, which are drugs currently used in clinical settings. Whereas (+) BayK8644 is known to inhibit L-type voltage-dependent Ca⁺⁺ channels, the (-) stereoisomer activates those channels (Grove et al., 1991; Hamilton et al., 1987; Yatani et al., 1988). Since both isomers inhibit Tmem176b/a activity, it is unlikely that our observations could be explained by indirect effects on Na⁺ influx through the modulation of Ca⁺⁺ channels. Although we cannot rule out the possibility that BayK8644 could inhibit Tmem176a in the ANG-2 experiments, in electrophysiology studies using Tmem176b-overexpressing Xenopus oocytes, (+) BayK8644 completely inhibited Tmem176b-dependent current (Figure 6B). Therefore, we focused on the (+) isomer for functional experiments.

Because BayK8644 inhibits Tmem176b-dependent ion fluxes, we asked whether this drug could trigger inflammasome activation in BMDCs. We observed that BayK8644 induced IL-1 β secretion and Caspase-1 activation in LPS-primed WT BMDCs but not in *Tmem176b^{-/-}* cells (Figure 6C and Figure S8B-D). Furthermore, BayK8644-induced IL-1 β was inhibited by the KCa inhibitors TEA and HCQ (Figure 6D). Thus, BayK8644 treatment on WT BMDCs phenocopied *Tmem176b^{-/-}* cells as IL-1 β secretion was highly dependent on Ca⁺⁺-activated K⁺ channels. In THP-1 macrophages, TMEM176B-dependent inhibition of IL-1 β secretion was prevented when these cells were treated with BayK8644 (Figure 6E). These results indicate that BayK8644 triggers inflammasome activation through inhibition of TMEM176B.

To evaluate the pre-clinical relevance of these findings, we then explored whether BayK8644 treatment may inhibit tumor growth. Administration of BayK8644 (i.p) significantly increased survival of tumor-bearing WT but not *Tmem176b*^{-/-} mice (Figure 6F) compared to injection of vehicle control, highlighting the ability of the drug to restrain tumor growth through inhibition of Tmem176b. Of note, *in vitro* treatment of EG7 thymic lymphoma cells with BayK8644 did not induce apoptosis at similar doses as those detected in plasma after i.p injection (Figure S8E). To explore whether BayK8644 recapitulated the effects in tumor growth control observed in untreated *Tmem176b*^{-/-} mice, we evaluated the effects of the drug in inflammasome activation by

disrupting important components of this pathway. We found that BayK8644 significantly improved survival of WT but not *Casp1/11^{-/-}* tumor-bearing mice (Figure 6G). Consistent with this observation, BayK8644 increased the frequency of CD11b⁺ cDCs expressing active Caspase-1 in TDLN (Figure 6H).

Similar to *Tmem176b^{-/-}* mice, which controlled tumor growth via IL-1β- and CD8⁺ T cell-dependent mechanisms, we observed that BayK8644 increased CD8⁺ T cellmediated tumor cytotoxicity *in vivo* (Figure 6I). Moreover, BayK8644-induced tumor control was dependent on CD8⁺ T cells, since depletion of these cells completely abolished the antitumor effect of this inhibitor (Figure 6J and Figure S8F). Thus, BayK8644 restrains tumor growth in a Tmem176b-, Caspase-1/11- and CD8⁺ T celldependent manner in EG7 tumors. Moreover, BayK8644 significantly impaired growth of CT26 colon cancer cells in BALB/c mice (Figure S8G-H). Thus, BayK8644 emerges as a new immunotherapeutic agent that limits tumor growth by licensing inflammasome activation.

Finally, we evaluated whether BayK8644 administration may enhance the antitumor activity of immune checkpoint blockers. Compared with mice treated with monotherapy, administration of BayK8644 in combination with anti-CTLA-4 antibodies significantly improved survival of tumor (EG7)-bearing mice (Figure 6K). Moreover, therapeutic administration of BayK8644 in mice with EG7 established tumors significantly improved the anti-tumoral effect of anti-PD-1 treatment (Figure 6L), whereas BayK8644 monotherapy was not effective in this therapeutic protocol (data not shown). Interestingly, combination of anti-PD-1 with BayK8644 was associated with an increased absolute number and percentage of TCR β ⁺CD4⁺ROR γ t⁺ T cells in TDLN (Figure S8I) and increased frequency of tumor-specific CD8⁺ T cells within the tumor microenvironment (Figure 6M) as compared to anti-PD-1 monotherapy. Depletion of CD8⁺ T cells in anti-PD-1 + BayK8644-treated animals abrogated antitumor immunity

(Figure 6N). This observation might be explained by concomitant CTL-mediated mechanisms required for both the antitumor activity of BayK8644 (Figure 6J and S8F) and anti-PD-1 therapy (Sharma and Allison, 2015). Thus, as expected, combination treatment strongly relies on the CD8⁺ T-cell compartment. Furthermore, BayK8644 significantly enhanced the anti-tumoral effect of anti-PD-1 therapy in mice bearing 5555 melanoma (Figure 6O), whereas this effect was also apparent in LL/2 lung cancer (Figure S8J-K) and MC38 colon cancer (Figure S8L-M) models, although not reaching statistical significance. Thus, unleashing inflammasome activation by targeting Tmem176b improves the anti-tumor activity of checkpoint inhibitors in different tumor models. Moreover, whereas BayK8644 reinforced the anti-tumor effects of anti-PD-1 treatment in mouse melanoma, it did not enhance tumor growth inhibition induced by anti-CTLA-4 and anti-PD-1 combination therapy, at least in this model (Figure S8O). Given the pharmacologic impact of channel inhibitors in cardiomyocyte function, we finally examined whether dihydropyridin BayK8644 may lead to acute cardiac toxicity. Notably, Bayk8644 treatment was not associated with electrocardiographic nor echocardiographic alterations 30 min after i.v. injection compared to mice treated with vehicle control (Tables 1-2). Thus, pharmacological inhibition of TMEM176B by Bayk8644, represents a novel therapeutic approach to unleash inflammasome activation, leading to potentiation of CD8⁺ T-cell-dependent antitumor immunity and greater efficacy of immune checkpoint blockers.

DISCUSSION

In this study, we demonstrate a central role of the inflammasome as a novel target to reinforce CD8⁺ T cell-dependent antitumor immunity and enhance the efficacy of immune checkpoint blockade therapies. In particular, we demonstrate the key role of TMEM176B, an ionic channel expressed on myeloid cells (mainly cDCs) as a negative regulator of inflammasome activation. Furthermore, we identify BayK8644 as a potent TMEM176B inhibitor that reinforces antitumor immunity and enhances the efficacy of 82

immune checkpoint blockers via inflammasome activation. Finally, we highlight the predictive value of NLRP3 inflammasome activation in clinical responses to immune checkpoint blockade in two independent cohorts. Thus, patients who do not respond to immune checkpoint blockers are expected to benefit from therapeutic strategies capable of triggering inflammasome activation.

Most immunotherapeutic approaches have focused on drugs targeting adaptive components of the immune system. However, innate immune pathways have recently emerged as potential targets amenable of intervention to trigger and control downstream adaptive players. In this regard, stimulation of STING activity has been shown to enhance the anti-tumoral effect of checkpoint blockers (Corrales et al., 2015; Demaria et al., 2015; Woo et al., 2014). Importantly, a type-I IFN pathway signature correlates with sensitivity to anti-CTLA-4 antibodies in melanoma patients (Chiappinelli et al., 2015). Nevertheless, the role of the IL-1β/IL-18/inflammasome in modulating anti-tumor responses is still controversial (Karki et al., 2017; Apte and Voronov, 2008). It has been proposed that the cell type in which inflammasome is activated and the nature of acute versus chronic inflammasome activation may dictate the outcome of the antitumor responses (Karki et al., 2017).

Immunogenic cell death triggered by chemotherapeutics, which sensitizes tumors to checkpoint blockade therapies, relies in NLRP3 inflammasome activation by DCs (Ghiringhelli et al., 2009; Pfirschke et al., 2016). Although recently proposed to play a role in the outcome of immunotherapeutic approaches (Mangan et al., 2018), the direct contribution of the inflammasome to adaptive checkpoint blockade remains elusive. Here we identified a new strategy to reinforce antitumor responses by targeting TMEM176B and promoting inflammasome disinhibition. Our results suggest that inflammasome activation plays a central role in antitumor immunity triggered by anti-CTLA-4 and anti-PD-1 antibodies. It is worth noting that experiments using *NIrp3*^{-/-}

animals did not reach statistical significance, whereas experiments in animals lacking downstream effectors *Casp1/11* did. These observations suggest that different inflammasomes may be involved in the anti-tumoral effect triggered by anti-CTLA-4 and anti-PD-1 therapies. Accordingly, analysis of anti-PD-1-treated melanoma patients (Figures 4 and 5) suggest that NLRP6, NLRP7, AIM2 and NLRC4 inflammasomes might contribute to antitumor responses unleashed by checkpoint blockers. Although the requirement of Caspase-1 autoproteolysis can differ within different inflammasomes (Broz et al., 2010) and Caspase-1 may cleave other proteins than IL-1 β and IL-18 (Sokolovska et al., 2013), to our knowledge, Caspase-1 and Caspase-11 activation mostly depend on inflammasomes. Thus, it is unlikely that results obtained with both *Casp1/11^{-/-}* and *Tmem176b^{-/-}Casp1^{-/-}* mice might rely on inflammasome-independent mechanisms.

Our results suggest that TMEM176B might be a predictive marker of response to anti-PD-1 therapy. In addition, *TMEM176B* expression in the tumor stroma was associated with poor survival in colorectal cancer patients, suggesting a potential role of this ion channel as a prognostic factor. Interestingly, TMEM176B was associated with diminished *NLRP3* and *IL1B* expression in macrophages infiltrating human melanoma, suggesting that this ion channel may function as an innate checkpoint signal that hinders immune responses in the tumor microenvironment. However, our results in experimental models support a key role for Tmem176b in the modulation of inflammasome activation mostly in TDLN during the induction phase of anti-tumor responses. Thus, Tmem176b-dependent immune inhibitory mechanisms may operate within the tumor microenvironment and TDLN. Although further mechanistic studies are warranted to elucidate the molecular pathways that control Tmem176b expression, we found a reciprocal regulation of this ion channel by inflammasome activation (Figure S9A). Notably, treatment with LPS and ATP induced a striking up-regulation of IL-6 and TNF- α (Figure S9A) and a very modest increase in cell death (Figure S9B) as

compared to untreated BMDCs, excluding the possibility that down-regulation of Tmem176b by inflammasome activation could be related to massive induction of cell death.

Recently, it has been proposed that pharmacologic manipulation of ion channels may influence NLRP3 inflammasome activation (Gong et al., 2018). Remarkably, BayK8644 treatment recapitulated *Tmem176b* deficiency as shown by CD8⁺ T-cell-dependent tumor control and Caspase-1 activation in CD11b⁺ cDCs. The latter observation is in line with the high expression of Tmem176b in these cells (Anandasabapathy et al., 2014; Crozat et al., 2011).

The hierarchy between Ca⁺⁺ and K⁺⁺ in inflammasome activation is a matter of debate (Gong et al., 2018). We have previously shown that Ca⁺⁺-activated K⁺ channels such as KCa1.1 can mediate NLRP3 inflammasome activation (Schroeder et al, 2017). Moreover, sustained K⁺ efflux through the voltage-gated (K_v1.3) or Ca⁺⁺-activated (KCa3.1) K⁺ channels has been shown to reinvigorate tumor-infiltrating T cells (Eil et al., 2016). The results presented herein suggest that Ca⁺⁺-induced K⁺ efflux in DCs may promote anti-tumor immunity by triggering inflammasome activation, a process that is repressed by TMEM176B. Taken together, these observations highlight a regulatory role for ion homeostasis in controlling anti-tumor immunity through modulation of both innate and adaptive immune programs.

In conclusion, our study links inflammasome activation to antitumor responses triggered by immune checkpoint blockers, highlighting a central role for TMEM176B, an ion channel expressed on myeloid cells, in repression of T-cell dependent immunity. Further efforts should be aimed at evaluating the clinical efficacy and safety of inflammasome disinhibition in the treatment of cancer patients, particularly those resistant to current immunotherapeutic modalities.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Uruguay INNOVA-2, FMV from ANII, grants from CABBIO, PEDECIBA, ECOS-SUD AUF/FAPESP and FOCEM (MERCOSUR Structural Convergence Fund), COF 03/11 to MH, CSIC UDELAR and FCE from ANII to MS, The Harry J Lloyd Foundation to MRG, the Instituto Nacional del Cancer (Argentina) to YDM, Agencia de Promoción Científica y Tecnológica (Argentina) to GAR and MRG, Fundación Bunge & Born and Fundación Sales (Argentina) to GAR and Wellcome Trust to RAF. We thank Sabrina Gatto for technical support. We than Gonzalo Ferreira (Facultad de Medicina, UDELAR) for advices in electrophysiology experiments Conceptualization, M.S., S.R. MCC, G.A.R. and M.H.; Methodology, M.S and S.R.; Validation, R.A.F., M.C.C., B.V., M.R.G., G.A.R and M.H.; Investigation, M.S., S.R., M.J., V.P., M.D., Y. D. M., S.V., F.V., M.R.G., P.C. and M.R.; Writing – Original Draft, M.S., S.R., M.R.G, G.A.R. and M.H.; Funding Acquisition, M.H.; Resources, C.L., R.A.F, I.A. and M.C.C.; Supervision, M.H.

DECLARATION OF INTERESTS

MH is founder and CSO of ARDAN Immuno Pharma. A patent application related to this work has been filed at the Unites States Patent and Trademark Office.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. The ionic channel TMEM176B inhibits the NLRP3 inflammasome

A) Six-to-eight weeks-old male WT, *Tmem176b^{-/-}* and *Tmem176b^{-/-}Casp1^{-/-}* mice were injected i.p with vehicle control (PBS) or 20 mg/kg ATP. Four hr later, peritoneal lavage was performed and absolute numbers of neutrophils (CD11b⁺ Ly6C^{int} Ly6G⁺) were determined by flow cytometry. The left panel shows representative dot plots and the right panel shows quantifications for the different groups. In the plots, CD11b⁺ cells were analyzed for Ly6C and Ly6G expression. At least six animals were studied in each group in two independent experiments. ns: not significant; * p<0.05; One-way ANOVA test.

B-C) WT and *Tmem176b^{-/-}* bone marrow-derived DCs (BMDCs) were treated with LPS (0.25 µg/ml) for 4 hr, then washed and treated with the indicated doses of ATP (left panel) or nigericine (Nig; right panel) for the indicated times. Dose-response experiments are shown in B) whereas time-response experiments are depicted in C). Culture supernatants were harvested and IL-1 β was determined by ELISA. One experiment representative of five is shown. * p<0.05; ** p<0.01; Two-way ANOVA test.

D) Western blot analysis of pro-IL-1 β and Pro-Caspase-1 (lysates) or IL-1 β and Caspase-1 (supernatants) in WT and *Tmem176b*^{-/-} BMDCs stimulated with LPS as in B-C) and then treated for 90 min with 2.5 μ M nigericin or 0.5 mM ATP. Culture supernatants and cell lysates were analyzed. One experiment representative of three is shown.

E) WT and *Tmem176b^{-/-}* BMDCs were treated with LPS and then with 0.5 mM ATP or 2.5 μ M nigericin (Nig) for 45 min. Cells were harvested and stained with FLICA1 660 to determine active Caspase-1. One experiment representative of three is shown. * p<0.05; Two-way ANOVA test.

F) IL-1 β secretion by WT and *Tmem176b^{-/-}* BMDCs treated as in E) and compared to an experimental condition where Caspase-1 was inhibited by adding 10 μ M Z-WEHD-FMK 15 min before ATP. One experiment representative of three is shown. ** p<0.01; **** p<0.0001; Two-way ANOVA test.

G-H) WT, *Tmem176b*^{-/-} and *Tmem176b*^{-/-}*Casp1*^{-/-}BMDCs were treated as in E). IL-1 β (G) or IL-18 (H) were determined in culture supernatants by ELISA. One experiment representative of two is shown. * p<0.05; ** p<0.01; **** p<0.0001; Two-way ANOVA test.

I) THP-1 cells were differentiated to macrophages by treatment with 0.1 μ M PMA for a 48 hr-period. Cells were then electroporated with *GFP* or *GFP-TMEM176B* encoding pcDNA1.3 plasmids. Sixteen hr later, cells were left untreated or treated for 3 hr with 0.25 μ g/ml LPS and then for 2 hr with 2.5 μ M nigericin (Nig). IL-1 β was determined in culture supernatants by ELISA. One experiment representative of four is shown. ** p<0.01; *** p<0.001; Two-way ANOVA test.

J) WT and *Tmem176b^{-/-}* BMDCs were treated for 3 hr with 0.25 μg/ml LPS. Cells were then loaded with the Ca⁺⁺-sensitive probe Fura-2. Emission at 340/380 nm was recorded in time-laps experiments. 0.5 mM ATP was added when indicated by the arrow. Scale bars, 10 μm.

K) NLRP3 inflammasome was activated in BMDCs as described in E) but in the presence of the intracellular Ca⁺⁺ chelator BAPTA (100 μ M) or DMSO vehicle control. One experiment representative of three is shown. *p<0.05. Two-way ANOVA test.

L) IL-1 β determination in BMDSCs following inflammasome activation in the presence of control buffer (5 mM) or high K⁺ buffer (120 mM). One experiment representative of three is shown. * p<0.05; Two-way ANOVA test.

M-N) IL-1 β determination in BMDSCs following inflammasome activation in the presence or absence of the Ca⁺⁺-activated K⁺ channels blockers iberiotoxin (IbTx, in M) or hydroxychloroquine (HCQ, in N). One experiment representative of three is shown in each case. * p<0.05; ** p<0.01; Two-way ANOVA test.

In ELISA experiments, ND stands for "Not Detected".

See also Figure S1.

Figure 2. Mice lacking *Tmem176b* control tumor growth through an IL-1 β and Caspase-1-dependent manner

A) MC38 colon cancer cells (1 x 10^6 ; left panel), LL2 lung cancer cells (1 x 10^5 ; center panel) or EG7 thymic lymphoma cells (1 x 10^6 ; right panel) were s.c. injected in WT and *Tmem176b^{-/-}* mice. Tumor growth and mice survival were monitored every three days. Tumors were measured by its longer and shorter diameters. Mice were sacrificed when one of the diameters reached 2 cm. The ratio shows the number of surviving animals/ total injected mice from three experiments. * p<0.05; ** p<0.01; Log-rank (Mantel-Cox) test.

