Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Rol del sistema Mica-NKG2D en la inmunovigilancia y en el escape tumoral

Fuertes, Mercedes Beatriz

2008

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

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

Cita tipo APA:
Fuertes, Mercedes Beatriz. (2008). Rol del sistema Mica-NKG2D en la inmunovigilancia y en el escape tumoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Fuertes, Mercedes Beatriz. "Rol del sistema Mica-NKG2D en la inmunovigilancia y en el escape tumoral". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

ROL DEL SISTEMA MICA-NKG2D EN LA INMUNOVIGILANCIA Y EN EL ESCAPE TUMORAL

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Mercedes Beatriz Fuertes

Director de tesis: Dr. Norberto Walter Zwirner

Consejero de Estudios: Dr Eduardo Arzt

Lugar de trabajo: Laboratorio de Inmunogenética- Hospital de Clínicas

Laboratorio de Inmunopatología- Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME)- CONICET

Buenos Aires, 2008

RESUMEN

Rol del sistema MICA-NKG2D en la inmunovigilancia y en el escape tumoral

La mayoría de los tumores crece en huéspedes inmunocompetentes a pesar de que expresan ligandos de NKG2D (NKG2DLs) como MICA (*MHC class I-chain related gene A*) y MICB. Sin embargo, su participación en el escape tumoral no ha sido totalmente dilucidada. En esta Tesis demostramos que numerosos melanomas humanos (líneas celulares y metástasis aisladas de pacientes) no expresan MICA en la superficie pero poseen depósitos intracelulares de este NKG2DL. Observamos correlación entre la citotoxicidad mediada por células NK y la relación entre NKG2DLs y moléculas de clase I del HLA, pero no con los niveles de MICA en superficie celular. La sobre-expresión de MICA por transfección restauró la expresión en superficie y resultó en un aumento en la citotoxicidad y la secreción de IFN-γ por células NK. Los melanomas que sobre-expresan MICA exhibieron un crecimiento retardado respecto de los controles en ratones atímicos (*nude*) debido a la inducción de apoptosis mediada por células NK *in vivo.* MICA fue retenida en el retículo endoplasmático (RE) aparentemente debido a la acumulación de formas inmaduras de MICA (sensibles a endoH), transporte retrógrado al citoplasma y degradación en el proteosoma. Por lo tanto la retención intracelular de MICA por acumulación de formas inmaduras del polipéptido en el RE constituye un novedoso mecanismo de escape tumoral que confiere privilegio inmunológico previniendo los mecanismos efectores anti-tumorales de las células NK. Sin embargo, este fenotipo puede ser revertido mediante estrategias de transfección que induzcan un aumento en la expresión de MICA. Estos resultados tienen importancia potencial para el desarrollo de estrategias de inmunoterapia en seres humanos empleando a MICA como blanco molecular.

Palabras clave: células NK – melanoma - escape tumoral - vigilancia inmunológica - NKG2D - MICA.

ABSTRACT

Role of the MICA-NKG2D system in immunosurveillance and tumor escape

Most tumors grow in immunocompetent hosts despite expressing NKG2D ligands (NKG2DLs) such as the *MHC class I-chain related genes A* and *B* (MICA and B). However, their participation in tumor cell evasion is still not completely understood. Here we demonstrate that several human melanomas (cell lines and freshly isolated metastases) do not express MICA on the cell surface but have intracellular deposits of this NKG2DL. Susceptibility to NK cell-mediated cytotoxicity correlated with the ratio of NKG2DLs to HLA class I molecules but not with the amounts of MICA on their cell surface. Transfection-mediated overexpression of MICA restored cell surface expression and resulted in an increased *in vitro* cytotoxicity and IFN-γ secretion by human NK cells. In xenografted *nude* mice, these melanomas exhibited a delayed growth and extensive *in vivo* apoptosis. Retardation of tumor growth was due to NK cell-mediated effector functions against MICA-transfected tumors because this effect was not observed in NK cell-depleted mice. Also, mouse NK cells killed MICA-overexpressing melanomas *in vitro*. MICA was retained in the endoplasmic reticulum which appeared to be due to an accumulation of endoH-sensitive (immature) forms of MICA, retrograde transport to the cytoplasm and degradation by the proteasome. Hence, our study identified a novel strategy developed by melanoma cells to evade NK-cell mediated immune surveillance based on the intracellular sequestration of immature forms of MICA in the endoplasmic reticulum and demonstrates that this tumor immune escape strategy can be overcome by gene therapy approaches aimed at over-expressing MICA on tumor cells.

Key words: NK cells - melanoma - tumor escape - immunosurveillance - NKG2D - MICA.

INDICE

ABREVIATURAS 3

INTRODUCCION 4
1. Tumores 4
2. Células NK 10
3. Receptores de células NK 13
3.1. Receptores específicos de moléculas clase I del HLA 14
3.1.1. Complejo de receptores leucocitarios (LRC) 15
3.1.1.a. Receptores KIR 15
3.1.1.b. Receptores ILT (o LIR) 15
3.1.2. Complejo de receptores de citotoxicidad natural (NKC): CD94/NKG2 16
3.2. Receptores no específicos de moléculas de clase I del HLA 17
3.2.1 Receptores asociados a ITAM 17
3.2.1.a. CD16 (FcγRIII) 17
3.2.1.b. NCR 17
3.2.2. Receptores no asociados a ITAM 18
3.2.2.a. NKp80 18
3.2.2.b. NKG2D 18
4. Ligandos NKG2D 19
5.Familia de genes MIC 20
6. Genética y Genómica de MICA 21
7. Transcripto y proteína de MICA 21
8. Polimorfismo 22
9. Patrón de expresión y modulación de MICA 23
10. MICA en tumores 25
11. NKG2D e inmunidad anti-tumoral 26
12. Mecanismos de escape que involucran al sistema NKG2D-NKG2DL 28

OBJETIVOS 31

METRIALES Y METODOS 32
1. Líneas celulares utilizadas 32
2. Muestras humanas 32
3. Reactivos 33
4. Extracción de proteínas 33
4.1. Lisados proteicos totales 33
4.2 Fracciones subcelulares 34
4.3. Cuantificación de proteínas 34
5. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) 34
5.1 Anticuerpos para *Western Blot* 36
6. Citometría de Flujo 36
6.1. Inmunomarcación de superficie 36
6.2. Cuantificación de la fluorescencia 37
6.3. Anticuerpos para inmunomarcación 37
7 Aislamiento de células NK 38
8. Ensayos de citotoxicidad 38

9. ELISA de captura para detección de 39
9.1. MICA 39
9.2. TGF-β 40
9.3. IFN-γ 40
10. Modulación de la expresión de MICA por TGF-β 40
11. Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal 40
12. Microscopía electrónica 41
13. Transfecciones 42
14. Ensayo de proliferación por MTS 43
15. Experimentos *in vivo* de desafío con tumores 43
16. Ensayo de apoptosis *in vivo* 44
17. Depleción de células NK *in vivo* en ratones *nude* 44
18. Secuenciación de MICA 44
19. Digestiones con EndoH 45
20. Análisis estadístico de los datos 45

RESULTADOS 46
1. Expresión de ligandos de NKG2D en melanomas humanos 46
2. Impacto funcional sobre la citotoxicidad mediada por células NK 51
3. Restauración de la expresión de MICA en superficie celular 53
4. Consecuencias funcionales *in vivo* 56
5. Mecanismo de escape 61
5.1 Reciclaje de MICA 61
5.2 Clivaje de MICA de la superficie 61
5.3 Rol del TGF-β 62
5.4 Localización intracelular de MICA 63
5.5 Estructura primaria del polipéptido de MICA 66
5.6 Rol de calnexina 67
5.7 Retrotranslocación de MICA al citoplasma 78
5.8 Maduración de la proteína MICA en el RE 70
5.9 Degradación de MICA en el proteosoma 71

DISCUSION 74

CONCLUSIONES 88

BIBLIOGRAFIA 90

ABREVIATURAS

ABC. Anticuerpos unidos por célula

Ac: Anticuerpo

AcMo: Anticuerpo monoclonal

CCDA: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

CDs: Células dendríticas

CI: Control de isotipo

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CMV: Citomegalovirus

CN: Calnexina

DN: Doble negativo

EGFP: Proteína fluorescente verde

GPI: Glicosilfosfoinositol

HLA: Antígeno leucocitario humano

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

ITAM: motivo de activación basado en tirosina

ITIM: motivo de inhibición basado en tirosina

MICA/B: MHC class I chain related A y B

Mr: Masa molecular relativa

NK: natural killer

NKG2DL: Ligando de NKG2D

RE: Retículo endoplasmático

sMICA: MICA soluble

ULPBs: UL16 binding proteins

INTRODUCCION

1. Tumores

Diversas líneas de evidencia indican que la tumorigénesis es un proceso que involucra múltiples pasos. Cada uno de estos pasos se produce por un cambio genético que conduce a la transformación progresiva de una célula normal en una célula neoplásica. Durante este proceso darwiniano que finalmente conduce al desarrollo de los tumores cada cambio genético sucesivo confiere algún tipo de ventaja adicional para el crecimiento del tumor y eventualmente el establecimiento de metástasis (1).

Se ha sugerido que existen 6 alteraciones esenciales en la fisiología de las células que colectivamente permiten la transformación tumoral. Estas alteraciones provocan:

- Autosuficiencia en la producción de factores de crecimiento
- Pérdida de respuesta a señales inhibitorias del crecimiento celular
- Evasión de o resistencia a la apoptosis
- Adquisición de potencial replicativo ilimitado
- Promoción de angiogenesis sostenida
- Invasión de tejidos (capacidad metastásica)

Por cada uno de los 100 tipos distintos de cáncer que se han descripto pueden existir además distintos subtipos de tumores. El cáncer de piel es el tercer tipo más frecuente de cáncer en humanos. Las formas más comunes de este tipo de cáncer son el carcinoma celular basal, el carcinoma celular escamoso y el melanoma, la forma más peligrosa y la que genera mayor número de muertes y que año tras año aumenta su incidencia en los países Occidentales. El melanoma resulta de la transformación maligna de los melanocitos, células pigmentadas especializadas que se encuentran predominantemente en la piel y los ojos. En la piel, estas células residen en la membrana basal de la epidermis y su homeostasis es regulada por queratinocitos epidermales. Diversos estímulos permiten a los melanocitos escapar a la regulación mediada por los queratinocitos y proliferar dando lugar a nevos o lunares. La proliferación de los melanocitos puede estar restringida a la epidermis (nevos de unión), a la dermis (nevo dérmico) o a ambas (nevo compuesto). Los nevos son por lo general benignos pero pueden progresar a la fase de crecimiento radial (RGP), una lesión intraepidermal que involucra algo de

microinvasión local de la dermis. Las células RGP pueden progresar a la fase de crecimiento vertical (VGP), que es un estadío más peligroso en el que las células adquieren potencial meastásico, con nódulos o nidos de células que invaden la dérmis (**Figura 1**). No todos los melanomas atraviesan cada una de estas fases, y tanto las RGP como las VGP pueden desarrollarse directamente a partir de melanocitos aislados o nevos y ambos pueden progresar directamente a un melanoma maligno metastático (2).

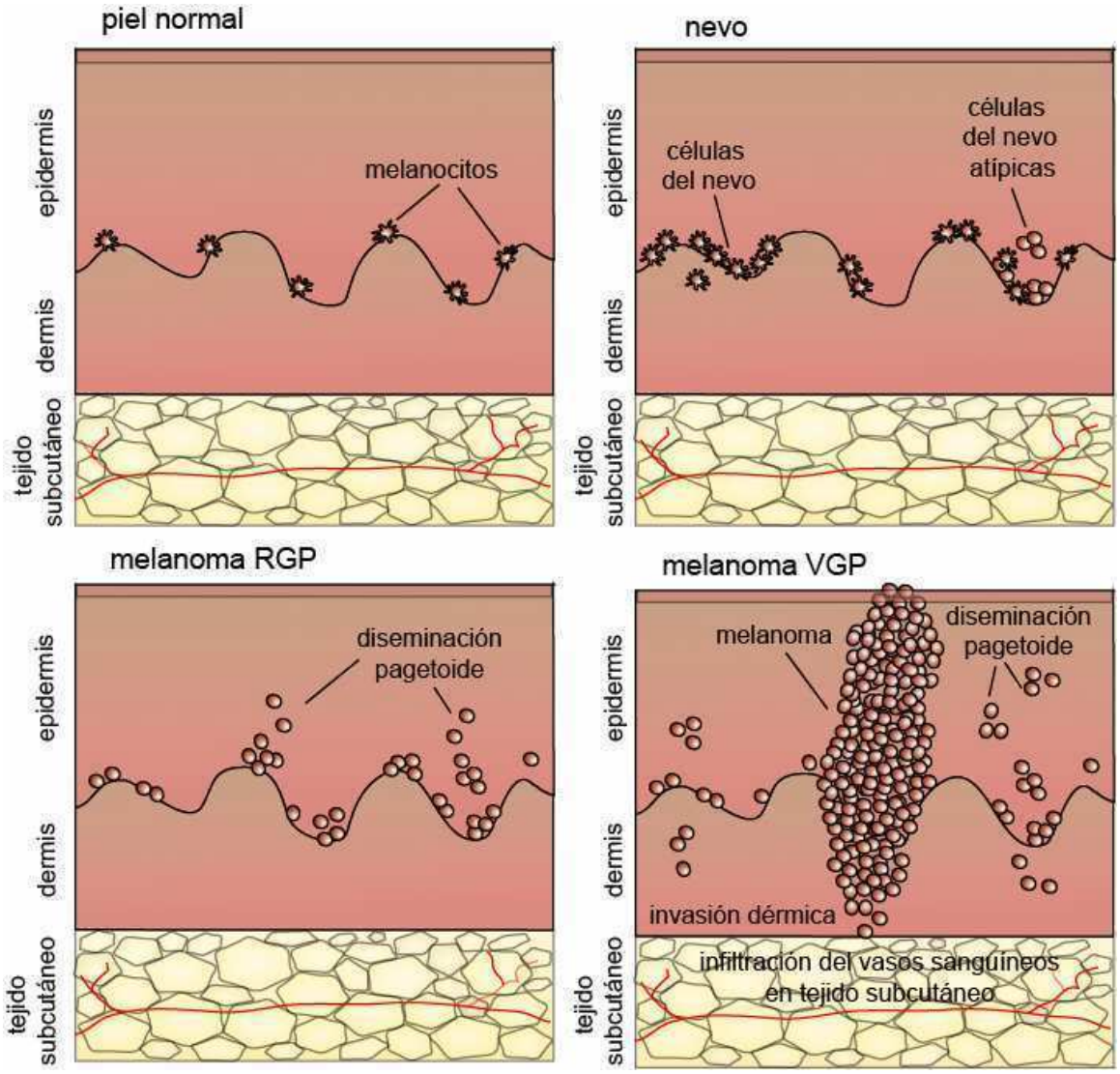


Figura 1: Progresión de la transformación del melanocito. La piel normal muestra una distribución pareja en la membrana basal de la epidermis de melanocitos con prolongaciones dendríticas. En los estadíos tempranos los nevos están formados mayoritariamente por melanocitos benignos con prolongaciones, pero algunos nevos son displásicos y están formados por melanocitos morfológicamente atípicos. Los melanomas en fase de crecimiento radial (RGP) son considerados como el estadío maligno primario. Los melanomas en fase de crecimiento vertical (VGP) poseen potencial metastático ya que son capaces de infiltrar al sistema linfático y vascular. La diseminación pagetoide es la migración vertical de los melanocitos, lo que es considerado como una característica histológica del melanoma. Adaptado de (2)

Cuando el melanoma se diagnostica en estadíos tempranos, generalmente puede ser curado por remoción quirúrgica. Sin embargo, una vez que se han esparcido más allá de la piel y los ganglios linfáticos locales, los melanomas malignos metastáticos son refractarios a las terapias existentes. Por ello es importante generar terapias antitumorales alternativas a la quimioterapia partiendo de un conocimiento detallado de la relación que se establece entre el tumor y el sistema inmune del hospedador. Esto se debe a que aunque los tumores derivan de células propias, generalmente la neotransformación se asocia también a la expresión de neoantígenos que pueden ser reconocidos por el sistema inmune del organismo. A través del reconocimiento de estos antígenos tumorales el sistema inmune es capaz de atacar a las células transformadas, destruyéndolas antes de que el tumor se forme como una masa celular de un tamaño tal que genere una sintomatología en el paciente. Este rol del sistema inmune fue originalmente propuesto por Paul Erlich a comienzos del siglo XX, luego la hipótesis fue expandida por Sir Macfarlane Burnet y Lewis Thomas en la década del ´50 y el fenómeno recibió el nombre de "vigilancia inmunológica del cáncer".

A pesar del rol del sistema inmune como efector de una respuesta inmune anti-tumoral, en muchos casos las células tumorales no son eliminadas en forma eficiente. Esto se debe a que los tumores han desarrollado una gran variedad de mecanismos de escape que les permite evadir la respuesta inmune montada por el organismo. Por este motivo, una vez que un tumor sólido está establecido, vascularizado y es clínicamente detectable, la regresión espontánea es un evento infrecuente (3).

