



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

**PP2A B55 β limita la capacidad antitumoral de las
células dendríticas**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

**PRESENTA:
GERARDO SUÁREZ ROJAS**

**DIRECTOR DE TESIS
Dr. José Carlos Crispín Acuña**

Facultad de Medicina



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

I. RESUMEN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Células dendríticas en el sistema inmunológico.....	3
2.1.1 Desarrollo y tipos	4
2.1.2 Coestimulación	7
2.1.3 Papel de las células dendríticas en el contexto tumoral.....	10
2.2 Fosfatasa PP2A.....	14
2.2.1 Papel de PP2A B55 β en el sistema inmunológico y en el contexto tumoral	16
2.2.2 PP2A y NF κ B.....	18
III. ANTECEDENTES.....	22
IV. HIPÓTESIS	23
V. OBJETIVOS	24
VI. MATERIALES Y MÉTODOS	25
6.1 Modelos animales	25
6.2 Ensayos de inmunidad antitumoral	26
6.3 Producción de IFN- γ	27
6.4 Diferenciación <i>in vitro</i> de células dendríticas (BMDCs)	28
6.5 Activación <i>in vitro</i> de células OT-I.....	28
6.6 Ensayo de tolerización de BMDCs con IL-10.....	28
6.7 Citometría de flujo.....	29
6.8 Western Blot	29
6.9 Análisis de datos.....	30
VII. RESULTADOS	31
7.1 PP2A B55 β en las células dendríticas es protumoral	31

7.2 PP2A B55 β regula la expresión de CD86 en las células dendríticas que infiltran el tumor	33
7.3 La expresión PP2A B55 β en las células dendríticas reduce la capacidad de los linfocitos T CD8+ de producir IFN- γ	36
7.4 PP2A B55 β no está implicada en la diferenciación ni maduración de las células dendríticas derivadas de médula ósea	38
7.5 PP2A B55 β no afecta la activación ni la proliferación de células T antígeno específicas.....	41
7.6 PP2A B55 β no modifica la tolerización de las BMDCs con IL-10.....	42
7.7 PP2A B55 β modula la activación de la vía de NF κ B en BMDCs	44
VIII. DISCUSIÓN	46
IX. CONCLUSIONES.....	49
X. PERSPECTIVAS.....	50
XI. REFERENCIAS.....	51

I. RESUMEN

Las células dendríticas son presentadoras de antígeno profesionales que orquestan la respuesta inmunológica de los linfocitos T, por lo que se han convertido en un blanco terapéutico contra el cáncer. Las células dendríticas dependen de la expresión de moléculas como el complejo principal de histocompatibilidad y moléculas de coestimulación para proveer señales que activan a los linfocitos T y con ello, promover la destrucción del tumor. Sin embargo, el cáncer presenta estrategias para evadir la respuesta antitumoral a través de inhibir la función de las células dendríticas.

La proteína fosfatasa 2A (PP2A) es una enzima compuesta de tres subunidades, la de andamiaje A, la catalítica C, y una subunidad reguladora B. Esta última determina la especificidad, regulación y localización de la enzima activa. Se ha demostrado que PP2A regula la actividad de proteínas centrales en la señalización que controla el crecimiento celular y la supervivencia. En especial, la familia de subunidades B55 puede regular la fosforilación de proteínas como Akt. Recientemente se encontró que PP2A B55 β promueve la muerte inducida por deprivación de citocinas (CWID) en los linfocitos T CD8+ durante la terminación de la respuesta inmune y que la deficiencia de PP2A B55 β en linfocitos T CD8+ mejora la inmunidad antitumoral. Sin embargo, el papel de PP2A B55 β en las células dendríticas en el contexto tumoral no ha sido estudiado.

En este trabajo utilizamos un modelo de deficiencia genética condicional, para evaluar la función de PP2A B55 β en células dendríticas. Observamos que, en un sistema de melanoma, la deficiencia de B55 β tiene un efecto modesto, pero consistente, de reducir la velocidad de crecimiento tumoral y mejorar la inmunidad ante el tumor. Pudimos asociar el efecto clínico a un incremento significativo en la expresión de la molécula CD86 en células dendríticas. Además, observamos una tendencia a que los linfocitos T CD8+ que infiltran el tumor, produzcan más IFN- γ en los ratones con deficiencia condicional de B55 β . En conjunto, estos resultados sugieren que B55 β modula a la baja la expresión de CD86 y limita la capacidad de las células dendríticas de activar a linfocitos T.

Abstract

Dendritic cells play a major role in antitumor immunity as antigen presenting cells. Tumor evasion controls immune response through inhibition of DCs function, as downregulation of coestimulation molecules. B55 β is a regulatory subunit of the protein phosphatase 2A (PP2A) that regulates apoptosis in T cells, through modulation of Akt following cytokine withdrawal, and inhibition of B55 β in T cells improve antitumor immunity.

Here we explored the effects of PP2A B55 β on dendritic cells during antitumor immunity. We found that genetic deletion of this molecules improves the immune response against tumor in mice. We analyzed the phenotype of dendritic cells obtained from tumors, and we found that DCs express more CD86 but not CD80 or CD40. Also, T cells produce more IFN- γ , these results explain how inhibition of B55 β on DCs improves antitumor immunity in mice.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Células dendríticas en el sistema inmunológico

El sistema inmune es un conjunto de componentes y fenómenos biológicos que instauran la homeostasis ante diferentes retos como las infecciones. Los componentes de este sistema se han agrupado en dos ramas principales, el sistema inmune innato y el adaptativo¹. El primero constituye una primera línea de defensa contra patógenos, que involucra mecanismos bioquímicos y celulares que se instauran rápidamente ante una infección. El segundo implica una respuesta más específica y duradera de defensa, con la capacidad de generar memoria, es decir, de responder más vigorosamente a exposiciones prospectivas con el mismo patógeno^{1,2}.

Los componentes celulares del sistema inmune innato y adaptativo son diferentes en su ontogenia y función, sin embargo, trabajan en conjunto para la resolución de las infecciones comunicándose a través de mediadores solubles como las citocinas o a través de contactos celulares². Es reconocido que el sistema inmune innato y el adaptativo funcionan en forma coordinada. El descubrimiento de las células dendríticas por Ralph Steinman contribuyó a conocer la coordinación funcional entre la inmunidad innata y la adaptativa³.

Las células dendríticas así como los macrófagos procesan antígenos exógenos y endógenos y los exponen a las células de la inmunidad adaptativa, los linfocitos^{1,2}. Esto las convierte en células presentadoras de antígenos, que se encargan de

evocar respuestas en linfocitos T vírgenes, por lo que representan un puente entre la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa.

2.1.1 Desarrollo y tipos

Las células dendríticas pertenecen al grupo de los fagocitos mononucleares mieloides⁴. Al igual que los macrófagos y monocitos, las DCs provienen de precursores de la médula ósea que se diferencian en respuesta a citocinas como Flt3L y al factor estimulante de colonias granulocíticas-macrofágicas (GM-CSF)⁵.

Estos precursores se diferencian hasta llegar a progenitor mielóide común (CMP) que a su vez se diferencia en precursores de monocitos y células dendríticas (MDP) que mantienen la potencialidad de convertirse en monocitos o DCs^{5,6}. El progenitor de células dendríticas común (CDP) es el primer precursor directo con la posibilidad de dar origen a los diferentes subtipos de DCs⁵.

Podemos distinguir dos tipos principales de las DCs: las células dendríticas plasmacitoides (pDC) y las células dendríticas convencionales (cDC). Éstas, a su vez, se dividen en tipos 1 y 2⁷. Ambos grupos de DCs se caracterizan por expresar en su membrana moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) y la integrina CD11c^{5,7} (**Figura 1**).

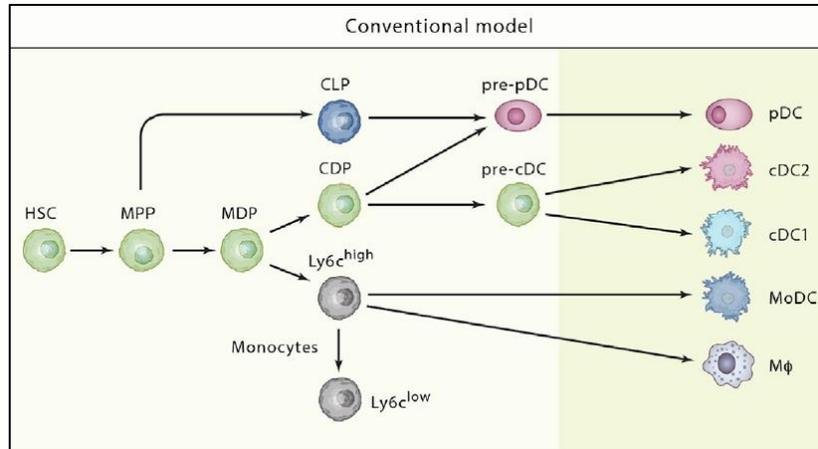


Fig. 1: Modelo convencional del desarrollo de las células dendríticas⁶.

Las pDCs se caracterizan por la expresión de B220, SiglecH y CD317, y juegan un papel importante en la respuesta antiviral. Expresan niveles altos de los receptores tipo Toll (TLR) 7 y 9, que reconocen patrones moleculares asociados a virus, y son productoras importantes de interferones tipo I^{5,7}. Sin embargo, se ha reportado que las pDCs tienen poca capacidad de presentar antígenos⁸. La diferenciación de este linaje de DCs es dependiente de Flt3L y está regulada por diferentes factores transcripcionales como Tcf4 y Bcl11a^{6,9}.

Las células encargadas de activar por primera vez a un linfocito, es decir realizar el *priming*, son las cDCs. Éstas se especializan de acuerdo con el contexto de los antígenos presentados. A pesar de que ambos tipos de cDCs provienen del mismo progenitor, es el ambiente inflamatorio el que determina la dinámica de factores transcripcionales que guían dicha especialización.

Las cDC1s murinas se identifican por la expresión de tres marcadores de superficie: CLEC9A, CD8α y XCR1^{5,8}. Además, se ha demostrado, utilizando ratones

genéticamente modificados, que su diferenciación depende de los factores transcripcionales *Batf3* e *Irf8*^{9,10}. Estas cDCs poseen una capacidad superior para presentar antígenos intracelulares, como aquellos derivados de virus y de bacterias intracelulares. Además, las cDC1s tienen una gran capacidad de llevar a cabo la presentación cruzada, la cual consiste en presentar antígenos exógenos a través de MHC-I. Por estas dos razones, las cDC1s son fundamentales para evocar respuestas mediadas por linfocitos T CD8⁺^{5,8,9} (**Figura 2**).

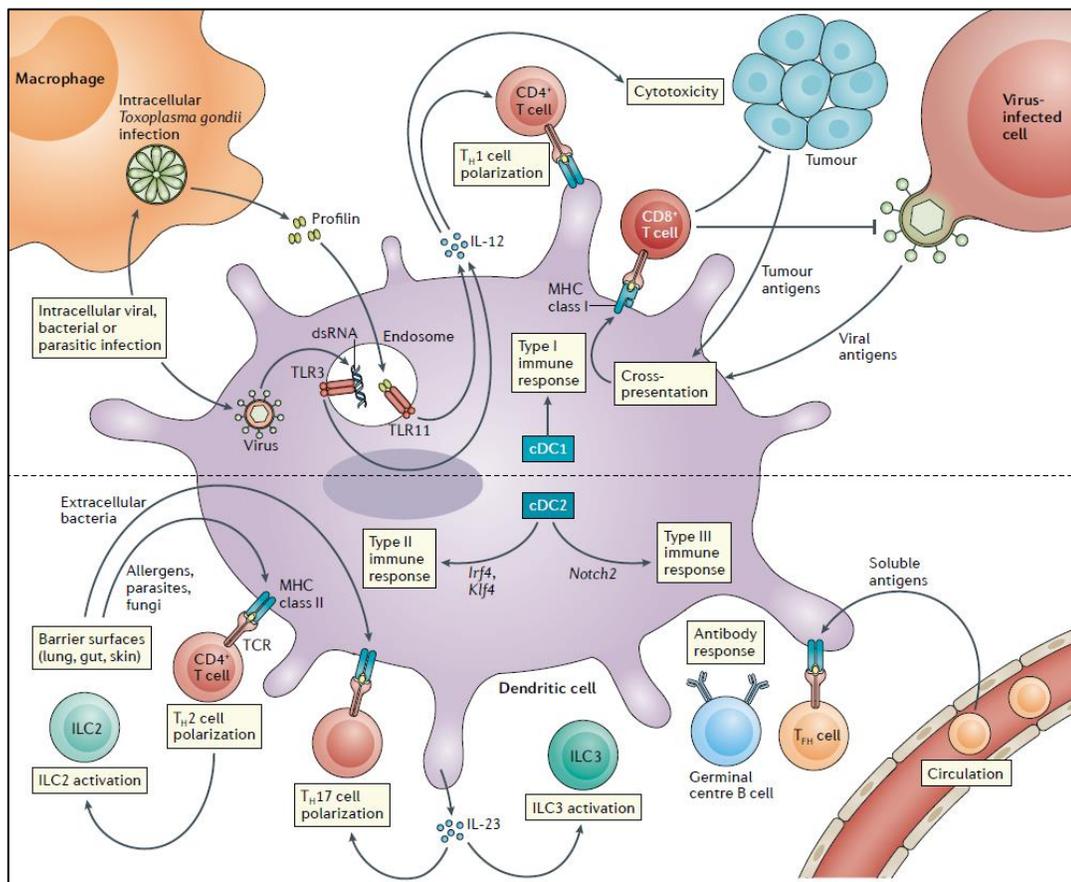


Fig. 2: Funciones especializadas de las células dendríticas convencionales murinas⁹.

Por otro lado, el conocimiento sobre el desarrollo de las cDC2s es más limitado. Se ha descrito que Irf4 y Zeb2 son los principales factores transcripcionales que guían este linaje^{8,9}. Además, se han identificado algunos marcadores que determinan la identidad de las cDC2s, entre ellos destacan CD11b y SIRP α ^{5,11}.

Aun cuando las cDC2s expresan una amplia variedad de receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), tienden a presentar antígenos a través de MHC-II y, consecuentemente, despiertan respuestas de linfocitos T CD4⁺ ^{5,11}. Son reconocidas por su capacidad fagocítica y por el reconocimiento de patógenos extracelulares y alérgenos, además de que tienen la facilidad de polarizar las respuestas inmunológicas a Th2 y Th17^{5,9,12}. Esto debido a que también son grandes productoras de citocinas inflamatorias como IL-6, IL-23 e IL-8⁵ (**Figura 2**).

2.1.2 Coestimulación

Una vez que las DCs capturan los antígenos y los procesan, pueden presentarlos a los linfocitos T. Como se explicó anteriormente, las DCs pueden iniciar y modelar las respuestas inmunológicas dependiendo del contexto inflamatorio y de la naturaleza del insulto. Para que los linfocitos T vírgenes completen su activación, son requeridas tres señales provenientes de las DCs que desencadenarán la respuesta efectora necesaria para resolver el insulto¹³. La primera señal es generada por la interacción del complejo MHC:péptido con el receptor de células T (TCR). Esta señal es esencial para la activación del linfocito T específico al antígeno^{2,13}.