B) Western blot analysis of Caspase-1 expression and cleavage in tumor-draining lymph nodes (TDLN) from WT and *Tmem176b^{-/-}* mice.

C) Densitometric analysis of Western blots shown in B. At least 4 animals/group are shown. * p<0.05; Student's *t* test.

D) Confocal microscopy of activated Caspase-1 expression using the FLICA1 fluorescent probe in TDLN. Scale bars, 10 µm.

E) Semiquantification of staining depicted in D is shown. WT and $Tmem176b^{-/-}$ animals (n=3 each group) were studied. * p<0.05; *** p<0.001; One-way ANOVA test.

F) Flow cytometry analysis of FLICA1⁺ cells within TDLN. SSC: Side Scatter. One experiment representative of two is shown.

G) Evaluation of FLICA1⁺ CD11b⁺ and CD11b⁻ classical DCs (cDCs) in the TDLN is shown. ns = not significant, *** p<0.001; Student's *t* test.

H) Survival of *Tmem176b*^{-/-} EG7 tumor-bearing mice treated with anti-IL-1β or control IgG antibodies. The ratio shows the number of surviving animals/ total injected mice from one experiment. * p<0.05; Log-rank (Mantel-Cox) test.

I) Survival of untreated *Tmem176b^{-/-}* and *Tmem176b^{-/-}Casp1^{-/-}* EG7 tumor-bearing mice. The ratio shows the number of surviving animals/ total injected mice pooled from three independent experiments. * p<0.05; Log-rank (Mantel-Cox) test.

J) In vivo cytotoxicity assay against OVA peptide-pulsed EG7 cells as a model tumor antigen. Naïve splenocytes were loaded with high dose DDAO and SIINFEKL peptide. Cells were mixed (1:1 ratio) with naïve splenocytes exposed to low dose DDAO without peptide. The mix was injected i.v. into naïve and tumor-bearing mice and 4 hr later the ratio between the high and low DDAO populations in the spleen was determined by flow cytometry. Representative histograms are shown in Figure S4E. Data from four different animals of one experiment in each group are shown. ** p<0.01; Student's *t* test.

K) In vivo cytotoxicity assay as described in J) in *Tmem176b^{-/-}* mice previously treated with anti-IL-1 β or control IgG antibodies. * p<0.05; Student's *t* test.

L) In vivo cytotoxicity assay as described in J) comparing CTLs from tumorbearing $Tmem176b^{-/-}$ and $Tmem176b^{-/-}Casp1^{-/-}$ mice. Data from two experiments are shown. * p<0.05; Student's *t* test.

M) Survival of tumor-bearing WT and *Tmem176b^{-/-}* mice left untreated or treated with anti-CD8 depleting antibodies. The ratio depicts the number of surviving animals/ total injected mice. Data from one experiment are shown. * p<0.05; Log-rank (Mantel-Cox) test.

The genetic background of the animals used was C57BL/6.

See also Figures S2-S5.

Figure 3. Inflammasome activation reinforces immune checkpoint blockade

Survival analysis of the indicated groups of animals in response to different treatments. The ratio depicts the number of surviving animals/total injected mice.

A) Tumor (EG7)-bearing WT (left panel), *Tmem176b^{-/-}* (central panel) and *Tmem176b^{-/-}Casp1^{-/-}* (right panel) mice were injected with anti-CTLA-4 or control IgG antibodies and mice survival was studied. *p<0.05; Log-rank (Mantel-Cox) test.

B-C) Tumor (EG7)-bearing WT and $Casp1/11^{-/-}$ (B) or $Nlrp3^{-/-}$ (C) mice were injected with control IgG (left panels), anti-CTLA-4 (central panels) or anti-PD-1 (right panels) antibodies and mice survival was studied. ns = not significant; *p<0.05; Log-rank (Mantel-Cox) test.

Data from three (A-B) or two (C) experiments are shown.

The genetic background of the animals used was C57BL/6.

Figure 4. Analysis of the inflammasome signature in tumor biopsies from melanoma patients treated with immune checkpoint blockers (cohort by Riaz *et al.* 2017)

A) Paired analysis of patients who did not respond to anti-PD-1 therapy and were not treated previously with anti-CTLA-4 antibody (IPI-naïve) comparing pre-treatment vs on-treatment melanoma biopsies. *TMEM176A* (left panel) and *TMEM176B* (right panel) were the only inflammasome-related genes that were significantly up-regulated in the on-treatment as compared to pre-treatment population. * p<0.05; Paired Student's *t* test.

See also Table S1.

B) Heat maps of transcriptomic analysis from tumor biopsies of melanoma patients responding (responders) or not (non responders) to anti-PD-1 therapy. The indicated inflammasome-related genes were significantly up-regulated in responder patients *p<0.05; unpaired Student's *t* test.

C) Paired analysis of patients responding to anti-PD-1 therapy comparing pretreatment vs on-treatment melanoma biopsies. The indicated inflammasome-related genes were significantly up-regulated during therapy. p<0.05; Paired Student's *t* test.

D-E) Paired study of pre-treatment vs on-treatment tumor biopsies from bulk patients responding to anti-PD-1 therapy analyzed through the CIBERSORT method. The relative frequency of CD8⁺ T cells (D, left panel), activated (D, central panel) and non-activated (D, right panel) memory CD4⁺ T cells were studied. The absolute number of total leukocytes (E, left panel), CD8⁺ T cells (E, central panel) and activated memory CD4⁺ T cells (E, right panel) were analyzed. * p<0.05; ** p<0.01; Paired Student's *t* test.

F) Association of NLRP3 expression with the frequency of total leukocytes, CD8⁺ T cells and activated memory CD4⁺ T cells in patients responding to anti-PD-1 therapy. Results show transcriptomics data obtained from tumor biopsies at the on-treatment stage.

Figure 5. Analysis of the inflammasome signature in tumor biopsies from melanoma patients treated with immune checkpoint blockers (cohort by Chen *et al.* 2016)

A) The log2-transformed normalized NanoString counts from melanoma tumor biopsies for the indicated inflammasome-related genes is shown for patients being treated with anti-PD-1 antibodies. The results for responding and non-responding patients as defined by Chen et al. 2016 * p<0.05; ** p<0.01; **** p<0.001; **** p<0.001; Unpaired Student's *t* test.

B) Paired analysis of the 16 inflammasome-related genes studied in (A) comparing pre-treatment and on-treatment tumor biopsies from melanoma patients responding (n= 5) or not responding (n= 7) to anti-PD-1 therapy. See color code to identify each gene in Figure S7C. * p<0.05; *** p<0.001; **** p<0.001; Paired Student's *t* test.

See also Figures S6 and S7.

Figure 6. Targeting Tmem176b with Bayk8644 triggers inflammasome-dependent antitumor immunity

A) Identification of Tmem176b inhibitors. CHO-7 cells were transfected with *Tmem176b* and *Tmem176a*-mCherry-coding pSecTag2B plasmids. Cells were then loaded with the Na⁺-sensitive fluorescent dye Asante NaTRIUM Green 2 (ANG-2). Left panels show representative flow cytometry histograms displaying ANG-2 fluorescence at the indicated conditions. The right panel shows quantification of ANG-2 mean fluorescence intensity (MFI) subtracting in each condition the MFI obtained in Na⁺-free

buffer. Untreated and (+) BayK8644-treated cells were studied. One experiment representative of five is shown. ** p<0.01; *** p<0.001; Two-way ANOVA test.

B) *Tmem176b*-coding mRNA was injected in *Xenopus* oocytes. Forty-eight hr later, oocytes were left untreated or treated for 30 min with 0.1 μ M PMA and extracellular pH 5.0 as described (Segovia et al., 2014). Tmem176b-dependent conductance was assessed in conditions were 10 μ M (+) BayK8644 was added to extracellular buffer during PMA stimulation. Representative currents are shown in the left panel. Determination of Tmem176b current at 800 s post-extracellular acidification is depicted in the right graph. *** p<0.001; One-way ANOVA test.

C) WT and *Tmem176b^{-/-}* BMDCs were primed for 3 hr with LPS and then left untreated or treated with 2.5 μ M BayK8644. IL-1 β was determined in culture supernatants by ELISA. One experiment representative of three is shown. * p<0.05; Two-way ANOVA test.

D) LPS-primed WT BMDCs were treated with 10 μ M BayK8644 alone or in combination with TEA (2 mM) or HCQ (10 μ M) to inhibit Ca⁺⁺-activated K⁺ channels. IL-1 β was determined in culture supernatants by ELISA. One experiment representative of three is shown. * p<0.05; ** p<0.01; One-way ANOVA test.

E) The human macrophage cell line (THP-1) was transfected with *GFP* or *TMEM176B/GFP*-coding plasmids and treated with LPS + nigericine (LPS/Nig) or left untreated in the presence of ethanol (vehicle) or 5 μ M BayK8644. IL-1 β was determined in culture supernatants by ELISA. To calculate the extent of TMEM176B-dependent inhibition, IL-1 β levels (pg/ml) were incorporated to the formula: [GFP/LPS/Nig – GFP untreated] – TMEM176B/LPS/Nig x 100. One experiment representative of three is shown. * p<0.05; Student's *t* test.

In F-N, EG7 tumors were studied. In O, 5555 melanoma was analyzed. In F, G, H, K, L, M and O the ratio represents the number of surviving mice/ total injected mice. For these experiments, we used C57BL/6 mice.

F) Tmem176b WT and *Tmem176b^{-/-}* mice were inoculated with EG7 tumor cells and treated with 1 mg/kg Bayk8644 i.p on days 2-15 after tumor cell injection. Mice survival was monitored. * p<0.05; Log-rank (Mantel-Cox) test.

G) WT (C57BL/6JN) or *Casp1/11^{-/-}* mice were inoculated with EG7 tumor cells and left untreated or treated with BayK8644 as in F. Mice survival was monitored. ** p<0.01; Log-rank (Mantel-Cox) test.

H) WT mice were injected with EG7 tumor cells and left untreated or treated with BayK8644 as in G. TDLN were resected 14 days after tumor injection and Caspase-1 activation was studied by flow cytometry using the FLICA1 reagent. * p<0.05; Student's *t* test.

I) WT mice were inoculated with EG7 tumor cells and left untreated or treated with BayK8644 from days 2-15. At day 15, *in vivo* cytotoxicity against OVA antigen was studied. * p<0.05; Student's *t* test.

J) WT mice were inoculated with EG7 tumor cells and left untreated or treated with BayK8644 or BayK8644 in the absence or presence of anti-CD8 depleting antibody. Mice survival was studied. ns: non significant. WT + Vehicle vs WT + BayK8644: * p<0.05; WT + BayK8644 vs WT + BayK8644 + anti-CD8: * p<0.05; WT + Vehicle vs WT + BayK8644 + anti-CD8: ns; Log-rank (Mantel-Cox) test.

K) WT mice were inoculated with EG7 tumor cells and left untreated or treated with BayK8644, anti-CTLA-4 antibodies or BayK8644 plus anti-CTLA-4 antibodies. Mice survival was monitored. ns: non significant. Untreated vs Bayk8644 + anti-CTLA-4: ** p<0.01; BayK8644 vs BayK8644 + anti-CTLA-4: ns; anti-CTLA-4 vs BayK8644 + anti-

CTLA-4: ns; untreated vs anti-CTLA-4: ns; untreated vs BayK8644: ns; Log-rank (Mantel-Cox) test.

L) WT mice were inoculated with EG7 tumor cells and then treated with 250 μg anti-PD-1 antibody at days 6, 9 and 12 after tumor inoculation. BayK8644 was injected every day since day 9 (all mice had established tumors) until day 21. Mice survival was monitored. * p<0.05; Log-rank (Mantel-Cox) test.

M) OVA-specific CD8⁺ T cells were assessed using fluorescent MHC pentamers and analyzed by flow cytometry in EG7 tumor suspensions from WT mice treated with anti-PD-1 alone or anti-PD-1 + BayK8644 in a therapeutic protocol as in M. * p<0.05; Unpaired Student's *t* test.

N) WT mice were inoculated with EG7 tumor cells and left untreated or treated with BayK8644 + anti-PD-1 or BayK8644 + anti-PD-1 + anti-CD8 depleting antibody. Mice survival was monitored. * p<0.05; Log-rank (Mantel-Cox) test.

O) WT mice were inoculated with 5555 melanoma cells and left untreated or treated either with anti-PD-1 antibody (days 6, 9 and 12), BayK8644 (days 9-21) or both. All animals had established tumors when BayK8644 treatment was started. Mice survival was monitored. ns: non significant. Untreated vs Bayk8644 + anti-PD-1: * p<0.05; BayK8644 vs BayK8644 + anti-PD-1: ns; PD-1 vs BayK8644 + anti-PD-1: ns; untreated vs anti-PD-1: ns; untreated vs BayK8644: ns; Log-rank (Mantel-Cox) test.

See also Figure S8.

TABLES

	RR	P wave	PR	QRS	QT	QTc
Control ^a	150±18 [♭]	16.0±0.0	32.0±2.0	13.3±1.2	53.3±4.1	43.6±0.8
Vehicle	143±9	14.7±0.7	32.0±1.5	13.7±1.8	56.0±2.5	46.8±0.8
Control	130±2	15.2±1.2	32.8±1.9	11.0±0.4	51.2±2.7	45.1±2.7
BayK8644	120±5	15.4±1.2	32.6±1.8	11.2±0.6	54.4±1.9	49.7±0.8

Table 1. Effect of BayK8644 or vehicle control on electrocardiographicparameters.

a. Values before injection of vehicle or BayK8644.

b. Mean \pm SD are expressed in ms.

Table 2. Effect of BayK8644 or vehicle control on echocardiographic parameters.

	Vehicle	BayK8644
Cardiac frequency (bpm)	457±50	515±35
Left ventricular telediastolic wall thicknesses	1.0±0.0	1.1±0.1
Left ventricular telediastolic diameter (mm)	3.2±0.2	2.8±0.2
Left ventricular ejection fraction (%)	82±1	93±2
E/A ratio	1.7±0.1	1.5±0.1
Isovolumic relaxation time (ms)	15.0±0.0	18.8±0.2
E-wave deceleration time (ms)	37.7±1.8	33.4±2.5

Mean \pm SD are expressed.

STAR METHODS

Contact for reagent and resource sharing

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by the Lead Contact, Marcelo Hill (mhill@pasteur.edu.uy).

Experimental models

Animals

Six-to-ten weeks old male or female C57BL/6 or BALB/c mice were used (Jackson Lab; Bar Harbor, ME) and bred for up to 20 generations at the Institut Pasteur Montevideo or at the Institute of Biology and Experimental Medicine, Buenos Aires. All experiments were performed according to local regulation and approved by the corresponding Ethics Committees for animal experimentation.

Tmem176b^{-/-} mice were generated in the 129/SvJ strain and heterozygous mice were backcrossed for 10 generations onto the C57BL/6 background (Janvier, Saint Berthevin, France) as reported (Segovia et al., 2014). *Nlrp3*^{-/-} (B6.129S6-*Nlrp3*^{tm1Bhk}/J; 021302) and *Casp1/11*^{-/-} (B6N.129S2-*Casp1*^{tm1Flv}/J; 016621) were from The Jackson Laboratory. *Nlrp3*^{-/-} animals were compared to 000664 C57BL/6J, and *Casp1/11*^{-/-} mice to <u>005304 C57BL/6NJ</u>. *Tmem176b*^{-/-} *Casp1*^{-/-} mice were generated by microinjecting Crispr/Cas9 targeting *Casp1* in *Tmem176b*^{-/-} embryos. F1 animals were genotyped and heterozygous mice were crossed to generate F2 homozygous *Tmem176b*^{-/-} animals. *Casp1* deficiency was confirmed by Western blot (Figure S1). All animal strains including *Tmem176b*^{-/-}, *C57BL/JN*, *Casp1/11*^{-/-} and *Tmem176b*^{-/-} Casp1^{-/-} were bred at a specific pathogen-free animal facility (Institut Pasteur, Montevideo).

Cell lines

EG7 (expressing the OVA antigen), LL2, CT26, THP-1 and CHO-K1 cell lines were purchased from ATCC (Manassas, VA). MC38 cells were from Kerafast (Boston, MA). The 5555 melanoma cell lines were kindly provided by R. Marais (Cancer Research UK, Manchester) and cultured as described (Hirata et al., 2015).

Tumor models and treatments

C57BL/6 mice were injected s.c. with 1 x 10⁶ MC38 colon cancer cells, 1 x 10⁵ LL2 lung cancer cells, 2.5 x 10^5 5555 melanoma cells or 1 x 10^6 EG7 thymic lymphoma cells. BALB/C animals were injected with 1 x 10⁵ CT26 colon cancer cells. Injection was performed alternating one WT and one Tmem176b^{-/-} mouse until completing both groups. In treated animals, alternation was done between drug- and vehicle-treated animals. Tumor growth was measured manually every 2-3 days with a caliper. The two major diameters were taken. Mice were sacrificed when one of the diameters reached 2 cm. In experiments where anti-IL-1 β , anti-IL-17A or control IgG were used, 4 µg antibody was injected i.p 7 days after inoculation of tumor cells. Injections were repeated every five days until day 27 post-injection or euthanasia. For depletion of CD8⁺ T cells, 100 µg YTS 169.4 antibody was injected every three days starting from the day before tumor inoculation. Depletion was confirmed in the spleen by flow cytometry. For administration of anti-CTLA-4 or control IgG, 100 µg antibody was given i.p starting from day 6 after tumor inoculation. Injections were repeated every three days until day 12. Anti-PD-1 or control IgG was injected (250 µg i.p) starting from day 6 and every three days until day 12. Bayk8644 or vehicle control (ethanol) was given i.p. at 1 mg/kg since day 3 after tumor inoculation and until day 15. In animals treated with BayK8644 and anti-CTLA-4 antibody, BayK8644 was injected at days 3-15 every day and anti-CTLA-4 at days 6, 9 and 12 after tumor inoculation. In mice treated with

BayK8644 and anti-PD-1 antibody, treatment with the former started at day 9 and repeated every day until day 21 after tumor inoculation. Anti-PD-1 treatment started at day six after tumor inoculation and repeated every three days until day 12.