Algunos autores consideran que no existe "escape" del tumor porque la respuesta inmune contra el tumor, al igual que contra los tejidos normales, se caracteriza por la ignorancia, tolerancia y supresión (4). Sin embargo, existen evidencias que indican que el sistema inmune selecciona, durante la formación del tumor, variantes que están mejor adaptadas para sobrevivir en un ambiente inmunológicamente intacto, de una manera muy parecida a lo que hace con virus, bacterias y parásitos. Por ejemplo, los tumores que se forman en huéspedes inmunocompetentes son menos inmunogénicos que los tumores que se desarrollan en ausencia de un sistema inmune intacto (5). De esta manera en los tumores que se generan bajo la presión del sistema inmune se seleccionan aquellas células más resistentes a los mecanismos efectores citotóxicos, produciendo variantes tumorales con inmunogenicidad reducida o que adquirieron otros mecanismos que les permiten evadir o suprimir el ataque inmune, y que tienen más probabilidades de sobrevivir en el hospedador inmunocompetente (6).

Teniendo en cuenta tanto la acción protectiva sobre el hospedador como la acción modeladora del sistema inmune sobre el tumor en desarrollo, Robert Schreiber postuló la hipótesis de inmunoedición del cáncer, un refinamiento de la vigilancia inmunológica que tiene una visión más amplia de las interacciones entre el sistema inmune y el tumor (5). De acuerdo con estas hipótesis, el proceso de inmunoedición del cáncer puede dividirse en tres etapas denominadas eliminación, equilibrio y escape.

El proceso de **eliminación** abarca el concepto original de la vigilancia inmunológica. En la primera fase del proceso de eliminación, una vez que los tumores sólidos alcanzan cierto tamaño, éstos comienzan a crecer invasivamente y requieren una mayor provisión de sangre, que llega como consecuencia de la producción de proteínas del estroma tisular y factores angiogénicos por parte del tumor. El crecimiento invasivo causa alteraciones menores en el tejido circundante e induce señales inflamatorias que llevan al reclutamiento de células de la inmunidad innata (células NK -por *natural killer-*, células NKT, linfocitos T$\gamma\delta$, macrófagos y células dendríticas –CDs-). Ciertas moléculas en las células transformadas (tanto expresadas como resultado del proceso de neotransformación en sí mismo o inducidas por la limitada respuesta inflamatoria) son reconocidas por las células linfoides infiltrantes, que son estimuladas para producir IFN-γ. Este fenómeno puede provocar la muerte tumoral por arresto del ciclo celular y por mecanismos apoptóticos (7). Asimismo, las células tumorales y la reacción inflamatoria desencadenada inducen la producción local de quimoquinas tales como CXC10 (proteína inducible por interferón-10, IP-10), CXCL9 (monoquina inducida por IFN-γ, MIG) y CXC11-α (quemoatractante de células T inducible por IFN, I-TAC). Estas quimoquinas contribuyen al reclutamiento de células linfoides con actividad citotóxica anti-tumoral. Algunas ejercen además efectos antiangiogénicos, contribuyendo a los mecanismos de eliminación del tumor (8-10). Los restos de células tumorales, generados como consecuencia directa o indirecta del IFN-γ sobre el tumor, son fagocitados por CDs locales, que luego migran a los ganglios linfáticos drenantes y dan inicio a una respuesta inmune adaptativa anti-tumoral. Por otra parte, las quimoquinas producidas durante la progresión del proceso inflamatorio reclutan más células NK y macrófagos. En la fase siguiente, los macrófagos y las células NK que infiltran el tumor se activan mutuamente por producción recíproca de IL-12 e IFN-γ, y destruyen más células tumorales por mecanismos que involucran perforina, TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral o *TNF-related apoptosis-inducing ligand*), e intermediarios reactivos del nitrógeno y del oxígeno (5). Las CDs que migraron a los ganglios

linfáticos drenantes inducen la activación y diferenciación de las células T $CD4^+$ específicas de tumor hacia un perfil Th1, productor de IFN-γ, que a su vez facilita la activación y diferenciación de células T $CD8^+$ citotóxicas específicas del tumor. Estas células T $CD4^+$ y $CD8^+$ migran al foco tumoral, donde los linfocitos T citotóxicos destruyen a las células tumorales remanentes que expresan el antígeno tumoral específicamente reconocido y cuya inmunogenicidad aumentó por la exposición al IFN-γ producido localmente (6). Cuando el proceso de eliminación es exitoso para destruir el tumor en desarrollo, esto constituye el proceso completo de edición, sin progresión a las fases siguientes. Sin embargo, y debido a la existencia de numerosos mecanismos de escape tumoral (3, 4, 11), la eliminación es ineficiente en muchos casos.

En el proceso de **equilibrio**, el sistema inmune y cualquier variante de las células tumorales que haya sobrevivido al proceso de eliminación, entran en un equilibrio dinámico. En este proceso, los linfocitos y el IFN-γ ejercen una potente presión de selección sobre las células tumorales, la que es suficiente para contener pero no para eliminar totalmente a un lecho tumoral que posee células inestables genéticamente y con alta tasa de mutación. Durante este período de selección darwiniana, muchas de las variantes originales de escape de las células tumorales son destruidas, y sobreviven selectivamente aquellas variantes que llevan mutaciones que les proporcionan una ventaja adaptativa, es decir, un aumento en la resistencia al ataque inmune. Se ha postulado que esta fase de equilibrio es la más larga de los tres procesos, pudiendo extenderse a lo largo de un período de muchos años (5, 12).

En la tercera fase, denominada **escape**, las variantes tumorales que sobrevivieron, comienzan a expandirse de forma descontrolada. Esto resulta en una enfermedad maligna observable clínicamente que, si se deja avanzar, resulta en la muerte del portador del tumor. En los últimos años se han estudiado y descripto numerosas estrategias inmunosupresoras utilizadas por las células tumorales, las que recientemente han sido reseñadas en un artículo de Rabinovich y col (11). Estos mecanismos incluyen defectos en la señalización luego de la estimulación del TCR, defectos en la maquinaria de presentación de antígenos, activación de señales coestimulatorias negativas en el microambiente tumoral (CTLA-4/B7, PD-1/PD-L1), secreción de factores inmunosupresores (IL-10, TGF-β, galectina-1, gangliosidos, prostaglandina E2), activación de vias proapoptóticas en las células efectoras de la respuesta inmune anti-tumoral (FasL, TRAIL, RCAS1) e inhibición de la diferenciación y maduración de las CDs (a través de factores reguladores negativos como VEGF e IL-10 y a través de vías de señalización intracelular como la de Stat3

y SOCS1). Además, distintas poblaciones de células regulatorias reclutadas o inducidas por los tumores contribuyen a esta red inmunosupresora, las que incluyen a las células T regulatorias naturales (Tregs) $CD4^+CD25^+$, las células T regulatorias inducibles Tr1, las células *natural killer* (NK) T productoras de IL-13 y distintas subpoblaciones de CDs mieloides y plasmocitoides (11).

Como se mencionara más arriba, uno de los mecanismos efectores más efectivos de la respuesta inmune anti-tumoral es la activación de células citotóxicas (linfocitos T $CD8^+$ y células NK). Ambas inducen la muerte de las células blanco por apoptosis mediada por dos tipos de mecanismos. En el primero, denominado mecanismo secretorio, las células citotóxicas reconocen y movilizan sus gránulos secretorios hacia el sitio de contacto con las células blanco. Estos gránulos contienen diferentes componentes que participan en el mecanismo citotóxico. Los de mayor relevancia son la granzima B, una serinoproteasa capaz de activar caspasas y la perforina, una proteína desestabilizante de membranas (13). En los gránulos secretorios la granzima B forma un complejo con la perforina y una tercera proteína de alto peso molecular denominada serglicina que actúa como proteína transportadora o *carrier*. Este complejo se libera en la zona de contacto entre las dos células donde es endocitado por la célula blanco, principalmente por el receptor de manosa 3-fosfato (MPR, 14). La internalización conduce a la formación de una vacuola de pH ácido que induce la activación de las perforinas que ejercen efectos desestabilizantes sobre la membrana de la vacuola endocítica permitiendo que la granzima B acceda al citosol de la célula blanco activando al sistema de caspasas que inducen la muerte por apoptosis (15). En el segundo proceso, denominado mecanismo no secretorio participan miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF)-α tales como el ligando de Fas (FasL) y en forma secundaria en las células NK, TRAIL (16). Una vez activadas, las células citotóxicas comienzan a expresar FasL en su superficie, lo que les permite unirse a diversas células que expresan su receptor CD95 (Fas). La interacción entre Fas y FasL induce la trimerización de Fas en la célula blanco promoviendo el reclutamiento de proteínas al dominio de muerte de Fas que desencadenan una cascada de activación de caspasas que involucra a la caspasa 8 y conduce a la apoptosis de la célula blanco.

Como se mencionara anteriormente, las células citotóxicas (linfocitos T $CD8^+$ y células NK) son las células efectoras más importantes en la batalla del sistema inmune contra los tumores. Existe evidencia emergente que indica que las células NK no sólo poseen funciones efectoras citotóxicas contra los tumores, sino que además, a través de la liberación de citoquinas y del diálogo cruzado con las CDs,

son capaces de regular la respuesta inmune adaptativa tanto en forma cualitativa como cuantitativa (17, 18). Esto las hace doblemente atractivas para estudios tendientes al desarrollo de inmunoterapias para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, ya que por un lado son capaces de destruir células transformadas y por otro tienen la habilidad de perfilar la respuesta inmune adaptativa anti-tumoral hacia un perfil Th1 y citotóxico mediado por linfocitos T $CD8^+$.

2. Células NK

Las células NK comprenden aproximadamente de un 5 a un 15% de las células linfoides circulantes en sangre periférica. Derivan de un precursor $CD34^+$ y completan su desarrollo en la médula ósea. Para su maduración requieren de varias citoquinas, entre las cuales la IL-15 liberada por células estromales de la médula ósea, parece tener un papel crucial en la diferenciación hacia el linaje de células NK (19). Otras citoquinas como la IL-7, el SCF (*stem cell factor*) y el flt3-L (ligando de flt3) jugarían además un papel relevante en las etapas tempranas de la maduración (19, 20). Esta maduración puede ocurrir en ausencia de un timo funcional tanto en humanos como en ratones (21). Sin embargo, las células NK comparten un precursor común con los linfocitos T (diferente del que da lugar a los linfocitos B y a los granulocitos/macrófagos) que sufre diferenciación hacia un linaje T o NK en función del microambiente (22).

Las células NK fueron descriptas hace más de 30 años por su capacidad de lisar células tumorales o células infectadas con virus que no expresaban moléculas de clase I del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Este concepto dio origen a la hipótesis del *missing self*, en la que se proponía que las células NK monitoreaban los niveles de expresión de moléculas de clase I del CMH sobre la célula y destruían a aquéllas células que por diversos mecanismos habían dejado de expresar niveles normales de estas moléculas (20), generalmente células tumorales o infectadas con virus. Aunque se las asoció inmediatamente con el fenómeno de vigilancia inmunológica, el reconocimiento de células con niveles bajos o nulos de moléculas de clase I del CMH implicaba necesariamente la existencia de receptores activadores de citotoxicidad que dispararan la actividad biológica de las células citotóxicas. En este sentido, las moléculas de clase I del CMH no son siempre necesarias para proteger de la lisis por parte de las células NK. Por ejemplo, las células NK son incapaces de rechazar tejidos no hematopoyeticos deficientes en moléculas de clase I del CMH, e *in vitro* no pueden lisar fibroblastos de ratones

deficientes en β2-microglobulina que no expresan moléculas de clase I del CMH (23). Por otro lado, la inhibición tras la unión de las moléculas del CMH de clase I no es siempre suficiente para prevenir la citotoxicidad por parte de las células NK. Algunas células infectadas con virus que mantienen la expresión de moléculas de clase I del CMH en superficie son lisadas eficientemente por células NK autólogas (24). Además, células NK activadas con IL-2 aumentan la actividad lítica comparada con células NK no estimuladas, y adquieren así, la capacidad de lisar blancos resistentes (25). Estas observaciones apuntan a la importancia crucial de los receptores activadores en la regulación de la función efectora de las células NK.

La unión de receptores activadores a moléculas de membrana de células blanco no solo desencadena la citotoxicidad sino que también promueve la producción de citoquinas, la migración de las células NK, su activación y su proliferación. Cada célula NK parece expresar su propio repertorio de receptores activadores e inhibidores (usualmente entre 3 y 4 de cada tipo) de manera que la citotoxicidad se encuentra finalmente regulada por un balance de señales provenientes de receptores inhibidores que interactúan con las moléculas del CMH clase I y de receptores activadores que reconocen moléculas relacionadas con el CMH de clase I en las células blanco (26).

Además, el rol de las células NK como "citotóxicas naturales" está siendo revisado ya que existe una gran proporción de células NK en sangre periférica fenotipicamente maduras pero con una muy baja actividad citotóxica contra células blanco susceptibles (27). Se ha comprobado que las células NK requieren de distintos pasos de activación, regulados por distintos receptores y citoquinas para adquirir la capacidad citotóxica en respuesta al reconocimiento de las células blanco. Tanto la localización de estas etapas de maduración finales como las células que proveen las señales de maduración no son totalmente conocidas. Sin embargo, las evidencias recientes indican que las CDs y/o los monocitos y macrófagos serían los responsables de promover tal activación (28, 29). Esto no solo tiene consecuencias sobre las células NK, sino que se trata de una interacción bidireccional que también resulta en la maduración, activación o apoptosis de las CDs dependiendo del estado de activación de ambos tipos celulares (30, 31). Este reconocimiento es mediado por el receptor activador NKp30 en la célula NK (32). Recientemente se ha demostrado que la interacción *in vivo* entre CDs y células NK juega un papel importante en la inducción de una respuesta inmune eficiente contra células infectadas con virus y células tumorales (33, 34).

Como consecuencia de este diálogo recíproco intenso establecido entre las CDs y las células NK se produce una estimulación bidireccional, las CDs adquieren

capacidad de actuar como células presentadoras de antígeno profesionales (CPAs que expresan moléculas coestimulatorias tales como CD80 y CD86) ya que las células NK promueven su maduración. Simultáneamente, en un proceso que involucra la *trans*-presentación de IL-15 por las CDs (35) las células NK adquieren la capacidad de ejercer funciones efectoras citotóxicas contra distintas células tumorales y la capacidad de secretar citoquinas inmunoregulatorias (principalmente, IFN-γ). Las células NK se convertirían así en una fuente temprana de IFN-γ necesaria para la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th1. Este programa de diferenciación es iniciado por la IL-12 liberada por CDs maduras y requiere del factor de transcripción T-bet (36). El IFN-γ tiene un papel dual en la polarización hacia el perfil Th1, ya que por un lado induce un aumento en la producción de IL-12 por CDs y por otra parte sinergiza con las señales transducidas a partir del TCR para maximizar la expresón de T-bet y consecuentemente el receptor de IL-12 en células T *naive*.

En los últimos años aumentó notablemente el conocimiento en el campo de las células NK. Recientemente Eric Vivier propuso una definición actualizada para estas células, teniendo en cuenta nuevos ensayos funcionales y análisis genómicos. Según esta definición "una célula NK es un linfocito NKp46^{+}CD3^{-} presente en todas las especies de mamíferos, que depende de IL-15 y responde a IL-12. Luego de su maduración, las células NK son una fuente temprana de IFN-γ y son capaces de lisar células que han perdido la expresión constitutiva de moléculas propias (como por ejemplo moléculas del CMH de clase I) y que expresan moléculas propias inducibles por estrés (ej: ligandos del receptor activador NKG2D -NKG2DLs-) o moléculas microbianas (ej: m157 de citomegalovirus murino o agonistas de TLR-3)" (28).

En humanos se han identificado dos subpoblaciones de células NK que se caracterizan por poseer funciones especializadas diferentes. La subpoblación mayoritaria (90%) expresa bajos niveles de CD56 (CD56^{dim}) y altos niveles del receptor para la porción Fc de la inmunoglobulina G CD16 (CD16^{bright}). Estas células son las responsables de la citotoxicidad natural que las hace capaces de lisar células tumorales *in vitro* e *in vivo* (20, 37) y de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA, 20). No expresan CCR7 ni L-selectina (CD62L), pero expresan altos niveles de LFA-1 y otras moléculas de adhesión, por lo que se supone que son capaces de migrar a tejidos periféricos donde ejercen su actividad (38). Por el contrario, la subpoblación minoritaria de células NK de sangre periférica (10%) expresa altos niveles de CD56 (CD56^{bright}) y niveles bajos o nulos de CD16

($CD16^{dim}$ o $CD16^{-}$). Esta población constituye una fuente importante de citoquinas inmunorregulatorias (IFN-γ, TNF-α, TNF-β, IL-10, IL-13, GM-CSF) que juegan un papel muy importante durante el desarrollo de la respuesta inmune innata y el disparo de la respuesta inmune adaptativa. Esta subpoblación expresa altos niveles de CCR7 y L-selectina (CD62L), lo que les confiere la habilidad de migrar y anidar en órganos linfáticos secundarios, donde liberan las citoquinas que regularían la respuesta adaptativa de linfocitos T y B (38).