Sin embargo, aun cuando el correceptor (CD4 o CD8) y el TCR se encuentren ligados, no son posibles, por sí mismos, de estimular la diferenciación a linfocitos T efectores². Es aquí donde intervienen la señal de coestimulación, que promueve la supervivencia y la expansión de los linfocitos T; y la señal de citocinas que organizan la diferenciación hacia los subtipos efectores de linfocitos T (**Figura 3**).

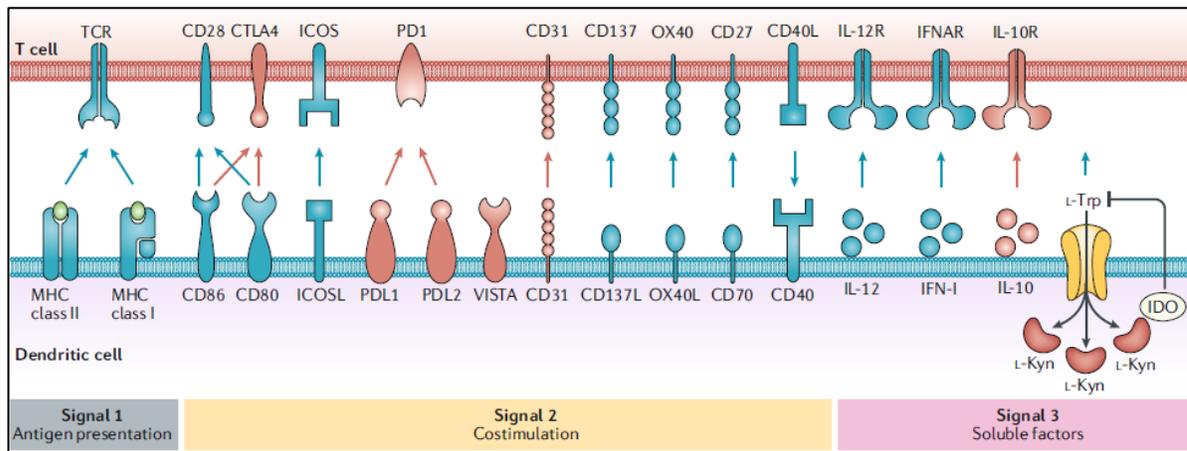


Fig. 3: Modelo de la activación de linfocitos T o tolerización¹⁴.

La vía B7-1/B7-2:CD28/CTLA-4 es la mejor caracterizada entre las vías de coestimulación de linfocitos T¹⁵. Es una vía compleja debido a la especificidad dual de B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) por el receptor estimulador CD28 y por el receptor inhibitorio CTLA-4¹⁶. Los receptores tienen distintas cinéticas de expresión y afinidades por su ligando; CD28 se expresa constitutivamente en la superficie de los linfocitos T, mientras que la expresión de CTLA-4 se induce después de su activación¹⁷. CTLA-4 es el receptor de mayor afinidad por CD80 y CD86¹⁸.

Las moléculas de coestimulación CD80 y CD86 también difieren en su cinética de expresión. CD86 se expresa constitutivamente en niveles bajos y se induce

rápidamente después de la activación de DCs, y la expresión de CD80 se induce después¹⁹. Además de la señalización por CD28 y CTLA-4, estas moléculas coestimuladoras tienen función de señalización reversa²⁰. Se ha encontrado que la unión de CD80 y CD86 con CTLA-4 provee a la DC una señal supresora que resulta en la expresión de la enzima indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO1) la cual inhibe la proliferación de linfocitos T²¹⁻²³ (**Figura 3**).

La expresión de estas moléculas de coestimulación está regulada por un grupo de factores transcripcionales que programan a las DCs en respuesta al ambiente inflamatorio. Dentro de los sitios reguladores en los genes de CD80 y CD86 se han encontrado motivos de unión a miembros de la familia de NFκB²⁴. Estos sitios responden a la estimulación de TLR4 con LPS y de CD40, que inducen la expresión de estas moléculas de coestimulación²⁵⁻²⁷.

Cuando las DCs presentan antígenos y estimulan a linfocitos T, éstos les proveen de señales que amplifican la capacidad de presentación antigénica y permite a las DCs aumentar la expresión de coestimuladoras en su superficie. Además, esta señal aumenta la producción de citocinas por las DCs. Las células T proveen de esta señal a través de la interacción entre CD40 en DCs y CD40L en los linfocitos T^{24,28}.

En los linfocitos T, PD-1 es un receptor inducido por la activación a través del TCR y por algunas citocinas²⁹. Tiene un papel central en la modulación de la respuesta inmune por su capacidad de inactivar a los linfocitos T. Además, en presencia sostenida de antígenos, como sucede en infecciones crónicas o cáncer, PD-1 participa en el agotamiento de los linfocitos T que se caracteriza por una disfunción generalizada en estas células^{30,31}.

PD-L1 es un ligando de PD-1 que se expresa constitutivamente en una variedad grande de células del sistema inmunológico y se induce con estímulos inflamatorios³². Al unirse a PD-1 se inicia un programa de apagado que se lleva a cabo gracias a los dominios ITIM (por *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) en la porción intracelular de PD-1. Los dominios ITIM reclutan fosfatasas que desfosforilan a componentes de la señalización del TCR y de otras vías como PI3K-Akt y MEK-ERK³³⁻³⁶.

Las DCs como moduladoras de la respuesta inmune dependen de la expresión de moléculas de coestimulación y de inhibición. En el contexto tumoral las DCs proveen señales que activan a los linfocitos T y promueven la destrucción tumoral, sin embargo, cuando se llega a una etapa de equilibrio y evasión, el cáncer presenta estrategias para apagar a los linfocitos T a través de moléculas de inhibición^{37,38}.

2.1.3 Papel de las células dendríticas en el contexto tumoral

El cáncer se origina a partir de un estado proliferativo mal controlado de células del organismo, que presentan sellos característicos³⁹. A pesar de que los antígenos tumorales son derivados de proteínas endógenas, estos pueden despertar respuestas inmunológicas. Sin embargo, la persistencia de los tumores se debe en parte, a la capacidad que tienen para modular la función de células inmunológicas⁴⁰.

Dado que las DCs orquestan las respuestas inmunológicas, se les ha conferido un papel central en la respuesta antitumoral, porque procesan antígenos tumorales y

los presentan a linfocitos T CD8⁺ y CD4⁺. Además producen citocinas que activan y atraen a células NK⁴¹⁻⁴³.

Los linfocitos T CD8⁺, los principales efectores de la respuesta antitumoral, son activados mediante la presentación cruzada de las DCs. En particular son las cDC1s las responsables de presentar los antígenos tumorales porque tienen una mayor capacidad de presentación cruzada⁴¹.

Recientemente se encontró que las cDC1s también pueden realizar el *priming* de linfocitos T CD4⁺ en las primeras etapas de la respuesta antitumoral y que esto favorece la función efectora de los linfocitos T CD8⁺ ⁴². A pesar de que las cDC2s pueden despertar respuestas en linfocitos T CD4⁺, su papel en la respuesta antitumoral aún no es del todo claro^{37,44}.

Generalmente el reclutamiento de cDC1s a los tumores se asocia a un mejor pronóstico clínico y a una respuesta antitumoral robusta⁴⁵. El acceso de las cDC1s al tumor depende de citocinas y quimiocinas producidas por células del sistema inmunológico, así como las producidas por las células tumorales. Quimiocinas como CXCL1, CCL2, y CCL20 son secretadas por el tumor y atraen a monocitos, macrófagos y células T reguladoras que promueven el crecimiento tumoral⁴⁶.

Las células NK producen CCL5 y XCL1 que atraen a cDC1s al tumor; se ha encontrado que la producción de estas quimiocinas está regulada indirectamente por la actividad de la ciclooxigenasa en los tumores⁴⁷. Estos estudios mostraron una vía en donde las células NK y las cDC1s cooperan para promover la respuesta contra el tumor⁴⁸. Una vez captado el antígeno, las DCs viajan al ganglio linfático drenante

donde maduran, aumentan la expresión de moléculas coestimuladoras como CD80, CD86 y CD40, que favorecen la activación de linfocitos T en el microambiente tumoral^{37,49}. La actividad efectora de los linfocitos T CD8⁺ depende de citocinas derivadas de las DCs que incluyen IL-12 e interferones tipo I y II, y también de quimiocinas que promueven la infiltración de linfocitos al tumor como CXCL9 y CXCL10^{50,51} (**Figura 4**)

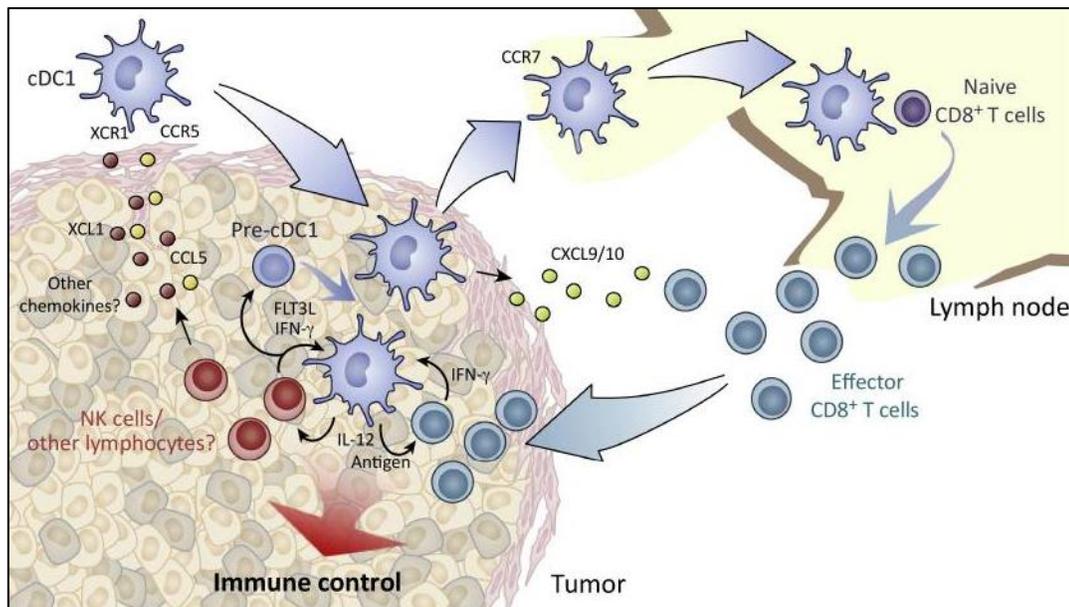


Fig. 4: Papel de las células dendríticas convencionales tipo 1 en el desarrollo de la respuesta antitumoral⁴⁹.

Bajo la presión de la respuesta antitumoral, células del cáncer pueden promover tolerancia inmunológica a través de modular la función de las células dendríticas³⁷. La presentación de antígenos tumorales en ausencia de señales de coestimulación induce anergia en linfocitos T⁵². Este fenómeno también se produce por señales dadas por moléculas inhibitorias que limitan la actividad efectora de los linfocitos T contra el tumor.

En las DCs una de las moléculas de inhibición más importantes es PD-L1, que al unirse a PD-1 en linfocitos T inhibe su proliferación y producción de citocinas en el microambiente tumoral³³. Otra señal inhibitoria es la proporcionada por CTLA-4, que compete con CD28 por la unión con CD80 y CD86 en las DCs¹⁸.

Las DCs también pueden modular la función de los linfocitos T modificando la disponibilidad a sustratos metabólicos. El triptófano es esencial para la respuesta de linfocitos T y las DCs lo eliminan a través de su conversión mediada por IDO1²³. IDO1 es inducida en DCs por la unión de CD80 y CD86 con CTLA-4. Notablemente, se ha observado un aumento en la expresión de IDO1 en DCs tumorales, y éstas a su vez, suprimen la proliferación y funciones efectoras de linfocitos CD8⁺, células NK y contribuyen a la diferenciación de células T reguladoras⁵³.

Además de antígenos asociados a tumores y patrones moleculares asociados a daño, el microambiente tumoral contiene una serie de factores inmunosupresores que modulan la función de las DCs³⁷. Entre ellos se encuentran los que inhiben la producción de citocinas proinflamatorias. Se ha visto que un ligando de TLR2 derivado del tumor induce IL-10 e IL-6 y la sobreexpresión de sus receptores en las DCs que conlleva a la inmunosupresión⁵⁴.

La IL-10 antagoniza los efectos de IL-12 e inhibe su producción en las cDC1s⁴⁹. Además, se encontró que en los tumores, los macrófagos son la fuente primaria de IL-10, que a través de STAT3 regula a la baja la maduración de DCs, pues inhibe la expresión de moléculas coestimuladoras y la producción de citocinas⁵⁵ (**Figura 5**).

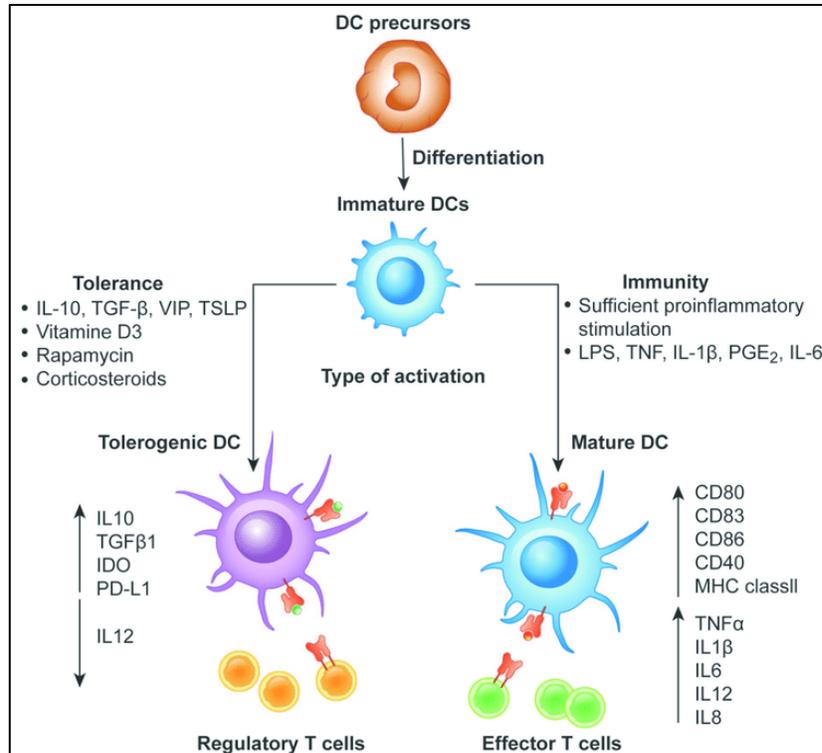


Fig. 5: Diferenciación funcional de las células dendríticas hacia tolerogénicas o maduras⁵⁶.