In vivo inflammasome activation

C57BL/6 animals were injected with 20 mg/kg ATP i.p. Four hr later, peritoneal lavage was performed using 5 ml PBS. Peritoneal cells were centrifuged and then stained with anti-CD11b, anti-Ly6C and anti-Ly6G antibodies. Cells were analyzed by flow cytometry. The percentage of Ly6C^{int} Ly6G^{hi} cells within the CD11b⁺ cell compartment (neutrophils) was determined. The absolute number of neutrophils was calculated for each condition.

In vitro inflammasome activation

Bone marrow-derived DCs (BMDCs) were differentiated by culturing bone marrow cells for 8 days in the presence of 0.4 ng/ml GM-CSF. At day 8, adherent cells were >95% CD11c⁺CD11b⁺MHC II^{int}. Cells were stimulated for 3 hr with 0.25 µg/ml LPS, washed and treated with the indicated doses of ATP or nigericin. The presence of IL-1 β was assessed in culture supernatants by ELISA (Biolegend, 432603). To determine Caspase-1 activation, BMDCs were stained with FLICA1 45 min after ATP or nigericin stimulation and analyzed by flow cytometry. For Western blot, culture supernatants from BMDCs stimulated in the absence of FBS were precipitated with 20 % (v/v) TCA and washed with acetone. Cell lysates were generated with RIPA buffer in the presence of a protease inhibitor cocktail. Cell lysates and precipitates from culture supernatants were electrophoresed, blotted and probed with anti-Caspase-1 (Adipogen, AG-20B-0042) or anti-IL-1 β (Santa Cruz Biotechnol, sc-7884) antibodies.

THP-1 transfection and inflammasome activation

THP-1 monocytes were differentiated into macrophages by treatment with 0.1 μ M PMA for 48 hr. Macrophages (2.5 x 10⁶) were then detached using trypsine and nucleofected with the *GFP* or *GFP-TMEM176B* coding pcDNA1.3 plasmids using the Amaxa Cell Line Nucleofector Kit V-Lonza and nucleofector device (Amaxa). Sixteen hr later, cells were treated for 3 hr with 0.25 μ g/ml LPS. Cells were washed and treated for 2 hr with 2.5 μ M nigericin. IL-1 β was assessed by ELISA in culture supernatants.

Method details

Cytosolic Ca⁺⁺ determination

BMDCs cultured on glass coverslips were loaded with 1 μ M Fura-2 for 45 min in the dark. Cells were then washed and analyzed by time-lapse microscopy at 37°C. Fluorescence emission intensity at 510 nm was determined in individual wells alternating excitation wavelengths of 340 and 380 nm every 3 s. ATP was added when indicated at 0.5 mM.

In vivo cytotoxicity assay

Splenocytes from naïve C57BL/6 mice were stained alternatively with 0.8 (high) or 0.08 μ M (low) DDAO-SE probe. The high DDAO population was loaded for 60 min at 37°C with 50 μ M SIINFEKL OVA peptide. After three washes, the high and low population were mixed at 1:1 ratio. The mixed cells (2 x 10⁶) were injected i.v in WT, *Tmem176b^{-/-}* or *Tmem176b^{-/-}Casp1^{-/-}* naïve and tumor-bearing mice. Four hr later, mice were sacrificed and the spleens harvested. Splenocytes were analyzed by flow cytometry to assess DDAO high and low populations. Specific cytotoxicity was calculated with the following formula:

% specific lysis= $(1-[r_{naïve}/r_{tumor bearing}])x100$ r = %DDAO^{low} cells/%DDAO^{high} cells

Screening of Tmem176b inhibitors

CHO cells were transfected using Lipofectamine2000 with pSecTag2B-PS-Tmem176amCherry and pSecTag2B-PS-Tmem176b-V5His plasmids for 4 hr, washed and cultured for 24 hr. Cells were then loaded with 1 µM ANG-2 for 30 min at 37°C, washed and incubated in 140 mM Na⁺-containing phosphate buffer or 140 mM NMDG to substitute Na⁺ in the presence of different doses of tested drugs or vehicle controls. Cells were then analyzed by flow cytometry using a BD Accuri C6 cytometer equipped with a 488 nm laser. ANG-2 emission was detected using band-pass filter 530/30 and mCherry using a 670 LP filter. FlowJo vX.0.7 software was used for data analysis. MFI from NMDG-containing solutions was subtracted to MFI from Na⁺-containing solutions. A maximum of two drugs was studied in each experiment. Screened drugs were from SCREEN-WELL® Ion Channel ligand library (Enzo Life Sciences; Farmingdale, NY).

Immunohistochemistry staining of human colon microarrays

Expression of TMEM176B was analyzed by immunohistochemistry on 90 specimens of human colon tumors (US Biomax, Inc; Rockville, MD). Briefly, antigenic recovery was done by boiling slides in a pressure cooker for 10 min in the presence of alkaline buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 9.0). 2.5 µg/ml anti-TMEM176B antibody (Abcam; ab103929) or control rabbit IgG were incubated ON at 4°C. Staining was verified using EnVision+ System- HRP-labelled polymer anti-rabbit (Dako/Agilent, Santa Clara CA). Slides were counterstained with Meyer's hematoxylin, analyzed by two independent researchers in a blind fashion and categorized as high or low/negative TMEM176B expression in the stroma and parenchyma. Expression levels were then correlated with survival information provided by US Biomax.

Electrophysiology experiments

Oocytes were surgically removed from MS222 (0.4%)-anesthetized Xenopus laevis female and dissociated under gentle agitation by a 2-3 hr incubation in an OR2 solution (82 mM NaCl; 2 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 5 mM HEPES pH 7.2) supplemented with collagenase 1A (1 mg/ml). Oocytes were then injected with 40 nl of in *vitro* synthesized *Tmem176b* mRNA at 1 µg/µL (mMessage mMachine Ultra kit). Tmem176b was fused to a signal peptide sequence (N-terminal) from pSecTag2B (Invitrogen, Carlsbad, CA) and to V5 + 6-His tags (C-terminal). The day after injection, oocytes were placed in a pH 8.0 solution (100 mM NaCl, 3 mM KCl, 2 mM MqCl₂, 15 mM HEPES pH 8.0) changed daily. Two to three days later, currents were recorded in two-electrode voltage-clamp using a genclamp500 amplifier (Axon Inst., Foster City, CA) interfaced to a personal computer using the Digidata 1200 interface and the pClamp software (v 7.0; Axon Inst.). Prior to recording, oocytes were incubated in PMA at 0.1 µM in pH 8.0 solution for 20–30 min. Currents were filtered at 100 Hz and digitalized at 0.5 kHz before storage and further analysis. During recording, oocytes were continuously superfused with the pH 8.0 solution. The currents were quantified 5-15 min after holding the extracellular pH at 5.0. In Tmem176b-expressing oocytes, induction of an inward current was obtained by switching to a pH 5.0 solution.

Gene expression analysis

Normalized NanoString nCounter data were analyzed from Chen *et al* (2016). Gene expression data from Riaz *et al* (2017) were obtained from their GitHub repository (https://github.com/riazn/bms038_analysis/tree/master/data). RNA-seq count data were normalized to FPKM (Fragment per kilobase per million) through the Bioconductor R package *DESeq2* 1.18.1. The on-treatment biopsy from patient 32 was excluded from further analyses since it presented extreme expression values.

CIBERSORT analysis

The leukocyte signature matrix LM22 (547 genes) that discriminates 22 types of tumorinfiltrating immune cells was used for analysis. Normalized gene expression data from Riaz *et al.* (2017) cohort were processed with the CIBERSORT web tool (http://cibersort.stanford.edu/) setting no quantile normalization and 1.000 permutations as parameters. All samples were run with both relative and absolute modes. The first mode infers the relative cellular fraction for each cell of the LM22 matrix and the second calculates a score that reflects the absolute proportion of each cell type in the mixture.

Single cell RNA-Seq data analysis

Normalized single cell expression data from Jerby-Arnon *et al.* (2018) was obtained from Gene Expression Omnibus (Accession number GSE115978). To study gene correlations, the expression matrix was processed with the software MAGIC (van Dijk et al., 2018) to deal with the undersampling of mRNA known as dropouts. R implementation of the MAGIC algorithm with default parameters (Rmagic v1.3.0) was applied. For correlation analysis, Spearman's Rank Correlation test was used.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed either by R project or GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Survival analyses were done with the Log-rank (Mantel-Cox) test. Comparison of two experimental conditions was done with paired or unpaired Student's *t* test. Comparison of multiple conditions was done with one or two-way ANOVA tests. Differences in gene expression and CIBERSORT scores between responder and non-responder groups were assessed using the unpaired *t*-test 106

when normality assumption was met. Otherwise, Mann-Whitney *U* test was used. Differences between matched samples pre- and on-treatment were evaluated with paired *t*-test when normality assumption was met or otherwise with Wilcoxon signedrank test. For correlation analysis, the Pearson coefficient was used when samples passed the normality test. Spearman coefficient was used for all other cases. Shapiro-Wilk test was performed to evaluate the normality assumption for all samples.

Data availability

Mendeley dataset: confirmation/gvj6fc2b8v/1 https://data.mendeley.com/datasets/publish-
REFERENCES

Anandasabapathy, N., Feder, R., Mollah, S., Tse, S.-W., Longhi, M.P., Mehandru, S., Matos, I., Cheong, C., Ruane, D., Brane, L., et al. (2014). Classical Flt3L-dependent dendritic cells control immunity to protein vaccine. J. Exp. Med. *211*, 1875–1891.

Apte, R.N., and Voronov, E. (2008). Is interleukin-1 a good or bad 'guy' in tumor immunobiology and immunotherapy? Immunol. Rev. 222, 222–241.

Baumeister, S.H., Freeman, G.J., Dranoff, G., and Sharpe, A.H. (2016). Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer. Annu. Rev. Immunol. *34*, 539–573.

Berraondo, P., Minute, L., Ajona, D., Corrales, L., Melero, I., and Pio, R. (2016). Innate immune mediators in cancer: between defense and resistance. Immunol. Rev. *274*, 290–306.

Binnewies, M., Roberts, E.W., Kersten, K., Chan, V., Fearon, D.F., Merad, M., Coussens, L.M., Gabrilovich, D.I., Ostrand-Rosenberg, S., Hedrick, C.C., et al. (2018). Understanding the tumor immune microenvironment (TIME) for effective therapy. Nat. Med. 24,541-550

Broz, P., von Moltke, J., Jones, J.W., Vance, R.E., and Monack, D.M. (2010). Differential Requirement for Caspase-1 Autoproteolysis in Pathogen-Induced Cell Death and Cytokine Processing. Cell Host Microbe *8*, 471–483.

Chen, P.-L., Roh, W., Reuben, A., Cooper, Z.A., Spencer, C.N., Prieto, P.A., Miller, J.P., Bassett, R.L., Gopalakrishnan, V., Wani, K., et al. (2016). Analysis of Immune Signatures in Longitudinal Tumor Samples Yields Insight into Biomarkers of Response and Mechanisms of Resistance to Immune Checkpoint Blockade. Cancer Discov. *6*, 827–837.

Chiappinelli, K.B., Strissel, P.L., Desrichard, A., Li, H., Henke, C., Akman, B., Hein, A., Rote, N.S., Cope, L.M., Snyder, A., et al. (2015). Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. Cell *162*, 974–986.

Condamine, T., Le Texier, L., Howie, D., Lavault, A., Hill, M., Halary, F., Cobbold, S., Waldmann, H., Cuturi, M.-C., and Chiffoleau, E. (2010). Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. J. Leukoc. Biol. *88*, 507–515.

Corrales, L., Glickman, L.H., McWhirter, S.M., Kanne, D.B., Sivick, K.E., Katibah, G.E., Woo, S.-R., Lemmens, E., Banda, T., Leong, J.J., et al. (2015). Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. Cell Rep. *11*, 1018–1030.

Crozat, K., Tamoutounour, S., Vu Manh, T.-P., Fossum, E., Luche, H., Ardouin, L., Guilliams, M., Azukizawa, H., Bogen, B., Malissen, B., et al. (2011). Cutting Edge: Expression of XCR1 Defines Mouse Lymphoid-Tissue Resident and Migratory Dendritic Cells of the CD8+ Type. J. Immunol. *187*, 4411–4415.

Demaria, O., De Gassart, A., Coso, S., Gestermann, N., Di Domizio, J., Flatz, L., Gaide, O., Michielin, O., Hwu, P., Petrova, T.V., et al. (2015). STING activation of tumor endothelial cells initiates spontaneous and therapeutic antitumor immunity. Proc. Natl. Acad. Sci. *112*, 15408–15413.

van Dijk, D., Sharma, R., Nainys, J., Yim, K., Kathail, P., Carr, A.J., Burdziak, C., Moon, K.R., Chaffer, C.L., Pattabiraman, D., et al. (2018). Recovering Gene Interactions from Single-Cell Data Using Data Diffusion. Cell *174*, 716-729.e27.

Drujont, L., Lemoine, A., Moreau, A., Bienvenu, G., Lancien, M., Cens, T., Guillot, F., Bériou, G., Bouchet-Delbos, L., Fehling, H.J., et al. (2016). RORγt+ cells selectively express redundant cation channels linked to the Golgi apparatus. Sci. Rep. *6*, 23682.

Durai, V., and Murphy, K.M. (2016). Functions of Murine Dendritic Cells. Immunity *45*, 719–736.

Eil, R., Vodnala, S.K., Clever, D., Klebanoff, C.A., Sukumar, M., Pan, J.H., Palmer, D.C., Gros, A., Yamamoto, T.N., Patel, S.J., et al. (2016). Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. Nature *5*37, 539–543.

Eon Kuek, L., Leffler, M., Mackay, G.A., and Hulett, M.D. (2016). The MS4A family: counting past 1, 2 and 3. Immunol. Cell Biol. *94*, 11–23.

Gaidt, M.M., Ebert, T.S., Chauhan, D., Ramshorn, K., Pinci, F., Zuber, S., O'Duill, F., Schmid-Burgk, J.L., Hoss, F., Buhmann, R., et al. (2017). The DNA Inflammasome in Human Myeloid Cells Is Initiated by a STING-Cell Death Program Upstream of NLRP3. Cell *171*, 1110-1124.e18.

Ghiringhelli, F., Apetoh, L., Tesniere, A., Aymeric, L., Ma, Y., Ortiz, C., Vermaelen, K., Panaretakis, T., Mignot, G., Ullrich, E., et al. (2009). Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. Nat. Med. *15*, 1170–1178.

Gong, T., Yang, Y., Jin, T., Jiang, W., and Zhou, R. (2018). Orchestration of NLRP3 Inflammasome Activation by Ion Fluxes. Trends Immunol. 39, 393-406

Grove, A., Tomich, J.M., and Montal, M. (1991). A molecular blueprint for the poreforming structure of voltage-gated calcium channels. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *88*, 6418–6422.

Hamilton, S.L., Yatani, A., Brush, K., Schwartz, A., and Brown, A.M. (1987). A comparison between the binding and electrophysiological effects of dihydropyridines on cardiac membranes. Mol. Pharmacol. *31*, 221–231.

Hirata, E., Girotti, M.R., Viros, A., Hooper, S., Spencer-Dene, B., Matsuda, M., Larkin, J., Marais, R., and Sahai, E. (2015). Intravital Imaging Reveals How BRAF Inhibition Generates Drug-Tolerant Microenvironments with High Integrin β 1/FAK Signaling. Cancer Cell *27*, 574–588.

Jerby-Arnon, L., Shah, P., Cuoco, M.S., Rodman, C., Su, M.-J., Melms, J.C., Leeson, R., Kanodia, A., Mei, S., Lin, J.-R., et al. (2018). A Cancer Cell Program Promotes T Cell Exclusion and Resistance to Checkpoint Blockade. Cell *175*, 984-997.e24.

Karki, R., Man, S.M., and Kanneganti, T.-D. (2017). Inflammasomes and Cancer. Cancer Immunol. Res. *5*, 94–99.

Kissenpfennig, A., Henri, S., Dubois, B., Laplace-Builhé, C., Perrin, P., Romani, N., Tripp, C.H., Douillard, P., Leserman, L., Kaiserlian, D., et al. (2005). Dynamics and function of Langerhans cells in vivo: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. Immunity *22*, 643–654.

Krieg, C., Nowicka, M., Guglietta, S., Schindler, S., Hartmann, F.J., Weber, L.M., Dummer, R., Robinson, M.D., Levesque, M.P., and Becher, B. (2018). Highdimensional single-cell analysis predicts response to anti-PD-1 immunotherapy. Nat. Med. *24*, 144–153.

Laoui, D., Keirsse, J., Morias, Y., Van Overmeire, E., Geeraerts, X., Elkrim, Y., Kiss, M., Bolli, E., Lahmar, Q., Sichien, D., et al. (2016). The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. Nat. Commun. *7*, 13720.

Louvet, C., Chiffoleau, E., Heslan, M., Tesson, L., Heslan, J.-M., Brion, R., Bériou, G., Guillonneau, C., Khalife, J., Anegon, I., et al. (2005). Identification of a new member of the CD20/FcepsilonRlbeta family overexpressed in tolerated allografts. Am. J. Transplant. Off. J. Am. Soc. Transplant. Am. Soc. Transpl. Surg. *5*, 2143–2153.

Mangan, M.S.J., Olhava, E.J., Roush, W.R., Seidel, H.M., Glick, G.D., and Latz, E. (2018). Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. Nat. Rev. Drug Discov. *17*, 588–606.

Muñoz-Planillo, R., Kuffa, P., Martínez-Colón, G., Smith, B.L., Rajendiran, T.M., and Núñez, G. (2013). K⁺ efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. Immunity *38*, 1142–1153.

Murakami, T., Ockinger, J., Yu, J., Byles, V., McColl, A., Hofer, A.M., and Horng, T. (2012). Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. *109*, 11282–11287.

Newman, A.M., Liu, C.L., Green, M.R., Gentles, A.J., Feng, W., Xu, Y., Hoang, C.D., Diehn, M., and Alizadeh, A.A. (2015). Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. Nat. Methods *12*, 453–457.