Recientemente se ha demostrado que las células NK de la población $CD56^{bright}$ son precursores que dan lugar a las células $CD56^{dim}$ luego ser activadas por citoquinas en sangre periférica (39).

3. Receptores de células NK

A diferencia de lo que ocurre con los linfocitos T y B, las células NK no emplean un único receptor para el reconocimiento de las células blanco. Por el contrario, expresan un conjunto de receptores asociados a cascadas de señalización intracelular específicas. Durante los últimos años se han caracterizado un número importante de estos receptores, todos los cuales son proteínas integrales de membrana asociados a subunidades transductoras de señales específicas.

Funcionalmente, los receptores de células NK se dividen en inhibidores y activadores de citotoxicidad (40, 41). Los receptores inhibidores poseen en su cola citoplasmática un dominio ITIM (motivo de inhibición basado en tirosina o *immunereceptor tyrosine based inhibitory motif*, cuya secuencia es V/IxYxxL/V), que luego de fosforilarse recluta fosfatasas de la familia SHP-1 que previenen las funciones efectoras de las células NK. Por el contrario, los receptores activadores de citotoxicidad poseen una cola citoplasmática corta que carece del dominio ITIM (37, 42). Para llevar a cabo la señalización se asocian con diferentes moléculas adaptadoras, tales como CD3ζ, FcεRIγ y DAP12, que poseen motivos ITAM (motivo de activación basado en tirosina o *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, cuya secuencia es YxxLx6-8YxxL/I) o DAP10, que contiene un motivo YxxM. La unión de estos receptores a sus ligandos resulta en la activación de una cascada de fosforilación, mediada por tirosin-quinasas intracelulares, que en última instancia llevan a la producción de citoquinas y movilización de gránulos secretorios que contienen perforina y granzimas (43)

Como se mencionara, la actividad citotóxica de las células NK se encuentra finamente regulada por la integración de las señales de activación e inhibición que

reciben a través de los receptores respectivos. En condiciones normales, la señalización a través de los receptores activadores está continuamente bloqueada y prevalecen las señales desencadenadas por los receptores inhibitorios, que mayoritariamente reconocen a diversas moléculas de clase I del CMH. En situaciones patológicas (principalmente en células tumorales o infectadas con virus) en las que se produce una disminución en la expresión de ligandos de receptores inhibitorios de células NK o en situaciones en las que se produce un aumento en la expresión de ligandos de receptores activadores de células NK, se genera un balance en la señalización intracelular en favor del desarrollo de citotoxicidad (26, 44). Sin embargo, en el caso de las células tumorales, en las que se produce a menudo tanto una disminución en los niveles de expresión de moléculas de clase I del CMH como un aumento en la expresión de ligandos de receptores activadores, se observa que los tumores crecen y hacen metástasis lo que sugiere la existencia de mecanismos de escape de la inmunidad anti-tumoral y/o el desarrollo de una inmunidad anti-tumoral deficiente para el control y erradicación de las células cancerosas que compromete no solo a las CDs, monocitos y linfocitos (11) sino también a las células NK (45).

3.1. Receptores específicos de moléculas clase I del HLA:

Desde el punto de vista de la organización de los genes, existen 2 grandes grupos de receptores de células NK:

1) el complejo de receptores leucocitarios o LRC (*leukocyte receptor complex*)
2) el complejo de receptores de citotoxicidad natural o NKC (*natural killer complex*).

El grupo de los LRCs comprende 2 familias de genes que se encuentran en el cromosoma 19 humano: los receptores de tipo KIR (*killer immunoglobulin-like receptor*) y los receptores ILT (*immunoglobulin-like transcripts*) o LIR (*leukocyte inhibitory receptors*). Por otra parte, los genes del NKC mapean en el cromosoma 12 humano y están compuestos mayoritariamente por la familia de genes NKG2 (CD94/NKG2A, -B, 46).

3.1.1. Complejo de receptores leucocitarios (LRC):

3.1.1.a . Receptores KIR

En las células NK humanas, el reconocimiento de diferentes alelos HLA (por *human leukocyte antigen*) -A, -B y -C está mediado por miembros de la familia KIR (CD158), codificados dentro del complejo LRC. Estos receptores son glicoproteínas de membrana de tipo I. Se pueden identificar dos subfamilias de KIR, basadas en el número de dominios de la superfamilia de las inmunoglobulinas en la región extracelular de estas moléculas (47). La subfamilia KIR3D contiene tres dominios, mientras que la subfamilia KIR2D contiene dos. A su vez, los dominios citoplasmáticos de los KIR pueden ser largos (L) o cortos (S), lo que se corresponde con su función como receptores inhibitorios o activadores, respectivamente. Los KIRs inhibitorios contienen una o dos secuencias ITIM en sus dominios citoplasmáticos. Por otra parte, los receptores activadores no señalizan directamente, sino que se asocian no covalentemente con otras moléculas adaptadoras con motivos ITAM que sirven como unidades de transducción de señales (47). Existe una excepción, el receptor KIR2DL4, que aunque posee dominio citoplasmático largo, con una secuencia ITIM, tiene función activadora (48).

En general, los KIR3D reconocen alelos HLA-A, y -B, mientras que los receptores KIR2D reconocen alelos HLA-C (49-51). Los KIR inhibitorios se expresan además en linfocitos T activados (52) donde modulan sus funciones (42, 47).

3.1.1.b. Receptores ILT (o LIR)

La familia ILT/LIR se compone de 13 genes relacionados que codifican proteínas con 2 ó 4 dominios extracelulares de la superfamilia de las inmunoglobulinas (47). Estos receptores están ampliamente distribuidos en las células del sistema inmune. Se los encuentra expresados en monocitos, macrófagos, CDs y algunas subpoblaciones de linfocitos B y células NK. La presencia de secuencias ITIM en las regiones citoplasmáticas de ILT2, 4, 5 y 8 sugiere que actuarían como receptores inhibitorios en una forma análoga a los KIRs.

Un miembro de esta familia, ILT2 (LIR-1), es un receptor inhibitorio que se une a distintas moléculas clase I del CMH, incluyendo la molécula no clásica HLA-G.

ILT2 se expresa en monocitos, macrófagos, células B, CDs y células NK, donde actúa como modulador negativo de sus funciones efectoras (42, 51).

3.1.2. Complejo de receptores de citotoxicidad natural (NKC): CD94/ NKG2

Los receptores pertenecientes a la familia de las lectinas tipo C CD94/NKG2 son heterodímeros (excepto NKG2D) unidos por puentes disulfuro, expresados como proteínas de membrana de tipo II en células NK y subpoblaciones de células T. Los genes que codifican para CD94 y NKG2 están localizados dentro del complejo NKC. La subunidad CD94 del receptor es invariante y está codificada por un solo gen. Por otro lado, NKG2 constituye una familia multigénica de al menos 5 proteínas, designadas NKG2A (y su variante generada por *splicing* alternativo, NKG2B), NKG2C, NKG2D y NKG2E (53, 54). Los dominios extracelulares de unión al ligando de NKG2A/B, -C y -E comparten un alto grado de homología. Los dominios citoplasmáticos pueden ser tanto largos (NKG2A/B) o cortos (NKG2C y E), correspondientes a isoformas CD94/NKG2 inhibitorias o activadoras respectivamente (47, 55). Los heterodímeros CD94/NKG2A o B, como todos los receptores inhibitorios, poseen motivos ITIM en su cola citoplasmática. El heterodímero CD94/NKG2C se asocia a través de su cola citoplasmática con la proteína adaptadora DAP12 (56), que señaliza en forma similar a la cadena CD3ζ, mediante la activación de tirosin-quinasas luego de la fosforilación del motivo ITAM presente en su porción citoplasmática (57). Por otra parte, las formas inhibitorias se unen a sus ligandos con mayor afinidad que su contraparte activadora.

Los heterodímeros CD94/NKG2A, B y C son receptores para la molécula no clásica de clase I del CMH, HLA-E (58). La expresión de HLA-E en la superficie celular requiere de un péptido que deriva de la secuencia líder de cadenas α de las moléculas de clase I del CMH (HLA-A, -B, -C y -G). La disminución en la síntesis de las moléculas de clase I del HLA, coordinadamente reducen la expresión de HLA-E por una menor disponibilidad del péptido necesario para el ensamblaje, estabilización y transporte a superficie celular de HLA-E (59). Por lo tanto, la expresión de niveles normales de HLA-E es un indicador de la biosíntesis normal de moléculas de clase I del CMH. De esta manera, los CD94/NKG2 fueron seleccionados para monitorear la integridad de la vía de síntesis de moléculas de clase I del HLA y detectar alteraciones inducidas entre otros por proteínas codificadas en el genoma de diferentes tipos de virus (42).

3.2. Receptores no específicos de moléculas de clase I del HLA

Algunos receptores no específicos de moléculas de clase I del HLA son receptores activadores. Entre estos receptores se encuentra un grupo asociado a proteínas adaptadoras que contienen motivos ITAM, tales como CD16 y los receptores activadores de citotoxicidad (NCR). Otro grupo de receptores está compuesto por moléculas asociadas a proteínas adaptadoras sin motivos ITAM. Entre estos se encuentran los miembros de la familia de CD2, CD2(60), 2B4 (61) y CRACC (62); NTB-A (63), DNAM-1 (64), NKp80 (65) y el receptor NKG2D, que es el más estudiado hasta el momento (66).

3.2.1. Receptores asociados a ITAM

3.2.1.a. CD16 (FcγRIII)

Es un receptor que une las porciones Fc de la IgG. De esta manera media la CCDA de células blanco. Señaliza a través de las cadenas CD3ζ y FcεRIγ. Si bien CD16 es uno de los receptores activadores más importantes en la jerarquía de receptores de las células NK (67), para ejercer su acción requiere de anticuerpos específicos (IgG) contra antígenos de superficie de las células tumorales o infectadas. Sin embargo, debido a que durante las etapas tempranas de la respuesta inmune adaptativa hay una limitada disponibilidad de estos anticuerpos, los otros receptores jugarían un papel más preponderante en la actividad de las células NK.

3.2.1.b. NCR

Recientemente se han descubierto tres receptores activadores de citotoxicidad cuya expresión se encuentra restringida a células NK. Estas tres moléculas, pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, fueron denominadas NKp46 (68), NKp44 (69, 70) y NKp30 (71) y representan los miembros de un grupo emergente denominado NCR (*Natural Cytotoxicity Receptors* o Receptores de Citotoxicidad Natural). Son glicoproteínas transmembrana de 46, 44 y 30 kDa respectivamente. Estos receptores están involucrados en el reconocimiento y la lisis de células tumorales humanas (43).

El receptor NKp46 es expresado por todas las células NK (en reposo y activadas) por lo que recientemente se ha sugerido que sería un excelente marcador de la población NK (28). Su porción citoplasmática no contiene ningún

motivo ITAM, pero la región transmembrana contiene un aminoácido cargado positivamente (R), que podría estar involucrado en la estabilización de la interacción con las proteínas adaptadoras CD3ζ y FcεRIγ (68).

El receptor NKp44 tiene una expresión restringida a células NK activadas por IL-2, mientras que está ausente en células NK no activadas de sangre periférica. En su región transmembrana posee un aminoácido cargado positivamente (K), que le permite asociarse a DAP12 (69).

El receptor NKp30 se expresa selectivamente en todas las células NK. Se asocia con cadenas CD3ζ, probablemente a través de un aminoácido cargado positivamente (R), presente en la región transmembrana (71).

Los receptores NKp44 y NKp46 son sialilados, lo que les permite unirse a la hemaglutinina del virus de la influenza y de esta manera reconocer células infectadas con este virus y activar la función citotóxica de las células NK (72, 73). NKp30 esta involucrado en el reconocimiento de CDs (32). Además, NKp30, NKp44 y NKp46 son importantes para el reconocimiento y lisis de células tumorales (74). Aunque recientemente se ha demostrado que proteglicanos de heparan-sulfato en la superficie de las células blanco están involucrados en este reconocimiento, los ligandos reconocidos sobre estas células por los receptores NKp30, 44 y 46 son aún desconocidos (75, 76).

3.2.2. Receptores no asociados a ITAM

3.2.1.a. NKp80

NKp80 (65) pertenece a la familia de las lectinas de tipo C y se expresa como homodímero sólo en la superficie de células NK. Recientemente se ha identificado su ligando, AICL, específico de células mieloides, expresado por monocitos, macrófagos y granulocitos. Asimismo, hay evidencias experimentales que muestran que la interacción entre NKp80 y AICL es importante para la activación mutua ente las células NK y las células mieloides y que esto puede influir en la iniciación y mantenimiento de la respuesta inmune (29).

3.2.1.b. NKG2D

NKG2D fue identificado por primera vez en 1991 por Houchins y col, como un cDNA expresado por células NK humanas (54). El rol de esta molécula fue ignorado hasta 1999, cuando NKG2D fue identificado como receptor de una

molécula relacionada con el CMH de clase I, MICA (*MHC class I chain related A*, 77). Desde entonces, NKG2D y sus ligandos fueron objeto de intensa investigación.

NKG2D es una molécula de transmembrana de tipo II que pertenece a la familia de las lectinas de tipo C. A diferencia de otros miembros de la familia NKG2, NKG2D no se asocia con CD94 y se expresa en forma constitutiva como homodímero en superficie celular en todas las células NK y linfocitos T $\gamma\delta$ y $\alpha\beta$ $CD8^+$. Este homodímero se une a la proteína adaptadora DAP10 en humanos y a DAP12 o DAP10 en ratones (78, 79). La proteína DAP10 no contiene motivos ITAM, pero tiene un motivo YxxM, que está implicado en la unión a la subunidad p85 de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K, 78) y a Grb (80), mientras que DAP12 contiene un motivo ITAM citoplasmático que recluta y activa a las tirosin-quinasas Syc o ZAP-70, que disparan una cascada de eventos que desembocan en el desarrollo de la citotoxicidad. Por otra parte, su expresión aumenta además por efecto de IL-12 e IFN-α en células NK y por IL-15 en linfocitos T CD8 (41, 78, 81, 82). NKG2D puede actuar como molécula coestimulatoria en células NK cuando éstas reciben señales de activación a través de NKp30, NKp44, NKp46 o NKp80, o como estructura primaria de reconocimiento de ligandos sobre células blanco (67). Esta función dual hace que NKG2D sea una molécula muy versátil (79, 83, 84), clave durante respuestas inmunes innatas y adaptativas. La estimulación de células NK a través de NKG2D gatilla una señal tan intensa que es capaz de sobrepasar a la señal inhibitoria disparada por el reconocimiento de moléculas de clase I del CMH por parte de los receptores inhibitorios KIRs conduciendo a la lisis de la célula blanco.

4. Ligandos NKG2D

NKG2D reconoce en ratón a las proteínas Rae1 (85), H60 (85) y MULT1 (86). Aunque MULT1 se expresa en diversos tejidos normales, Rae1 y H60 se expresan principalmente en tumores murinos de diversos fenotipos. En humanos, NKG2D reconoce a las moléculas denominadas *UL16 binding proteins* (ULBP) -1, ULBP-2 y ULBP-3 (87, 88). Este grupo de moléculas de superficie ancladas a GPI (glicosilfosfoinositol) se expresan en algunos tejidos normales, pero se ha observado que se expresan en mayores niveles en tumores de diversos fenotipos (87, 88). En humanos, así como en varias especies de mamíferos pero no en ratón, existe otro grupo de ligandos de NKG2D (NKG2DL). Estas moléculas son proteínas integrales de membrana denominadas **MICA** y MICB (77). En la **Figura 2** se muestra una representación esquemática de los NKG2DL.

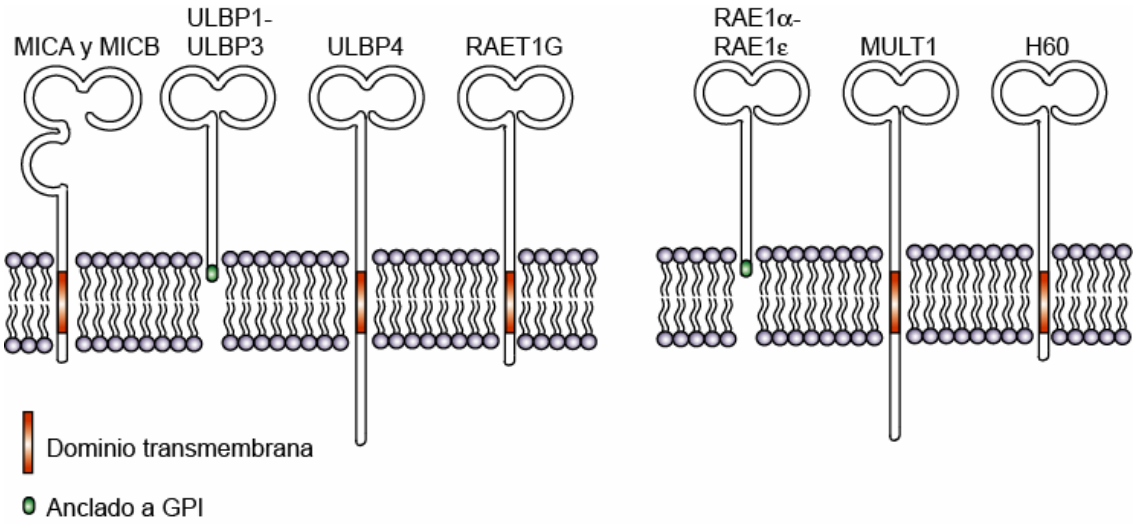


Figura 2: Representación esquemática de los ligandos de NKG2D. Tanto en humanos (izquierda) como en ratón (derecha) algunas de estas moléculas están ancladas a GPI y otras poseen dominios transmembrana. Adaptado de (89).