Dada su importancia en la respuesta antitumoral, las DCs y en especial las cDC1s se han convertido en blancos terapéuticos para promover la inmunidad contra el cáncer. Se han evaluado estrategias que promueven la activación, proliferación y maduración de las DCs dentro del microambiente tumoral^{37,49}.

2.2 Fosfatasa PP2A

Muchos procesos celulares son regulados por la fosforilación de proteínas. Esto permite a la célula reaccionar al entorno y adaptarse al cambio, y el proceso reversible (desfosforilación) también implica un control de las funciones celulares⁵⁷.

En condiciones fisiológicas, esta dinámica está controlada y balanceada por una red finamente regulada de cinasas y fosfatasas⁵⁸.

La fosforilación de proteínas se clasifica en dos grupos, fosforilación en tirosinas y fosforilación en serinas y treoninas (Ser/Thr). De manera análoga, existen fosfatasas de tirosinas y de Ser/Thr. PP2A y PP1 representan más del 90% de la actividad fosfatasa de Ser/Thr en casi todos los tipos celulares^{57,58}. La desregulación de PP2A está fuertemente relacionada con diversos estados patológicos como autoinmunidad, cáncer y enfermedades neurodegenerativas dado que tiene un papel importante en la modulación de apoptosis, diferenciación y ciclo celular⁵⁸⁻⁶⁰.

PP2A es una familia de holoenzimas heterotriméricas compuesta de tres subunidades⁵⁷. Una subunidad de andamiaje A, una subunidad catalítica C, y una subunidad reguladora B. Esta última determina la especificidad, regulación y localización de la enzima activa^{59,61}.

La subunidad catalítica existe en dos isoformas, α y β , codificadas por dos genes homólogos altamente conservados. Sin embargo, estas dos isoformas parecen no presentar funciones redundantes. Al igual que la subunidad catalítica, existen dos isoformas de la subunidad de andamiaje (α y β) las cuales contienen un dominio HEAT que les permite conectar a la subunidad catalítica con la subunidad reguladora^{57,58,61}.

Las subunidades reguladoras están codificadas por al menos 4 familias de genes (B, B', B'', B'''), cada una compuesta por dos a cinco genes⁶¹. La familia de las subunidades B, también llamada B55, PR5 o PPP2R2, está compuesta por cuatro

proteínas: B55 α , B55 β , B55 γ y B55 δ . Donde B55 β y B55 γ se encuentran principalmente enriquecidas en el sistema nervioso⁶¹ (**Figura 6**)

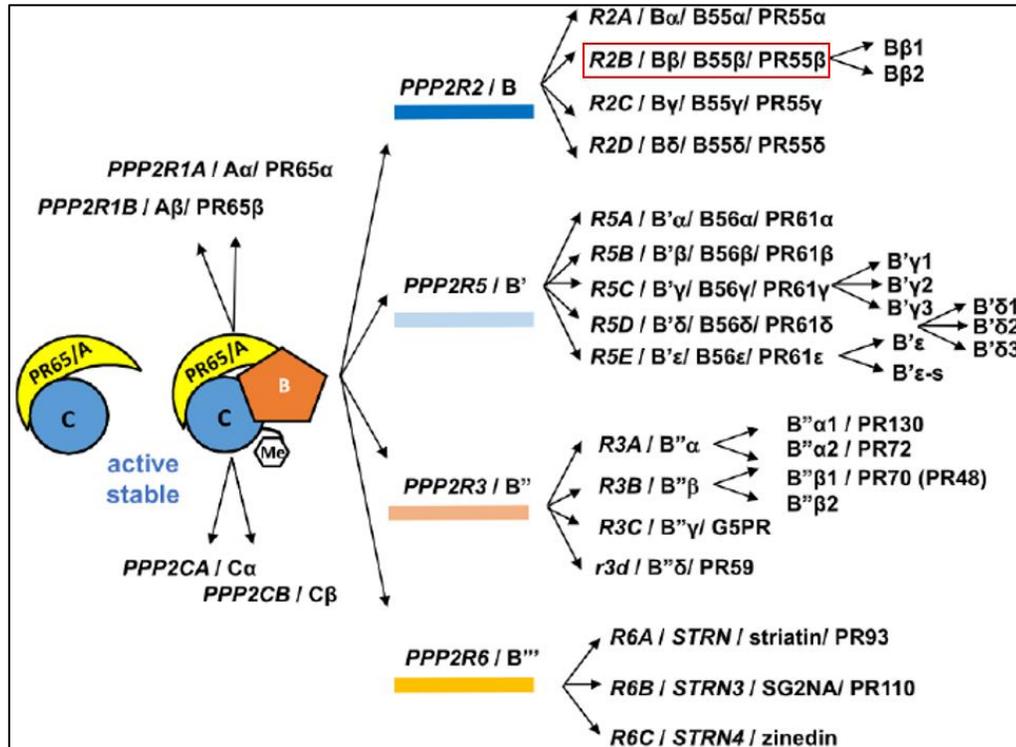


Fig. 6: Componentes de la proteína fosfatasa 2A, diversidad de las subunidades reguladoras B⁵⁵. En rojo PP2A B55 β .

2.2.1 Papel de PP2A B55 β en el sistema inmunológico y en el contexto tumoral

Se ha demostrado que PP2A regula la actividad de proteínas centrales en la señalización que controla el crecimiento celular y la supervivencia. En especial, la familia de subunidades B (B55), puede regular la fosforilación de proteínas como Akt, Ras/MAPK, Src, mTOR, y Wnt/ β Catenina^{57,60}.

Una marca común de las enfermedades autoinmunes sistémicas es la pérdida de la tolerancia y el desarrollo de una respuesta autoinmune crónica revelada por la presencia de autoanticuerpos y números altos de células T activadas⁶². La expresión y función alterada de PP2A en células del sistema inmunológico adaptativo ha sido documentada en pacientes con lupus eritematoso generalizado (LEG)⁶³. Se ha encontrado que distintas subunidades PP2A son necesarias para la función correcta de células B, células T reguladoras y células T CD8⁺ ^{64–66}.

Recientemente se encontró que PP2A B55 β es una molécula esencial en el control de la supervivencia de los linfocitos T CD8⁺ durante la fase de contracción de la respuesta inmune y que la regula mediante la desfosforilación de Akt culminando con la activación de la molécula proapoptótica Hrk. En este mismo estudio se encontró que la deficiencia de PP2A B55 β en linfocitos T CD8⁺ mejoraba la inmunidad antitumoral en ratones inoculados con melanoma B16-OVA, previamente infectados con *Listeria monocytogenes* que expresa OVA (Lm-OVA). Esto debido a que se mantenían clonas antígeno específicas activadas aun después de la resolución de la infección consecuencia de una deficiencia en la apoptosis de estos linfocitos⁶⁶.

Este fenómeno, observado en respuestas inmunes agudas, también puede ser un mecanismo de eliminación de clonas autorreactivas en la periferia para evitar el desarrollo de autoinmunidad. Se ha encontrado que la exposición prolongada de linfocitos T a TNF α , como en un ambiente inflamatorio crónico, promueve la hipermetilación del promotor de *PPP2R2B*, inhibiendo así la expresión de B55 β en estas células⁶⁷. Al igual que se ha observado que las células T de un grupo de

pacientes con LEG, tienen resistencia a la apoptosis y un defecto en la expresión de PP2A B55 β después de que se les priva de IL-2⁶⁸.

Se ha visto que PP2A tiene un papel supresor en el desarrollo tumoral dado que la inhibición de la fosfatasa es oncogénica^{57,69,70}. También, una baja en la expresión de PP2A B55 β provocada por la hipermetilación del promotor de *PPP2R2B* se ha encontrada en el 90% de los tumores de colon y se ha asociado a otros tipos de cáncer^{61,71}.

2.2.2 PP2A y NF κ B

El reconocimiento de patrones moleculares asociados a daño celular o a patógenos es primordial para la activación del sistema inmune innato y la inflamación⁷². Las células dendríticas están provistas de una gran cantidad de PRRs, entre ellos TLR4 que reconoce el lipopolisacárido (LPS) en las bacterias y TLR3 que reconoce RNA de doble cadena en los endosomas para despertar la respuesta antiviral^{5,7}.

Muchas de las vías de señalización de PRRs culminan en la translocación de NF κ B al núcleo⁵⁹. NF κ B es una familia de factores transcripcionales que promueve, en DCs, la transcripción de genes asociados a la respuesta inflamatoria como moléculas de coestimulación y citocinas. La vía de NF κ B depende de la fosforilación en serinas y treoninas, que a su vez está regulada por fosfatasas como PP2A⁷³. (**Figura 7**)

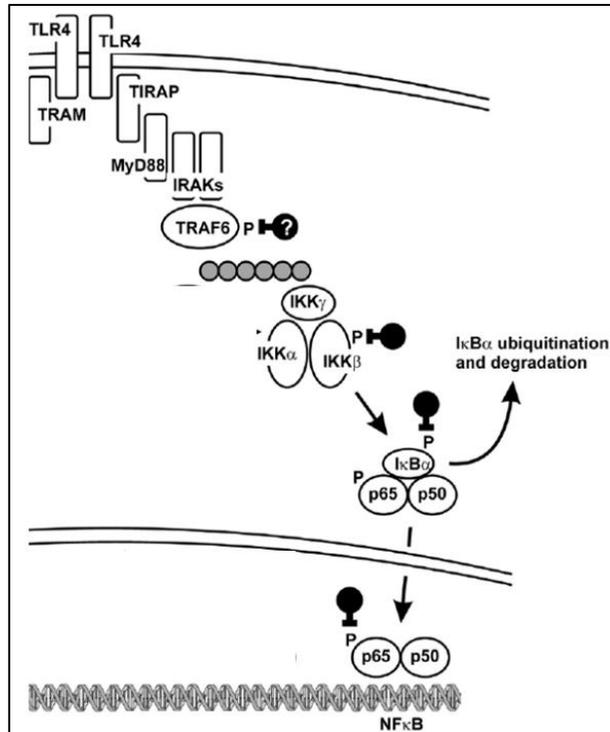


Fig. 7: Vía de NFκB bajo la activación de TLR4, los círculos negros representan sitios donde PP2A regula la fosforilación⁵⁹.

En condiciones homeostáticas, NFκB está secuestrado en una forma inactiva en el citoplasma por IκBα (inhibidor de NFκB α). La activación de NFκB requiere la fosforilación y posterior degradación de IκBα. Cuando se activa la señalización de TLR4, a través de moléculas adaptadoras como MyD88 e IRAK, se recluta un complejo con actividad cinasa (complejo IKK) que fosforila a IκBα en las serinas 32 y 36. Esta fosforilación promueve su poliubiquitinación y dirige a IκBα a la degradación proteosomal^{2,59,72}. **(Figura 7)**

En muchos casos, la inhibición de PP2A, sola o en conjunto con agonistas como LPS, TNF α o IL-1 β , incrementa la expresión de los genes blanco de NF κ B, y se ha visto que PP2A interactúa con el complejo IKK y con I κ B α ^{74,75}.

Por otro lado, PP2A se ha visto implicada en la señalización de linfocitos T; como se describió anteriormente, la completa activación de estas células requiere de la señal del TCR y la coestimulación vía CD28 mientras que la señal dada por CTLA-4 inhibe la activación⁶¹. La vía de NF κ B se activa mediante la señalización del TCR y depende de la actividad de PP2A B56 γ . Se encontró que en células Jurkat (línea celular de linfocitos T), el silenciamiento de B56 γ provocaba niveles elevados de fosforilación del complejo IKK y de I κ B α que son requeridos para la activación de NF κ B⁷⁶. También se ha encontrado a PP2A asociada a CTLA-4 y CD28 sin embargo el mecanismo por el cual son modulados aún se desconoce⁶¹.

En macrófagos, la eliminación específica de la subunidad catalítica de PP2A prolonga la fosforilación de IKK β (componente del complejo IKK) y de RelA (un componente de NF κ B) y favorece la expresión de mediadores inflamatorios en respuesta a la activación por TLR4⁷⁷. En otro estudio se encontró que la delección de PP2A C α resulta en una respuesta antiviral más robusta, mostrada por una mayor protección contra inyecciones letales del virus de la estomatitis vesicular en ratones. Esto asociado a una actividad prolongada de la vía de NF κ B y una mayor señalización de interferones tipo I⁷⁸.

La IL-10 es una citocina antiinflamatoria que toleriza a las DCs. Uno de los efectos de la IL-10 en células dendríticas derivadas de médula ósea (BMDCs) es la inhibición

de la vía de NF κ B a través de la desfosforilación de la vía PI3K-Akt⁷⁹. Por otro lado, se encontró que PP2A B55 β inhibe la activación de NF κ B inducida por el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) en una línea celular de osteoblastos⁸⁰.

III. ANTECEDENTES

En nuestro laboratorio se ha descrito que PP2A B55 β juega un papel importante en la muerte inducida por privación de citocinas en linfocitos T CD8⁺, esto mediado por la desfosforilación de Akt. Lo anterior promueve la inmunidad antitumoral pues la inhibición de B55 β mantiene clonas activadas incluso después de la fase de contracción⁶⁶.

Una de las estrategias de evasión del cáncer es la tolerización de DCs en el microambiente tumoral. Esto provocado en parte, por la inhibición de la vía de NF κ B y por lo tanto en las moléculas de coestimulación CD80 y CD86. Donde PP2A B55 β podría modular esta vía a través de Akt. Sin embargo, los efectos de B55 β en las células dendríticas del microambiente tumoral aun no han sido explorados.

IV. HIPÓTESIS

En las células dendríticas del microambiente tumoral, PP2A B55 β regula negativamente la capacidad de activar a células T, por la inhibición de la vía de NF κ B y, consecuentemente, la expresión de moléculas coestimuladoras.