Pfirschke, C., Engblom, C., Rickelt, S., Cortez-Retamozo, V., Garris, C., Pucci, F., Yamazaki, T., Poirier-Colame, V., Newton, A., Redouane, Y., et al. (2016). Immunogenic Chemotherapy Sensitizes Tumors to Checkpoint Blockade Therapy. Immunity *44*, 343–354.

Pitt, J.M., Vétizou, M., Daillère, R., Roberti, M.P., Yamazaki, T., Routy, B., Lepage, P., Boneca, I.G., Chamaillard, M., Kroemer, G., et al. (2016). Resistance Mechanisms to

Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-Intrinsic and -Extrinsic Factors. Immunity *44*, 1255–1269.

Rathinam, V.A.K., and Fitzgerald, K.A. (2016). Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. Cell *165*, 792–800.

Riaz, N., Havel, J.J., Makarov, V., Desrichard, A., Urba, W.J., Sims, J.S., Hodi, F.S., Martín-Algarra, S., Mandal, R., Sharfman, W.H., et al. (2017). Tumor and Microenvironment Evolution during Immunotherapy with Nivolumab. Cell *171*, 934-949.e15.

Schroeder, Sofía Russo, Carlos Costa, Juliana Hori, Inés Tiscornia, Mariela Bollati-Fogolín5, Darío S Zamboni, Gonzalo Ferreira, Ernesto Cairoli, and Marcelo Hill (2017). Pro-inflammatory Ca++-activated K+ channels are inhibited by hydroxychloroquine. Sci Rep 7, 1892.

Segovia, M., Louvet, C., Charnet, P., Savina, A., Tilly, G., Gautreau, L., Carretero-Iglesia, L., Beriou, G., Cebrian, I., Cens, T., et al. (2014). Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. Am. J. Transplant. *14*, 1021–1031.

Sharma, P., and Allison, J. (2015). Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy: Toward Combination Strategies with Curative Potential. Cell *161*, 205–214.

Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J.A., and Ribas, A. (2017). Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. Cell *168*, 707–723.

Sokolovska, A., Becker, C.E., Ip, W.K.E., Rathinam, V.A.K., Brudner, M., Paquette, N., Tanne, A., Vanaja, S.K., Moore, K.J., Fitzgerald, K.A., et al. (2013). Activation of caspase-1 by the NLRP3 inflammasome regulates the NADPH oxidase NOX2 to control phagosome function. Nat. Immunol. *14*, 543–553.

Syn, N.L., Teng, M.W.L., Mok, T.S.K., and Soo, R.A. (2017). De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. Lancet Oncol. *18*, e731–e741.

Topalian, S.L., Drake, C.G., and Pardoll, D.M. (2015). Immune Checkpoint Blockade: A Common Denominator Approach to Cancer Therapy. Cancer Cell *27*, 450–461.

Topalian, S.L., Taube, J.M., Anders, R.A., and Pardoll, D.M. (2016). Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. Nat. Rev. Cancer *16*, 275–287.

Woo, S.-R., Fuertes, M., Corrales, L., Spranger, S., Furdyna, M., Leung, M.K., Duggan, R., Wang, Y., Barber, G., Fitzgerald, K., et al. (2014). STING-Dependent Cytosolic
DNA Sensing Mediates Innate Immune Recognition of Immunogenic Tumors. Immunity *41*, 830–842.

Xiang, Y., Wang, X., Yan, C., Gao, Q., Li, S.-A., Liu, J., Zhou, K., Guo, X., Lee, W., and Zhang, Y. (2013). Adenosine-5'-Triphosphate (ATP) Protects Mice against Bacterial Infection by Activation of the NLRP3 Inflammasome. PLoS ONE *8*, e63759.

Yatani, A., Kunze, D.L., and Brown, A.M. (1988). Effects of dihydropyridine calcium channel modulators on cardiac sodium channels. Am. J. Physiol. *254*, H140-147.









Α



Α



Figure 5



Figure 6



Supplementary Material

Figure S1



Figure S1. Related to Figure 1.

A) Sequence of genomic DNA (*Casp1* gene) from *Tmem176b^{-/-}* and *Tmem176b^{-/-}Casp1^{-/-}* mice. *Tmem176b^{-/-}Casp1^{-/-}* (double KO) mice were generated by deletion of the indicated bases in *Casp1* gene in *Tmem176b^{-/-}* mice using the CRISPR/Cas9 strategy. Proteins sequences are shown in the lower part of the alignment. Right panel: Western blot confirming the absence of Caspase-1 in *Tmem176b^{-/-}Casp1^{-/-}* splenocytes.

B) 6-8 weeks-old male WT and *Tmem176b^{-/-}* mice were injected i.p. with 20 mg/kg ATP. 4 hr later, peritoneal lavage was performed and absolute number of neutrophils (CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C^{int}) were determined by flow cytometry. In the plots, CD11b⁺ cells were analyzed for Ly6C and Ly6G expression. When indicated, the Caspase-1 inhibitor Z-YVAD-CMK was injected i.p. at 5 mg/kg at the time of ATP treatment. At least six animals were studied in each group in two independent experiments. * p<0.05. ns: non significant. One-way ANOVA test. Left panel shows representative scatter dot plots and right panel shows quantification for the different groups.

C) WT and *Tmem176b^{-/-}* bone marrow-derived DCs (BMDCs) were treated with LPS (0.25 µg/ml) during 4 hr, then washed and treated with 500 µg/ml of aluminum particles for the indicated times (left panel). Dose-response experiments are shown in the central panel. Culture supernatants were harvested and IL-1β was determined by ELISA (left and central panels). Right panel: Caspase-1 activation was studied by flow cytometry using the FLICA1 reagent. BMDCs were stimulated for 3 hr with LPS and then incubated in the presence or absence of 500 µg/ml aluminum particles during 45 min. ND: not detected. * p<0.05; ** p<0.01 One-way ANOVA test. One experiment representative of three is shown.

D) WT BMDCs were primed for 3 hr with LPS (0.25 μg/ml), then washed and left untreated or treated during 45 min with 5 μM nigericin. Cell lysates and culture supernatants were analyzed by Western blot for Pro-Caspase-1 and Caspase-1 (p20) expression. One experiment representative of two is shown.

E) THP-1 cells were differentiated to macrophages by treatment for 48 hr with 0.1 μM PMA. Cells were then electroporated with *GFP* or *GFP-TMEM176B-1* coding pcDNA1./8203 plasmids. Sixteen hr later, cells were left untreated or treated for 3 hr with 0.25 μg/ml LPS and then exposed for 2 hr to 2.5 μM nigericin. Transfection efficiency was assessed by flow cytometry.

F) Cell viability was studied by analysis of propidium iodide staining by flow cytometry. One experiment representative of three is shown.



Figure S2. Related to Figure 2.

A) Stromal TMEM176B expression is associated with lower survival in human colon cancer patients. Ninety (90) samples from human colon carcinomas were assessed for TMEM176B expression (brown staining, counterstained with hematoxylin) by immunohistochemistry, Representative images for parenchyma and stroma depicting low and high expression are shown. Scale bars, 10 or 25 μm.

B) Survival analysis of colon cancer patients with high and low TMEM176B expression. High stromal TMEM176B expression was associated with worse overall survival. p=0.0194 Log-rank (Mantel-Cox) test. Parenchymal expression did not correlate with survival (p=0.55; Log-rank (Mantel-Cox) test). The staining and analysis were done by two independent researchers in a blinded fashion, ignoring the survival data for each sample.

C) Matrix of scatterplots showing correlations between *NLRP3, IL1B, IL18, TMEM176A and TMEM176B* gene expression in 420 macrophages from single cell RNA-Seq data from melanoma biopsies (Jerby-Arnon et al., 2018). Correlations were made using Spearman's correlation coefficient. Red lines indicate the local regression (LOESS) fit. P, p value; rho, Spearman's correlation coefficient.

D) 1 x 10⁶ MC38 colon cancer cells (left panel), 1 x 10⁵ LL2 lung cancer cells (central panel) or 1 x 10⁶ EG7 thymic lymphoma cells (right panel) were s.c. injected into WT and *Tmem176b^{-/-}* mice. Tumor growth was monitored every three days and measured in its longer and shorter diameters. Mice were euthanized when one of the diameters reached 2 cm. The ratio in the inset shows the number of animals developing tumors over the number of injected animals.

E) *Tmem176b* mRNA expression assessed by RT-PCR. The 249-bp band corresponds to the expected size of the specific amplified fragment. One experiment representative of two is shown.

F) Tmem176b-specific cell lysis was assessed by using the method described in the STAR METHODS section. WT naïve splenocytes were loaded either with low or high doses of DDAO and injected i.v. in tumor-bearing WT and *Tmem176b^{-/-}* animals 14 days after tumor inoculation. Four hr after injection, spleen was harvested and the ratio of low and high DDAO populations was studied to assess the percentage of specific cell death as explained in the STAR METHODS METHODS section. Not significant. Student's *t* test.

G) Analysis of caspase-1 activation by Western blot comparing tumors lysates from WT and *Tmem*176b^{-/-} animals. One experiment representative of two is shown.

H) Left panel shows a representative scatter dot plot for MHCII and CD11c expression within TDLN to identify migratory and resident cDCs. The middle and right panels depict the percentage of FLICA1⁺ cells (expressing active caspase-1) within CD11b⁺ resident and migratory cDCs respectively from WT and *Tmem176b^{-/-}* animals. One experiment representative of two is shown. * p<0.05 Student's *t* test.

I) Lymph nodes from naive mice or tumor-bearing animals (TDLN; harvested 14 days after EG7 tumor cell injection) were immunostained with anti-Tmem176b (red) and anti-CD11b (Cyan) antibodies. Nuclei were stained with DAPI (blue). The white arrows indicate Tmem176b⁺ CD11b^{int} cells. At least three animals were studied in each group. Scale bars, 10 or 25 μm.

J) TCR β^+ CD4⁺ ROR γ t⁺ T cells were assessed by flow cytometry in TDLN from EG7-bearing WT and *Tmem176b*^{-/-} mice. Relative (left panel) and absolute (central panel) number of cells were determined. The right panel shows relative cell number of *Tmem176b*^{-/-} animals treated with control IgG or anti-IL-1 β neutralizing antibody. * p<0.05 Student's *t* test.

K) EG7-bearing WT and Tmem176b^{-/-} animals were euthanized 14 days after tumor cell inoculation. TDLN cells were

re-stimulated *in vitro* with 10 µM OVA peptide 323-339 (ISQAVHAAHAEINEAGR). IL-17A⁺ CD4⁺ T cells were assessed by flow cytometry. One experiment representative of three is shown. * p<0.05; ** p<0.01 Two-way ANOVA test.

L) EG7-bearing *Tmem176b^{-/-}* mice were treated with control IgG or anti-IL-17A neutralizing antibody and mouse survival was studied. p=0.0593. Log-rank (Mantel-Cox) test.



Figure S3. Related to Figure 2.

A) EG7 tumors and tumor-draining lymph nodes (TDLN) from WT and *Tmem176b^{-/-}* mice were harvested 14 days after tumor cell injection (n=5 per group). Quantitative RT-PCR was performed for the indicated genes. * p<0.05 Student's *t* test.

B) EG7 tumors from WT and *Tmem176b^{-/-}* mice were harvested 14 days after tumor cell injection (at least n=5 per group). Tumors were disaggregated with collagenase D and cell suspensions were stained with the following antibodies and analyzed by flow cytometry (Infiltrating cells: TCRV β 12⁻ (EG7 cells are TCRV β 12⁺); NK: TCRV β 12⁻ TCR β -NK1.1⁺; NKT: TCRV β 12⁻TCR β +NK1.1⁺; T $\gamma\delta$ CD27⁺: TCRV β 12⁻TCR $\gamma\delta$ +CD27⁺; T $\gamma\delta$:TCRV β 12⁺TCR $\gamma\delta$ +; Th17: TCRV β 12⁺TCR β +CD4⁺ROR γ t⁺ B: TCRV β 12⁻TCR β -CD19⁺; MDSCs: TCR β -CD11b⁺Gr1⁺. Student's *t* test.



126

Figure S4. Related to Figure 2.

A) Representative flow cytometry analysis of total and OVA (SIINFEKL peptide)-specific CD8⁺ T cells within the tumor microenvironment. TCRVβ12 staining was used to identify tumoral EG7 T cells. Representative of three experiments.

B) Determination of the frequency of total and OVA-specific CD8⁺ T cells in WT and *Tmem176b*[→] mice studied in A. * p<0.05 (Student's *t* test).

C) Assessment of intratumoral regulatory T cells (Tregs) and CD8/Treg ratio within the tumor microenvironment. * p<0.05 (Student's *t* test).

D) Tumor-infiltrating T cells were purified by negative selection and re-stimulated *in vitro* in the presence of LPStreated BMDCs (1/10 ratio) with SIINFEKL peptide. Proliferation of CD8⁺ T cells was determined by flow cytometry by analyzing DDAO dilution. Four WT and four *Tmem176b*^{-/-} animals were studied. * p<0.05; ** p<0.01. Student's *t* test.

E) Representative histograms of *in vivo* T-cell cytotoxicity against OVA tumoral antigen in experiments shown in Figure 2G.

F) Percentage of CD107a (degranulation marker) studied by flow cytometry within CD8⁺ T cells infiltrating tumors in *Tmem176b^{-/-}Caspase1^{-/-}* mice. * p<0.05. Student's *t* test.



128

Figure S5. Related to Figure 2.

Tumor-draining lymph nodes from EG7-bearing WT and *Tmem176b*[→] animals were harvested 14 days after tumor inoculation. Different lymphocyte populations were analyzed by flow cytometry.

A) Representative scatter dot plots indicating the frequency of cells expressing TCR $\alpha\beta$, CD4, CD8 and Foxp3.

B) Percentage and absolute number of different lymphocyte populations. Student's *t* test. * p<0.05.

Table S1. Related to Figure 4. Analysis of data from Riaz *et al.* 2017. Paired analysis of inflammasome-associated gene expression profile in non-responders on/pre-treatment (anti-PD-1 antibody). IPI naïve patients

Gene	p_value	fdr	fc ^a	p_value_log2	fdr_log2
TMEM176B	0.0390625	0.46875	0.7567829	0.029506455	0.37796936
TMEM176A	0.0390625	0.46875	0.72357185	0.048297486	0.37796936
CASP4	0.06761715	0.46875	0.3790591	0.111900929	0.44760372
IL18R1	0.08848316	0.46875	-0.42848366	0.175189823	0.54545455
NLRP6	0.09765625	0.46875	0.64605376	0.09765625	0.44760372
IL1RN	0.12890625	0.4921875	0.66854228	0.062994893	0.37796936
IL1RAP	0.1640625	0.4921875	0.3397688	0.25	0.54545455
IL1R2	0.1640625	0.4921875	0.62915261	0.053073014	0.37796936
IL1B	0.203125	0.54166667	0.39703187	0.31477899	0.62955798
CASP5	0.25	0.54545455	0.32829776	0.220629385	0.54545455
NLRP12	0.25	0.54545455	-0.78174959	0.25	0.54545455
AIM2	0.359375	0.71875	0.3707348	0.214068788	0.54545455
PYCARD	0.43022486	0.79426128	-0.17641233	0.477043954	0.74553571
GSDMD	0.49609375	0.85044643	0.07568183	0.588683156	0.74553571
IL18RAP	0.58736276	0.86979167	0.32970506	0.577301487	0.74553571
SIRT3	0.65103296	0.86979167	-0.06294952	0.607275156	0.74553571
IL1A	0.65234375	0.86979167	-0.01555178	0.65234375	0.74553571
IL18	0.65234375	0.86979167	0.14703032	0.55410695	0.74553571
ABHD5	0.8916341	1	0.01940535	0.786760725	0.85828443
CASP1	0.91015625	1	0.20761326	0.604608002	0.74553571
IL1R1	0.93720565	1	-0.02012097	0.65234375	0.74553571
NLRP7	0.94418251	1	0.16525862	0.833634883	0.86987988
NLRC4	0.95868982	1	0.01288561	0.645871386	0.74553571
NLRP3	1	1	-0.12646354	0.901745055	0.90174505

a: fc=FC=Log2(on-treatment/pre-treatment)

Table S2. Related to Figure 4. Analysis of data from Riaz *et al.* 2017. Inflammasome-related gene expression profile at pre-treatment stage (Anti-PD-1). Bulk patients

Gene	p_value	fdr	fca	p_value_log2	fdr_log2
IL18	0.26886624	0.9610583	-0.06039552	0.44313385	0.90452546
AIM2	0.30215351	0.9610583	-1.18605245	0.302153513	0.90452546
ABHD5	0.30818719	0.9610583	0.16813754	0.382450457	0.90452546
NLRP7	0.32975435	0.9610583	-0.65461498	0.329754349	0.90452546
NLRP6	0.36689235	0.9610583	-0.39904646	0.366892345	0.90452546
TMEM176A	0.43219326	0.9610583	-0.25246754	0.511560587	0.90452546
TMEM176B	0.50555314	0.9610583	-0.19952116	0.574971819	0.90452546
IL1RAP	0.51837548	0.9610583	-0.30412707	0.403383302	0.90452546
IL1R2	0.54450591	0.9610583	0.38787846	0.544505907	0.90452546
NLRP3	0.57126261	0.9610583	-0.195523	0.571262605	0.90452546
CASP1	0.5848672	0.9610583	0.1042929	0.571883087	0.90452546
IL1A	0.60894254	0.9610583	0.87696368	0.608942545	0.90452546
IL1B	0.62654098	0.9610583	0.51189721	0.626540976	0.90452546
IL1R1	0.62654098	0.9610583	0.50606896	0.600290705	0.90452546
IL18R1	0.63778549	0.9610583	-0.45389818	0.437045786	0.90452546
IL1RN	0.64070554	0.9610583	1.45651703	0.640705535	0.90452546
NLRP12	0.77138887	0.99608145	0.65653567	0.771388868	0.91889441
SIRT3	0.78870657	0.99608145	0.08908715	0.530108715	0.90452546
CASP5	0.80403261	0.99608145	-0.1828214	0.804032606	0.91889441
NLRC4	0.89734932	0.99608145	0.24808789	0.72127875	0.91889441
IL18RAP	0.91224132	0.99608145	0.18853179	0.912241316	0.9592106
GSDMD	0.91307466	0.99608145	-0.0650615	0.775336521	0.91889441
PYCARD	0.97625031	1	0.43830075	0.919243494	0.9592106
CASP4	1	1	0.04520392	1	1

Table S3. Related to Figure 4. Analysis of data from Riaz *et al.* 2017. Inflammasome gene expression at pre-treatment stage (Anti-PD-1). IPI naïve patients.