5. Familia de genes MIC:

La familia de genes MIC fue identificada en 1994 por el grupo de Spies cuando buscaba nuevos genes en la región del HLA-B (90). Esta familia se compone de dos genes (MICA y MICB) y 4 pseudogenes (90-92), cuya ubicación se muestra esquemáticamente en la **figura 3**.

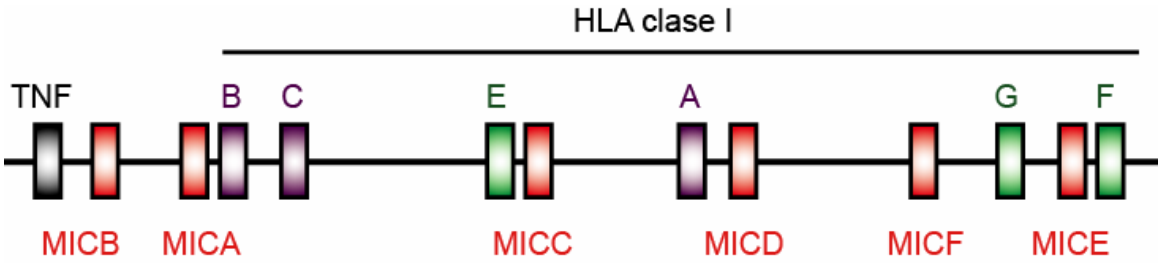


Figura 3: Ubicación de los genes de la familia MIC en la región de clase I del HLA. Se muestran los genes para las moléculas de clase I HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F y HLA-G, así como los 2 genes (MICA y MICB) y 4 pseudogenes (MICC, MICD, MICE y MICF) de la familia MIC.

Se ha demostrado que los genes MIC están conservados en muchos mamíferos, entre los que se encuentran primates (chimpancé, orangután, babuino, tamarindo, gibón), cabra, cerdo, vaca, perro y hámster (90, 93). Sin embargo, no se ha encontrado dicho gen en el genoma murino (90, 93). No obstante,

recientemente se ha descripto una familia de genes en ratón denominada Mill (*MHC class I-like located near the LRC*), compuesta por los genes *Mill1* Y *Mill2* que están relacionados con MICA y MICB (94).

6. Genética y Genómica de MICA

Los genes MICA y MICB, de 11,7 kpb y 12,9 kpb, respectivamente. Son inusualmente largos comparados con los genes del HLA, que tienen una longitud promedio de 3,5 kpb (95, 96). Sin embargo, la estructura genómica general semeja aquella de los genes de clase I del CMH, donde distintos dominios están codificados por distintos exones (97). MICA posee un primer intrón muy largo (90), donde existen sitios de unión para factores de transcripción como NFκB (98).

7. Transcripto y proteína de MICA

El gen de MICA codifica para un ARNm de 1.382 nucleótidos (nt) que contiene un marco de lectura abierta de 1.149 nt, originando un polipéptido de 383 aminoácidos con un peso molecular de 43 kDa (90). Esta longitud varía de acuerdo al número de repeticiones de alanina del segmento transmembrana de diferentes alelos. El gen de MICB genera un transcripto de 2.376 nt y un marco de lectura abierto de la misma longitud que MICA, con quien comparte un 83% de similitud de secuencia aminoacídica (96). La homología entre MICA y otros genes del HLA de clase I es muy baja, siendo de 15 a 21% en el dominio α1, 19 a 30% en el dominio α2 y 32 a 36% en el dominio α3 (90). Esta baja homología entre miembros de la familia de genes MIC y los genes de clase I del HLA es reflejo de una diversificación muy temprana en la evolución.

El polipéptido de MICA neosintetizado consta de 383 aminoácidos, contiene un péptido líder para translocación al retículo endoplasmatico (RE), tres dominios extracelulares α1, α2 y α3, un segmento hidrofóbico de transmembrana y una cola citoplasmática relativamente corta (90). En células epiteliales polarizadas se observó que la cola citoplasmática dirige a esta molécula a la superficie basolateral (99). El dominio α3 carece de la secuencia de unión al correceptor CD8. La presencia de 8 sitios de N-glicosilación en MICA y 5 en MICB, contrasta con el único sitio de glicosilación de las moléculas clásicas de clase I, el que a su vez está ausente en MICA y MICB (90). La proteína MICA nativa está altamente glicosilada,

lo que incrementa su peso molecular de 43 (péptido desnudo) a 65 kDa (proteína madura 100). Además, no requiere de β_2-microglobulina ni del procesamiento antigénico o de las proteinas TAP para su expresión en superficie (101, 102).

En 1999 se cristalizó la porción extracelular del alelo MICA*001 (**Figura 4**, 103) y se pudo observar que efectivamente el hipotético bolsillo de unión de péptido es muy angosto (10 Å de ancho) como para contener un ligando, comparado a los 18 Å del bolsillo de las moléculas clásicas de clase I del CMH. Además, la estructura obtenida confirmó que MICA no se une a β_2-microglobulina.

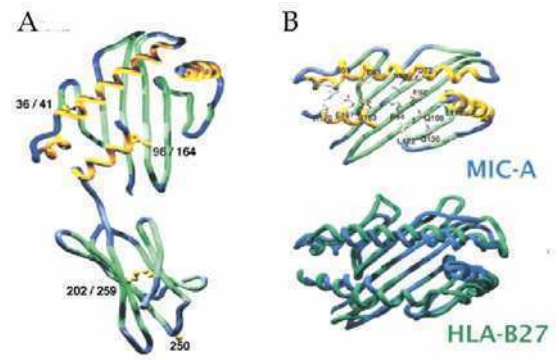


Figura 4: Estructura cristalográfica de MICA: A) La estructura de los dominios α1, α2 y α3 responden a la estructura general de las moléculas de clase I del CMH, pero **B**) el bolsillo formado por los dominios α1 y α2 es demasiado angosto para contener un péptido, comparado con la molécula clásica HLA-B27 . Tomado de (103)

8. Polimorfismo

Al igual que los genes de clase I del HLA, MICA y MICB son polimórficos y se expresan de forma codominante (104), conociéndose hasta la fecha más de 60 alelos de MICA (105-108) y 30 alelos de MICB (109-111). La mayoría de los sitios polimórficos varían en posiciones nucleotídicas no redundantes, con predominancia en los dominios α2 y α3. Una lista actualizada de los alelos de MICA y MICB se encuentra en el sitio de Internet de la agrupación inglesa *The Anthony Nolan Trust* (http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/index.html).

La gran divergencia entre MICA y MICB reside dentro de los respectivos exones del segmento transmembrana. A diferencia de MICB, MICA posee variaciones en el número de repeticiones de la secuencia en tándem GCT, que codifica para diferente número de alaninas (112). Basado en el número de estas repeticiones, los alelos se denominaron A4, A5, A6, A9 A10 y A5.1. Este último es idéntico a A5 excepto que posee una inserción (G) que genera un corrimiento del marco de lectura y un codón de terminación prematuro dentro de la región transmembrana (113). Además, el alelo MICA*010 codifica para una proteína inestable que es degradada rápidamente dentro de la célula y que no alcanza a expresarse en superficie celular (114).

Los alelos más frecuentes en diferentes grupos étnicos son MICA*008, seguido por MICA*002, MICA*004 y MICA*010, dependiendo de las poblaciones (115). Los genes MIC parecen no ser esenciales para la vida, ya que por una deleción en la región del CMH, el 0,1024% de la población japonesa carece completamente del gen de MICA y el gen de MICB contiene un codón de terminación prematuro (116). A diferencia de las graves consecuencias de la ausencia de genes funcionales de clase I o clase II del CMH, los individuos $MIC^{-/-}$ son aparentemente normales. Esto podría deberse a que existe redundancia en los NKG2DL y así en caso de que las proteínas MICA y MICB estén ausentes, su función podría ser reemplazada por otro ligando, como los ULBPs.

9. Patrón de expresión y modulación de MICA

MICA tiene un patrón de expresión restringido a células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, monocitos y epitelio gastrointestinal, pero no se expresa en linfocitos T o B en reposo (100, 102, 117).

En la región 5´ del gen de MICA se ha demostrado la existencia de un elemento regulador de la respuesta al choque térmico, similar al que se encuentra en el gen de la proteína de choque térmico de 70 kDa (hsp70, 100). Consecuentemente, la expresión de MICA es regulada por diversos estímulos de estrés. Se induce por choque térmico (100) y estrés oxidativo (118) en líneas de carcinoma humanos. También se ha documentada su inducción en fibroblastos y células endoteliales infectadas *in vitro* con citomegalovirus (CMV, 119). En este sentido, es interesante destacar que las células infectadas con este virus escapan al reconocimiento por células T debido a que expresan productos virales que impiden el procesamiento de antígenos y la expresión de moléculas clase I del CMH (120). Sin embargo, al inducir la expresión de MICA, el virus facilita el reconocimiento a través de NKG2D, lo que aumenta fuertemente la respuesta de células citotóxicas T $\alpha\beta$ $CD8^+$ específicas del virus (50). No obstante, el aumento de los NKG2DL se ve contrarestado ya que la proteína viral UL16 es capaz de producir una disminución en la expresión de MICB y los ULBP -1 y -2 (121, 122). Además, el CMV es capaz de inducir la degradación de MICA (123). Llamativamente, el alelo más frecuentemente encontrado en diversas poblaciones, MICA*008 (que posee una inserción que genera un codón stop prematuro y una proteína truncada que carece de la porción citoplasmática, pero que mantiene su capacidad de estimular a las células NK), es resistente a esta degradación mediada por el virus (123). Por lo

tanto, aquellas personas portadoras del alelo MICA*008 serían resistentes a la infección por CMV. De esta manera, la interacción con patógenos como el CMV durante el transcurso de la evolución, pudo haber ejercido una presión selectiva para el desarrollo del polimorfismo de los genes MIC, así como también para la existencia de múltiples ligandos de NKG2D. La infección de CDs y de líneas epiteliales con *Mycobacterium tuberculosis* también induce un aumento en la expresión de MICA en superficie *in vivo* e *in vitro* (124) lo que las hace susceptibles al reconocimiento por NKG2D presente en linfocitos T $\gamma\delta$ (Vγ2Vδ2). Este reconocimiento permite potenciar la respuesta celular dependiente del TCR contra antígenos no peptídicos y a superantígenos, por lo que en determinadas circunstancias MICA actuaría como molécula coestimulatoria (124). Asimismo, la infección de líneas epiteliales con bacterias del grupo de *Escherichia coli* también induce la expresión de MICA en superficie, e induce la liberación de IFN-γ (125). La **Figura 5** resume los mecanismos expuestos anteriormente.

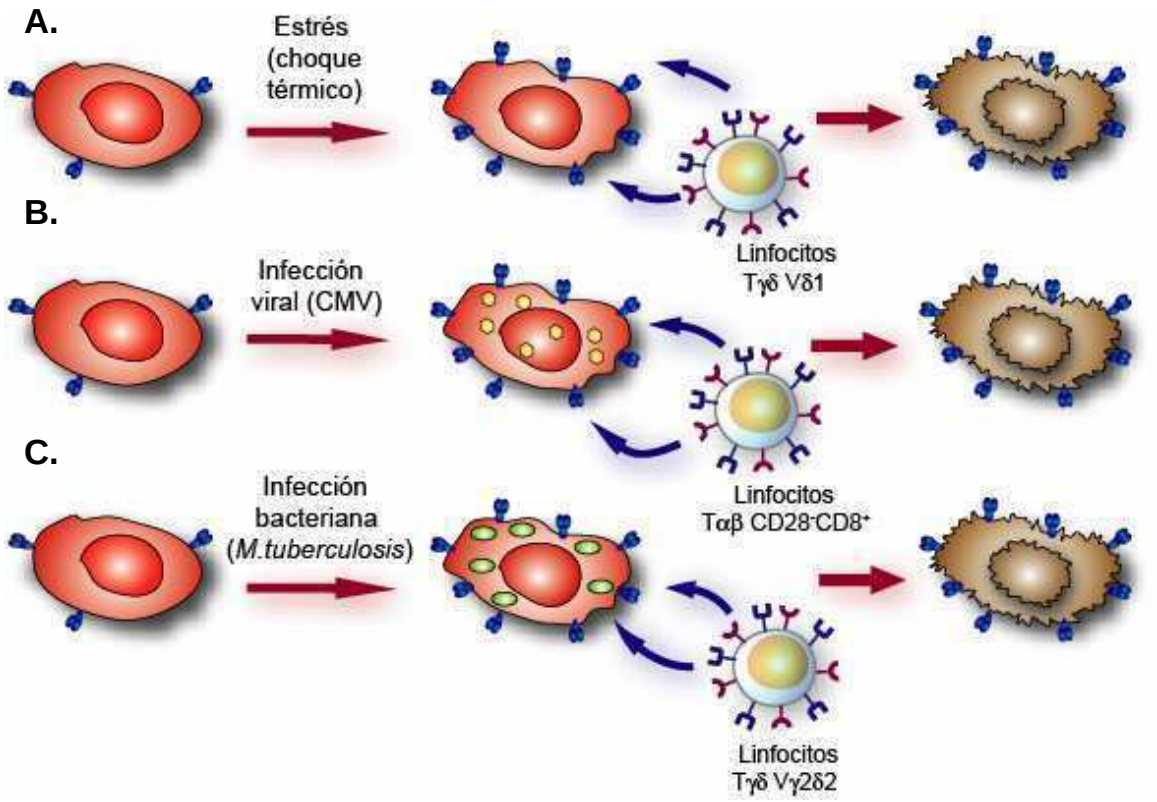


Figura 5: **Expresión regulada de MICA en diferentes situaciones**. Generalmente las células normales de distinto tipo no expresan MICA (o la expresan en niveles bajos) pero si expresan moléculas de clase I del CMH. Diferentes situaciones pueden conducir a un aumento en la expresión de MICA. **A**) *In vitro*, se ha observado que el choque térmico y el stress oxidativo inducen la expresión de MICA en células de adenocarcinoma de colon, lo que gatilla la secreción de IFN-γ y una respuesta citotóxica por linfocitos T intestinales con TCR $\gamma\delta$, contribuyendo a la lisis de las células que expresan MICA y a la restauración de la homeostasis del epitelio. **B**) Durante la infección viral con CMV, los fibroblastos y células endoteliales aumentan la expression de MICA y promueven una respuesta citotóxica mediada por linfocitos T con TCR $\alpha\beta$ $CD28^{-}CD8^{+}NKG2D^{+}$. **C**) Durante la infección con *Mycobacterium tuberculosis*, se induce la expresión de MICA en CDs y endoteliales, gatillando una respuesta citotóxica mediada por linfocitos T Vγ2Vδ2. En ambos casos las células infectadas son eliminadas y la expresión de MICA contribuye al reconocimiento de células infectadas con esos patógenos.

Nuestro grupo ha demostrado que MICA se induce en linfocitos T $CD4^+$ y $CD8^+$ estimulados con células alogeneicas *in vitro*, proceso en el que interviene la microagregación del complejo TCR/CD3 y la molécula coestimulatoria CD28 (126). La señalización intracelular involucra la activación de las vías de transducción de señales *Lck/Fyn*, ERK1/2, p38 MAPK, calcineurina, las rutas de señalización dependientes de IL-2, Jaks/STATs y $p70^{S6}$ quinasa (127) y al factor de transcripción NF-κB (98). Sin embargo, en la superficie de linfocitos T $CD4^+$ activados solo se detecta una mínima expresión de MICA. Esto podría constituir un mecanismo para protegerlos de la lisis mediada por células NK en un microambiente tumoral o inflamatorio (128). No obstante, otros autores detectaron expresión de MICA en la superficie tanto de linfocitos T $CD4^+$ como $CD8^+$ lo que los hace susceptibles a la lisis por células NK autólogas, limitando de esta manera la respuesta T (129, 130). Esta discrepancia puede explicarse por la utilización de distintos tiempos y estímulos para activar a los linfocitos T.

Por lo tanto, estos hallazgos indican que MICA funcionaría como un sensor de homeostasis celular. El reconocimiento de células que han inducido expresión de altos niveles de MICA en superficie celular por estímulos de estrés, activación celular o infección induce su destrucción en forma NKG2D-dependiente por parte de células citotóxicas (77, 100, 119, 124, 131, 132). Este fenómeno, constituye un novedoso mecanismo de eliminación de células infectadas.