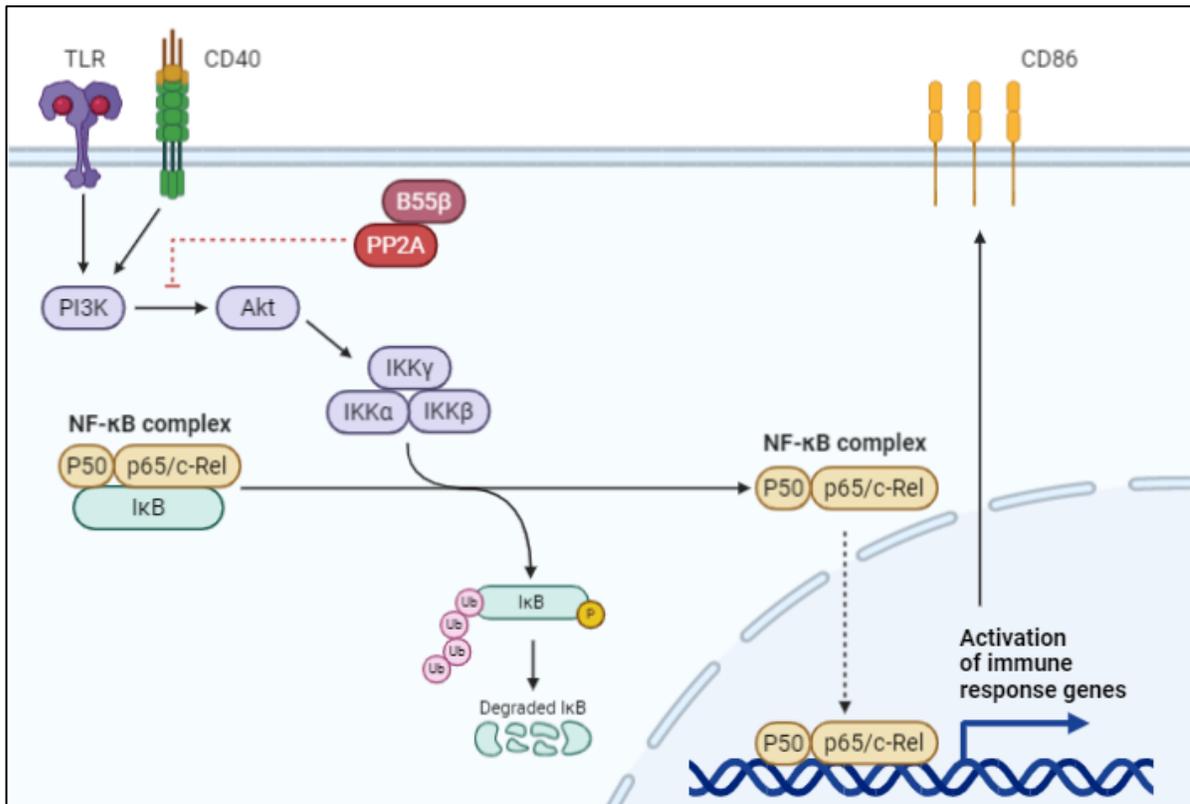


Fig. 8: Esquema de la hipótesis

V. OBJETIVOS

General

Evaluar el papel de PP2A B55 β en células dendríticas durante el establecimiento de la inmunidad antitumoral.

Particulares

Caracterizar la respuesta antitumoral en ratones con deficiencia condicional de B55 β (*Ppp2r2b*) en células dendríticas.

1. Analizar la infiltración de linfocitos y células dendríticas en un tumor de melanoma B16.
2. Evaluar la expresión de moléculas de coestimulación.

Evaluar el papel de B55 β en la diferenciación y maduración *in vitro* de células dendríticas.

1. Analizar los efectos de la deficiencia de B55 β en la presentación de antígenos y la activación de células T.
2. Analizar si la ausencia B55 β afecta la expresión de moléculas de coestimulación y la activación de NF κ B en células dendríticas expuestas a IL-10.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Modelos animales

Todos los ratones que se usaron en este proyecto estaban en fondo C57BL/6. Los ratones C57BL/6 y los *Cd11c^{Gfp-Cre}* se adquirieron en Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME, EUA). Los OT-I y CD45.1 fueron un obsequio de la Dra. Gloria Soldevila (Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM). Las cepas con más de un locus modificado se generaron por cruza. Así, en ensayos de inmunidad antitumoral se estudiaron ratones con deficiencia condicional de PP2A B55 β (*Ppp2r2b*) en células CD11c (cKO: CD45.2 *Ppp2r2b^{fl/fl}Cd11c^{Gfp-Cre}*) y, como animales control, se usaron ratones *Ppp2r2b^{+/+}Cd11c^{Gfp-Cre}* (WT). Todos los ratones tenían entre 7 y 12 semanas de edad. Los ratones se mantuvieron en condiciones estándar (21°C; ciclos de luz/oscuridad de 12 h; acceso libre a comida y agua), en un bioterio de barrera, libres de patógenos específicos, en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ). Este proyecto y todos los procedimientos que incluye fueron aprobados por el Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del INCMNSZ (IRE-1805). Los animales fueron revisados todos los días para asegurar su bienestar y se les aplicó el punto final humanitario de acuerdo con lo establecido por el CICUAL del INCMNSZ.

6.2 Ensayos de inmunidad antitumoral

Se inocularon ratones CD45.2 WT y cKO con células de melanoma B16 que expresan OVA (2×10^5) por vía subcutánea. Se monitoreó el crecimiento del tumor durante 21 días usando la fórmula: $\text{tumor mm}^2 = (\text{anchura}) \times (\text{altura}) \times \pi$. Se extirparon los tumores y el ganglio linfático drenante (dLN), para analizar poblaciones linfoides (células T CD4 y CD8, células NK) y células dendríticas, mediante citometría de flujo. Se utilizaron los marcadores indicados en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Anticuerpos para tinción celular	
Células dendríticas	Poblaciones linfoides
Ghost Dye RF710	
IA/IE – Pacific Blue	CD3 – PE Cy7
CLEC9A - PE	NK1.1 – APC Fire 750
SIRP α – APC Cy7	TCR β - FITC
CD8 α – PerCP Cy5.5	CD4 - APC
CD80 - APC	CD8 - PerCP Cy5.5
CD86 – PE Cy7	FoxP3 - PE
CD40 – PE o APC Cy7	Helios – Pacific Blue
PDL1 – BV605	

En algunos experimentos, con el fin de analizar en forma más específica las características fenotípicas y funcionales de las células T CD8 específicas para el tumor, se transfirieron, por inyección intravenosa células OT-I CD45.1 (1×10^6) el día

previo a la inoculación del tumor (**Figura 9**). Dichas células se aislaron usando el *CD8α+ T Cell Isolation Kit II* (Miltenyi Biotec) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

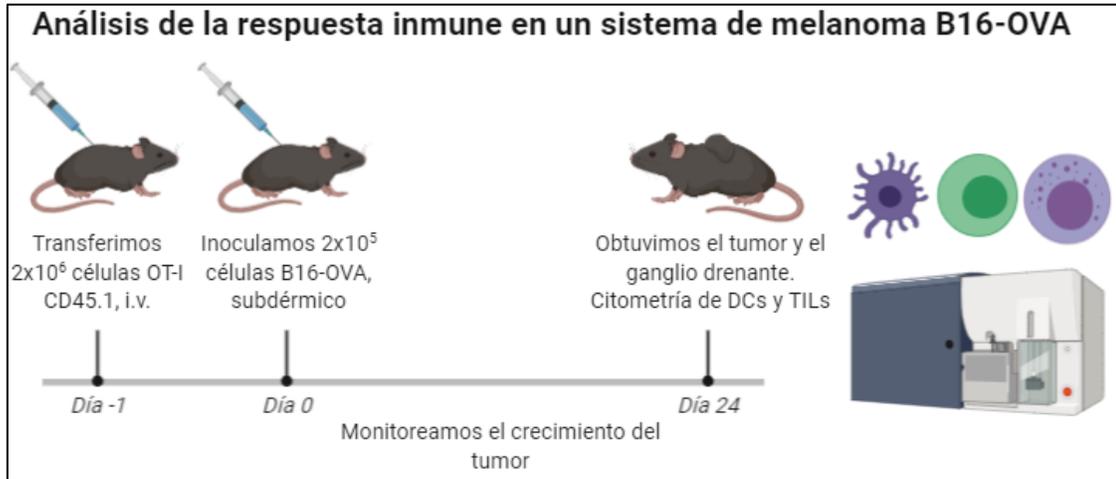


Fig. 9: Diseño experimental para evaluar la respuesta antitumoral en ratones transgénicos.

6.3 Producción de IFN- γ

En los experimentos en los que se transfirieron células OT-I, se incubaron suspensiones celulares obtenidas del tumor a 37°C en medio RPMI 1640 completo (con 10% de suero bovino fetal y antibióticos) toda la noche, en presencia del péptido derivado de OVA (SIINFEKL; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) que es reconocido por el receptor de células T transgénico que expresan las células OT-I. Al día siguiente, se agregó 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Brefeldina A (BD Biosciences) y se incubó por 4 horas a 37°C. Las células se tiñeron con marcadores de superficie y con anti-IFN- γ usando el sistema *BD Biosciences Cytofix/Cytoperm Fixation/Permeabilization Kit*, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

6.4 Diferenciación *in vitro* de células dendríticas (BMDCs)

Se obtuvo médula ósea de ratones WT y cKO, a partir de diáfisis de tibias y fémures. Se formó una suspensión celular al pasar la médula ósea a través de una criba de 70 μm . Se lisaron los eritrocitos con ACK y se sembraron células con densidad de $1 \times 10^6/\text{mL}$ en placas no tratadas, en medio RPMI 1640 completo, adicionado con 20 ng/mL de GM-CSF (Peprotech). Se agregaron citocinas y medio nuevos al día 3 y 6 del cultivo. Después de 8 días se recolectaron las células no adherentes, para su análisis por citometría de flujo y para estudios funcionales.

6.5 Activación *in vitro* de células OT-I

Se hicieron co-cultivos de BMDCs CD45.2 con células OT-I CD45.1 teñidas con *CellTrace™ Violet* (Invitrogen), en proporción 1:20, en presencia de SIINFEKL (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), por 72 horas, en medio RPMI 1640 completo. Se midió el porcentaje de activación, la proliferación y la producción de IFN- γ por células T antígeno específicas mediante citometría de flujo.

6.6 Ensayo de tolerización de BMDCs con IL-10

Se incubaron BMDCs en medio RPMI 1640 completo, en presencia de 25 ng/mL de rhIL-10 (Peprotech) por 24 horas a 37°C. Después, se adicionó LPS (100 ng/mL) durante 24 h. Finalmente, se analizó la expresión de moléculas coestimuladoras

(CD80, CD86, CD40 y PDL1) con citometría de flujo. Se sortearon células GFP⁺ para extraer RNA con Trizol y determinar la expresión de genes mediante PCR en tiempo real.

6.7 Citometría de flujo

Para las tinciones de moléculas extracelulares, se empleó una dilución 1:100 de los anticuerpos en PBS con 2% de suero bovino fetal. Las células se incubaron 30 minutos a 4°C en oscuridad. Para las tinciones intracelulares de IFN- γ se empleó el procedimiento descrito previamente y una dilución 1:25. Las células se adquirieron en un citómetro NovoCyte Quanteon (Agilent).

6.8 Western blot

Se estimularon BMDCs con 100 ng/mL de LPS y se lisaron en diferentes tiempos en buffer de lisis (50mM Tris-HCl pH 7.5, 1mM EGTA, 1mM EDTA, 50mM NaF, 1mM Na₃VO₄, NP-40 1%, 0.27M Sacarosa, β -mercaptoetanol 0.1%). Se centrifugaron por 15 minutos a 4°C (15000 RPM) y se recuperó el sobrenadante y se congeló a -80°C. Los lisados se descongelaron en hielo y se determinó la concentración de proteína usando *Quick-start Bradford Dye* (Bio-Rad). Se desnaturalizaron cantidades iguales de lisado hirviéndolos en buffer Laemmli y se realizó la electroforesis en un gel de acrilamida (SDS-PAGE). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Thermo Fisher Scientific) y la detección se hizo usando los anticuerpos primarios indicados, incubando después con anticuerpos secundarios

correspondientes acoplados a peroxidasa (HRP). Las proteínas se visualizaron por quimioluminiscencia (Pierce ECL Western blotting substrate).

6.9 Análisis de datos

Para analizar los datos de citometría de flujo, se utilizó el programa FlowJo VX (FlowJo, LLC). Las pruebas estadísticas fueron calculadas usando Microsoft Excel y GraphPad Prism 7. En general para la comparación entre dos grupos, se usó t de Student de dos colas. Para datos agrupados se usó ANOVA con corrección de Bonferroni. El número de experimentos está indicado en cada figura, y los datos se presentan como media \pm SEM. Valores de P menores a 0.05 se consideraron significativos.

VII. RESULTADOS

7.1 PP2A B55 β en las células dendríticas es protumoral

Para evaluar la posible contribución de PP2A B55 β , en células dendríticas, en el establecimiento y desarrollo de la inmunidad antitumoral, inoculamos ratones WT y deficientes de B55 β en células dendríticas CD11c⁺ (cKO: CD45.2 *Ppp2r2b^{fl/fl}Cd11c^{Gfp-Cre}*) con células de melanoma B16 que expresa OVA. Veinticuatro días después, sacrificamos y analizamos el tumor y los ganglios drenantes.

Observamos una tendencia a que en los ratones cKO, los tumores fueran de menor tamaño que en los ratones WT (cKO 0.7396 ± 0.2423 vs. WT 1.567 ± 0.4203 , $p=0.1$) (**Figura 10A**). Como era esperable, la transferencia de 1×10^6 células CD8 OT-I (específicas para ovoalbúmina, un antígeno expresado por el tumor) redujo el tamaño de los tumores y, como se observa en la **Figura 10B**, se mantuvo la tendencia a que los tumores crecieran menos en los ratones cuyas dendríticas eran deficientes de PP2A B55 β .

Normalizamos los tamaños de los tumores de los diferentes experimentos para poderlos comparar (**Figura 10C**), tomamos el tumor más grande de cada experimento (N=4 con 4 a 6 ratones por experimento de cada genotipo) como el 100% de crecimiento y normalizamos respecto a ese los demás tumores. Encontramos que en 3 de 4 experimentos independientes los tumores más grandes

crecen en ratones WT, y que la tendencia se mantiene en todos los experimentos (cKO 24.93 ± 5.957 vs. WT 42.09 ± 8.098 , $p=0.09$).

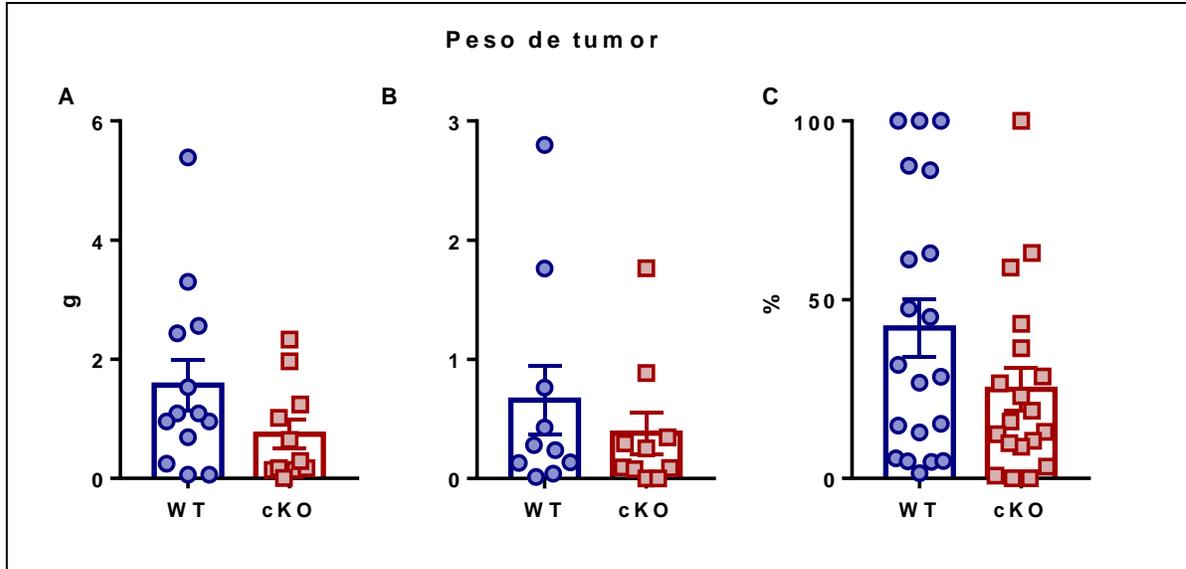


Fig. 10: Peso de los tumores al día del sacrificio. 24 días después de la inoculación de melanoma B16-OVA se obtuvieron los tumores y se pesaron. A) Peso de los tumores de ratones WT y deficientes de B55 β sin transferencia de OT-I $n=4-6$. B) Peso de los tumores de ratones WT y deficientes de B55 β con transferencia de 1×10^6 OT-I $n=4-6$. C) Peso normalizado de los tumores respecto al de mayor peso en cada experimento de los 4 experimentos independientes.