Gene	p_value	fdr	fcª	p_value_log2	fdr_log2
IL1RAP	0.04919459	1	-0.84507093	0.068028757	0.97593334
CASP1	0.14290646	1	0.8346638	0.215221623	0.97593334
IL1R2	0.1895867	1	-0.27886838	0.189586695	0.97593334
ABHD5	0.2409666	1	0.28218828	0.336421084	0.97593334
NLRC4	0.25253619	1	0.57558152	0.427551872	0.97593334
PYCARD	0.28754702	1	0.786833	0.278688796	0.97593334
IL18R1	0.44913681	1	0.06558208	0.687783063	0.97593334
NLRP6	0.51709317	1	-0.31920005	0.517093172	0.97593334
IL1A	0.5180268	1	-1.37787825	0.518026796	0.97593334
AIM2	0.52539868	1	-1.62832169	0.285701311	0.97593334
IL1R1	0.66298319	1	0.20863927	0.525398683	0.97593334
NLRP3	0.69470252	1	0.02702505	0.694702525	0.97593334
IL1B	0.69470252	1	-1.04185706	0.694702525	0.97593334
GSDMD	0.69470252	1	-0.01225233	0.871411967	0.97593334
TMEM176A	0.73989814	1	-0.25420257	0.739898142	0.97593334
IL18RAP	0.73989814	1	0.22563589	0.739898142	0.97593334
NLRP12	0.73989814	1	1.41454798	0.739898142	0.97593334
CASP5	0.78594874	1	-0.32849091	0.78594874	0.97593334
NLRP7	0.92607981	1	-0.18311634	0.926079813	0.97593334
CASP4	0.96607684	1	-0.01321584	0.871781457	0.97593334
IL1RN	0.97593334	1	0.45616083	0.956178957	0.97593334
IL18	0.97593334	1	0.46255714	0.975933341	0.97593334
SIRT3	1	1	0.12306673	0.586578059	0.97593334
TMEM176B	1	1	-0.20950591	0.749503358	0.97593334

Table S4. Related to Figure 4. Analysis of data from Riaz *et al.* 2017. Inflammasome gene expression at pre-treatment stage (Anti-PD-1). IPI progressors patients.

Gene	p_value	fdr	fcª	p_value_log2	fdr_log2
NLRP7	0.11883877	0.87847857	-1.43340439	0.118838768	0.93807971
IL18	0.1981639	0.87847857	-0.41133656	0.237145531	0.93807971
IL18R1	0.27567576	0.87847857	-0.80848563	0.193730961	0.93807971
PYCARD	0.30505426	0.87847857	0.20522215	0.324660564	0.93807971
TMEM176A	0.44302914	0.87847857	-0.0569624	0.69003012	0.93807971
AIM2	0.49979366	0.87847857	-0.75123062	0.429215461	0.93807971
NLRP12	0.53313639	0.87847857	-0.11519728	0.533136387	0.93807971
TMEM176B	0.53995284	0.87847857	-0.01448501	0.756637021	0.93807971
IL1RN	0.53995284	0.87847857	2.1700564	0.388204956	0.93807971
NLRP3	0.60978261	0.87847857	-0.41559361	0.609782609	0.93807971
NLRP6	0.62191817	0.87847857	-0.37938013	0.621918166	0.93807971
SIRT3	0.66060345	0.87847857	0.09644427	0.60716929	0.93807971
IL18RAP	0.6777879	0.87847857	0.20423474	0.9658985	0.9658985
IL1B	0.68321676	0.87847857	2.29490109	0.68321676	0.93807971
NLRC4	0.72110363	0.87847857	-0.02883275	0.826361869	0.93807971
CASP1	0.72110363	0.87847857	-0.17541481	0.89899306	0.93807971
CASP4	0.72110363	0.87847857	0.15641347	0.721103627	0.93807971
IL1A	0.7546836	0.87847857	2.81678569	0.7546836	0.93807971
ABHD5	0.75627594	0.87847857	0.07287696	0.756880106	0.93807971
IL1R2	0.7988051	0.87847857	0.84095489	0.798805099	0.93807971
GSDMD	0.83902191	0.87847857	-0.05960373	0.71436234	0.93807971
IL1R1	0.87847857	0.87847857	0.77439692	0.828883091	0.93807971
IL1RAP	0.87847857	0.87847857	0.17601368	0.878478572	0.93807971
CASP5	0.87847857	0.87847857	-0.04991744	0.878478572	0.93807971

Table S5. Related to Figure 4. Analysis of data from Riaz *et al.* 2017. Inflammasome-related gene expression at on-treatment stage (Anti-PD-1). IPI naïve patients.

Gene	p_value	fdr	fcª	p_value_log2	fdr_log2
TMEM176B	0,00390625	0,0625	1,84751874	0,00390625	0,0625
GSDMD	0,00541809	0,0625	0,63057312	0,00541809	0,0625
TMEM176A	0,0078125	0,0625	1,7844506	0,0078125	0,0625
NLRP6	0,01824504	0,07943254	0,80397817	0,01824504	0,07943254
IL18R1	0,01890336	0,07943254	0,88988129	0,01890336	0,07943254
IL1RAP	0,01985814	0,07943254	-0,890935	0,01985814	0,07943254
IL18RAP	0,02734375	0,09375	1,08256634	0,02734375	0,09375
CASP1	0,0546875	0,16193182	0,93111062	0,0546875	0,16193182
IL18	0,07344048	0,16193182	1,17698945	0,07344048	0,16193182
NLRP7	0,07421875	0,16193182	0,98046218	0,07421875	0,16193182
IL1R1	0,07421875	0,16193182	0,90803425	0,07421875	0,16193182
CASP4	0,0846027	0,1692054	0,60492518	0,0846027	0,1692054
PYCARD	0,15770119	0,29114067	0,60839068	0,15770119	0,29114067
NLRC4	0,25	0,42160536	0,91383868	0,25	0,42160536
NLRP3	0,26670139	0,42160536	0,55527122	0,26670139	0,42160536
CASP5	0,28107024	0,42160536	0,6440894	0,28107024	0,42160536
AIM2	0,30078125	0,42463235	0,22745745	0,30078125	0,42463235
IL1A	0,359375	0,47916667	0,67605275	0,359375	0,47916667
IL1R2	0,42578125	0,53782895	0,82922261	0,42578125	0,53782895
NLRP12	0,5226743	0,62720916	0,47842529	0,5226743	0,62720916
ABHD5	0,74473826	0,85112944	-0,0715091	0,74473826	0,85112944
IL1RN	0,8203125	0,89488636	0,98637591	0,8203125	0,89488636
SIRT3	0,97073348	1	0,00631734	0,97073348	1
IL1B	1	1	0,92505986	1	1

Table S6. Related to Figure 4. Analysis of data from Riaz *et al.* 2017. Paired analysis of Inflammasome-related gene expression in responders (Anti-PD-1) on/pre-treatment stage. IPI naïve patients.

Gene	n value	fdr	fc	n value log2	fdr log2
	0.021/2250	0.51440626	0 4950693	0.021/2250/	0.51440626
IL TORT	0,02143359	0,51440626	-0,4659665	0,021433594	0,51440626
ILIRAP	0,12932599	0,86453951	0,17706561	0,129325989	0,864539513
NLRP12	0,22875214	0,86453951	-0,066435	0,228752136	0,864539513
NLRP7	0,28588144	0,86453951	-0,2509041	0,285881445	0,864539513
IL1R2	0,30379486	0,86453951	0,16216661	0,303794861	0,864539513
GSDMD	0,30379486	0,86453951	0,00292277	0,303794861	0,864539513
ABHD5	0,36921692	0,86453951	0,21108858	0,369216919	0,864539513
CASP4	0,36921692	0,86453951	0,0423972	0,369216919	0,864539513
NLRP3	0,43614622	0,86453951	-0,1577218	0,43614622	0,864539513
IL1RN	0,44229889	0,86453951	0,32536957	0,442298889	0,864539513
IL18RAP	0,44229889	0,86453951	0,16380521	0,442298889	0,864539513
SIRT3	0,46035442	0,86453951	-0,0661062	0,460354416	0,864539513
IL1B	0,46829224	0,86453951	0,21193413	0,468292236	0,864539513
IL18	0,5508728	0,88139648	-0,0953584	0,550872803	0,881396484
TMEM176A	0,5508728	0,88139648	-0,422569	0,550872803	0,881396484
IL1R1	0,60945892	0,90792501	0,02509495	0,609458923	0,907925011
NLRC4	0,75676165	0,90792501	-0,0565318	0,756761647	0,907925011
PYCARD	0,76602936	0,90792501	-0,4921455	0,766029358	0,907925011
TMEM176B	0,79870605	0,90792501	-0,3214791	0,798706055	0,907925011
CASP1	0,79914976	0,90792501	0,03520439	0,799149764	0,907925011
AIM2	0,80196793	0,90792501	0,06147296	0,801967933	0,907925011
NLRP6	0,83226459	0,90792501	-0,080559	0,832264593	0,907925011
IL1A	0,88706869	0,9256369	-0,0472519	0,887068694	0,925636898
CASP5	1	1	-0,2518302	1	1

a: fc=FC=Log2(on-treatment/pre-treatment)



в

Figure S6. Related to Figure 5.

The log2-transformed normalized NanoString counts from melanoma tumor biopsies for the indicated inflammasomerelated genes is shown (Chen *et al.* 2016 cohort analyzed in Figure 5). Biopsies were obtained before anti-CTLA-4 therapy in A and B.

A) Patients were classified as responders and progressors to anti-CTLA-4 therapy according to clinical outcome as defined by Chen *et al* (2016). * p<0.05. Non-paired Student's *t* test.

B) Patients progressing to anti-CTLA-4 therapy were then treated with anti-PD-1 antibodies. Based on their clinical outcome (with regards to anti-PD-1 therapy), they were classified as responders and progressors. * p<0.05; ** p<0.01. Non-paired Student's *t* test.



C	
•	NLRP3
•	CASP1
	PYCARD
	IL1B
•	IL1A
•	IL 18
•	IL1R1
	IL1RN
•	IL18RAP
•	IL 1 R 2
•	IL 18B P
	IL 18R1
	A 1M 2
	IL 17 F
•	NLRP6
•	NIRPT

Figure S7. Related to Figure 5.

The log2-transformed normalized NanoString counts from melanoma tumor biopsies for the indicated inflammasomerelated genes is shown for melanoma patients from the Chen *et al.* 2016 cohort analyzed (in Figure 5). Non-paired Student's *t* test.

A) Tumor biopsies were obtained before anti-PD-1 therapy in patients not responding to anti-CTLA-4 antibodies. In the figure, responders and progressors were classified according to their clinical outcome in response to anti-PD-1 therapy.

B) Tumor biopsies were obtained during the anti-CTLA-4 therapy (first 2-3 months). In the figure responders and progressors were classified according to their clinical outcome in response to anti-CTLA-4 therapy.

C) Color code to identify the genes studied in Figure 5B.



Figure S8. Related to Figure 6.

A) CHO-7 cells were transfected with *Tmem176b* and *Tmem176a*-mcherry-coding pcDNA1.3 plasmids. Cells were then loaded with the Na⁺-sensitive fluorescent dye Asante NaTRIUM Green 2 (ANG-2). The graph indicates quantification of ANG-2 mean fluorescence intensity (MFI) subtracting in each condition the MFI obtained in Na⁺-free buffer. Untreated and (-) BayK8644-treated cells were studied. One experiment representative of three is shown. ** p<0.01; *** p<0.001. Two-way ANOVA test.

B) BMDCs were treated for 3 hr with 0.25 μg/ml LPS. Cells were washed and then treated with 2 mM ATP, 2.5 μM BayK8644 or both stimuli. Cell lysates and precipitated culture supernatants were electrophoresed, blotted and analyzed using an anti-IL-1β antibody. One experiment representative of four is shown.

C) Western blot analysis of pro-caspase-1 and caspase-1 expression in BMDCs (supernatants) treated as follows. 1: LPS; 2: LPS/ATP; 3: LPS/verapamil + ATP; 4: LPS/nifedipine + ATP; 5: LPS/diltiazem + ATP; 6: LPS/DMSO + ATP; 7: LPS/ATP medium standard K⁺; 8: LPS/BayK8644 medium standard K⁺; 9: LPS/ATP medium high K⁺; 10: LPS/BayK medium high K⁺. One experiment representative of two is shown.

D) BMDCs were treated with 0.5 μ M BayK8644 for two hr and then stained with FLICA1 to determine active caspase-1 by flow cytometry. Student's *t* test. * p<0.05. One experiment representative of three is shown.

E) EG7 tumor cells were untreated or treated *in vitro* with vehicle (ethanol) or with (+) BayK8644 (10 μM). Apoptosis was determined by analyzing active caspase-3/7. The grey histogram shows unstained conditions and the dotted line shows caspase-3/7 staining. One experiment representative of three is shown.

F) WT mice were inoculated with EG7 tumor cells and left untreated or treated with BayK8644 in the absence or presence of anti-CD8 depleting antibody. Growth of individual tumors is shown.

G-H) Growth of individual tumors (G) and survival (H) of BALB/c mice injected s.c with 1x10⁵ CT26 colon cancer cells. Mice were treated daily i.p with vehicle or 1 mg/kg BayK8644 at days 3-15 after tumor cell inoculation. * p<0.05; Log-rank (Mantel-Cox) test.

I) Absolute number (left panel) and percentage (right panel) of TCRβ⁺CD4⁺RORγt⁺ T cells within TDLN from tumor (EG7)-bearing mice treated with anti-PD-1 or anti-PD-1 + BayK8644. 250 µg anti-PD-1 antibody was injected i.p at days 6, 9 and 12 after tumor inoculation. BayK8644 was injected every day since day 9 (in mice had established tumors) until day 21. * p<0.05 Student's *t* test.

J-K) Growth of individual tumors (J) and survival (K) of C57BL/6 mice injected s.c. with 1 x 10⁵ LL/2 lung tumor cells. WT mice were injected with LL/2 cells and then treated with 250 µg anti-PD-1 antibody at days 6, 9 and 12 after tumor inoculation. BayK8644 was injected daily since day 9 (tumors were 10-20 mm² in surface) until day 21. In this therapeutic protocol BayK8644 monotherapy showed no anti-tumoral effect. ns: non significant. Log-rank (Mantel-Cox) test.

L-M) Growth of individual tumors (L) and survival (M) of C57BL/6 mice injected s.c with 1 x 10⁶ MC38 colon cancer cells. WT mice were injected with MC38 cells and then treated with 250 µg anti-PD-1 antibody at days 6, 9 and 12 after tumor inoculation. BayK8644 was injected daily since day 9 (tumors were 10-20 mm² in surface) until day 21. In this therapeutic protocol BayK8644 monotherapy showed no significant anti-tumoral effect. ns: non significant. Logrank (Mantel-Cox) test

N) WT mice were inoculated with 5555 melanoma cells and left untreated or treated either with anti-PD-1 antibody

(days 6, 9 and 12), BayK8644 (days 9-21) or both. All animals had established tumors when BayK8644 treatment was started. Growth of individual tumors is shown.

O) C57BL/6 mice were s.c injected with 2.5 x 10⁵ 5555 melanoma cells. Ten days after tumor cell inoculation, animals were treated with control IgG, anti-CTLA-4 + anti-PD-1 or anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + BayK8644. Mice were sacrificed when one of the tumor diameters reached 2 cm. Mice survival was monitored. Statistical significance was determined through the Log-rank (Mantel-Cox) test. ns: non significant. Control IgG vs anti-CTLA-4 + anti-PD-1 p= 0.0057; Control IgG vs anti-CTLA-4 + anti-PD-1 + BayK8644 p<0.0001; anti-CTLA-4 + anti-PD-1 vs anti-CTLA4 + anti-PD-1 + BayK8644, ns.





143
Figure S9. Related to the Discussion section of the manuscript.

WT and *Caspase1/11^{-/-}* BMDCs were left untreated (NT) or were treated with LPS (0.25 µg/ml for 3 hr), washed and exposed to ATP (0.5 mM for 2 hr). A-B) Data are representative of two independent experiments. ns: non significant; * p<0.05; *** p<0,001. Two-way ANOVA test.

A) Tmem176b, Tnfa and II6 mRNA expression was assessed by qRT-PCR.

B) Annexin V/7AAD staining of WT BMDCs left untreated (NT) or treated with LPS+ATP. The numbers indicate the percentage of cells in each quadrant.

Gene or mRNA	Primer forward	Primer reverse
Rorγt (mRNA)	GGA GGA CAG GGA GCC AAG TT	AGT AGG CCA CAT TAC ACT GCT
ll17a	AGT CCA GGG AGA GCT TCA TCT	TCT TCA TTG CGG TGG AGA GTC
<i>Foxp3</i>	TCC AAG TCT CGT CTG AAG GC	GCG AAA GTG GCA GAG AGG TA
Tgfb1	TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG G	GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC
ll10	CCA AGC CTT ATC GGA AAT GA	TTT TCA CAG GGG AGA AAT CG
lfng	TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG	TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA
Tnfa	TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC	CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A
Ctla4	CTG AAG GTT GGG TCA CCT GT	TGG ACT CCG GAG GTA CAA AG
Ccl22	CAC CCT CTG CCA TCA CGT TT	CCT GGG ATC GGC ACA GAT AT
Ccl5	ACT CCC TGC TGC TTT GCC TAC	GAG GTT CCT TCG AGT GAC A
ll12b	GGA AGC ACG GCA GCA GAA TA	AAC TTG AGG GAG AAG TAG GAA TGG
114	GGT CTC AAC CCC CAG CTA GT	GCC GAT GAT CTC TCT CAA GTG AT
Gata3	AGG ATG TCC CTG CTC TCC TT	GCC TGC GGA CTC TAC CAT AA
Tbx21	GTC TGG GAA GCT GAG AGT CG	CTT TCC ACA CTG CAC CCA CT
Cebpb	GGA GAC GCA GCA CAA GGT	AGC TGC TTG AAC AAG TTC CG
Ccl19	GAC CTT CCC AGC CCC AAC T	CGG AAG GCT TTC ACG ATG TT
116	GAG GAT ACC ACT CCC AAC AGA CC	AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA
Fas	AGT TTC ATG AAC CCG CCT C	GCA GAC ATG CTG TGG ATC TG
Cd274	ATG CTC AGA AGT GGC TGG AT	TGC TGC ATA ATC AGC TAC GG
Tmem176b	ACT CCA GCT AGA ATT GCC ACA G	CAT CAG CAT CCA CAT CCA CC
Gapdh	CTA CAG CAA CAG GGT GGT GG	TAT GGG GGT CTG GGA TGG

Table S7. Mouse oligonucleotides used in this study.