10. MICA en tumores

Por otra parte, se ha observado que carcinomas de mama, pulmón, ovario, próstata, colon, riñón y melanomas expresan altos niveles de MICA, por lo que se ha asociado la expresión de esta proteína a la neotransformación (131, 133, 134). Asimismo, MICA se encuentra frecuentemente sobre-expresada en distintas líneas celulares tumorales (131). Si bien el anti-oncogen p53 está vinculado con la protección ante una transformación maligna (135), este supresor de tumores no parecería esta involucrado en la regulación de la expresión de MICA (136). Recientemente de ha demostrado que las células responden ante daños genotóxicos (altas dosis de radiación ionizante, tratamiento con inhibidores de la replicación del ADN o de la ADN polimerasa) induciendo la expresión de MICA y otros NKG2DLs. Por lo tanto, la expresión constitutiva de NKG2DLs en tumores, que

generalmente poseen mutaciones, podría deberse a la activación crónica de las vías de reparación del ADN (136).

11. NKG2D e inmunidad anti-tumoral

Actualmente, sabemos que las poblaciones celulares linfocitarias efectoras de una respuesta anti-tumoral son los linfocitos T citotóxicos (con TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$) y las células NK, las que forman parte de los infiltrados linfocitarios que se detectan en los tumores (TILs: *tumor infiltrating lymphocytes*). Por otra parte, conocemos la existencia de variados mecanismos de escape tumoral (11).

Se han publicado recientemente algunas revisiones acerca de cómo debería abordarse la potenciación de la respuesta inmune contra células tumorales (137-140), pero las estrategias de inmunoterapia anti-tumoral ensayadas hasta el presente no han conducido a resultados clínicos exitosos (141). El desafío para los inmunólogos consiste pues en comprender los mecanismos por los cuales los tumores evitan desencadenar una respuesta inmune eficiente y desarrollar nuevas estrategias de inmunoterapia o terapia génica que conduzcan al disparo de señales de activación inmune óptimas y la eliminación de factores responsables del escape tumoral, la reaparición de los tumores primarios y de las metástasis. Por otra parte, muchas de las terapias actualmente empleadas llevan al desarrollo de reacciones autoinmunes, tal como es el caso del vitiligo observado en pacientes con melanomas que recibieron transferencia de linfocitos T citotóxicos propagados *ex vivo* (140, 142).

Experimentos *in vitro* han demostrado que las células NK son capaces de disparar una citotoxicidad NKG2D-dependiente contra células tumorales provenientes de tumores epiteliales y no epiteliales (131, 132). En algunos casos, NKG2D fue el único receptor involucrado en el reconocimiento de las células tumorales, por lo que las moléculas blanco reconocidas, en particular MICA, son de interés para su estudio exhaustivo como candidatos a ser empleados en el desarrollo de estrategias de terapia génica o inmunoterapia anti-tumoral (**Figura 6**).

En años recientes, se han publicado 2 estudios realizados en ratones en los que se investigó el papel de la molécula NKG2D como estructura de reconocimiento de células tumorales (139, 143, 144). En uno de ellos, se demostró que la expresión ectópica de Rae1 y H60 en células tumorales de ratón por transducción

con adenovirus, induce el rechazo de los tumores *in vivo* en ratones singeneicos de una manera NKG2D-dependiente, en un fenómeno mediado por células NK y linfocitos T CD8$^+$ citotóxicos (143). El re-desafío de los animales sobrevivientes con los tumores transducidos o inclusive con los tumores salvajes permitió demostrar que las células efectoras de la respuesta inmune anti-tumoral fueron los linfocitos T CD8$^+$ citotóxicos y que el desafío original generó memoria inmunológica. Más recientemente, utilizando un modelo murino humanizado de células de cáncer de pulmón transducidas y células NK humanas o murinas, se demostró que la sobre-expresión de MICA promueve una fuerte respuesta inmune anti-tumoral (139). Asimismo, se ha demostrado que la sobre-expresión de ciertos NKG2DLs en líneas celulares derivadas de gliomas humanos produce un crecimiento retardado de estas células en ratones atímicos (145). Sin embargo, en este trabajo no se estudiaron los mecanismos involucrados en el crecimiento demorado de los tumores.

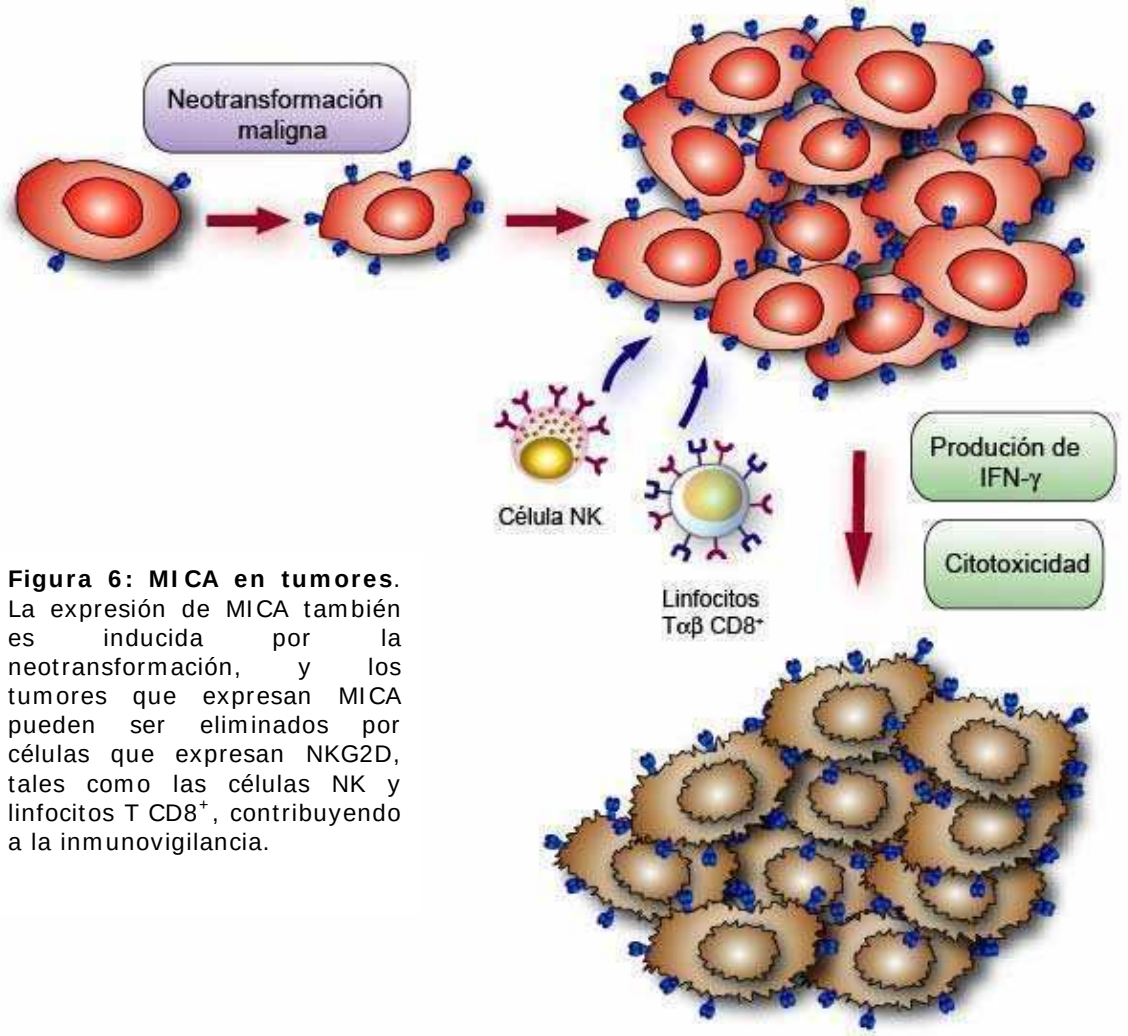


Figura 6: MICA en tumores. La expresión de MICA también es inducida por la neotransformación, y los tumores que expresan MICA pueden ser eliminados por células que expresan NKG2D, tales como las células NK y linfocitos T CD8$^+$, contribuyendo a la inmunovigilancia.

NKG2D, además de ser importante en el control del crecimiento y establecimiento de tumores y metástasis que expresan sus ligandos, protege al huésped de la iniciación de tumores, ya que la neutralización de NKG2D en ratones induce un aumento en la incidencia de tumores generados con carcinógenos químicos (146). Además, ratones que presentan una disminución sistémica de la expresión de NKG2D en células NK y linfocitos T $CD8^+$ no son capaces de rechazar tumores que expresan MICA (147). Recientemente se ha demostrado que los TILs de pacientes con melanomas expresan NKG2D y que este receptor es importante para el reconocimiento del tumor por parte de estos linfocitos (148), reforzando la idea de que NKG2D es importante en la inmunidad anti-tumoral también en humanos. Pese a la expresión de NKG2D en TILs y de NKG2DL en diversos tumores humanos, éstos continúan con su desarrollo lo que se debe a la existencia de diversos mecanismos de escape que comprometen a las células NK y más específicamente a NKG2D.

12. Mecanismos de escape que involucran al sistema NKG2D-NKG2DL

Hasta el momento se han descripto diversos mecanismos que contribuyen al escape de la respuesta inmune mediada por células NK. Entre ellos se destacan la secreción de citoquinas inmunosupresoras (149), la expresión de isoformas solubles de HLA-G (150) y el reclutamiento de Tregs al microambiente tumoral (151). Sin embargo, el hecho de que las células tumorales que expresan altos niveles de NKG2DL sean altamente susceptibles al reconocimiento y destrucción mediados por NKG2D *in vitro*, y a la vez estén infiltrados por células $NKG2D^+$ sugiere que existen mecanismos que *in vivo* alteran el normal reconocimiento y desarrollo de funciones efectoras por el sistema NKG2D-NKG2DL. Esto podría resultar en la selección de variantes tumorales que impiden este reconocimiento. En primer lugar se demostró que el ectodominio de MICA puede ser secretado *in vitro* al medio de cultivo y detectado *in vivo* en suero de pacientes con cáncer, lo que afecta la funcionalidad de células citotóxicas por interferencia en la interacción con el receptor NKG2D (152, 153). El clivaje involucra la acción de metaloproteasas (153) y recientemente se ha demostrado que MICA se asocia en la superficie celular con la proteína ERp5 y que esta interacción es requerida para el clivaje de MICA y la secreción del ectodominio soluble (154). El clivaje de MICA no solo genera variantes tumorales con baja expresión de MICA sino que induce la internalización de NKG2D en células

NK y linfocitos T $CD8^+$ y, consecuentemente una disminución de su expresión en superficie. De esta manera las células citotóxicas se ven impedidas de reconocer a las células tumorales. Otro mecanismo de escape que involucra al sistema NKG2DL-NKG2D es mediado por TGF-β. Esta citoquina inmunosupresora (155) tiene un doble efecto sobre el sistema NKG2DL-NKG2D. Por un lado regula negativamente la expresión de MICA y otros NKG2DL en la superficie de células tumorales (156) y por otro lado induce una disminución en la expresión de NKG2D en linfocitos T $CD8^+$ y células NK, lo que evita el reconocimiento y destrucción de distintos tipos celulares (151, 156-158) sin afectar la expresión de perforina y FasL (159). El TGF-β además de ser secretado por los tumores, es expresado en la superficie de las células Treg, que en el microambiente tumoral inducen una disminución de NKG2D en las células NK (151). Recientemente se ha demostrado otro mecanismo de escape que evita el reconocimiento de los tumores por células NK en forma dependiente de NKG2D. Éste involucra la expansión selectiva de linfocitos T $CD4^+NKG2D^+$ en la sangre de pacientes con tumores. Esta población poco convencional de células tiene un fenotipo supresor, ya que la forma soluble de MICA (sMICA) no induce una disminución en la expresión de NKG2D en esta población (en oposición a lo que ocurre en linfocitos T $CD8^+NKG2D^+$) sino que la estimula para producir FasL soluble, lo que induce una expansión de las células T $CD4^+NKG2D^+$ con fenotipo supresor y un arresto del ciclo celular en linfocitos T $CD4^+NKG2D^-$ y $CD8^+NKG2D^-$ que serían los mediadores de la inmunidad anti-tumoral (160). De esta manera este mecanismo contribuye a que los tumores logren escapar al reconocimiento por el sistema inmune. Los mecanismos de escape que involucran al sistema NKG2D-NKG2DL se encuentran resumidos en la **Figura 7.**

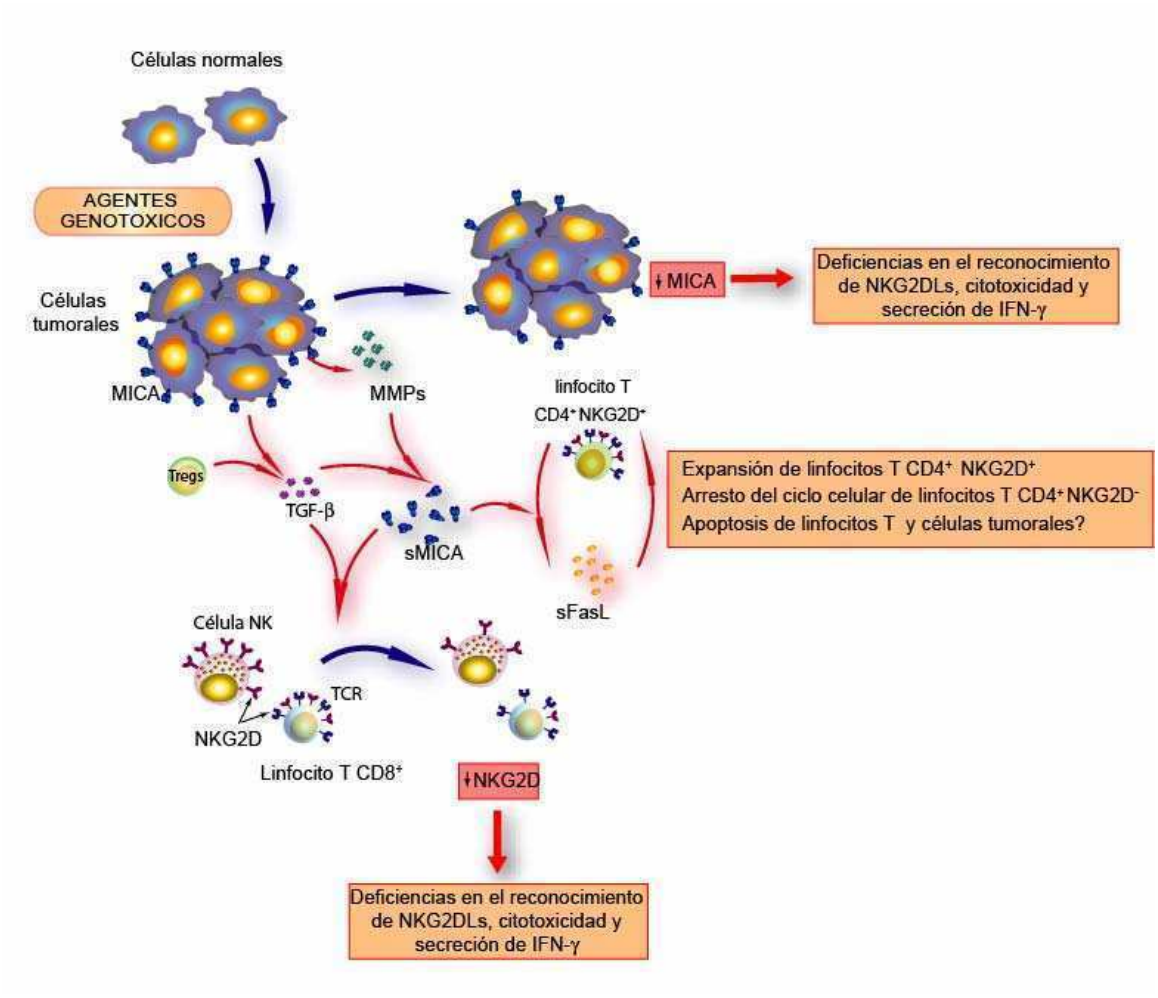


Figura 7: Mecanismos de escape tumoral que involucran a NKG2D y sus ligandos: Se muestran los tres mecanismos de escape que involucran a NKG2D descriptos hasta el momento: MICA es clivada de la superficie de ciertos tumores por metaloproteasas (MMPs) y junto con el TFG-β (secretado por el tumor y/o por células Treg) induce una disminución en la expresión de NKG2D en linfocitos T $CD8^+$ y en células NK. Los tumores que expresan bajos niveles de NKG2DL son entonces deficientemente reconocidos por las células citotóxicas que además muestran baja expresión de NKG2D. Además, Fas soluble secretado por una población de células $NKG2D^+CD4^+$ supresoras induce la expansión autócrina de esta población e induce el arresto del ciclo celular de células $CD4^+NKG2D^-$. Adaptada de (45).