Al mismo tiempo, evaluamos la supervivencia de los ratones inoculados con tumor B16-OVA sin transferencia de OT-I y encontramos que la deficiencia de B55 β aumenta significativamente la supervivencia de los ratones inoculados con tumor (**Figura 11A**). Por otro lado, medimos el crecimiento del tumor en los ratones cada dos días. Observamos que en los ratones cKO la velocidad de crecimiento del tumor era menor (**Figura 11B**). Estos datos sugieren que la expresión PP2A B55 β en las células dendríticas limita la respuesta antitumoral.

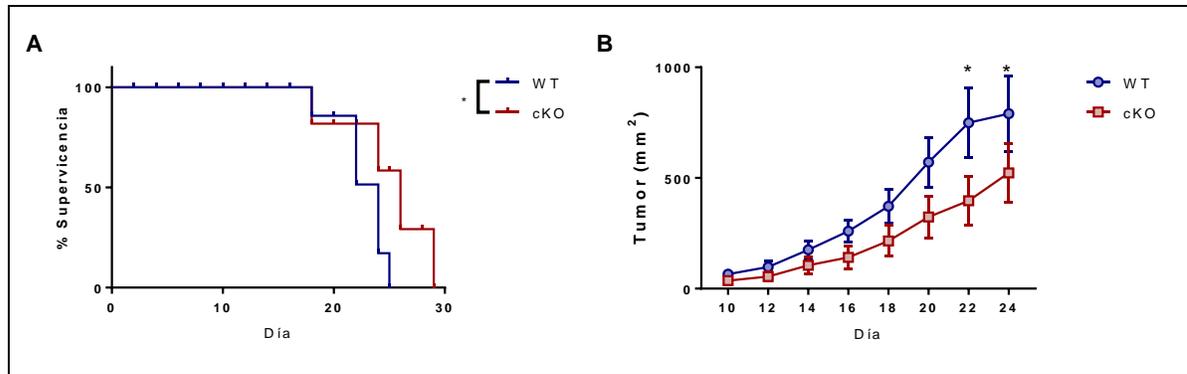


Fig. 11: A) Porcentaje de supervivencia de los ratones inoculados con células B16-OVA sin transferencia de OT-I. B) Curva de crecimiento del tumor en ratones sin transferencia de OT-I medida con un calibrador Vernier electrónico cada 2 días iniciando a los 10 días después de la inoculación de B16-OVA

7.2 PP2A B55 β regula la expresión de CD86 en las células dendríticas que infiltran el tumor

Con el fin de analizar si la ausencia de PP2A B55 β afecta el comportamiento de las células dendríticas intratumorales, sacrificamos a los ratones 24 días después de la inoculación de las células tumorales y obtuvimos los tumores y los ganglios drenantes (dLN). Disgregamos el tumor con Colagenasa IV y DNAsa I, y obtuvimos una suspensión celular que fue analizada por citometría de flujo. Evaluamos la abundancia de la infiltración de células dendríticas en el tumor (**Figura 12**) y el perfil de expresión de moléculas de coestimulación en ambos tejidos (**Figuras 13 y 14**).

No encontramos diferencias cuantitativas en las células dendríticas que infiltran el tumor, tampoco encontramos diferencias en el porcentaje de DCs en el ganglio linfático drenante (**Figura 12**).

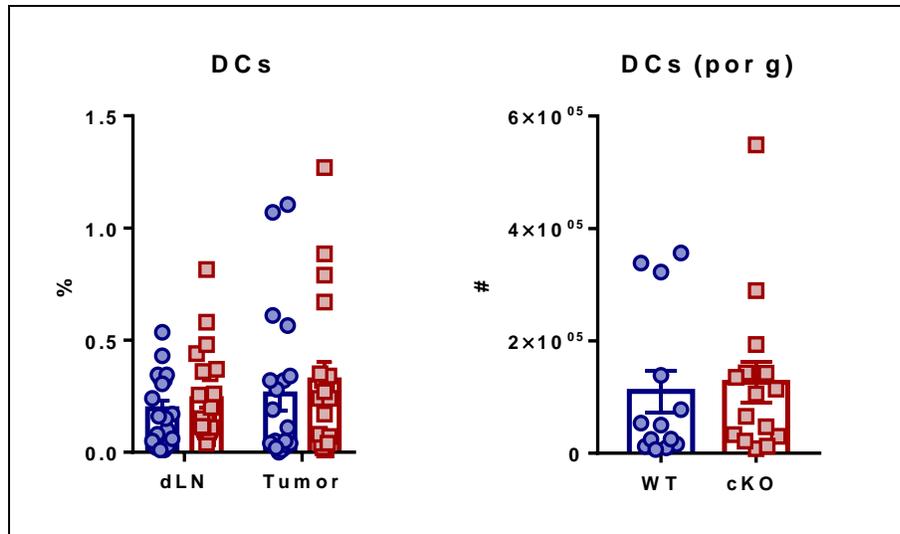


Fig. 12: Porcentaje de células dendríticas en cada tejido (GFP^+MHCII^+) y cuantificación de las células dendríticas por cada gramo de tumor. Las diferencias no son significativas en ningún caso. Resultados de 4 experimentos independientes con una n de 4-6 ratones por experimento. En azul: WT. En rojo: cKO.

Por otro lado, al analizar la expresión de moléculas de coestimulación en las DCs que infiltran el tumor, encontramos un incremento estadísticamente significativo en el porcentaje de DCs deficientes en PP2A B55 β que expresan CD86 (B7-2) (**Figura 13**).

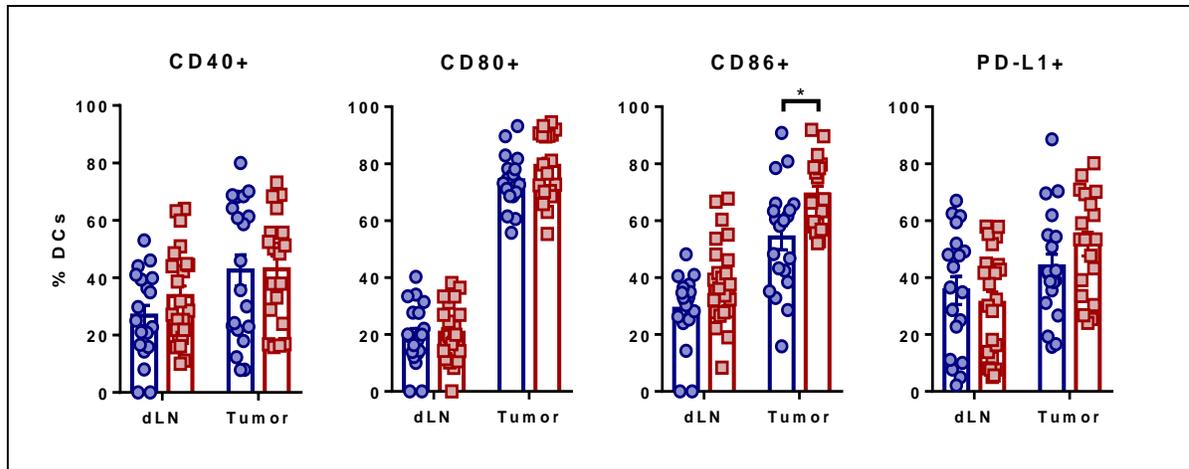


Fig. 13: Porcentaje de células dendríticas que expresan las diferentes moléculas de coestimulación en cada tejido analizado. Resultados de 4 experimentos independientes con una n de 4-6 ratones por experimento. En azul: WT. En rojo: cKO.

Al mismo tiempo, analizamos la intensidad media de fluorescencia (IMF), la cual es indicador de la expresión de cada molécula de coestimulación por célula. Encontramos que la deficiencia de PP2A B55 β promueve un aumento significativo en la expresión de CD86 por célula, en las DCs que infiltran el tumor (**Figura 14**).

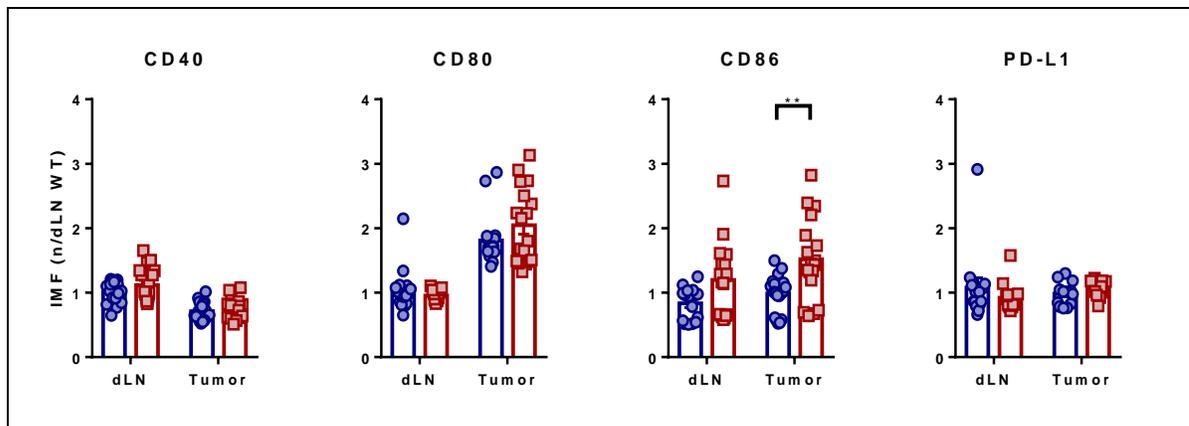


Fig. 14: Intensidad media de fluorescencia (IMF) de cada molécula de coestimulación, normalizada a la IMF promedio del WT en el ganglio drenante. Resultados de 4 experimentos independientes con una n de 4-6 ratones por experimento.

Estos resultados demuestran que PP2A B55 β regula la expresión de CD86 en las células dendríticas cuando se exponen al microambiente tumoral, además que podrían indicar que la capacidad de las DCs para coestimular a linfocitos T está aumentada solo en el tumor, pues no observamos diferencias en la expresión de esta molécula coestimuladora ni de otras en el dLN.

7.3 La expresión PP2A B55 β en las células dendríticas reduce la capacidad de los linfocitos T CD8⁺ de producir IFN- γ

Por otro lado, evaluamos la parte efectora de la respuesta antitumoral, es decir, evaluamos la infiltración de linfocitos en el tumor de melanoma B16. Analizamos las poblaciones de linfocitos T (CD3⁺TCR β ⁺) CD4⁺ y CD8⁺, células NK (CD3⁻NK1.1⁺), linfocitos T reguladores (Tregs: CD4⁺Foxp3⁺) y reguladores naturales (nTregs: CD4⁺Foxp3⁺Helios⁺) (**Figura 15**).

A pesar de la disminución en el crecimiento y peso de los tumores inoculados en ratones cKO, no encontramos diferencias significativas en las poblaciones linfoides que infiltran el tumor que pudiesen explicar este fenómeno (**Figura 15**).

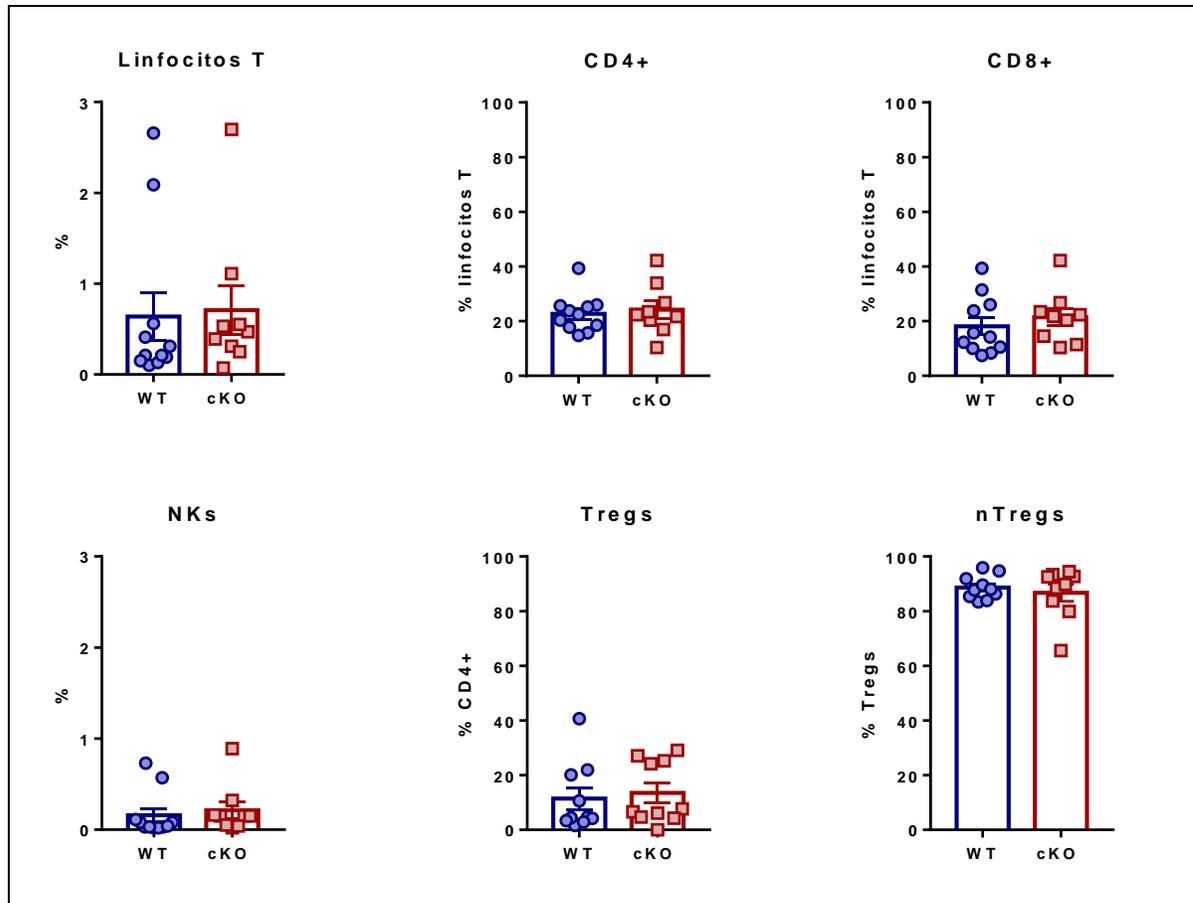


Fig. 15: Análisis de las poblaciones de linfocitos infiltrantes del tumor. Linfocitos T ($CD3+TCR\beta+$) $CD4+$ y $CD8+$, células NK ($CD3-NK1.1+$), linfocitos T reguladores (Tregs: $CD4+Foxp3+$) y reguladores naturales (nTregs: $CD4+Foxp3+Helios+$). $N=2$ con n de 4-6 ratones por experimento.