Discusión

La homeostasis iónica es crucial para el correcto funcionamiento de las células. Sin embargo, durante mucho tiempo no se le dio la debida importancia a la función de los canales iónicos en las células inmunes. Actualmente se reconoce que canales iónicos y la homeostasis iónica controlan funciones importantes de las células inmunes, como por ejemplo la respuesta inflamatoria¹⁶. Es claro que la homeostasis iónica es crítica en la activación del inflamasoma NLRP3, habiéndose relacionado la movilización de K⁺, Ca²⁺ y Cl^{- 2}. A pesar de esto, poco se sabe en cuanto a los canales implicados en estos mecanismos y en cómo esos iones interactúan para activar al inflamasoma, por lo que nos propusimos aportar conocimiento en este sentido.

Nuestros resultados sugieren que los canales de K⁺ activados por Ca²⁺, K_{Ca}1.1 y K_{Ca}3.1, están involucrados en el mecanismo de activación del inflamasoma NLRP3, y que estos canales son inhibidos por la hidroxicloroquina. Logramos mostrar que la inhibición de los canales K_{ca}1.1 impide la activación del inflamasoma NLRP3 inducida por el ATP. A su vez, vimos que la activación farmacológica de los canales iónicos K_{Ca}1.1 y K_{Ca}3.1 resultaba en una activación del inflamasoma en macrófagos THP-1. En aparente contradicción con estos resultados, recientemente Di et al mostraron que en macrófagos derivados de la médula ósea (BMDMs) de ratones el tratamiento con tetraetilamonio (TEA, inhibidor de los canales de K⁺ voltaje dependientes), o con iberiotoxina (inhibidor de los canales K_{Ca}1.1) no era capaz de inhibir la activación de caspasa-1, ni la secreción de IL-1β inducida por el ATP¹⁸. Esta diferencia puede deberse a la utilización de tipos celulares diferentes; nosotros utilizamos macrófagos humanos THP-1 y células dendríticas derivadas de la médula ósea de ratones, mientras que Di et al utilizaron BMDMs murinos. Ya ha sido reportado que la expresión de los diferentes canales iónicos es dependiente de la especie, la fuente de las células y de las condiciones del cultivo¹⁰⁹, pudiendo de esta forma explicar las diferencias de

nuestros resultados con los publicados por Di *et al.* Sin embargo, como se desarrollará a continuación, otros datos de la literatura, aunque indirectamente, apoyan nuestros resultados del rol de K_{Ca}1.1 y K_{Ca}3.1 en la activación del inflamasoma NLRP3.

A nivel del sistema inmune, $K_{Ca}3.1$ se expresa en células T, células B de memoria, macrófagos¹⁰⁹, y en células dendríticas¹¹⁰. Por otro lado, la expresión de $K_{Ca}1.1$ a nivel del sistema inmune parece estar más restringida a células mieloides, no habiéndose reportado su expresión en células T ¹¹¹. De manera interesante, ambos canales se han relacionado con patologías inflamatorias^{112–114}.

Los canales de K_{Ca}3.1 son de conductancia intermedia, y son parte de las cascadas de señalización que involucran la elevación del calcio durante la activación celular, la proliferación, la secreción de citoquinas, y la regulación del volumen en muchas células inmunes, incluyendo células T, células B, microglia y macrófagos. Estos canales son independientes del voltaje y solo requieren de un aumento pequeño en el calcio intracelular para ser activados¹¹². El calcio intracelular se une a moléculas de calmodulina, que se asocian constitutivamente con el canal, e induce la apertura del mismo. Particularmente, en macrófagos los canales K_{Ca}3.1 están involucrados en la activación, migración, proliferación y en el estallido respiratorio¹¹². Se ha reportado la expresión de K_{Ca}3.1 en macrófagos localizados en placas ateroscleróticas, y el tratamiento de ratones Apoe^{-/-} con un inhibidor de estos canales (TRAM-34) resulta en una reducción en la formación de lesiones ateroscleróticas¹¹⁵. El mecanismo por el cual K_{Ca}3.1 participa en la aterogénesis no es del todo conocido. En este sentido, se ha reportado que K_{Ca}3.1 tiene un rol clave en regular la expresión de genes proinflamatorios durante la polarización de los macrófagos, el bloqueo de K_{Ca}3.1 resulta en una inhibición de la polarización de macrófagos hacia el fenotipo M1¹¹². Por lo tanto, un mecanismo propuesto es que la reducción de las lesiones ateroscleróticas luego del bloqueo de K_{Ca}3.1 es debido a una polarización de los macrófagos hacia un fenotipo más tipo M2¹¹². De manera interesante, se ha mostrado que el inflamasoma 147

NLRP3 tiene un rol central en la aterogénesis, siendo activado por cristales de colesterol¹¹⁶. Teniendo en cuenta nuestro resultado de que la activación del canal K_{Ca} 3.1 conduce a la activación del inflamasoma, la reducción en la aterosclerosis en los ratones *Apoe^{-/-}* tratados con un inhibidor de K_{Ca} 3.1 podría explicarse a través de la inhibición del inflamasoma.

Reforzando el rol de K_{ca}3.1 en patologías inflamatorias, ha sido reportado que la inhibición farmacológica de K_{Ca}3.1 o su deleción génica reduce significativamente el área infartada luego de un accidente cardiovascular isquémico en ratones. En este modelo experimental bloqueo $K_{Ca}3.1$ inhibe la el de activación de microglia/macrófagos, y reduce los niveles de IL-1 β , IFN- γ e TGF- β en el cerebro¹¹⁴. Estos resultados son concordantes con los nuestros, en los que la activación farmacológica de estos canales conduce a una activación del inflamasoma y por lo tanto a la secreción de IL-1β. Por lo tanto, la inhibición de los canales K_{Ca}3.1 en este modelo experimental puede tener un efecto anti-inflamatorio a través de la inhibición del inflamasoma NLRP3.

Cabe destacar que se ha reportado que $K_{Ca}3.1$ es un factor clave en la respuesta quimiotáctica y en la capacidad migratoria de los neutrófilos¹¹⁷. Por lo tanto, en nuestro modelo de evaluación de la activación del inflamasoma *in vivo*, no es posible descartar que el menor reclutamiento de neutrófilos al peritoneo en los ratones tratados con HCQ luego de la inyección con ATP no se deba, al menos en parte, al rol de $K_{Ca}3.1$ en la migración de estas células.

Como se mencionó anteriormente, además de los canales $K_{Ca}3.1$, los canales $K_{Ca}1.1$ también se han asociado a inflamación patogénica. Más específicamente, se ha sugerido que $K_{Ca}1.1$ tiene un rol patogénico en la artritis reumatoide¹¹³. Los canales $K_{Ca}1.1$ son de gran conductancia, y son activados por Ca²⁺ intracelular así como por la despolarización de la membrana plasmática. Estos canales se encuentran sobre-

expresados en sinoviocitos tipo fibroblastos (FLS)¹¹³. Los FLS son células residentes de las membranas sinoviales articulares, y contribuyen al daño de la articulación al secretar una variedad de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, como pueden ser la IL-6 e IL-18¹¹⁸. A su vez, se ha reportado que el inflamasoma NLRP3 tiene un rol central en la iniciación de la artritis reumatoide, aumentando su expresión en los FLS patogénicos³¹. El bloqueo de K_{Ca}1.1 en ratas con artritis reumatoide conduce a una mejora de la enfermedad¹¹⁹. El mecanismo propuesto para esta mejora fue que K_{Ca}1.1 regula la expresión de MHC-II en los FLS, por lo que al bloquear dicho canal se reduce la habilidad del FLS de estimular la proliferación y migración de células T efectoras de memoria (T_{EM}), las cuales están involucradas en la patogenia de esta enfermedad¹²⁰. Sin embargo, teniendo en cuenta nuestros resultados, una explicación alternativa, que no excluye la anterior, es que esta mejora se deba a la inhibición del inflamasoma mediante el bloqueo del eflujo de potasio a través de K_{Ca}1.1.

Como se mencionó anteriormente, logramos mostrar que la hidoxicloroquina (HCQ) es capaz de inhibir los canales K_{Ca}1.1 y K_{Ca}3.1. El tratamiento con HCQ en pacientes con lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide ha mostrado efectos beneficiosos, de hecho es considerada la terapia referente para el tratamiento de lupus¹²¹. La relación de los canales K_{Ca}1.1 con la artritis reumatoide y el inflamasoma se discutió previamente en esta sección. Sin bien no se ha reportado un rol de los canales K_{Ca}1.1 o K_{Ca}3.1 en la patogenia del lupus, sí se ha relacionado al inflamasoma con esta enfermedad autoinmune³⁰. Se ha mostrado que los inmuno-complejos y las trampas extracelulares de neutrófilos (NETs), característicos de la fisiopatogenia del lupus, son capaces de activar al inflamasoma, el cual a su vez contribuye al desarrollo de nefritis³⁰. Los pacientes con lupus presentan una activación persistente de respuestas de interferón de tipo I (IFN-I), y estas se han identificado como contribuyentes importante en la patogénesis del lupus³². Un estudio reciente mostró que los IFN-I promueven la activación del inflamasoma en monocitos de pacientes con

lupus, vinculando dos vías de la inmunidad innata relevantes en la patogénesis del lupus³². El tratamiento de pacientes con lupus con HCQ disminuye el riesgo de empujes, diabetes, eventos trombóticos y aterosclerosis¹²². Como se discutió anteriormente, estas patologías han sido relacionadas con la activación del inflamasoma²⁸. Por lo tanto, estos datos clínicos apoyan nuestros resultados de que la HCQ ejerce su actividad anti-inflamatoria, al menos en parte, a través de la inhibición del inflamasoma.

En conclusión, nuestros resultados aportan dos nuevos blancos (K_{Ca} 1.1 y K_{Ca} 3.1) para la modulación del inflamasoma, pudiendo ser relevante en diversas patologías inflamatorias. Resta evaluar directamente si el bloqueo de estos canales mejora la evolución de diferentes patologías inflamatorias (artritis reumatoide y aterosclerosis por ejemplo) de manera dependiente del inflamasoma. A su vez, también mostramos que la hidroxicloroquina es capaz de inhibir estos canales, constituyendo un nuevo mecanismo anti-inflamatorio de dicho fármaco.

El trabajo de esta tesis también contribuyó a demostrar que otro canal iónico, Tmem176b, es capaz de modular la activación del inflamasoma. Mostramos, tanto *in vitro* como *in vivo*, que Tmem176b inhibe al inflamasoma NLRP3. El mecanismo por el cual Tmem176b controla la activación del inflamasoma parece ser a través de la regulación de la concentración de Ca²⁺ intracelular. En células deficientes en Tmem176b, la estimulación con ATP conduce a un aumento más pronunciado en la concentración de Ca²⁺ intracelular, lo que llevaría a la activación de los canales K_{Ca}1.1, y a su vez, el eflujo de K⁺ a través de estos canales activaría al inflamasoma NLRP3.

Como se discutió en la introducción, el rol del inflamasoma en el cáncer es controvertido, habiéndose reportado tanto roles anti-tumorales como pro-tumorales. Las propiedades anti-tumorales o pro-tumorales del inflamasoma están en gran medida determinadas por el tipo celular, tejidos y órganos involucrados⁸⁹. A su vez, la

forma en que se da la activación del inflamasoma, si de forma crónica o en pulsos puntuales, probablemente determine si se da una respuesta anti-tumoral o no⁹¹. Con esto en mente, nos preguntamos si la modulación del inflamasoma por Tmem176b tenía un efecto en la progresión tumoral.

Mediante la inoculación de diferentes líneas tumorales a ratones Tmem176b^{-/-} o WT encontramos que los ratones deficientes en Tmem176b presentaban un menor crecimiento tumoral y, por ende, una mejor sobrevida que los ratones WT. Al evaluar el mecanismo implicado en dicha diferencia encontramos que si bien a nivel del microambiente tumoral no había diferencia en la activación del inflamasoma, en el ganglio que drena el tumor de los ratones Tmem176b^{-/-} había una mayor activación del inflamasoma que en los WT. Esta activación del inflamasoma en los ratones *Tmem176b^{-/-}* es necesaria para la respuesta anti-tumoral va que la neutralización de IL-1ß o la deficiencia en Caspasa-1 resulta en una pérdida del efecto. A su vez, encontramos que a nivel del microambiente tumoral, los ratones Tmem176b^{-/-} presentaban un mayor infiltrado por células T CD8⁺ que los ratones WT, siendo estos linfocitos necesarios para la respuesta anti-tumoral. Además, los ratones Tmem176b^{-/-} mostraron una mayor lisis específica de antígenos tumorales en ensayos de citotoxicidad in vivo, mostrando de esta forma la funcionalidad de estas células T CD8⁺. Nuevamente, la activación del inflamasoma es necesaria para esta mayor citotoxicidad in vivo, y la misma se pierde en ratones Tmem176b^{-/-}Caspasa-1^{-/-}, así como en ratones *Tmem176b^{-/-}* a los cuales se les neutralizó la IL-1 β . Por lo tanto, en este trabajo mostramos que la desinhibición del inflamasoma en ratones deficientes en Tmem176b lleva a un aumento en los linfocitos T CD8⁺ intratumorales, tanto totales como específicos del tumor, resultando en una mejor sobrevida que los ratones WT.

De manera interesante, la diferencia en Caspasa-1 activa entre los ratones WT y *Tmem176b^{-/-}* se vio únicamente en células dendríticas de tipo 2 (cDC2) residentes del ganglio que drena el tumor, pero no en las cDC2 migradoras ni en las cDC1. Cabe 151 destacar que las cDC2 son CD11b⁺, las cDC1 residentes del ganglio son CD8a⁺, mientras que las cDC1 migradoras son CD103^{+ 124}. En un modelo de inmunización subcutánea se vio que las cDCs residentes del ganglio iniciarían la activación de células T CD4⁺, y luego las cDCs migradoras serían requeridas para potenciar esta activación¹²³. Distinguimos las células migradoras y residentes del ganglio mediante su expresión de CD11c y MHC-II, las células migradoras fueron reportadas como MHC-II^{hi}CD11c^{int} mientras que las residentes como las MHC-II^{int}CD11c^{hi 124}. Cabe destacar que Tmem176b se expresa fuertemente en las células dendríticas CD11b⁺¹²⁵, por lo tanto es coherente que sea en estas células en las que se dé una mayor activación del inflamasoma por ausencia de Tmem176b. Mientras que las células cDC1 están especializadas en inducir respuestas T citotóxicas, las cDC2 son eficientes en inducir respuestas Th17 o Th2¹²⁴. De hecho, nuestros resultados muestran que en el ganglio que drena el tumor de ratones *Tmem176b^{-/-}* hay un mayor número de células Th17 que en los ratones WT.

El rol de las células Th17 en el cáncer, así como el del inflamasoma, es controvertido. Han sido reportados estudios que muestran un efecto anti-tumoral de las células Th17, así como otros que muestran su participación en la progresión tumoral. De hecho, una alta frecuencia en células Th17 en el infiltrado tumoral de pacientes con cáncer de colon, de hígado, o de páncreas se correlaciona fuertemente con un mal pronóstico. Sin embargo, un aumento en el número de células Th17 en tumores de ovario se ha asociado a mejor sobrevida ^{24,126}. Este rol ambiguo de las células Th17 en la inmunidad anti-tumoral puede explicarse por las vías de diferenciación de las mismas.

Las células Th17 pueden diferenciarse a partir de células T CD4⁺ naïve en presencia de TGF- β e IL-6, y son mantenidas a largo plazo por la presencia de IL-21 e IL-23¹²⁷. A su vez, también pueden diferenciarse en ausencia de TGF- β , en presencia de IL-6, IL-1 β e IL-23, generando células Th17 con potentes funciones efectoras¹²⁸.

Las células Th17 se caracterizan por su capacidad de secretar IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 y CCL20¹²⁹. Las células Th17 y sus citoquinas asociadas median la progresión tumoral a través de la inducción de angiogénesis y la supresión de respuestas antitumorales. La IL-17A promueve la angiogénesis y recluta células mieloides supresoras¹³⁰. A su vez, el TGF-β induce la expresión de las endonucleotidasas CD39 y CD73 por las células Th17126. La expresión de CD39 y CD73 lleva a la transformación de ATP o ADP a adenosina, la cual tiene un potente efecto inmunosupresor. Además, estas células Th17 diferenciadas en presencia de TGF-B producen IL-10, reforzando su poder inmunoregulador¹²⁶. En cambio, las células Th17 diferenciadas en presencia de IL-1β, IL-6 e IL-23 no expresan CD39 ni CD73. Estas células co-expresan los factores de transcripción Tbet y RORyt, lo que resulta en la secreción de IFN-γ e IL-17, pero no IL-10^{24,126}. Estas células Th17, tipo Th1, median la regresión tumoral observada en algunos diseños experimentales. Por lo tanto, la IL-1β tiene un rol central en la programación de células Th17 con capacidades efectoras. Por otro lado, las células Th17 pueden aumentar la frecuencia y función de células T CD8⁺ en el tumor¹³¹. Las células Th17 pueden promover la producción de la quimioquina CCL20 por el tejido tumoral, y de esta forma reclutar células T CD8⁺ al tumor¹³². A su vez, las células Th17 pueden activar a las células T CD8⁺ en el microambiente tumoral por mecanismos tanto directos como indirectos. Pueden interaccionar directamente con células T CD8⁺ al adquirir moléculas de MHC-Ipéptidos, siendo cruciales para la respuesta por las células T CD8⁺. Además al secretar IL-2 ayudan a la activación de las células T CD8⁺¹³². La IL-17A también tiene efectos anti-tumorales, al reclutar linfocitos T, aumentar la acción de las células NK y al promover la producción y activación de linfocitos citotóxicos^{129,131}.