Objetivos

Los antecedentes descriptos ponen en evidencia la importancia crucial del sistema NKG2DL/NKG2D en la vigilancia inmunológica contra tumores. Por ello y con el objetivo de desarrollar estrategias de inmunoterapia para el tratamiento de pacientes con cáncer basadas en la regulación de la expresión de los diversos NKG2DLs, resulta fundamental elucidar los mecanismos desarrollados por los tumores que comprometen al reconocimiento de NKG2DLs por NKG2D y consecuentemente, al desarrollo de funciones efectoras por células NKG2D$^+$ (células NK y linfocitos CD8$^+$). Por lo tanto, el **objetivo central** de esta tesis fue analizar el rol que juega el sistema MICA-NKG2D en el reconocimiento de melanomas humanos por células NK y de qué manera la dinámica de MICA en la célula tumoral puede afectar el reconocimiento de los tumores por parte de las células NK y la calidad de la respuesta inmune anti-tumoral.

En este marco, los **objetivos específicos** fueron:

- estudiar la expresión de NKG2DL (y en particular, MICA) en melanomas humanos y evaluar su influencia en la actividad biológica de las células NK;

- estudiar la dinámica de expresión de MICA en melanomas humanos; e

- investigar la existencia de variaciones en la expresión de MICA que puedan promover el escape al reconocimiento inmune de los tumores.

Materiales y Métodos

1. Líneas celulares utilizadas

Se utilizaron las siguientes líneas celulares adherentes de origen humano: **HeLa** (adenocarcinoma de cuello de útero, ATCC CCL-2), **HT29** (adenocarcinoma de colon, ATCC HBT-38), **HCT 116** (adenocarcinoma de colon, ATCC CCL-247). Y los melanomas, **M8** (provisto por la Dra M. Pérez, A.R.N., Buenos Aires, 161), **A375N** (cedido por la Dra. E. Medrano, Baylor College of Medicine, Houston, TX, 162), **IIB-Mel-LES** (163), **IIB-Mel-IAN** (163), **IIB-MEL-J** (164), **SKmel-28** (ATCC HTB-72) y **MEL-888** (provista por el Dr. O. Podhajcer, Instituto Leloir, Buenos Aires), **SKmel-24** (ATCC HTB-71), **CIO Mel-001** y **CIO-MEL-002** (cedidas por el Dr. Mordoh, FUCA, Buenos Aires). CIO-MEL-001 es una línea celular establecida a partir de una metástasis de melanoma detectada en una mujer caucásica de 33 años que luego de entrar en fase I de un ensayo clínico permanecía libre de enfermedad por más de 30 meses al momento del último control. CIO-MEL-002 es una línea celular establecida a partir de un melanoma primario obtenido de una mujer caucásica de 27 años. Esta paciente fue tratada con IFN-α pero 29 meses después desarrolló metástasis y enfermedad progresiva, y falleció 39 meses después del diagnóstico inicial (Barrio M. y col., comunicación personal).

Los adenocarcinomas fueron cultivados en medio DME (Sigma, Saint Louis, MO, EEUU) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Invitrogen, Gaithersburg, MD, EEUU), 54 ng/ml de piruvato sódico, 0,292 mg/ml de glutamina, 50 U/ml de penicilina sódica y 50 mg/ml de estreptomicina (todos de Invitrogen).

Los melanomas fueron cultivados en medio RPMI-1640 (Invitrogen) suplementado con 10% de SFB, piruvato sódico, glutamina, penicilina sódica y estreptomicina.

2. Muestras humanas

Se obtuvieron suspensiones de células tumorales a partir de la escisión quirúrgica de 6 metástasis de melanomas en piel o ganglio linfático. Estas muestras fueron divididas en dos partes: la primera fue utilizada para preparar suspensiones de células por disrupción mecánica o enzimática; la segunda fue destinada a

histología de rutina y diagnóstico. Las muestras fueron obtenidas respetando las recomendaciones de los comités de ética locales y en concordancia con la declaración de Helsinki. La grasa fue removida con bisturí, los tumores fueron lavados con medio DME y cortados en pequeños pedazos. Para las metástasis dérmicas, se realizó una digestión durante 2-16 h a 37ºC con 50-100 U/ml de colagenasa de tipo I (Invitrogen) en DME completo. A continuación se disgregó el tejido por pasajes a través de una mala metálica estéril hasta obtener una suspensión celular. Las células fueron centrifugadas, resuspendidas y lavadas con medio fresco, contadas y congeladas en nitrógeno líquido.

Los nevos fueron extraídos en el marco de una colaboración con el Servicio de Dermatología del Hospital de Clínicas. La extracción se realizó empleando un "*punch*" de 3 mm y las muestras fueron disgregadas mecánicamente utilizando un émbolo y una malla de metal. Las células obtenidas fueron utilizadas para marcaciones de citometría de flujo y en los casos en que la muestra fue abundante, también se utilizaron para preparar lisados y analizar la expresión de MICA por *Wester blot.*

3. Reactivos

Se emplearon las drogas citocalasina B, brefeldina A, cloroquina (todas de Sigma) y bortezomib (Velcade). La citocalasina B se usó a 1 μg/ml, la brefeldina A se usó a 5 ng/ml, la cloroquina se usó a 50 μM y el Bortezomib a 50nM.

4. Extracción de proteínas

4.1. Lisados proteicos totales

Un millón de células fueron lavadas 3 veces con NaCl 150 mM, fosfatos 50 mM, pH=7,4 (PBS), centrifugadas a 2.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente (t.a.) y resuspendidas en 60 μl de *buffer* de lisis (TBS -150 mM de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 7,4-, una dilución 1/100 de un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma) y 1% de 3-[(3-cloroaminopropil)dimetilamino]-1-propano-sulfonato -CHAPS, Sigma-). Los extractos se incubaron durante 1 h a 4 ºC, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se trasvasó a un

tubo nuevo. Se tomaron 47 μl de los extractos y se diluyeron con 3 μl de 0,2 M de ditiotreitol (DTT) y 10 μl de *buffer* de siembra para SDS-PAGE (7 ml de *buffer* de apilamiento 4X, 3 ml de glicerol, 1 g de SDS, 2 mg de azul de bromofenol).

4.2 Fracciones subcelulares

Las células fueron cultivadas durante 24 h en presencia o ausencia de 50nM del inhibidor del proteosoma bortezomib. A partir de cuatro millones de células se obtuvieron las fracciones de citoplasma y membrana. Para ello, las células fueron lavadas como se describió previamente, resuspendidas en una dilución 1/100 del cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma) en TBS seguidamente, y lisadas por sonicación durante 10 segundos a 60A. A continuación los extractos se centrifugaron 10 min a 1000 rpm, se descartó el *pellet*, el sobrenadante se trasvasó a un tubo limpio y se ultracentrifugó durante 1 h a 4ºC a 100.000 *g*. El sobrenadante obtenido (fracción citoplasmática) se guardó a -20ºC y el *pellet* se resuspendió en *buffer* de lisis. Se incubó durante 1 h a 4ºC y se ultracentrifugó durante 1 h a 4ºC a 100.000 *g*. El sobrenadante obtenido (fracción de membrana) se colectó y guardó a -20ºC. La expresión de MICA se evaluó por *Western blot*. Como control de pureza de las fracciones se analizó por *Western blot* la expresión de moléculas de clase I del HLA usando el AcMo HC10 y la expresión de hsp70 usando el AcMo BRM-22 (Sigma).

4.3. Cuantificación de proteínas

Se cuantificó por duplicado la concentración de proteínas en los distintos lisados proteicos con el reactivo comercial *MicroBCA Protein Assay Reagent* (Pierce, Rockford, IL, EEUU) de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante, utilizando una dilución 1/100 de las muestras en agua.

5. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)

Se utilizó el método discontinuo en placa descripto por Hames (165), con un gel de separación de 10% de poliacrilamida (2 ml de acrilamida:bisacrilamida 30:0,8 respectivamente, 1,5 ml de *buffer* separador 4X -1,5 M de Tris-HCl, 0,4% de SDS pH 8,8-, 20 μl de una solución al 10% de persulfato de amonio, 4 μl de TEMED y H_2Odd c.s.p. 6 ml), y un gel de apilamiento de 3% de poliacrilamida (292,5 μl de

acrilamida: bisacrilamida 30:0,8, 550 μl de *buffer* de apilamiento 4X -0,5 M de Tris-HCl, 0,4% de SDS pH 6,8-, 13 μl de una solución al 10% de persulfato de amonio, 3 μl de TEMED y H_2Odd c.s.p. 2.200 μl). Se sembraron marcadores de peso molecular Mark12™ MW Standard (Invitrogen) y 20 μg de extractos proteicos disueltos en *buffer* de siembra por calle. Se llevó a cabo la corrida electroforética en *buffer* de corrida (3,02 g de Tris base, 14,4 g de glicina, 1 g de SDS y H_2Odd c.s.p. 1 litro) a 150 V hasta que el frente de corrida alcanzó el límite del gel, en una cuba de electroforesis Mini Protean II o III (Bio-Rad, Hercules, CA). Las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad), utilizando *buffer* de transferencia (3,02 g de Tris base, 14,4 g de glicina, 200 ml de metanol y H_2Odd c.s.p. 1 litro) durante 75 min a 250 mA en una cuba de transferencia MiniTransBlot (Bio-Rad). Se comprobó la transferencia de proteínas a la membrana por tinción con Ponceau S 0,1% en 1% de ácido tricloroacético. Se comprobó la igualdad de carga proteica en cada calle revelando las membranas también con un Ac anti-β-actina.

Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada (Bio-Rad) al 5% en TBS durante 16 h a 4 ºC. Posteriormente se realizaron 3 lavados (el primero de 15 min y los siguientes de 5 min) con TBS-T (TBS con 0,1 % de Tween 20, Sigma). Se incubó a t.a. el anticuerpo (Ac) primario diluido en TBS-T con leche descremada al 1% desde 1 h hasta 16 h, dependiendo del Ac. Posteriormente las membranas fueron lavadas 5 veces con TBS-T (primer lavado de 15 min y los siguientes de 5 min) e incubadas durante 1 h con el Ac de secundario conjugado a peroxidasa (HRP, Bio-Rad) en leche descremada al 1% en TBS-T. A continuación las membranas se lavaron 5 veces con TBS-T y se revelaron por quimioluminiscencia empleando el reactivo ECL™ (Amersham Biosciences) de acuerdo a las especificaciones del fabricante y placas Biomax light (Kodak, San Pablo, Brasil). Las placas fueron digitalizadas en un scanner y la intensidad de las bandas fue cuantificada por análisis densitométrico con el programa de análisis Scion Image (www.scioncorp.com, Scion Corporation, Frederick, Maryland, EEUU). En primer lugar se sustrajo el *background*, posteriormente se utilizó la herramienta "*thersholding*" para establecer el valor medio de grises de la imagen y luego se convirtió la imagen a binaria. Finalmente se seleccionó el área correspondiente a cada banda y se cuantificó el número de pixeles.

5.1 Anticuerpos para Western Blot

Anti-MICA: Se incubó durante 16 h en una dilución 1/3000 de sueros de conejo anti-MICA #620 y #621 (generados contra péptidos correspondientes a los aminoácidos 42-60 y 140-160 de la secuencia traducida de MICA, respectivamente 102). Como Ac secundario se utilizaron inmunoglobulinas (Ig) de cabra anti-IgG de conejo conjugadas a HRP.

En los experimentos de digestión con EndoH la expresión de MICA fue detectada con IgG purificadas de los sueros #620 y #621 biotiniladas y estreptavidina conjugada a HRP (Southern Biotech, Birmingham, AL, EEUU).

Anti-MICB: Se incubó durante 16 h en una dilución 1/3000 de sueros de conejo anti-MICB #631 y #632 (generados contra péptidos de la secuencia traducida de MICB respectivamente, 166) biotinilados, y estreptavidina conjugada a HRP.

Anti-β-actina: Se incubó durante 1 a 16 h en una dilución 1/3000 del AcMo I-19 (Santa Cruz). Como Ac secundario se utilizaron Ig de cabra anti-IgG de conejo conjugadas a HRP.

Anti-calnexina: Se incubó durante 16 h en una dilución 1/1000 del AcMo TO-5 (167). Como Ac secundario se utilizaron Ig de cabra anti-IgG de ratón conjugadas a HRP.

Anti-Hsp70: Se incubó durante 16 h en una dilución 1/5000 del AcMo BRM-22 (Sigma). Como Ac secundario se utilizaron Ig de cabra anti-IgG de ratón conjugadas a HRP.

Anti-HLA de clase I: Se incubó durante 16 h en una dilución 1/100 de sobrenadante de cultivo del hibridoma HC10 (168). Como Ac secundario se utilizaron Ig de cabra anti-IgG de ratón conjugadas a HRP.

6. Citometría de Flujo

6.1. Inmunomarcación de superficie

Se utilizaron 500.000 células por tubo. Las células se lavaron con PBS con 1% de SFB y 0,1% de NaN_3 (PSA). Posteriormente se incubaron 15 min a 37 ºC en PBS y 10% de suero normal de cabra, con el objeto de bloquear las uniones inespecíficas, se centrifugaron a 1000 *g* durante 5 min, se descartaron los sobrenadantes y las células se resuspendieron en 10 μl del Ac primario

correspondiente. Se incubaron durante 30 min en hielo, se centrifugaron lavaron 2 veces con 200 μl de PSA, las células se resuspendieron en 20 μl de una dilución 1/40 del Ac secundario conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) o ficoeritrina (PE) diluido en PSA y se incubaron durante 30 min en hielo y oscuridad. Posteriormente las células se lavaron 2 veces con 200 μl de PSA, y se resuspendieron en 400 μl de PBS y 0,1% de NaN_3. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) y los datos obtenidos se analizaron con el programa WinMDI 2.8 (http://facs.scripps.edu).

6.2. Cuantificación de la fluorescencia

Para cuantificar la florescencia se utilizó el kit QuantiBRITE™ PE (Becton Dickinson) siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante. Brevemente, en el citómetro se adquirió la fluorescencia de las perlas (*beads*) de QuantiBRITE™ y a continuación y, utilizando la misma ganancia para PE, se adquirieron las distintas células marcadas con Ac y conjugado con PE. Este ensayo permite una estimación del número de moléculas de Ag por célula. Para lograrlo, se emplean perlas marcadas con un número conocido de fluorocromos (515, 5956, 26653 y 69045 moléculas de PE por perla). Conociendo este número y la media de fluorescencia que se obtiene en el citómetro es posible realizar una curva y una regresión lineal que relacione ambos parámetros. Así pudimos calcular el número de moléculas de anticuerpo unido por célula, ABC (*antibody bound per cell*).

En algunos experimentos, se calculó el índice de fluorescencia específica (SFI, *Specific fluorescence index*) definido como la intensidad de fluorescencia media producida por cada AcMo específico dividido la fluorescencia media producida por el AcMo control de isotipo (CI).

6.3. Anticuerpos para inmunomarcación

Para la detección de MICA se utilizaron 10μl de 10 μg/ml del AcMo anti-MICA D7 generado en nuestro laboratorio (IgG_{2b},κ, (169). Dicho AcMo se obtuvo por inmunización de ratones de la cepa BALB/c con la proteína recombinante soluble MICA*008. El mismo reacciona por citometría de flujo con distintas líneas celulares humanas (carcinomas y líneas epiteliales) y detecta al menos más del 95% de los alelos de MICA descriptos hasta el momento

Los AcMo anti-ULBP-1, -2, y -3 empleados fueron de R&D Systems (Minneapolis, MN). El AcMo anti-HLA-E, MEM-E06, fue de Exbio (Vestec, República Checa).

Para la detección de moléculas de clase I del CMH, se utilizó una dilución 1/1000 de líquido ascítico del AcMo W6/32. Como Ac CI se utilizó una dilución equivalente del AcMo BI24 (IgG2b, purificado 170). Como Ac secundario se utilizó una dilución 1/40 de IgG de cabra contra IgG de ratón, conjugadas con FITC o PE (DAKO, Glostrup, Dinamarca).

7. Aislamiento de células NK

Las células NK fueron aisladas de sangre periférica de voluntarios humanos sanos utilizando el reactivo RosetteSep (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada) y un gradiente de centrifugación en Ficoll-Paque™ Plus (Amersham Biosciences). Las células NK de ratón fueron aisladas de bazo de ratones Swis utilizando el reactivo SpinSep (Stem Cell Technologies). Las células NK humanas o murinas aisladas fueron lavadas con RPMI 1640, y resuspendidas en RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, piruvato de sodio, glutamina y penicilina-estreptomicina. Estas células fueron empleadas como células efectoras en ensayos de citotoxicidad y cocultivos para evaluar la liberación de IFN-γ.