Una de las citocinas implicadas en la respuesta efectora de los linfocitos T es el $IFN-\gamma$. Para evaluar la producción de $IFN-\gamma$ en respuesta a un antígeno tumoral, transferimos células OT-I a ratones WT y cKO, posteriormente inoculamos con células de melanoma B16 que expresa ovoalbúmina la cual es reconocida por las OT-I. Al día 24 obtuvimos el tumor y analizamos el infiltrado de OT-I, así como la producción de $IFN-\gamma$ al estimular toda la noche con SIINFEKL.

No encontramos diferencias en la infiltración de las células OT-I, sin embargo, observamos una tendencia a que en ratones cKO hubiera una mayor producción de IFN- γ , tanto en frecuencia de células productoras (cKO 5.7 ± 2.07 vs. WT 1.9 ± 0.76 , $p=0.1$), como en producción por célula (cKO 5940 ± 388 vs. WT 5067 ± 554 , $p=0.2$) (Figura 16).

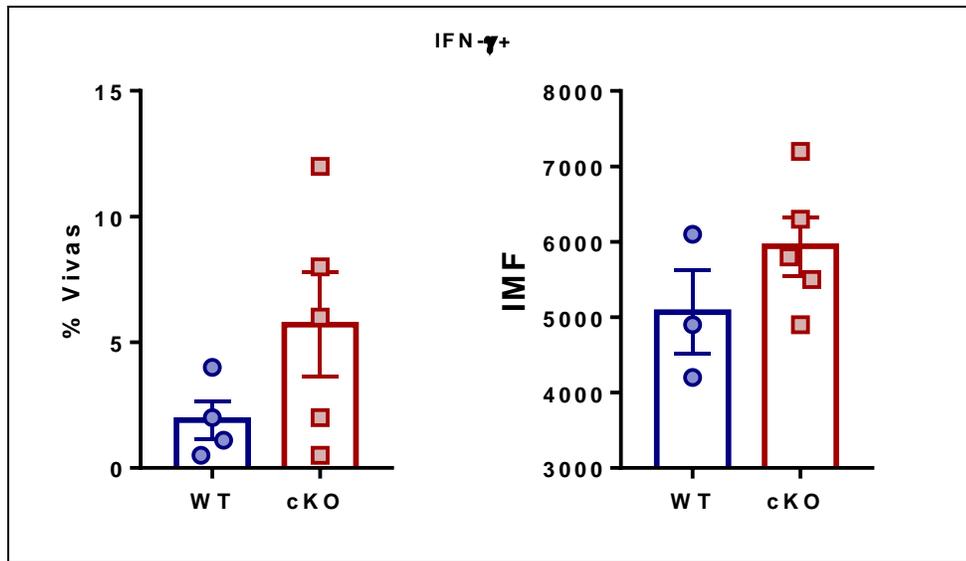


Fig. 16: Análisis de la producción de IFN- γ por los linfocitos T OT-I después de una re-estimulación con SIINFEKL ($1 \mu\text{g/mL}$). $N=2$ con n de 4-6 ratones por experimento.

7.4 PP2A B55 β no está implicada en la diferenciación ni maduración de las células dendríticas derivadas de médula ósea

En base a que nuestros resultados mostraban que PP2A B55 β afecta el fenotipo, y quizá la función, de las células dendríticas en un contexto determinado, probamos si B55 β tiene un efecto adicional en la diferenciación de dichas células en respuesta a citocinas. Con el fin de probar esto, recurrimos a un modelo bien conocido de diferenciación in vitro de células dendríticas a partir de precursores de médula ósea.

Recuperamos la medula ósea de tibias y fémures de ratones WT o cKO y estimulamos la diferenciación de estos precursores con GM-CSF por 8 días con cambios periódicos de medio y citocinas. Al final de la diferenciación analizamos la expresión de GFP el cual es en nuestros ratones un reportero de la expresión de CD11c. Además, evaluamos la expresión de las moléculas de clase II (MHCII) y de coestimulación CD40, CD80, CD86 y PD-L1.

No encontramos diferencias en el porcentaje de células GFP⁺ ni en la IMF de esta proteína (**Figura 17**). Asimismo, al evaluar el porcentaje de BMDCs GFP⁺MHCII⁺ no encontramos diferencias y tampoco en la expresión de moléculas coestimuladoras 8 días después del cultivo de los precursores (**Figura 18**).

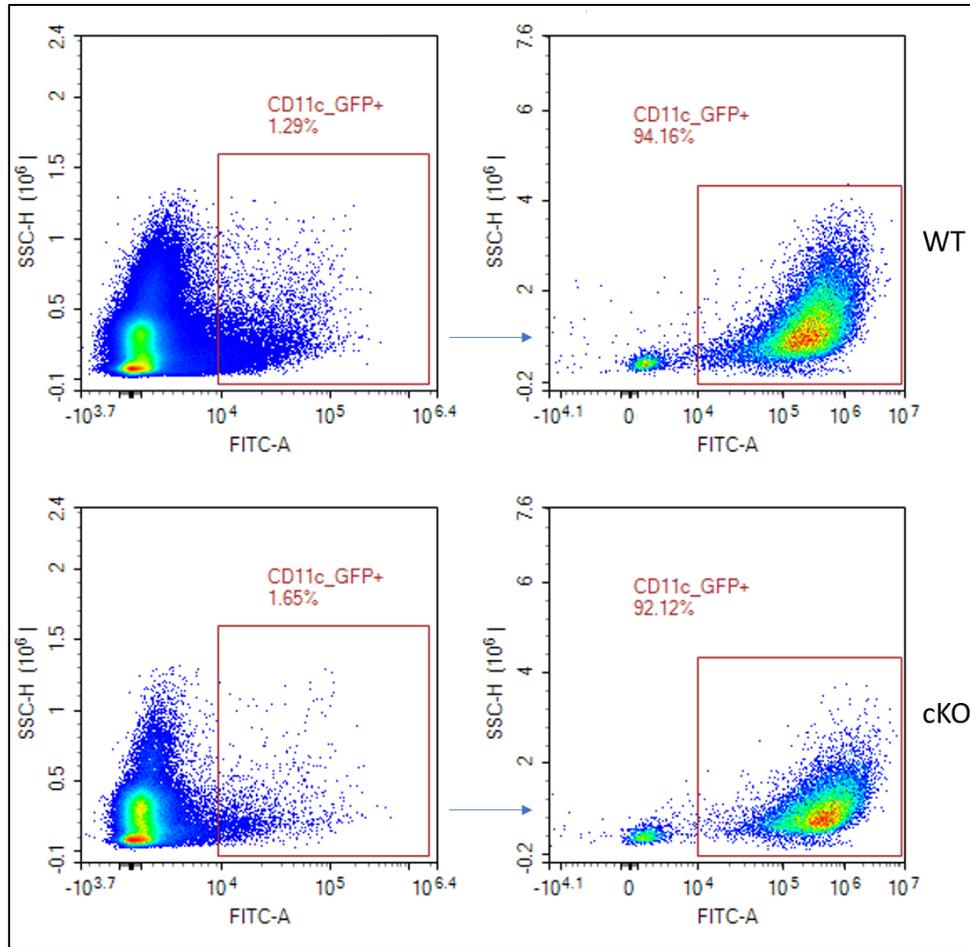


Fig. 17: Citometría representativa de la fluorescencia de GFP (adquirido en el filtro para FITC) de los precursores en la médula ósea (izquierda) y a 8 días de diferenciación con GM-CSF (derecha). N=3 con n de 2-3 ratones por experimento.

Estos resultados sugieren que PP2A B55 β no participa en la diferenciación ni maduración de las células dendríticas mediada por GM-CSF a partir de precursores provenientes de la médula ósea.

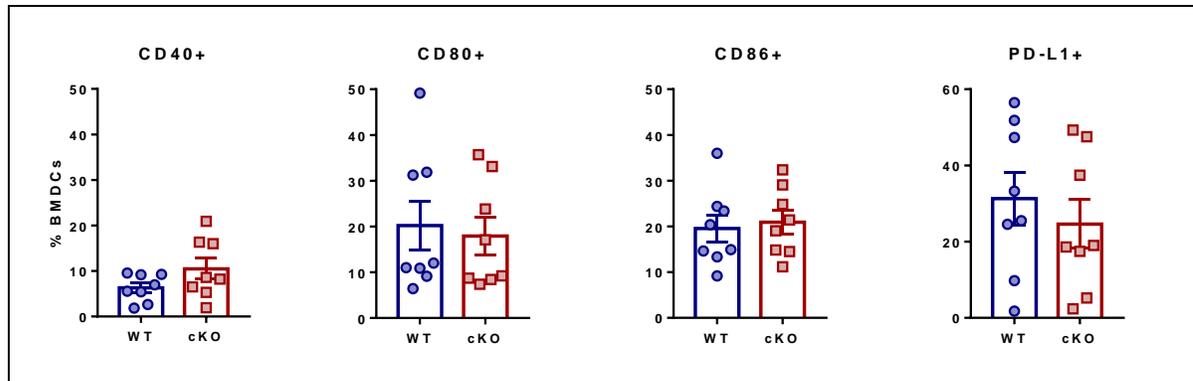


Fig. 18: Porcentaje de expresión de CD40, CD80, CD86 y PD-L1 en BMDCs después de 8 días de diferenciación con GM-CSF a partir de médula ósea. N=3 con n de 2-3 ratones por experimento.

7.5 PP2A B55 β no afecta la activación ni la proliferación de células T antígeno específicas

Para analizar la capacidad presentadora de las BMDCs y determinar si B55 β afecta esta capacidad, co-cultivamos BMDCs con células OT-I marcadas con Cell Trace Violet (CTV), agregamos el péptido reconocido por estas células (SIINFEKL) y analizamos la activación y proliferación de las OT-I 72 horas después. No encontramos diferencias en la proliferación ni en la activación (CD44⁺) de las OT-I en respuesta a la presentación del SIINFEKL (**Figura 19**).

Con estos resultados mostramos que PP2A B55 β no interfiere con la capacidad presentadora de antígenos de las BMDCs por lo que en el *priming* de los linfocitos T no participa esta subunidad.

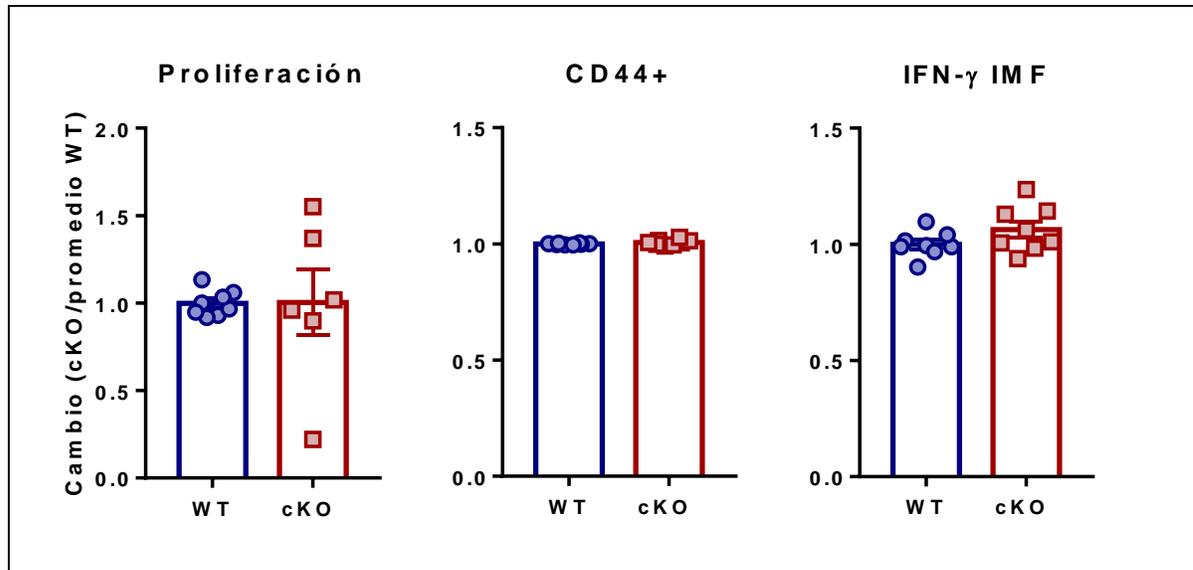


Fig. 19: Análisis de la activación y proliferación de los linfocitos T en presencia de BMDCs y péptido específico. Se graficó el cambio entre el cKO con el promedio de WT. La proliferación fue tomada como el porcentaje de dilución del CTV respecto al pico inicial. N=2 con n de 3-4 ratones por experimento

7.6 PP2A B55β no modifica la tolerización de las BMDCs con IL-10

Una de las citocinas implicadas en el proceso de tolerización de las células dendríticas es la IL-10. En el microambiente tumoral la IL-10 es una de las principales estrategias para la evasión tumoral, por lo que PP2A B55β podría estar participando en este proceso.

Para evaluar la contribución de PP2A B55β en la tolerización de células dendríticas mediada por IL-10, diferenciamos BMDCs WT o cKO con GM-CSF por 8 días y al día 9 estimulamos con IL-10 por 24 horas, posteriormente estimulamos a través de TLR4 con LPS por otras 24 horas y al final analizamos las moléculas de coestimulación mediante citometría de flujo. En la **Figura 20** se muestra el cambio

de la expresión de las coestimuladoras que encontramos entre la estimulación con LPS y el pretratamiento con IL-10.

En estos experimentos no encontramos diferencias cualitativas en la expresión de moléculas de coestimulación ni en la expresión por célula. Indicando que, a las 24 horas, B55 β no contribuye a la tolerización de las células dendríticas por la IL-10.