En nuestro modelo experimental, las células Th17 parecen tener un rol importante en el desarrollo de la respuesta anti-tumoral en ratones *Tmem176b^{-/-}*, ya que la neutralización de la IL-17A en estos ratones conduce a la pérdida del efecto

anti-tumoral. A su vez, mostramos que la IL-1 β tiene un rol clave en la generación de estas células Th17, dado que la neutralización de dicha citoquina en ratones *Tmem176b*^{-/-} resulta en una reducción en el número de células Th17 a nivel del ganglio que drena el tumor.

Un estudio reciente mostró que los macrófagos alveolares de pacientes con cáncer de pulmón presentaban al inflamasoma NLRP3 severamente disminuido comparado con macrófagos alveolares de personas sanas, lo que implicaría una inmunosupresión mediada por el cáncer¹³³. Lasithiotaki *et al* plantean que dado el rol del inflamasoma NLRP3 en inducir una muerte celular inmunogénica, la activación de dicho inflamasoma en macrófagos alveolares podría constituir una nueva terapia antitumoral contra el cáncer de pulmón¹³³.

Los bloqueadores de puntos de control inmunológicos (BPC) han revolucionado la terapia anti-tumoral, sin embargo solo una fracción de los pacientes responden. Como se mencionó en la introducción, un mayor infiltrado de células T en el tumor se asocia a una mayor respuesta a los BPC⁸¹. A su vez, se ha reportado que la inducción de una muerte celular inmunogénica mediante el uso de determinados quimioterapéuticos mejora la eficacia de los BPC, al transformar tumores inmunológicamente "fríos", no infiltrados por células T, en tumores "calientes" enriquecidos de células T¹³⁴. Como la activación del inflamasoma NLRP3 causa piroptosis, una muerte celular inmunogénica, y la liberación de citoquinas pro-inflamatorias, la activación de NLRP3 podría sinergizar con los BPC mejorando su eficacia²⁷. Sin embargo, esta hipótesis hasta el momento no había sido evaluada.

Nuestros resultados muestran que el tratamiento con BPC en ratones *Tmem176b^{-/-}* es más eficaz que en ratones WT, de manera dependiente del inflamasoma. A su vez, la activación del inflamasoma parece ser relevante para la respuesta anti-tumoral desarrollada por los BPC, ya que se pierde en los ratones

Casp-1/11^{-/-}. Estos resultados son apoyados por datos obtenidos a partir del perfil de expresión génica en biopsias de dos cohortes independientes de pacientes con melanoma tratados con BPC. Analizando estas dos cohortes encontramos una fuerte asociación entre la activación del inflamasoma y la respuesta clínica. Los pacientes respondedores al tratamiento, pero no los progresores, activan a nivel del tumor una firma molecular de transcriptos relacionados al inflamasoma. Por otra parte, los pacientes no respondedores aumentan solamente la expresión dos genes vinculados al inflamasoma durante el tratamiento, TMEM176A y TMEM176B. Estos resultados sugieren que TMEM176B podría ser un factor de resistencia a los BPC en el cáncer. Por lo tanto, nuestros resultados podrían tener una gran relevancia clínica, pacientes que no responden al BPC podrían verse beneficiados por estrategias terapéuticas que apunten a desinhibir al inflamasoma.

Recientemente se ha reportado una relación entre el índice de masa corporal y la respuesta al tratamiento con anti-PD-1/PD-L1^{135,136}. Dos estudios independientes mostraron que pacientes con sobrepeso (índice de masa corporal mayor a 25) tenían una mejor respuesta al tratamiento que los pacientes con peso normal^{135,136}. A su vez, la obesidad ha sido relacionada con el inflamasoma NLRP3. Se ha observado un aumento en la expresión de *NLRP3* y *ASC* en adipocitos de pacientes obesos¹³⁷. La expresión de Caspasa-1 también aumenta con la diferenciación de los adipocitos y el desarrollo de la obesidad, y regula la adipogénesis, potencialmente a través de IL- $1\beta^{137}$. La inhibición de Caspasa-1 en un modelo murino de obesidad espontánea resultó en una reducción del peso, una menor lipogénesis y una mayor oxidación de grasas respecto a los ratones control, sin verse afectada la cantidad de comida ingerida, lo que sugiere un rol de Caspasa-1 en promover la obesidad¹³⁷. Por lo tanto, es posible que los pacientes obesos respondan mejor al tratamiento con anti-PD-1 debido a un aumento en la activación del inflamasoma, en concordancia con nuestros resultados.

Como se comentó en la introducción, se ha correlacionado un perfil de IFN-I con una mejor respuesta al tratamiento con BPC en pacientes con melanoma⁸⁵. A su vez, nosotros mostramos que un perfil de activación del inflamasoma se asocia con una mejor respuesta al tratamiento con anti-PD-1 en pacientes con melanoma. Estas observaciones podrían en un principio parecer incompatibles, ya que había sido reportado que los IFN-I inhiben al inflamasoma¹³⁸. Sin embargo, recientemente se mostró que una exposición crónica a IFN-I aumenta la expresión de Caspasa-1, promoviendo una mayor activación del inflamasoma³². Es posible entonces que el perfil de IFN-I resulte en un perfil de activación del inflamasoma y por lo tanto, en una mejor respuesta al tratamiento con BPC.

Dada la respuesta anti-tumoral observada en los ratones Tmem176b^{-/-} nos propusimos identificar un inhibidor farmacológico de Tmem176b. Mediante la utilización de una sonda específica de Na⁺ evaluamos la actividad de Tmem176b/a en células CHO-7 transfectadas con Tmem176b/a, logrando identificar un inhibidor, BayK8644. El compuesto BayK8644 es una dihidropiridina que modula canales de calcio tipo L. Cabe destacar que el enantiómero (R)-(+)-BayK8644 tiene un efecto opuesto a la mezcla racémica (±)-BayK8644 y al (S)-(-)-BayK8644, siendo el primero un bloqueador de canales de calcio de tipo L mientras que los últimos son agonistas de estos canales¹³⁹. Dado que en nuestros ensayos ambos enantiómeros tienen el mismo efecto a nivel de la concentración citosólica de Na⁺, esto no se explicaría por un efecto indirecto a través de los canales de calcio de tipo L. Nuestros resultados muestran que el BayK8644 es capaz de activar al inflamasoma in vitro de manera dependiente de Tmem176b y de canales de potasio operados por calcio (probablemente K_{Ca}1.1). A su vez, la administración de BayK8644 a ratones con tumor resulta en una mejor sobrevida siendo este efecto dependiente de Tmem176b y, al igual que en los ratones Tmem176b⁷, de Caspasa-1 y de células T CD8⁺. De manera remarcable, el tratamiento con BayK8644 también logró aumentar la eficacia de los

BPC, pudiendo constituir un nuevo fármaco para mejorar la respuesta clínica de los BPC.

Cabe destacar que estos resultados permitieron, además de los artículos adjuntados en esta tesis, el depósito de una patente provisional en Estados Unidos para el uso del BayK8644 como tratamiento anti-tumoral (Serial No. 62/500,113, ver anexo).

Conclusiones

En esta tesis se logró aportar conocimiento respecto al rol que juega la homeostasis iónica en la regulación de la activación del inflamasoma, y su impacto en la respuesta inmune anti-tumoral y en el tratamiento con bloqueadores de puntos de control inmunológico.

Nuestros resultados sugieren que los canales de K⁺ activados por Ca²⁺, K_{Ca}1.1 y K_{Ca}3.1, están involucrados en el mecanismo de activación del inflamasoma NLRP3. La activación de dichos canales fue capaz de inducir la activación del inflamasoma.

Por otro lado, mostramos que otro canal iónico, Tmem176b, es un inhibidor del inflamasoma NLRP3, y logramos identificar un inhibidor de este canal iónico, BayK8644. A su vez, mostramos que la inhibición de Tmem176b potencia la inmunidad anti-tumoral y aumenta la eficacia de los bloqueadores de puntos de control a través de la desinhibición del inflamasoma.

De esta forma aportamos tres nuevos blancos (K_{Ca}1.1, K_{Ca}3.1 y Tmem176b) para la modulación del inflamasoma, potencialmente relevantes para el tratamiento de diferentes patologías. Nuestros resultados sugieren que la manipulación del inflamasoma a través de la inhibición de Tmem176b podría constituir una nueva terapia anti-tumoral que mejore terapias ya existentes como los bloqueadores de puntos de control inmunológicos.

Declaración de autoría

Los resultados mostrados en esta tesis fueron obtenidos directamente por mí o con mi colaboración, salvo los experimentos que se detallan a continuación.

Parte I.

Ensayos de electrofisiología, realizados en colaboración con Gonzalo Ferreira, Facultad de Medicina, UdelaR.

Western blots y ensayo de evaluación del eflujo de K⁺, realizados por María Eugenia Schroeder.

Parte II

Análisis de bioinformática y triple tratamiento de ratones con anti-CTLA4+anti-PD1+BayK8644, realizados en colaboración con el laboratorio de Romina Girotti y Gabriel Rabinovich, IBYME, Buenos Aires, Argentina

Ensayos de electrofisiología en oocitos de Xenopus, realizados en colaboración con Pierre Charnet, Université de Montpellier, Montpellier, Francia.

Evaluación de toxicidad cardíaca del BayK8644 en ratones, realizado como servicio en Xenothera, Nantes, Francia

En la sección "Author Contribution" de cada artículo se encuentra detallado la contribución de los autores.

Perspectivas

Estudios recientes han sugerido que las células Th17 podrían estar implicadas en la respuesta anti-tumoral desencadenada por los bloqueadores de puntos de control inmunológicos. El reporte de un caso clínico reciente sugiere un rol de la IL-17 tanto en la eficacia como en la toxicidad de la terapia de BPC en pacientes con cáncer ¹⁴⁰. Dicho caso consiste en un paciente que estaba siendo tratado para cáncer de colon metastásico con anti-PD-1 mostrando respuesta al tratamiento. El paciente ya contaba con historia clínica de psoriasis y enfermedad de Crohn, las cuales empeoraron severamente con el tratamiento con anti-PD-1. Con el objetivo de paliar los efectos secundarios se le administró anti-IL17A. El bloqueo de la IL-17A resultó en una mejora de los efectos secundarios, sin embargo la actividad anti-tumoral se vio reducida¹⁴⁰. Por otro lado, una alta expresión de IL-17 por linfocitos T CD4⁺ se ha asociado recientemente a respuesta clínica al bloqueo de PD-1 en pacientes con melanoma metastasico¹⁴¹. Es importante destacar que si bien estas observaciones sugieren que la IL-17 producida por esos linfocitos promueve la inmunidad anti-tumoral desencadenada por la terapia anti-PD-1, no existe evidencia directa a la fecha que pruebe ese mecanismo.

Estos antecedentes y los resultados obtenidos durante mi doctorado han llevado a plantearnos la hipótesis de que el inflamasoma NLRP3 mejora la eficacia de los BPC a través de la activación de las células Th17. La evaluación de esta hipótesis de trabajo va a constituir mi proyecto de Post-Doctorado, para el cual ya obtuve financiación de la ANII a través del Fondo Clemente Estable (FCE_3_2018_1_148260).

Referencias

- Vanaja, S. K., Rathinam, V. a. K. & Fitzgerald, K. a. Mechanisms of inflammasome activation: recent advances and novel insights. *Trends Cell Biol.* 25, 308–315 (2015).
- 2. Gong, T., Yang, Y., Jin, T., Jiang, W. & Zhou, R. Orchestration of NLRP3 Inflammasome Activation by Ion Fluxes. *Trends Immunol.* **39**, 393–406 (2018).
- 3. Zitvogel, L., Kepp, O., Galluzzi, L. & Kroemer, G. Inflammasomes in carcinogenesis and anticancer immune responses. *Nat. Immunol.* **13**, 343–51 (2012).
- 4. Guo, H., Callaway, J. B. & Ting, J. P.-Y. Inflammasomes: mechanism of action, role in disease, and therapeutics. *Nat. Med.* **21**, 677–687 (2015).
- 5. Murakami, T. *et al.* Critical role for calcium mobilization in activation of the NLRP3 inflammasome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109,** 11282–11287 (2012).
- 6. Tang, T. *et al.* CLICs-dependent chloride efflux is an essential and proximal upstream event for NLRP3 inflammasome activation. *Nat. Commun.* **8**, 202 (2017).
- 7. Pétrilli, V. *et al.* Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ.* **14**, 1583 (2007).
- 8. Gross, C. J. *et al.* K(+) Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity* **45**, 761–773 (2016).
- 9. He, Y., Zeng, M. Y., Yang, D., Motro, B. & Nunez, G. NEK7 is an essential mediator of NLRP3 activation downstream of potassium efflux. *Nature* **530**, 354–357 (2016).
- 10. Feldmeyer, L. *et al.* The inflammasome mediates UVB-induced activation and secretion of interleukin-1beta by keratinocytes. *Curr. Biol.* **17**, 1140–1145 (2007).
- Katsnelson, M. A., Rucker, L. G., Russo, H. M. & Dubyak, G. R. K+ efflux agonists induce NLRP3 inflammasome activation independently of Ca2+ signaling. *J. Immunol.* **194**, 3937–3952 (2015).
- 12. Lee, G. *et al.* The calcium-sensing receptor regulates the NLRP3 inflammasome through Ca2+ and cAMP. *Nature* **492**, 123–127 (2012).
- 13. Kass, G. E. N. & Orrenius, S. Calcium signaling and cytotoxicity. *Environ. Health Perspect.* **107**, 25–35 (1999).
- 14. Sutterwala, F. S., Haasken, S. & Cassel, S. L. Mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1319**, 82–95 (2014).
- 15. Verhoef, P. A., Kertesy, S. B., Lundberg, K., Kahlenberg, J. M. & Dubyak, G. R. Inhibitory effects of chloride on the activation of caspase-1, IL-1beta secretion, and cytolysis by the P2X7 receptor. *J. Immunol.* **175**, 7623–7634 (2005).
- 16. Hafner-Bratkovič, I. & Pelegrín, P. Ion homeostasis and ion channels in NLRP3 inflammasome activation and regulation. *Curr. Opin. Immunol.* **52**, 8–17 (2018).
- 17. Zhu, J. et al. T-lymphocyte Kv1.3 channel activation triggers the NLRP3

inflammasome signaling pathway in hypertensive patients. *Exp. Ther. Med.* **14**, 147–154 (2017).

- 18. Di, A. *et al.* The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation. *Immunity* **49**, 56–65.e4 (2018).
- 19. Evavold, C. L. & Kagan, J. C. How Inflammasomes Inform Adaptive Immunity. *J. Mol. Biol.* **430**, 217–237 (2018).
- Ben-Sasson, S. Z. *et al.* IL-1 enhances expansion, effector function, tissue localization, and memory response of antigen-specific CD8 T cells. *J. Exp. Med.* 210, 491–502 (2013).
- Ben-Sasson, S. Z., Wang, K., Cohen, J. & Paul, W. E. IL-1β strikingly enhances antigen-driven CD4 and CD8 T-cell responses. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 78, 117–24 (2013).
- Ghiringhelli, F. *et al.* Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1B-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat. Med.* 15, 1170–1178 (2009).
- 23. Mellor, A. L. & Munn, D. H. Physiologic control of the functional status of Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **186**, 4535–4540 (2011).
- 24. Bailey, S. R. *et al.* Th17 cells in cancer: The ultimate identity crisis. *Front. Immunol.* **5**, 1–13 (2014).
- 25. Dostert, C., Ludigs, K. & Guarda, G. Innate and adaptive effects of inflammasomes on T cell responses. *Curr. Opin. Immunol.* **25**, 359–365 (2013).
- 26. Broderick, L., De Nardo, D., Franklin, B. S., Hoffman, H. M. & Latz, E. The Inflammasomes and Autoinflammatory Syndromes. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **10**, 395–424 (2015).
- 27. Mangan, M. S. J. *et al.* Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases. *Nature reviews. Drug discovery* **17**, 688 (2018).
- 28. de Zoete, M. R., Palm, N. W., Zhu, S. & Flavell, R. A. Inflammasomes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a016287 (2014).
- 29. Pontillo, A. *et al.* Polimorphisms in inflammasome genes are involved in the predisposition to systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* **45**, 271–278 (2012).
- Kahlenberg, J. M. & Kaplan, M. J. The inflammasome and lupus: another innate immune mechanism contributing to disease pathogenesis? *Curr. Opin. Rheumatol.* 26, 475–481 (2014).
- 31. Shen, H.-H. *et al.* NLRP3: A promising therapeutic target for autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.* **17**, 694–702 (2018).
- 32. Liu, J., Berthier, C. C. & Kahlenberg, J. M. Enhanced Inflammasome Activity in Systemic Lupus Erythematosus Is Mediated via Type I Interferon-Induced Up-Regulation of Interferon Regulatory Factor 1. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **69**, 1840–1849 (2017).
- 33. Situación epidemiológica del Uruguay en relación al cáncer. Registro Nacional de Cáncer. Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer (2018).

- 34. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
- 35. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
- Galluzzi, L. *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* 25, 486–541 (2018).
- 37. Ke, B., Tian, M., Li, J., Liu, B. & He, G. Targeting Programmed Cell Death Using Small-Molecule Compounds to Improve Potential Cancer Therapy. *Med. Res. Rev.* **36**, 983–1035 (2016).
- 38. Bhome, R. *et al.* A top-down view of the tumor microenvironment: structure, cells and signaling. *Front. Cell Dev. Biol.* **3**, 1–9 (2015).
- 39. Chen, F. *et al.* New horizons in tumor microenvironment biology: challenges and opportunities. *BMC Med.* **13**, 45 (2015).
- 40. Pietras, K., Pahler, J., Bergers, G. & Hanahan, D. Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med.* **5**, e19 (2008).
- Lu, Y. *et al.* Th9 Cells Represent a Unique Subset of CD4(+) T Cells Endowed with the Ability to Eradicate Advanced Tumors. *Cancer Cell* 33, 1048–1060.e7 (2018).
- 42. Chraa, D., Naim, A., Olive, D. & Badou, A. T lymphocyte subsets in cancer immunity: Friends or foes. *J. Leukoc. Biol.* **105**, 243–255 (2019).
- 43. Ehrlich, P. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. 5:273-290 (1909).
- 44. Burnet, F. M. The concept of immunological surveillance. *Prog. Exp. Tumor Res.* **13**, 1–27 (1970).
- 45. Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J. & Schreiber, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat. Immunol.* **3**, 991–998 (2002).
- 46. Dunn, G. P., Koebel, C. M. & Schreiber, R. D. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 836–848 (2006).
- 47. Old, L. J. & Boyse, E. A. Immunology of Experimental Tumors. *Annu. Rev. Med.* **15,** 167–186 (1964).
- 48. Murphy, K., Travers, P. & Walport, M. *Janeway's Immunobiology. Garland Science* **7**, (2008).
- 49. Quezada, S. A., Peggs, K. S., Simpson, T. R. & Allison, J. P. Shifting the equilibrium in cancer immunoediting: from tumor tolerance to eradication. *Immunol. Rev.* **241**, 104–118 (2011).
- 50. Bhatia, A. & Kumar, Y. Cancer-immune equilibrium: questions unanswered. *Cancer Microenviron.* **4**, 209–217 (2011).
- 51. Mittal, D., Gubin, M. M., Schreiber, R. D. & Smyth, M. J. New insights into cancer immunoediting and its three component phases-elimination, equilibrium

and escape. Curr. Opin. Immunol. 27, 16-25 (2014).