8. Ensayos de citotoxicidad

Las relaciones efector:blanco (E:B) utilizadas fueron 20:1, 10:1, 5:1 y 1:1 (células NK humanas) o 60:1 (células NK de ratón). Se realizó la incubación de las células blanco con cromato de sodio radioactivo en solución acuosa (^{51}Cr, Amersham Biosciences) a razón de 0,1 mCi/1x10^6 células, durante 1 h en baño de agua a 37ºC. Se lavaron las células 3 veces con RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB y se incubaron con distintos números de células efectoras durante 5 hs en estufa a 37ºC (volumen total: 200μl). Posteriormente se cosecharon 100μl de los sobrenadantes de cultivo y se cuantificó la radiación en un contador γ (Clinigamma, LKB, Wallac, Turku, Finland). Los resultados obtenidos fueron transformados en % de lisis, utilizando la fórmula:

$$\% \quad de \quad lisis \quad = \frac{cpm_X - cpm_{LE}}{cpm_{MAX} - cpm_{LE}} x\,100$$

donde, X es la muestra, LE es la liberación espontánea de las células blanco al ser incubadas sin células efectoras y MAX es la liberación máxima, que se determinó incubando las células blanco con Triton X-100 al 1 %. En todos los casos la liberación espontánea fue menor al 15% de la liberación máxima.

En algunos ensayos se preincubaron las células efectoras con el AcMo bloqueante anti-NKG2D humano, 1D11 (eBioscience, San Diego, CA, EEUU) o su correspondiente CI IgG2b a 10 μg/ml durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación, estas células fueron incubadas con las células blanco como se describiera previamente y los resultados fueron expresados como % de lisis.

9. ELISA de captura para detección de:

9.1. MICA

Se sensibilizaron placas de 96 fosas de fondo plano Maxisorp (NUNC, Rochester, NY, USA), con 0,5 μg de Ac de captura (D7) diluido en 50μl de PBS por fosa, durante 16 h a 4ºC en cámara húmeda. Los pocillos fueron lavados y bloqueados con 150 μl/fosa de leche descremada al 3% (Bio-Rad) en PBS durante 1h a 37ºC. Se descartó el líquido y se realizaron 2 lavados con PBS-T. Luego se incubó durante 2h a 37ºC con los sobrenadantes de cultivo de los melanomas SK-Mel-28, Mel-888, IIB-Mel-LES, IIB-Mel-IAN, CIO-Mel-001, CIO-Mel-002, Mel-J, M8, SK-Mel-24 y A375N concentrados 50 veces en tubos Centricon (Millipore corporation, Bradford, MA, EEUU) o con diluciones seriadas de la proteína rMICA*009 diluída en medio de cultivo (para realizar una curva de calibración, 50 μl/fosa, 171). Como Ac de detección se utilizó una dilución 1/1000 de los sueros policlonales de conejo 621 y 622 (102) en PBS-T leche durante 2 hs a 37ºC. Se descartó el líquido y se realizaron 2 lavados con PBS-T Se incubó durante 1 h con Igs de cabra anti-Igs de conejo conjugadas a HRP y se reveló con o-fenildiamina (OPD, Sigma). Se midieron las absorbancias a 492 nm utilizando un lector Titertek Multiscan MK II ELISA (Labsystems, Helsinki, Finlandia).

9.2. TGF-β

Se analizó por ELISA de captura la secreción de TGF-β por los melanomas utilizando un AcMo anti-TGF-β (R&D Systems) como Ac de captura pegado a placas Maxisorp y sobrenadantes de cultivo acidificado para detectar TGF-β bioactivo. El TGF-β capturado fue detectado usando un AcMo anti-TGF-β biotinilado (R&D Systems) y avidina marcada con HRP (Pierce, Rockford, IL), revelándose luego con TMB (Sigma). Se obtuvo una curva estándar empleando TGF-β recombinante.

9.3. IFN-γ

Se realizaron cocultivos de células NK y células de melanoma, a distintas relaciones E:T en estufa de atmósfera controlada a 37ºC. Luego de 16h se cosecharon los sobrenadantes de cultivo y se utilizaron para evaluar por ELISA de captura la presencia de IFN-γ. Para esto se empleó un AcMo anti-IFN-γ (Pierce) como Ac de captura pegado a placas Maxisorp. El IFN-γ capturado fue detectado usando un AcMo anti-IFN-γ biotinilado (Pierce) y avidina marcada con HRP (Pierce), revelándose luego con OPD.

En algunos ensayos se preincubaron las células efectoras con el AcMo bloqueante anti-NKG2D humano, 1D11 o su correspondiente CI IgG2b a 10 μg/ml durante 30 min a temperatura ambiente. A continuación estas células fueron incubadas con las células blanco como fuera descripto previamente.

10. Modulación de la expresión de MICA por TGF-β

Luego de cultivar las células de melanoma durante 48 hs en presencia de 5μg/ml de un AcMo neutralizante anti-TGF-β (R&D Systems), se ensayó la expresión de MICA en la superficie utilizando el AcMo anti-MICA D7 y citometría de flujo como fuera descripto.

11. Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal

Las células se cultivaron en *chamber slides* (NUNC) hasta que alcanzaron un 80-90% de confluencia, se fijaron con 2% de *p*-formaldehido (pfa) en PBS durante 5 min a t. a. Luego de lavar, se bloqueó con suero normal de cabra diluido 1/20 en

PBS durante 30 min a t.a. A continuación, las células fueron incubadas con 200 μg/ml del AcMo anti-MICA D7 o con el AcMo CI durante 30 min a t. a. El Ac unido fue detectado incubando las células con Ig de burro anti-IgG de ratón marcado con Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) durante 30 min a t. a. Luego de lavar, los portaobjetos fueron montados con DABCO y observados en un microscopio confocal digital Nikon Eclipse E800 C1 con objetivos Nikon Plan Apo 60X/1,40 Oil y Nikon Plan Apo 40X/0,95. Para las inmunofluorescencias con células permeabilizadas, las células fueron tratadas con saponina 0,1% (Sigma) en PBS durante 10 min luego de la fijación con pfa. Posteriormente, los bloqueos, lavados y marcaciones se llevaron a cabo como fuera descripto, pero en todas las soluciones se incluyó saponina al 0,1%.

Para los experimentos de colocalización en líneas celulares, las células fijadas y permeabilizadas fueron incubadas con el AcMo anti-MICA D7 (200μg/ml) e IgG de burro anti-IgG de ratón conjugadas a Cy3 (1/50) como fuera descripto. Posteriormente, las células se lavaron e incubaron con los siguientes AcMo marcados con FITC (todos de Becton Dickinson): anti-calnexina, anti-EEA1, anti-GM130, y anti-LAMP2. El AcMo utilizado como CI fue de Southern Biotech. En todos los casos, los Ac fueron diluidos en saponina al 0,1% en PBS.

Para los experimentos de colocalización en melanomas humanos se utilizaron muestras de metástasis de melanomas incluidas en parafina. Para desparafinar las muestras se hicieron 3 lavados en xilol durante 5 min cada uno. Para rehidratar los tejidos se incubaron, nuevamente durante 5 min en concentraciones decrecientes de etanol (etanol absoluto, etanol 80%, etanol 70%, etanol 50% y por último agua destilada). Las marcaciones se llevaron a cabo de la misma manera que en el caso de las líneas de melanoma, pero las diluciones de los anticuerpos se realizaron en PBS con Tween 20 al 0,1%. Una vez marcados los preparados se deshidrataron por pasajes de 5 min en etanol en concentraciones crecientes (50%, 70%, 80% y 100%) y xilol durante 5 minutos. Se drenaron los vidrios y se cubrieron con cubreobjetos

En todos los casos los preparados fueron observados por microscopía confocal.

12. Microscopía electrónica:

Células de la línea IIB-Mel-LES se fijaron con pfa al 4% y glutaraldehído al 0,75%. Posteriormente se cosecharon, lavaron y deshidrataron con etanol. Las

células fueron embebidas en resina acrílica y benzoilperóxido. Se cortaron secciones ultrafinas y se realizó la inmunomarcación con el AcMo D7 e IgG de cabra anti-IgG de ratón conjugadas a particulas de oro coloidal de 10 nm (Sigma). Utilizando uranil-acetato al 1 % y solución citrato de plomo de Reynolds se realizó una coloración de contraste. Las muestras se observaron en un Microscopio Electrónico C10 Zeiss. Las microfotografías fueron obtenidas en films Kodak 4489.

13. Transfecciones

La secuencia completa de MICA*001 fue clonada en el vector de expresión pCIneo (Promega, Madison, WI) a partir de cDNA obtenido de la línea celular HCT116. Se chequeó la ausencia de mutaciones por secuenciación del DNA. Se transfectaron establemente células del melanoma IIB-MEL-LES con el plásmido pCIneo-MICA o con plasmado vacío, empleando Lipofectamine 2000® (Invitrogen). Las células transfectadas se cultivaron en 0,8 mg/ml de G418 (Invitrogen) durante 2 semanas, se cosecharon y emplearon para analizar la expresión de MICA por citometría de flujo o PCR (para las células transfectadas con plásmido vacío). Los cultivos que resultaron positivos se clonaron por dilución límite y se reanalizaron para detectar la expresión de MICA en superficie. Siguiendo este método, se generaron 3 clones que expresan MICA en forma estable en superficie (clones 1, 2 y 3) y un clon transfectado con plasmado vacío (clon control o clon C), que se siguieron cultivando en presencia de G418 a 0,4 mg/ml.

En otros experimentos, se transfectaron en forma transiente células del melanoma IIB-MEL-LES con el plásmido bicistrónico pMSCV2.2 que codifica para EGFP y la proteína p97 salvaje (*wild type*, WT) o una forma dominante negativo (DN), gentilmente cedidos por el Dr. Peter Cresswell, Yale University, New Heaven, CT, que permiten correlacionar la expresión de EGFP con la de p97 (172). Las células de melanoma fueron transfectadas con Lipofectamine 2000® (Invitrogen), cultivadas durante 24 h y analizadas por citometría de flujo para evaluar la expresión de MICA en las poblaciones $EGFP^+$ y $EGFP^-$.

14. Ensayo de proliferación por MTS

Se ensayó la proliferación *in vitro* de los clones utilizando el método no radiactivo CellTiter 96® AQueous Non-radioactive proliferation assay (Promega). Brevemente, las células en crecimiento exponencial fueron lavadas y luego incubadas durante 24 hs en medio libre de suero para sincronizar el crecimiento celular. A continuación, se cultivaron 10^3 células/fosa en placas de 96 fosas en medio DME completo. Se determinó el crecimiento celular a intervalos de 24 hs reemplazando el medio de cultivo por 0,1 ml de solución MTS, siguiendo las instrucciones provistas por el fabricante.

15. Experimentos *in vivo* de desafío con tumores

Todos los experimentos que involucran ratones se realizaron con la aprobación del comité de ética del Laboratorio de Inmunogenética, Hospital de Clínicas, (Buenos Aires, Argentina) y de acuerdo a los lineamientos de los Institutos Nacionales de Salud de EEUU (*NIH, guidelines, Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*). En todos los experimentos se utilizaron ratones hembra Swiss N:NIH(S)nu (*nude)* de 6-7 semanas de edad. Grupos de 4–6 ratones se inyectaron por vía subcutánea en el flanco derecho con $5x10^6$ células del melanoma IIB-Mel-LES transfectadas. Se midió el tamaño del tumor cada 2-3 días utilizando un calibre. El volumen tumoral se calculó como $(d^2 \times D)/2$, donde d y D son los diámetros menor y mayor del tumor, respectivamente. Por razones éticas, los ratones fueron sacrificados cuando los tumores alcanzaron un volumen de 2000 mm^3. Aquellos ratones con un volumen tumoral menor a 500 mm^3 fueron considerados como libres de tumor para el análisis de Kaplan-Meier. Se recuperaron los tumores de cada ratón sacrificado y se evaluó la expresión de MICA y moléculas de clase I del CMH en superficie de las células como se describió previamente. En otra serie de experimentos, los ratones portadores de tumores fueron sacrificados al día 48 y los tumores fueron extraídos y congelados en nitrógeno líquido para evaluar la apoptosis *in vivo*.

16. Ensayo de apoptosis *in vivo*

Se analizó la apoptosis de las células tumorales *in vivo* en criosecciones de los tumores de 10 μm empleando la técnica de TUNEL, utilizando el kit de detección ApopTag® Fluorescein (Chemicon, Temecula, CA). Los especímenes fueron analizados por microscopía confocal.

17. Depleción de células NK *in vivo* en ratones nude

Cada ratón recibió 20 μg del Ac anti-asialoGM1 (Wako BioProducts, Richmond, VA, USA) en un volumen de 0,1 ml los días 1, 7, 17, 31 y 42 mediante inyección intraperitoneal, tomando como día 0 el día de la inoculación del tumor. Los ratones control recibieron cantidades equivalentes de IgG de conejo normal los mismos días.

18. Secuenciación de MICA

Se extrajo RNA total de las distintas líneas de melanoma, utilizando el reactivo Trizol® (Invitrogen). Se amplificaron las secuencias codificantes del gen de MICA utilizando los *primers* MICA1 (*forward primer*, CACTGCTTGAGCCGCTGAGA) y MICA1211 (*reverse primer*, ACTCTACAGCCAGGCAGCTG) realizando una PCR como se detalla: un paso de desnaturalización a 94°C durante 2 min, 10 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, apareamiento a 63°C durante 50 seg, y extensión a 68°C durante 1 min, 25 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 seg, apareamiento a 59°C durante 50 seg, y extensión a 68°C durante 1 min, y una extensión final a 72°C durante 5 min. Se purificaron los amplicones a partir de geles de agarosa empleando el kit de extracción Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Valencia, CA) y se secuenciaron los productos obtenidos en un secuenciador automático de ADN ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) empleando los *primers* MICA1 (*forward primer*), MICA173 (*reverse primer*, TTGGCCATGAACGTCAGG), MICA182 (*forward primer*, GTGCCCCCCATGGTGAAT) y MICA1211 (*reverse primer*). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias publicadas de MICA utilizando el programa de alineación CLUSTALW (www.ebi.ac.uk/clustalw/) y revisadas manualmente.

19. Digestiones con EndoH

Veinte microgramos de proteínas de los lisados totales de melanomas se digirieron con 1500 U de EndoH (New England Biolabs, Ipswich, MA, EEUU) durante 4 h a 37ºC. Posteriormente la expresión de MICA se analizó por *Westen blot*.

20. Análisis estadístico de los datos

Para realizar correlaciones se realizó el test de Pearson.

Para comparar la citotoxicidad, el análisis estadístico de los resultados obtenidos se realizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) con corrección de Student-Newman-Keuls, utilizando el programa InStat.

Para comparar la secreción de IFN-γ por células NK contra distintas células blanco, se utilizó un test de ANOVA con comparación de Dunnett.

Los resultados de crecimiento tumoral obtenidos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) con corrección de Student-Newman-Keuls, utilizando el programa InStat.

Para comparar los niveles de MICA digerida por EndoH se utilizó un test t no apareado.

Los resultados son presentados como la media ± desvío estándar (SD) o error estándar (SEM).

Resultados

1. Expresión de ligandos de NKG2D en melanomas humanos

Con el objeto de investigar la relevancia funcional de MICA y de otros ligandos NKG2DL, analizamos la expresión de estas moléculas en la superficie de 10 líneas celulares derivadas de melanomas humanos (**Figura 8** y **Tabla I**). Los resultados obtenidos mostraron que la línea celular IIB-Mel-IAN fue la que exhibió mayores niveles de expresión de MICA, mientras que otras líneas celulares expresaron niveles intermedios. Llamativamente, algunos melanomas (Skmel-24, A375N, SKmel-28, CIO-Mel-002 e IIB-Mel-LES) no expresaron MICA en su superficie.

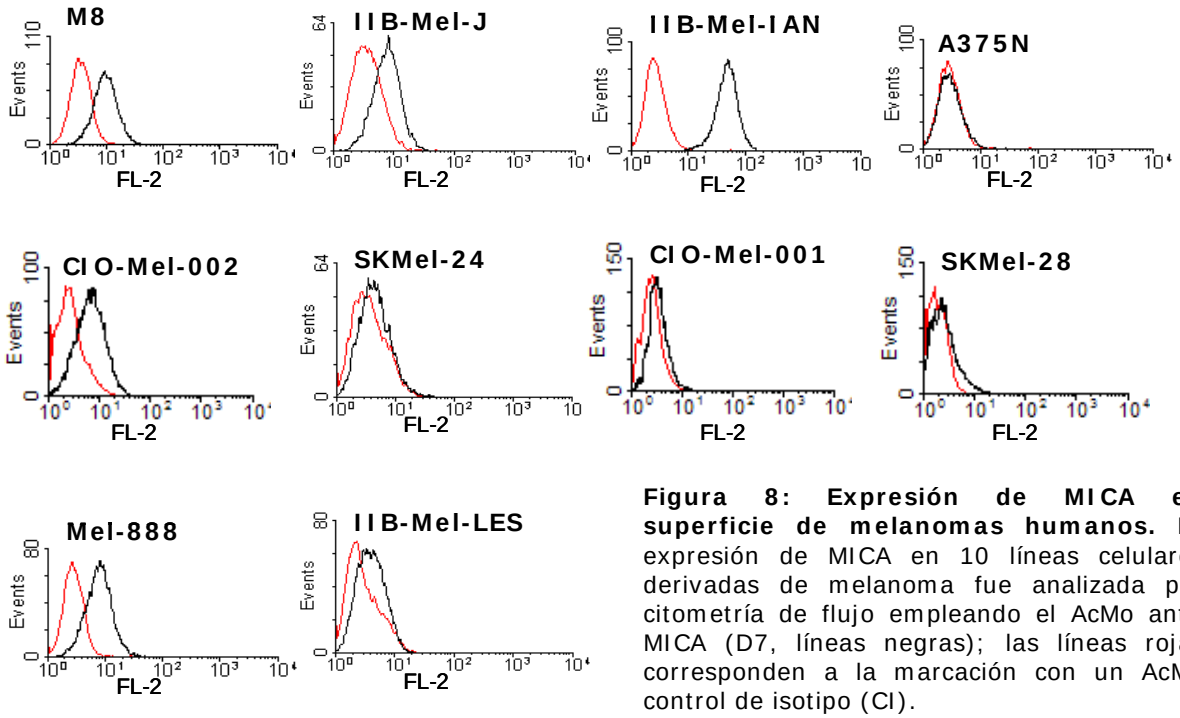


Figura 8: Expresión de MICA en superficie de melanomas humanos. La expresión de MICA en 10 líneas celulares derivadas de melanoma fue analizada por citometría de flujo empleando el AcMo anti-MICA (D7, líneas negras); las líneas rojas corresponden a la marcación con un AcMo control de isotipo (CI).