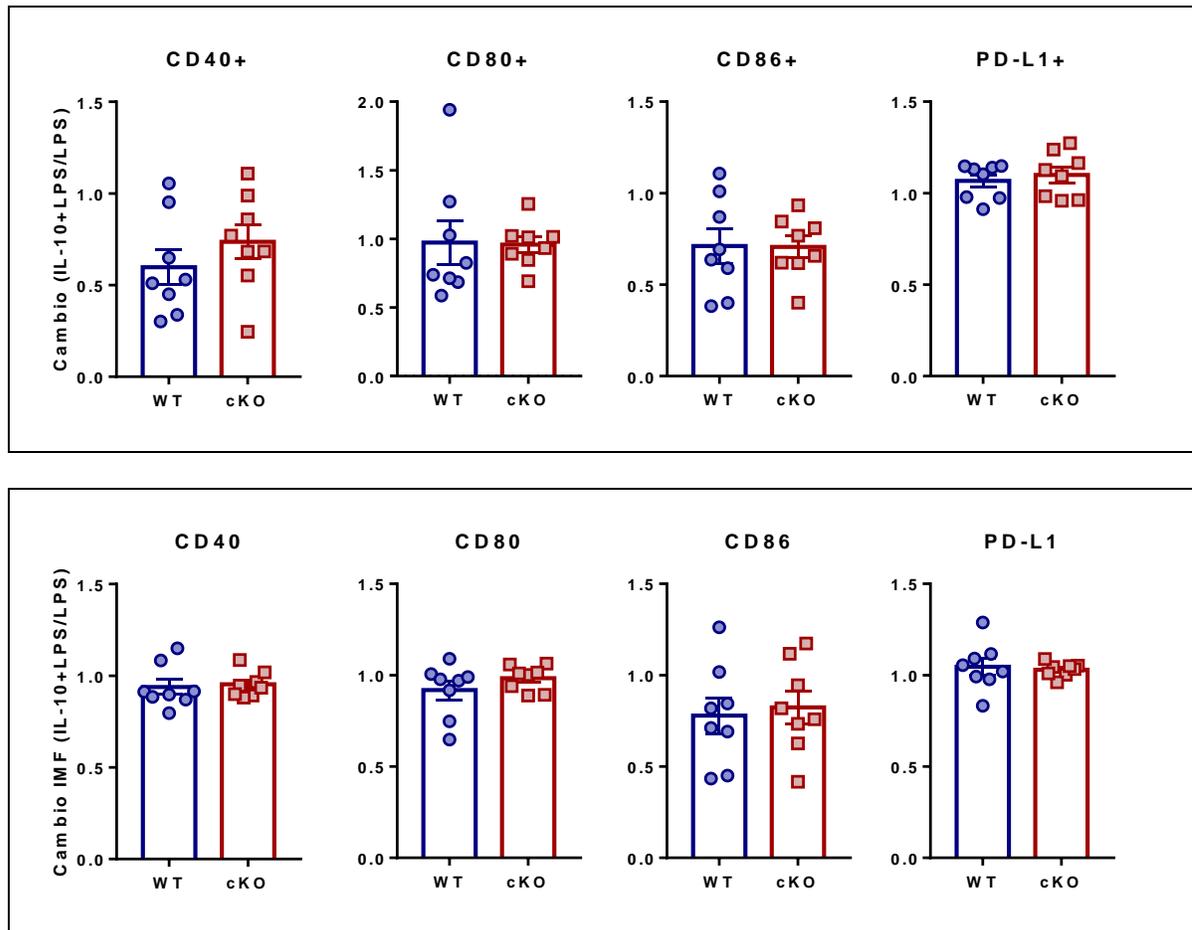


Fig. 20: Cambio en la expresión e IMF de CD40, CD80, CD86 y PD-L1 de BMDCs tratadas con IL-10 (25 ng/mL) por 24 horas y después estimuladas con LPS (100 ng/mL) por 24 horas. N=3 con n de 2-3 ratones por experimento.

7.7 PP2A B55 β modula la activación de la vía de NF κ B en BMDCs

La vía de NF κ B modula la expresión de moléculas de coestimulación en las células presentadoras de antígeno. Se ha visto que la vía PI3K-Akt activa a NF κ B, un mecanismo que se previene con la adición de IL-10. En otras células se ha encontrado que uno de los blancos de PP2A B55 β es Akt, por lo que hipotetizamos que esta fosfatasa podría modular la activación de NF κ B mediante su efecto en Akt.

Para comprobar esta hipótesis, evaluamos la activación de NF κ B en BMDCs estimuladas con IL-10 por 24 horas y activadas con LPS por 5 y 15 minutos. Mediante Western blot analizamos la degradación del inhibidor de NF κ B (I κ B α) como indicador de la activación de esta vía, y normalizamos la cantidad de proteína respecto a la intensidad de α -tubulina. Después normalizamos la degradación respecto al no tratado (NT) de cada genotipo. En la **Figura 21** mostramos un Western blot representativo de la degradación de I κ B α .

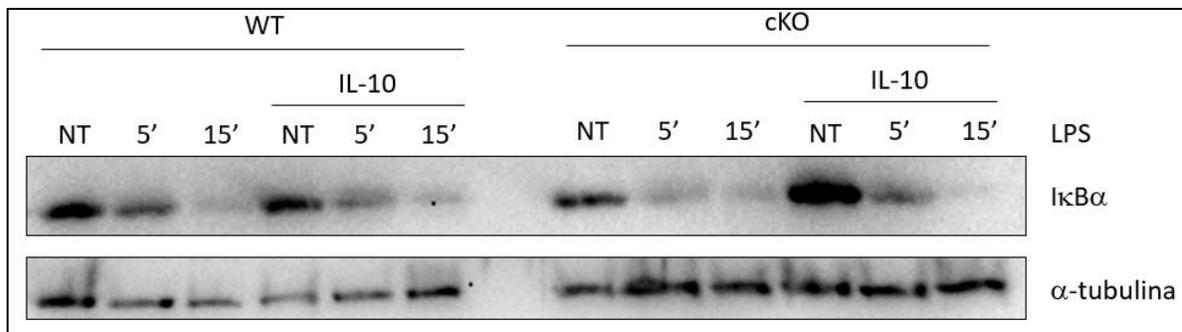


Fig. 21: Imagen representativa de Western blot de la degradación de I κ B α en BMDCs estimuladas con LPS.

Al evaluar la densitometría, encontramos una tendencia a mayor degradación del inhibidor de NF- κ B a los 5 minutos de la activación con LPS en las BMDCs

deficientes de B55 β (cKO 0.289 ± 0.17 vs. WT 0.628 ± 0.18 , $p=0.2$). Sin embargo, este efecto es abatido cuando son pretratadas con IL-10 (**Figura 22**). Al ser NF κ B una vía dependiente de fosforilación y de cinasas, aquí mostramos que PP2A B55 β regula negativamente esta vía cuando se activa TLR4 y que la IL-10 no favorece la función de PP2A en este contexto.

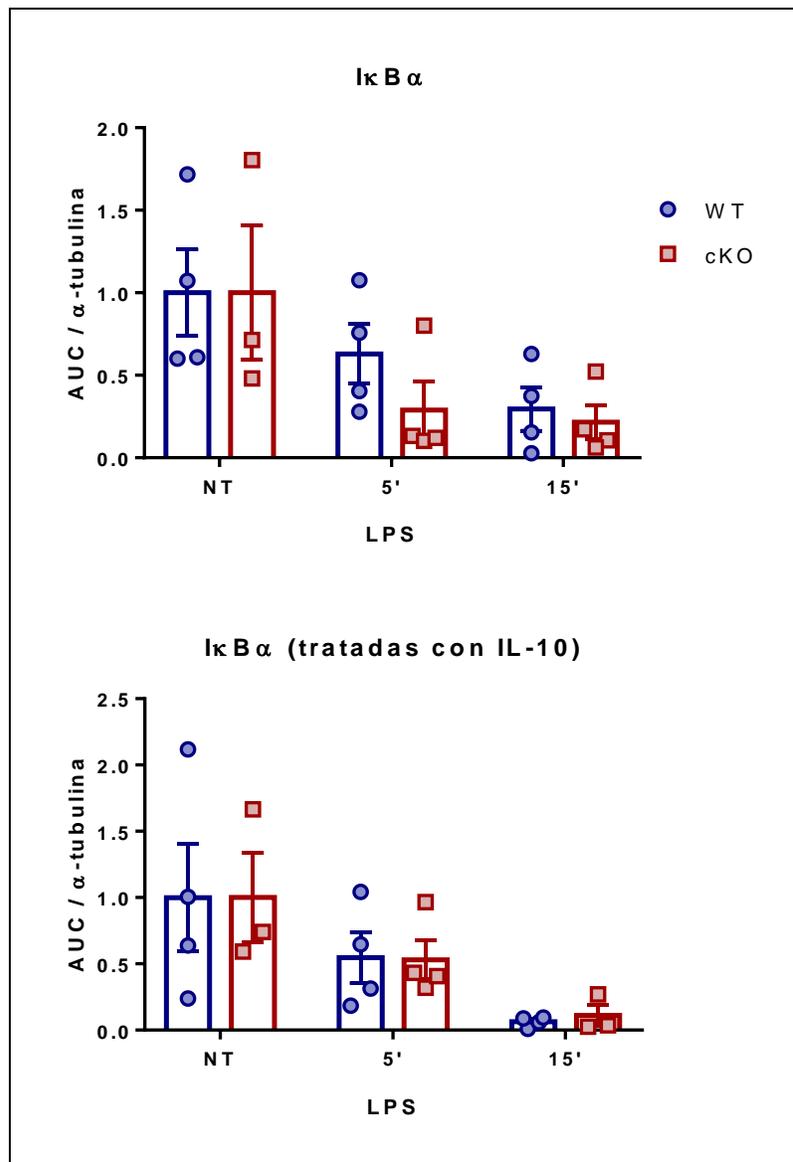


Fig. 22: Análisis densitométrico de los Western blots obtenidos de lisados de BMDCs diferenciadas con GM-CSF y tratadas con IL-10 (25 ng/mL) y estimuladas con 100 ng/mL de LPS a 5 y 15 minutos. N=2 con n de 1-3 ratones por experimento.

VIII. DISCUSIÓN

En este trabajo utilizamos un modelo de deficiencia genética condicional, para evaluar la función de PP2A B55 β en células dendríticas. Observamos que, en un modelo de melanoma, la deficiencia de PP2A B55 β tiene un efecto ligero, pero consistente, de reducir la velocidad de crecimiento tumoral y mejorar la inmunidad ante el tumor. Pudimos asociar el efecto clínico a un incremento significativo en la expresión de la molécula CD86 en células dendríticas. Además, observamos una tendencia a que los linfocitos T CD8⁺ que infiltran el tumor, produjeran más IFN- γ en los ratones con deficiencia condicional de B55 β . En conjunto, estos resultados sugieren que PP2A B55 β modula a la baja la expresión de la molécula de coestimulación CD86 y limita la capacidad de las células dendríticas de activar a células T. El microambiente tumoral es sumamente complejo, por lo que decidimos explorar los efectos de B55 β en la diferenciación y función de las células dendríticas en un sistema reduccionista, más controlado. Con ese fin, aislamos células de médula ósea de ratones silvestres (WT) o con deficiencia condicional de B55 β e indujimos su diferenciación *in vitro* a células dendríticas en presencia del factor estimulante de colonias granulocíticas-macrofágicas (GM-CSF). No observamos ningún efecto. En las células deficientes de B55 β , el proceso de diferenciación transcurría en forma normal. La morfología, la supervivencia, la proliferación y la adquisición de moléculas asociadas a diferenciación y función, incluyendo CD86 y otras moléculas de coestimulación, era similar en las células sin B55 β y en las células

control.

La falta de efecto y, en particular, la inconsistencia entre lo observado *in vivo* e *in vitro* podría ser debido a múltiples factores. En primer lugar, el sistema de recombinación que utilizamos depende de la expresión de un transgén que codifica a la enzima CRE. La transcripción de dicho transgén está controlada por el promotor de *Itgax* (CD11c), por lo que, cuando las células derivadas del ratón con deficiencia condicional llevan a cabo la mayor parte del proceso con los alelos de *Ppp2r2b* intactos. Este concepto está respaldado por la cinética de expresión de la proteína verde fluorescente (GFP) que está incluida en el transgén que codifica CRE, donde su expresión indica transcripción de la recombinasa. Como es esperable, las células de médula ósea no expresan la integrina CD11c y tampoco presentan GFP. Ambas moléculas se inducen varios días después de iniciada la diferenciación *in vitro*, por lo que es esperable que la mayor parte del proceso suceda en presencia de niveles normales de B55 β . Una manera de evitar este problema hubiera sido usar un sistema diferente de expresión de la recombinasa CRE. Por ejemplo, con el transgén asociado al promotor de *Vav1*, que se expresa en células hematopoyéticas⁹ de médula ósea, o a un promotor inducido por tamoxifeno. Estas estrategias hubieran permitido analizar si la diferenciación de células dendríticas a partir de precursores de médula ósea es modulada por B55 β . En segundo lugar, la inconsistencia entre lo observado *in vivo* e *in vitro* podría ser causada por el hecho de que la diferenciación de células dendríticas *in vitro* en respuesta a GM-CSF es un proceso que no es equivalente a la diferenciación *in vivo*^{45,81}. La diferenciación de células dendríticas *in vivo* es un proceso en el que intervienen muchos más factores solubles y contactos

intercelulares que no están presentes en el sistema *in vitro*⁴⁵. Además, las células dendríticas que migran a un tumor están expuestas a una gran variedad de elementos microambientales que alteran su fenotipo y su función⁴⁹. Ese escenario es muy diferente al escenario que se recrea en el sistema *in vitro* que usamos. En algunos experimentos, agregamos IL-10 al cultivo, con el fin de observar si la presencia de esa citocina anti-inflamatoria, abundante en algunos tumores⁵⁵, producía en las células diferenciadas *in vitro*, un efecto similar al observado en el tumor. Esto no fue así. La adición de IL-10 ejerció un efecto predecible, ya que disminuyó la expresión de moléculas de coestimulación, un efecto asociado a menor activación de NF- κ B, pero el proceso no se alteró significativamente por la ausencia de B55 β . Porque los tumores causan cambios importantes en el fenotipo y función de las células dendríticas que los infiltran, el incremento en la expresión de CD86 observado *in vivo* podría ser el resultado de la resistencia a la inhibición de algún factor derivado del tumor⁵⁶. El diseño experimental que elegimos en este trabajo, guiado por una hipótesis, no nos permitió identificar el o los factores derivados del tumor cuyos efectos podrían ser regulados por B55 β . Eso podrá investigarse en trabajos subsecuentes.

En el tumor existen otras células, como los macrófagos, que expresan CD11c⁴. Por esa razón, la deficiencia de B55 β podría no estar limitada a células dendríticas y los efectos que observamos *in vivo* podrían ser resultado combinado de la falta de B55 β en células diferentes a las células dendríticas¹¹.

IX. CONCLUSIONES

1. B55 β regula la expresión de CD86 en las células dendríticas que infiltran los tumores.
2. B55 β limita la capacidad de las células dendríticas de estimular la producción de IFN γ en los linfocitos T CD8 $^+$ infiltrantes del tumor.
3. B55 β no participa en la infiltración ni proliferación de células dendríticas del tumor.
4. B55 β no afecta la diferenciación ni la capacidad presentadora de las células dendríticas en presencia de GM-CSF.