- 52. Chow, M. T., Moller, A. & Smyth, M. J. Inflammation and immune surveillance in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **22**, 23–32 (2012).
- 53. Chen, D. S. & Mellman, I. Oncology meets immunology: The cancer-immunity cycle. *Immunity* **39**, 1–10 (2013).
- 54. Sharma, P. & Allison, J. P. The future of immune checkpoint therapy. *Science* **348**, 56–61 (2015).
- 55. Corthay, A. Does the immune system naturally protect against cancer? *Front. Immunol.* **5**, 1–8 (2014).
- 56. Melum, E. *et al.* Cholangiocarcinoma in primary sclerosing cholangitis is associated with NKG2D polymorphisms. *Hepatology* **47**, 90–96 (2008).
- 57. Chen, D. *et al.* Genome-wide association study of susceptibility loci for cervical cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **105**, 624–633 (2013).
- 58. Koebel, C. M. *et al.* Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* **450**, 903–907 (2007).
- 59. Gebremeskel, S. & Johnston, B. Concepts and mechanisms underlying chemotherapy induced immunogenic cell death : Impact on clinical studies and considerations for combined therapies. *Oncotarget* **6**, 41600-41619 (2015).
- 60. Aymeric, L. *et al.* Tumor Cell Death and ATP Release Prime Dendritic Cells and Efficient Anticancer Immunity. *Cancer Res.* **70**, 855–858 (2010).
- 61. Tesniere, A. *et al.* Immunogenic cancer cell death: a key-lock paradigm. *Curr. Opin. Immunol.* **20**, 504–511 (2008).
- 62. Reynders, K., Illidge, T., Siva, S., Chang, J. Y. & De Ruysscher, D. The abscopal effect of local radiotherapy: using immunotherapy to make a rare event clinically relevant. *Cancer Treat. Rev.* **41**, 503–510 (2015).
- 63. Kaminski, J. M. *et al.* The controversial abscopal effect. *Cancer Treat. Rev.* **31**, 159–172 (2005).
- 64. Demaria, S. & Formenti, S. C. Radiation as an immunological adjuvant: current evidence on dose and fractionation. *Front. Oncol.* **2**, 1–7 (2012).
- 65. Naran, K., Nundalall, T., Chetty, S. & Barth, S. Principles of Immunotherapy: Implications for Treatment Strategies in Cancer and Infectious Diseases. *Front. Microbiol.* **9**, 1–23 (2018).
- 66. Galluzzi, L. *et al.* Classification of current anticancer immunotherapies. *Oncotarget* **5**, (2014).
- 67. Sharma, P., Hu-Lieskovan, S., Wargo, J. a. & Ribas, A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* **168**, 707–723 (2017).
- 68. Tang, J., Shalabi, a. & Hubbard-Lucey, V. M. Comprehensive analysis of the clinical immuno-oncology landscape. *Ann. Oncol.* **29**, 84–91 (2018).
- 69. Wei, S. C., Duffy, C. R. & Allison, J. P. Fundamental mechanisms of immune checkpoint blockade therapy. *Cancer Discov.* **8**, 1069–1086 (2018).

- Schildberg, F. A., Klein, S. R., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. *Immunity* 44, 955–972 (2016).
- 71. Ribas, A. & Wolchok, J. D. Cancer immunotherapy using checkpoint blockade. *Science* **359**, 1350–1355 (2018).
- 72. Qureshi, O. S. *et al.* Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science* **332**, 600–603 (2011).
- 73. Hui, E. *et al.* The T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target of PD-1 mediated inhibition. *Science* **355**, 1428–1433 (2017).
- 74. Kamphorst, A. O. *et al.* Rescue of exhausted CD8 T cells by PD-1 targeted therapies is CD28-dependent. *Science* **355**, 1423–1427 (2017).
- 75. Nishikawa, H. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **27**, 1–7 (2014).
- 76. Cha, E. *et al.* Improved survival with T cell clonotype stability after anti-CTLA-4 treatment in cancer patients. *Sci. Transl. Med.* **6**, 238ra70 (2014).
- 77. Tumeh, P. C. *et al.* PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* **515**, 568–571 (2014).
- 78. Spitzer, M. H. *et al.* Systemic Immunity Is Required for Effective Cancer Immunotherapy. *Cell* **168**, 487–502.e15 (2017).
- Garris, C. S. *et al.* Successful Anti-PD-1 Cancer Immunotherapy Requires T Cell-Dendritic Cell Crosstalk Involving the Cytokines IFN-gamma and IL-12. *Immunity* 49, 1148–1161.e7 (2018).
- Galluzzi, L., Chan, T. A., Kroemer, G., Wolchok, J. D. & López-Soto, A. The hallmarks of successful anticancer immunotherapy. *Sci. Transl. Med.* 10, 1–15 (2018).
- 81. Nishino, M., Ramaiya, N. H., Hatabu, H. & Hodi, F. S. Monitoring immunecheckpoint blockade: Response evaluation and biomarker development. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **14**, 655–668 (2017).
- Spencer, C. N., Wells, D. K. & LaVallee, T. M. It Is a Capital Mistake to Theorize Who to Treat with Checkpoint Inhibitors before One Has Data. *Trends in cancer* 5, 79–82 (2019).
- O'Donnell, J. S., Teng, M. W. L. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting and resistance to T cell-based immunotherapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 16, 151–167 (2018).
- 84. Eil, R. *et al.* Ionic immune suppression within the tumour microenvironment limits T cell effector function. *Nature* **537**, 539–543 (2016).
- Chiappinelli, K. B. *et al.* Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell* 162, 974–986 (2015).
- 86. Sivick, K. E. *et al.* Magnitude of Therapeutic STING Activation Determines CD8+ T Cell-Mediated Anti-tumor Immunity. *Cell Rep.* **25**, 3074–3085.e5 (2018).

- 87. Corrales, L. *et al.* Direct Activation of STING in the Tumor Microenvironment Leads to Potent and Systemic Tumor Regression and Immunity. *Cell Rep.* **11**, 1018–1030 (2015).
- Gaidt, M. M. *et al.* The DNA Inflammasome in Human Myeloid Cells Is Initiated by a STING-Cell Death Program Upstream of NLRP3. *Cell* **171**, 1110–1124.e18 (2017).
- 89. Karki, R., Man, S. M. & Kanneganti, T.-D. Inflammasomes and Cancer. *Cancer Immunol. Res.* **5**, 94–99 (2017).
- Allen, I. C. *et al.* The NLRP3 inflammasome functions as a negative regulator of tumorigenesis during colitis-associated cancer. *J. Exp. Med.* 207, 1045–1056 (2010).
- 91. Terme, M. *et al.* IL-18 induces PD-1-dependent immunosuppression in cancer. *Cancer Res.* **71**, 5393–5399 (2011).
- 92. Bunt, S. K. *et al.* Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression. *Cancer Res.* **67**, 10019–10026 (2007).
- 93. Bruchard, M. *et al.* Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloidderived suppressor cells activates the NIrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat. Med.* **19**, 57–64 (2013).
- Chow, M. T. *et al.* NLRP3 suppresses NK cell-mediated responses to carcinogen-induced tumors and metastases. *Cancer Res.* **72**, 5721–5732 (2012).
- 95. Kaplanov, I. *et al.* Blocking IL-1beta reverses the immunosuppression in mouse breast cancer and synergizes with anti-PD-1 for tumor abrogation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (2018). doi:10.1073/pnas.1812266115
- Ridker, P. M. *et al.* Effect of interleukin-1β inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* **390**, 1833–1842 (2017).
- 97. Louvet, C. *et al.* Identification of a new member of the CD20/FcepsilonRlbeta family overexpressed in tolerated allografts. *Am. J. Transplant* **5**, 2143–53 (2005).
- 98. Condamine, T. *et al.* Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* **88**, 507–515 (2010).
- 99. Drujont, L. *et al.* RORγt+ cells selectively express redundant cation channels linked to the Golgi apparatus. *Sci. Rep.* **6**, 23682 (2016).
- Segovia, M. *et al.* Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *Am. J. Transplant.* 14, 1021– 1031 (2014).
- 101. Zuccolo, J. *et al.* Phylogenetic analysis of the MS4A and TMEM176 gene families. *PLoS One* **5**, 1–10 (2010).
- 102. Eon Kuek, L., Leffler, M., Mackay, G. a & Hulett, M. D. The MS4A family:

counting past 1, 2 and 3. *Immunol. Cell Biol.* 1–13 (2015). doi:10.1038/icb.2015.48

- 103. Cuajungco, M. P. *et al.* Abnormal accumulation of human transmembrane (TMEM)-176A and 176B proteins is associated with cancer pathology. *Acta Histochem.* **114**, 705–712 (2012).
- 104. Anandasabapathy, N. *et al.* Classical Flt3L-dependent dendritic cells control immunity to protein vaccine. *J. Exp. Med.* **211**, 1875–1891 (2014).
- 105. Gao, Y. *et al.* Control of T Helper 2 Responses by Transcription Factor IRF4-Dependent Dendritic Cells. *Immunity* **39**, 722–732 (2013).
- 106. Wang, Y. *et al.* Large Scale Identification of Human Hepatocellular Carcinoma-Associated Antigens by Autoantibodies. *J. Immunol.* **169**, 1102–1109 (2002).
- 107. Otsubo, T. *et al.* Identification of novel targets for antiangiogenic therapy by comparing the gene expressions of tumor and normal endothelial cells. *Cancer Sci.* **105**, 560–567 (2014).
- 108. Sun, L., Zhang, Y. & Zhang, C. Distinct expression and prognostic value of MS4A in gastric cancer. *Open Med.* **13**, 178–188 (2018).
- 109. Feske, S., Wulff, H. & Skolnik, E. Y. Ion channels in innate and adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **33**, 291–353 (2015).
- Shao, Z., Makinde, T. O. & Agrawal, D. K. Calcium-activated potassium channel KCa3.1 in lung dendritic cell migration. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 45, 962– 968 (2011).
- 111. Ge, L. *et al.* Big Potassium (BK) ion channels in biology, disease and possible targets for cancer immunotherapy. *Int. Immunopharmacol.* **22**, 427–443 (2014).
- Xu, R. *et al.* Role of KCa3.1 Channels in Macrophage Polarization and Its Relevance in Atherosclerotic Plaque Instability. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37, 226–236 (2017).
- 113. Tanner, M. R., Pennington, M. W., Laragione, T., Gulko, P. S. & Beeton, C. KCa1.1 channels regulate beta1-integrin function and cell adhesion in rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* **31**, 3309–3320 (2017).
- 114. Chen, Y.-J. *et al.* The potassium channel KCa3.1 constitutes a pharmacological target for neuroinflammation associated with ischemia/reperfusion stroke. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **36**, 2146–2161 (2016).
- 115. Toyama, K. *et al.* The intermediate-conductance calcium-activated potassium channel KCa3.1 contributes to atherogenesis in mice and humans. *J. Clin. Invest.* **118**, 3025–3037 (2008).
- 116. Duewell, P. *et al.* NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* **464**, 1357–1361 (2010).
- 117. Henriquez, C. *et al.* The calcium-activated potassium channel KCa3.1 plays a central role in the chemotactic response of mammalian neutrophils. *Acta Physiol. (Oxf).* **216**, 132–145 (2016).
- 118. Bottini, N. & Firestein, G. S. Duality of fibroblast-like synoviocytes in RA: passive 167

responders and imprinted aggressors. Nat. Rev. Rheumatol. 9, 24-33 (2013).

- 119. Tanner, M. R. *et al.* Targeting KCa1.1 Channels with a Scorpion Venom Peptide for the Therapy of Rat Models of Rheumatoid Arthritis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **365**, 227–236 (2018).
- 120. Tanner, M. R. *et al.* KCa1.1 and Kv1.3 channels regulate the interactions between fibroblast-like synoviocytes and T lymphocytes during rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **21**, 6 (2019).
- Costedoat-Chalumeau, N., Dunogue, B., Morel, N., Le Guern, V. & Guettrot-Imbert, G. Hydroxychloroquine: a multifaceted treatment in lupus. *Presse Med.* 43, e167-80 (2014).
- 122. Rainsford, K. D., Parke, A. L., Clifford-Rashotte, M. & Kean, W. F. Therapy and pharmacological properties of hydroxychloroquine and chloroquine in treatment of systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis and related diseases. *Inflammopharmacology* **23**, 231–269 (2015).
- Allenspach, E. J., Lemos, M. P., Porrett, P. M., Turka, L. A. & Laufer, T. M. Migratory and lymphoid-resident dendritic cells cooperate to efficiently prime naive CD4 T cells. *Immunity* 29, 795–806 (2008).
- 124. Laoui, D. *et al.* The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. *Nat. Commun.* **7**, 13720 (2016).
- Crozat, K. *et al.* Cutting edge: expression of XCR1 defines mouse lymphoidtissue resident and migratory dendritic cells of the CD8alpha+ type. *J. Immunol.* **187**, 4411–4415 (2011).
- Martin, F., Apetoh, L. & Ghiringhelli, F. Controversies on the role of Th17 in cancer: a TGF-beta-dependent immunosuppressive activity? *Trends Mol. Med.* 18, 742–749 (2012).
- 127. Muranski, P., Restifo, N. P. & Dc, W. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood* **121**, 2402–2414 (2013).
- 128. Ghoreschi, K. *et al.* Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* **467**, 967–971 (2010).
- 129. Asadzadeh, Z. *et al.* The paradox of Th17 cell functions in tumor immunity. *Cell. Immunol.* **322**, 15–25 (2017).
- 130. Bruchard, M. *et al.* Chemotherapy-triggered cathepsin B release in myeloidderived suppressor cells activates the NIrp3 inflammasome and promotes tumor growth. *Nat. Med.* **19**, 57–64 (2013).
- 131. Martin-Orozco, N. *et al.* T Helper 17 Cells Promote Cytotoxic T Cell Activation in Tumor Immunity. *Immunity* **31**, 787–798 (2009).
- 132. Ankathatti Munegowda, M., Deng, Y., Mulligan, S. J. & Xiang, J. Th17 and Th17stimulated CD8(+) T cells play a distinct role in Th17-induced preventive and therapeutic antitumor immunity. *Cancer Immunol. Immunother.* **60**, 1473–1484 (2011).
- 133. Lasithiotaki, I. et al. NLRP3/Caspase-1 inflammasome activation is decreased in

alveolar macrophages in patients with lung cancer. *PLoS One* **13**, e0205242 (2018).

- 134. Pfirschke, C. *et al.* Immunogenic Chemotherapy Sensitizes Tumors to Checkpoint Blockade Therapy. *Immunity* **44**, 343–354 (2016).
- 135. Cortellini, A. *et al.* A multicenter study of body mass index in cancer patients treated with anti-PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors: when overweight becomes favorable. *J. Immunother. cancer* **7**, 57 (2019).
- 136. Wang, Z. *et al.* Paradoxical effects of obesity on T cell function during tumor progression and PD-1 checkpoint blockade. *Nat. Med.* **25**, 141–151 (2019).
- 137. Stienstra, R. *et al.* The inflammasome-mediated caspase-1 activation controls adipocyte differentiation and insulin sensitivity. *Cell Metab.* **12**, 593–605 (2010).
- 138. Guarda, G. *et al.* Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity* **34**, 213–223 (2011).
- 139. Franckowiak, G., Bechem, M., Schramm, M. & Thomas, G. The optical isomers of the 1,4-dihydropyridine BAY K 8644 show opposite effects on Ca channels. *Eur. J. Pharmacol.* **114**, 223–226 (1985).
- Esfahani, K. & Miller, W. H. J. Reversal of Autoimmune Toxicity and Loss of Tumor Response by Interleukin-17 Blockade. *The New England journal of medicine* **376**, 1989–1991 (2017).
- 141. Krieg, C. *et al.* High-dimensional single-cell analysis predicts response to anti-PD-1 immunotherapy. *Nat. Med.* **24**, 144–153 (2018).

ANEXO



US 20180318273A1

(19) United States

(12) Patent Application Publication (10) Pub. No.: US 2018/0318273 A1 Hill et al. (43) Pub. Date: Nov. 8, 2018

(54) IMMUNORESPONSIVE METHODS OF TREATING TUMORS

- (71) Applicant: Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo (UY)
- (72) Inventors: Marcelo Hill, Canelones (UY); Mercedes Segovia, Canelones (UY); Sofia Russo, Canelones (UY); Maria Cristina Cuturi, Nantes (FR); Mathias Jeldres, Montevideo (UY); Maria Romina Girotti, Buenos Aires (AR); Maite Duhalde Vega, Buenos Aires (AR); Yamil Damián Mahmoud, Buenos Aires (AR)
- (73) Assignee: Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo (UY)
- (21) Appl. No.: 15/969,350

(22) Filed: May 2, 2018

Related U.S. Application Data

(60) Provisional application No. 62/500,113, filed on May 2, 2017.

Publication Classification

- (51) Int. Cl. *A61K 31/4422* (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
- (52) U.S. Cl.
 - CPC A61K 31/4422 (2013.01); A61K 39/3955 (2013.01); C07K 16/2827 (2013.01); C07K 16/2818 (2013.01)

(57) ABSTRACT

Within the scope of the present invention is a new pharmacological strategy for the treatment of tumors based on anti-tumoral immune responses.