En conjunto, nuestros resultados indican que la subunidad reguladora B55 β de la fosfatasa PP2A podría tener una función como regulador del comportamiento de las células dendríticas en ciertos microambientes como el tumoral.

X. PERSPECTIVAS

- Analizar la actividad de la vía de NF κ B en el modelo in vivo de tumores.
- Probar in vitro otras señales que tolerizan a las células dendríticas como TGF- β .
- Evaluar la producción de moléculas citotóxicas y citocinas en los linfocitos T CD8 del microambiente tumoral como granzima B y TNF- α .
- Analizar otros factores de transcripción que podrían ser regulados por B55 β en las células dendríticas y que controlen exclusivamente la expresión de CD86 en estas células.
- Probar otros estímulos de diferenciación de células dendríticas que también participan en el microambiente tumoral tales como FLT3 e IL-4, a partir de los precursores de la médula ósea o de monocitos.

XI. REFERENCIAS

1. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. H. & Pillai, S. *Cellular and Molecular Immunology*. (Elsevier Health Sciences, 2017).
2. Murphy, K. & Weaver, C. *Janeway's Immunobiology*. (Garland Science, 2016).
3. Mellman, I. Dendritic Cells: Master Regulators of the Immune Response. *Cancer Immunol. Res.* **1**, 145–149 (2013).
4. Collin, M. & Bigley, V. Monocyte, Macrophage, and Dendritic Cell Development: the Human Perspective. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).
5. Balan, S., Saxena, M. & Bhardwaj, N. Dendritic cell subsets and locations. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **348**, 1–68 (2019).
6. Nutt, S. L. & Chopin, M. Transcriptional Networks Driving Dendritic Cell Differentiation and Function. *Immunity* **52**, 942–956 (2020).
7. Macri, C., Pang, E. S., Patton, T. & O'Keeffe, M. Dendritic cell subsets. *Semin. Cell Dev. Biol.* **84**, 11–21 (2018).
8. Segura, E. Review of Mouse and Human Dendritic Cell Subsets. *Methods Mol. Biol.* **1423**, 3–15 (2016).
9. Anderson, D. A. 3rd, Dutertre, C.-A., Ginhoux, F. & Murphy, K. M. Genetic models of human and mouse dendritic cell development and function. *Nat. Rev. Immunol.* (2020) doi:10.1038/s41577-020-00413-x.
10. Sichien, D. *et al.* IRF8 Transcription Factor Controls Survival and Function of Terminally Differentiated Conventional and Plasmacytoid Dendritic Cells, Respectively. *Immunity* **45**, 626–640 (2016).
11. Bosteels, C. *et al.* Inflammatory Type 2 cDCs Acquire Features of cDC1s and Macrophages to Orchestrate Immunity to Respiratory Virus Infection. *Immunity* 1–18 (2020) doi:10.1016/j.immuni.2020.04.005.
12. McDaniel, M. M., Kottyan, L. C., Singh, H. & Pasare, C. Suppression of Inflammasome Activation by IRF8 and IRF4 in cDCs Is Critical for T Cell Priming. *Cell Rep.* **31**, (2020).
13. Reis e Sousa, C. Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 476–483 (2006).
14. Gardner, A. & Ruffell, B. Dendritic Cells and Cancer Immunity. *Trends Immunol.* **37**, 855–865 (2016).
15. 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).
16. Greenwald, R. J., Freeman, G. J. & Sharpe, A. H. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 515–548 (2005).

17. Taylor, P. A. *et al.* B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions [corrections]. *J. Immunol.* **172**, 34–39 (2004).
18. Rowshanravan, B., Halliday, N. & Sansom, D. M. CTLA-4: a moving target in immunotherapy. *Blood* **131**, 58–67 (2018).
19. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 227–242 (2013).
20. Lohr, J., Knoechel, B., Jiang, S., Sharpe, A. H. & Abbas, A. K. The inhibitory function of B7 costimulators in T cell responses to foreign and self-antigens. *Nat. Immunol.* **4**, 664–669 (2003).
21. Munn, D. H., Sharma, M. D. & Mellor, A. L. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J. Immunol.* **172**, 4100–4110 (2004).
22. Grohmann, U. *et al.* CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* **3**, 1097–1101 (2002).
23. Fallarino, F. *et al.* Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**, 1206–1212 (2003).
24. O’Keefe, G. M., Nguyen, V. T. & Benveniste, E. N. Regulation and function of class II major histocompatibility complex, CD40, and B7 expression in macrophages and microglia: Implications in neurological diseases. *J. Neurovirol.* **8**, 496–512 (2002).
25. Zou, G.-M. & Hu, W.-Y. LIGHT regulates CD86 expression on dendritic cells through NF-kappaB, but not JNK/AP-1 signal transduction pathway. *J. Cell. Physiol.* **205**, 437–443 (2005).
26. Zhao, J., Freeman, G. J., Gray, G. S., Nadler, L. M. & Glimcher, L. H. A cell type-specific enhancer in the human B7.1 gene regulated by NF-kappaB. *J. Exp. Med.* **183**, 777–789 (1996).
27. Fong, T. C., Wu, Y. & Kipps, T. J. Identification of a promoter element that regulates tissue-specific expression of the human CD80 (B7.1) gene. *J. Immunol.* **157**, 4442–4450 (1996).
28. Chand Dakal, T. *et al.* Mechanistic basis of co-stimulatory CD40-CD40L ligation mediated regulation of immune responses in cancer and autoimmune disorders. *Immunobiology* **225**, 151899 (2020).
29. Kinter, A. L. *et al.* The common gamma-chain cytokines IL-2, IL-7, IL-15, and IL-21 induce the expression of programmed death-1 and its ligands. *J. Immunol.* **181**, 6738–6746 (2008).
30. Okazaki, T., Chikuma, S., Iwai, Y., Fagarasan, S. & Honjo, T. A rheostat for immune responses: the unique properties of PD-1 and their advantages for clinical application. *Nat. Immunol.* **14**, 1212–1218 (2013).
31. Barber, D. L. *et al.* Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* **439**, 682–687 (2006).
32. Yamazaki, T. *et al.* Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and

- APC. *J. Immunol.* **169**, 5538–5545 (2002).
33. Chemnitz, J. M., Parry, R. V, Nichols, K. E., June, C. H. & Riley, J. L. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J. Immunol.* **173**, 945–954 (2004).
 34. Sheppard, K.-A. *et al.* PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ . *FEBS Lett.* **574**, 37–41 (2004).
 35. Patsoukis, N., Li, L., Sari, D., Petkova, V. & Boussiotis, V. A. PD-1 increases PTEN phosphatase activity while decreasing PTEN protein stability by inhibiting casein kinase 2. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 3091–3098 (2013).
 36. Patsoukis, N. *et al.* Selective effects of PD-1 on Akt and Ras pathways regulate molecular components of the cell cycle and inhibit T cell proliferation. *Sci. Signal.* **5**, ra46 (2012).
 37. Wculek, S. K. *et al.* Dendritic cells in cancer immunology and immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **20**, 7–24 (2020).
 38. Nagai, S. & Azuma, M. The CD28-B7 Family of Co-signaling Molecules. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1189**, 25–51 (2019).
 39. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
 40. 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).
 41. Theisen, D. J. *et al.* WDFY4 is required for cross-presentation in response to viral and tumor antigens. *Science* (80-.). **362**, 694–699 (2018).
 42. Ferris, S. T. *et al.* cDC1 prime and are licensed by CD4+ T cells to induce anti-tumour immunity. *Nature* **584**, 624–629 (2020).
 43. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**, 503–510 (2008).
 44. Sánchez-Paulete, A. R. *et al.* Antigen cross-presentation and T-cell cross-priming in cancer immunology and immunotherapy. *Ann. Oncol.* **28**, xii44–xii55 (2017).
 45. Salmon, H. *et al.* Expansion and Activation of CD103+ Dendritic Cell Progenitors at the Tumor Site Enhances Tumor Responses to Therapeutic PD-L1 and BRAF Inhibition. *Immunity* **44**, 924–938 (2016).
 46. Nagarsheth, N., Wicha, M. S. & Zou, W. Chemokines in the cancer microenvironment and their relevance in cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **17**, 559–572 (2017).
 47. Zelenay, S. *et al.* Cyclooxygenase-Dependent Tumor Growth through Evasion of Immunity. *Cell* **162**, 1257–1270 (2015).
 48. Böttcher, J. P. *et al.* NK Cells Stimulate Recruitment of cDC1 into the Tumor Microenvironment Promoting Cancer Immune Control. *Cell* **172**, 1022-1037.e14 (2018).

49. Böttcher, J. P. & Reis e Sousa, C. The Role of Type 1 Conventional Dendritic Cells in Cancer Immunity. *Trends in cancer* **4**, 784–792 (2018).
50. Curtsinger, J. M. & Mescher, M. F. Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. *Curr. Opin. Immunol.* **22**, 333–340 (2010).
51. Spranger, S., Dai, D., Horton, B. & Gajewski, T. F. Tumor-Residing Batf3 Dendritic Cells Are Required for Effector T Cell Trafficking and Adoptive T Cell Therapy. *Cancer Cell* **31**, 711-723.e4 (2017).
52. Steinman, R. M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future. *Annu. Rev. Immunol.* **30**, 1–22 (2012).
53. Munn, D. H. & Mellor, A. L. IDO in the Tumor Microenvironment: Inflammation, Counter-Regulation, and Tolerance. *Trends Immunol.* **37**, 193–207 (2016).
54. Tang, M. *et al.* Toll-like Receptor 2 Activation Promotes Tumor Dendritic Cell Dysfunction by Regulating IL-6 and IL-10 Receptor Signaling. *Cell Rep.* **13**, 2851–2864 (2015).
55. Ruffell, B. *et al.* Macrophage IL-10 blocks CD8+ T cell-dependent responses to chemotherapy by suppressing IL-12 expression in intratumoral dendritic cells. *Cancer Cell* **26**, 623–637 (2014).
56. Fucikova, J., Palova-Jelinkova, L., Bartunkova, J. & Spisek, R. Induction of Tolerance and Immunity by Dendritic Cells: Mechanisms and Clinical Applications. *Front. Immunol.* **10**, 2393 (2019).
57. Goguet-Rubio, P. *et al.* PP2A-B55 Holoenzyme Regulation and Cancer. *Biomolecules* **10**, (2020).
58. Reynhout, S. & Janssens, V. Physiologic functions of PP2A: Lessons from genetically modified mice. *Biochim. Biophys. acta. Mol. cell Res.* **1866**, 31–50 (2019).
59. Clark, A. R. & Ohlmeyer, M. Protein phosphatase 2A as a therapeutic target in inflammation and neurodegeneration. *Pharmacol. Ther.* **201**, 181–201 (2019).
60. Wlodarchak, N. & Xing, Y. PP2A as a master regulator of the cell cycle. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **51**, 162–184 (2016).
61. Fowle, H., Zhao, Z. & Graña, X. Chapter Two - PP2A holoenzymes, substrate specificity driving cellular functions and deregulation in cancer. in (eds. Tew, K. D. & Fisher, P. B. B. T.-A. in C. R.) vol. 144 55–93 (Academic Press, 2019).
62. Flores-Mendoza, G., Sansón, S. P., Rodríguez-Castro, S., Crispín, J. C. & Rosetti, F. Mechanisms of Tissue Injury in Lupus Nephritis. *Trends Mol. Med.* **24**, 364–378 (2018).
63. Katsiari, C. G., Kyttaris, V. C., Juang, Y.-T. & Tsokos, G. C. Protein phosphatase 2A is a negative regulator of IL-2 production in patients with systemic lupus erythematosus. *J. Clin. Invest.* **115**, 3193–3204 (2005).
64. Meidan, E. *et al.* Serine/threonine phosphatase PP2A is essential for optimal B cell function. *JCI insight* **5**, (2020).
65. Apostolidis, S. A. *et al.* Phosphatase PP2A is requisite for the function of regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **17**, 556–564 (2016).

66. Rodríguez-Rodríguez, N. *et al.* Protein phosphatase 2A B55 β limits CD8+ T cell lifespan following cytokine withdrawal. *J. Clin. Invest.* **130**, 5989–6004 (2020).
67. Madera-Salcedo, I. K. *et al.* PPP2R2B hypermethylation causes acquired apoptosis deficiency in systemic autoimmune diseases. *JCI Insight* **4**, (2019).
68. Crispín, J. C., Apostolidis, S. A., Finnell, M. I. & Tsokos, G. C. Induction of PP2A B β , a regulator of IL-2 deprivation-induced T-cell apoptosis, is deficient in systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 12443 LP – 12448 (2011).
69. Kurimchak, A. & Graña, X. PP2A Counterbalances Phosphorylation of pRB and Mitotic Proteins by Multiple CDKs: Potential Implications for PP2A Disruption in Cancer. *Genes Cancer* **3**, 739–748 (2012).
70. Hahn, W. C. & Weinberg, R. A. Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2**, 331–341 (2002).
71. Tan, J. *et al.* B55 β -associated PP2A complex controls PDK1-directed myc signaling and modulates rapamycin sensitivity in colorectal cancer. *Cancer Cell* **18**, 459–471 (2010).
72. O’Neill, L. A. J., Golenbock, D. & Bowie, A. G. The history of Toll-like receptors — redefining innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 453–460 (2013).
73. Mitchell, S., Vargas, J. & Hoffmann, A. Signaling via the NF κ B system. *WIREs Syst. Biol. Med.* **8**, 227–241 (2016).
74. Swingle, M., Ni, L. & Honkanen, R. E. Small-molecule inhibitors of ser/thr protein phosphatases: specificity, use and common forms of abuse. *Methods Mol. Biol.* **365**, 23–38 (2007).
75. Tsuchiya, Y. *et al.* Distinct B subunits of PP2A regulate the NF- κ B signalling pathway through dephosphorylation of IKK β , I κ B α and RelA. *FEBS Lett.* **591**, 4083–4094 (2017).
76. Breuer, R. *et al.* The protein phosphatase 2A regulatory subunit B56 γ mediates suppression of T cell receptor (TCR)-induced nuclear factor- κ B (NF- κ B) activity. *J. Biol. Chem.* **289**, 14996–15004 (2014).
77. He, Z., Du, L., Ke, Y., Wen, C. & Zhang, Y. PP2A α of Alveolar Macrophages Is a Novel Protective Factor for LPS-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. *Inflammation* **42**, 1004–1014 (2019).
78. Long, L. *et al.* Recruitment of Phosphatase PP2A by RACK1 Adaptor Protein Deactivates Transcription Factor IRF3 and Limits Type I Interferon Signaling. *Immunity* **40**, 515–529 (2014).
79. Bhattacharyya, S. *et al.* Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of I κ B kinase activity. *Blood* **104**, 1100–1109 (2004).
80. SUZUKI, A. *et al.* Regulation of NF- κ B Signalling Through the PR55 β -RelA Interaction in Osteoblasts. *In Vivo (Brooklyn)*. **34**, 601–608 (2020).
81. Broz, M. L. *et al.* Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity. *Cancer Cell* **26**, 638–652 (2014).