Cuando investigamos la expresión de otros NKG2DL (**Tabla I**), observamos que excepto IIB-Mel-J y M8, el resto de los melanomas casi no expresaron ULBP-1. ULBP-2 fue detectado en altos niveles en todas las líneas celulares excepto en SKmel-24, Mel-888 y IIB-Mel-LES. Las distintas líneas de melanoma también expresaron niveles variables de ULBP-3. De acuerdo a los datos volcados en la **Tabla I**, observamos que CIO-Mel-001, SKmel-28, Mel-888 e IIB-Mel-LES fueron las líneas con los menores niveles de expresión global de NKG2DL en superficie.

Ranking	Línea celular	MICA/B	ULBP-1	ULBP-2	ULBP-3	HLA clase I	HLA-E
1	M8	718.65 ± 297.35	1359.90 ± 137.26	13449.29 ± 9.80	741.53 ± 84.57	71938.07 ± 518.75	24714.23 ± 2651.89
2	IIB-Mel-J	673.33 ± 99.31	482.05 ± 38.02	4958.39 ± 669.49	886.27 ± 6.02	44056.25 ± 3132.40	302.43 ± 3.28
3	IIB-Mel-IAN	2294.47 ± 13.92	94.04 ± 34.83	3062.10 ± 645,40	1070.43 ± 66.85	40914.26 ± 3767.15	424.75 ± 50.52
4	A375N	63.31 ± 29.42	15.66 ± 8.04	2269.28 ± 35.93	163.32 ± 44.37	51778.22 ± 4001.77	2871.18 ± 294.93
5	CIO-MEL-002	845.37 ± 38.59	260.19 ± 38.07	388.14 ± 44.32	573.73 ± 54.31	12690.20 ± 1308.17	316.04 ± 35.89
6	SKmel-24	375.75 ± 55.15	21.37 ± 27.70	1299.76 ± 109.55	31.99 ± 16.55	31716.84 ± 7923.77	3541.74 ± 418.18
7	CIO-MEL-001	239.50 ± 58.98	74.03 ± 42.85	1266.14 ± 122.16	77.94 ± 46.76	18032.17 ± 4083.10	180.35 ± 55.65
8	SKmel-28	185.91 ± 10.71	9.42 ± 6.20	1275.24 ± 36.35	168.38 ± 63.16	26947.82 ± 7327.31	1618.62 ± 156.89
9	Mel-888	718.82 ± 24.31	82.88 ± 45.27	310.32 ± 95.5	345.76 ± 176.1	17800 ± 3421.35	1079.34 ± 229.62
10	IIB-Mel-LES	149.15 ± 109.42	82.04 ± 3.74	633.91 ± 11.16	307.73 ± 32.52	71671.59 ± 2554.71	1242.66 ± 127.24

Tabla I. Expresión de NKG2DL, HLA de clase I y HLA-E en la superficie de las 10 líneas de melanoma humanos utilizados en este estudio. La expresión de MICA/B, ULBPs-1 a -3, HLA de clase I y HLA-E fue analizada por citometría de flujo y los valores que se muestran corresponden a los ABC ± SEM que fueron calculados como se explicó en la sección Materiales y Métodos. Las líneas celulares fueron ordenadas de acuerdo a los niveles totales de NKG2DL (suma de los valores de ABC de MICA/B y ULBPs) y quellas que no expresaron MICA en superficie celular o que expresaron niveles muy bajos se encuentran subrayadas

La expresión de MICA en las líneas de melanoma también fue analizada por *Western Blot* (**Figura 9**). Para nuestra sorpresa, todas las líneas celulares mostraron expresión de MICA. Además, las distintas líneas analizadas mostraron diferentes niveles de expresión de MICB, pero IIB-Mel-LES y SKMel-28 no expresaron este NKG2DL (**Figura 10**).

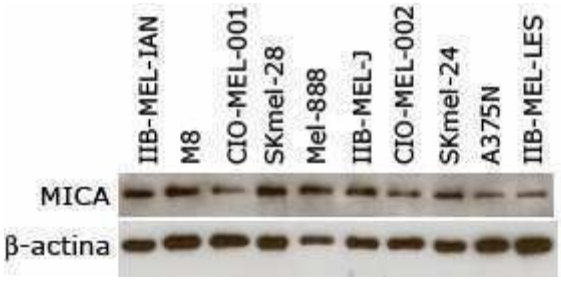


Figura 9. Expresión de MICA y MICB en melanomas humanos. La expresión de MICA en 10 líneas celulares derivadas de melanoma fue analizada por *Western blot* empleando sueros policlonales de conejo específicos anti-MICA. Se muestra también la normalización con β-actina.

Figura 10. Expresión de MICB en melanomas humanos. La expresión de MICB en 5 líneas celulares derivadas de melanoma fue analizada por *Western blot* empleando sueros policlonales de conejo específicos anti-MICB. Se utilizó también la línea HCT-116 como control positivo.

A continuación analizamos si la diferencia en los niveles de expresión de MICA en superficie eran atribuibles a diferencias en los niveles totales de expresión de esta proteína (**Figura 11**). Los resultados obtenidos indican que no existe correlación entre los niveles de expresión de MICA detectados por citometría de flujo y los niveles totales de MICA analizados por *Western blot* normalizados contra β-actina.

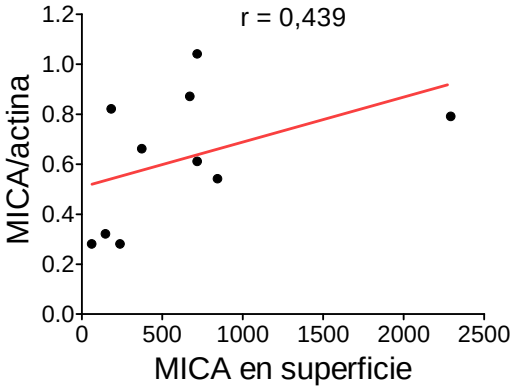


Figura 11: Relación entre los niveles totales de MICA y los niveles de MICA en superficie. Se realizó una correlación de Pearson utilizando los valores de ABC para MICA volcados en la tabla I y la cuantificación de las bandas obtenidas en el *Western blot* de la figura 9, normalizada con β-actina. La cuantificación de las bandas se realizó empleando el programa *Scion* según se explicó en *Materiales y Métodos.*
r Pearson = 0,439, p=0,2 (n.s).

Debido a que los experimentos de *Western blot* fueron revelados con un suero policlonal de conejo contra MICA y las marcaciones para citometría de flujo fueron realizadas con un AcMo de ratón (D7), quisimos comprobar que los resultados negativos obtenidos por citometría de flujo no se debieran a falta de reactividad del AcMo contra alelos de MICA expresados por las líneas celulares que no mostraron marcación por citometría de flujo. Para eso, realizamos marcaciones con el AcMo e

inmunofluorescencias con células fijadas (marcación de superficie) y con células fijadas y permeabilizadas (marcación intracitoplasmática) utilizando las líneas IIB-Mel-LES, A375N (ambas negativas para MICA por citometría de flujo), IIB-Mel-IAN y M8 (ambas expresan MICA por citometría de flujo, **Figura 8**).

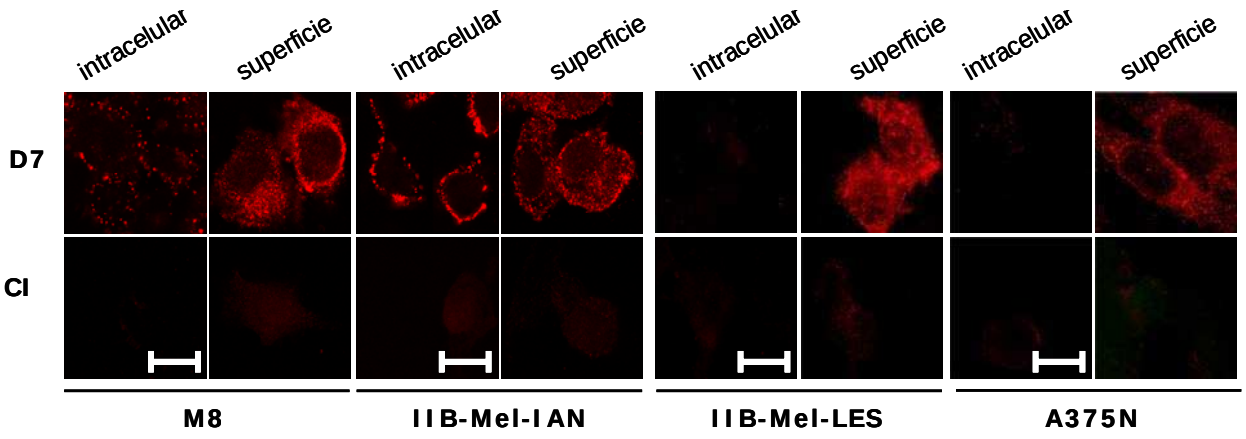


Figura 12. Expresión de MICA en melanomas humanos. Inmunofluorescencia sobre las líneas celulares M8, IIB-Mel-IAN, IIB-Mel-LES y A375N, fijadas y no permeabilizadas (superficie), o fijadas y permeabilizadas (intracelular), empleando el AcMo anti-MICA D7 o un AcMo CI, un conjugado marcado con Cy3 (rojo) y microscopía confocal. La barra corresponde a 10µm.

En la **Figura 12** observamos que si bien las células permeabilizadas de las cuatro líneas analizadas mostraron expresión de MICA, sólo observamos marcación para este NKG2DL en superficie de IIB-Mel-IAN y M8 (con células no permeabilizadas). Estos resultados son acordes con los resultados obtenidos por citometría de flujo (**Figura 8**) y *Western blot* (**Figura 9**). Por lo tanto, globalmente estos resultados confirman la existencia de depósitos intracelulares de MICA en algunos melanomas y descartan la posibilidad de la falta de reactividad del AcMo D7 con alelos particulares de MICA expresados por estas líneas tumorales.

Para determinar si la ausencia de expresión de MICA en superficie en presencia de depósitos intracelulares se observa también *in vivo* decidimos analizar la expresión de MICA en 6 metástasis de melanomas humanos aisladas de piel y ganglio linfático. Coincidentemente con lo observado en las líneas celulares, el análisis de las metástasis mostró que 3 de ellas expresaron MICA en superficie (SAR y dos muestras de LEN, provenientes de ganglio y piel) mientras que otras 3 fueron negativas (JOR, MAN y ARA, **Figura 13 A**). Sin embargo 5 de las 6 metástasis mostraron expresión de MICA por *Western blot* (**Figura 13 B**). En un caso (MAN), no detectamos expresión de MICA por *Western blot*.

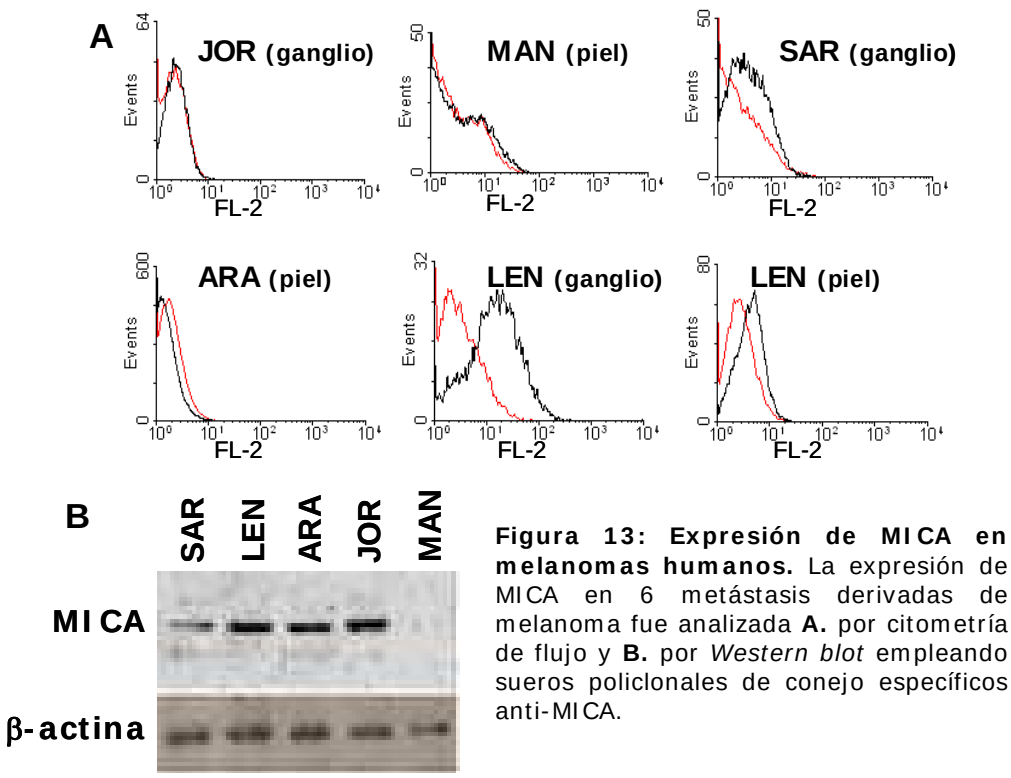


Figura 13: Expresión de MICA en melanomas humanos. La expresión de MICA en 6 metástasis derivadas de melanoma fue analizada **A.** por citometría de flujo y **B.** por *Western blot* empleando sueros policlonales de conejo específicos anti-MICA.

A continuación y para corroborar que nuestros resultados fueran específicos de células tumorales, analizamos la expresión de MICA por citometría de flujo y *Western blot* en 14 nevos benignos y en un melanoma primario maligno (**Figura 14**, donde se muestran resultados con muestras representativas). De los resultados obtenidos podemos concluir que los nevos, compuestos por células que no sufrieron una transformación tumoral, no expresan MICA en superficie pero tampoco poseen depósitos intracelulares de esta proteína. El melanoma primario en cambio, expresó este NKG2DL en su superficie.

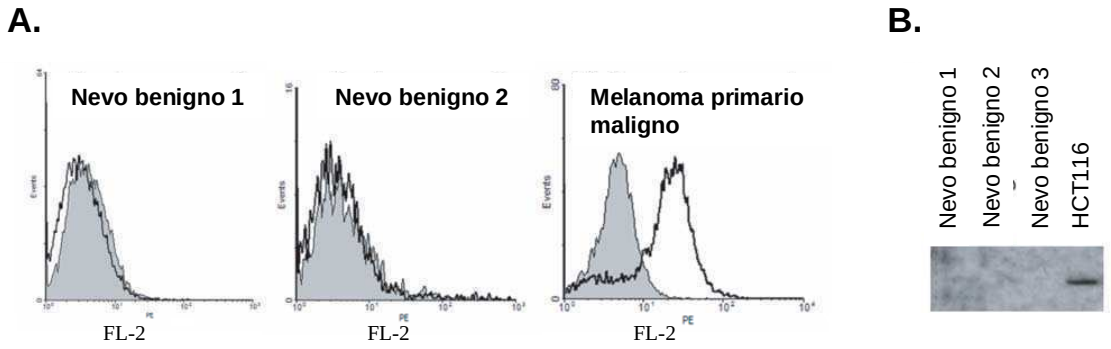


Figura 14: Expresión de MICA en nevos benignos y en un melanoma maligno. A) La expresión de MICA en 2 nevos benignos representativos y un melanoma primario maligno fue analizada por citometría de flujo. **B**) La expresión de MICA en 3 nevos benignos y la línea celular HCT116 fue analizada por *Western blot* empleando sueros policlonales de conejo específicos anti-MICA.

Las 10 líneas de melanoma y 5 de 6 metástasis de melanoma expresan MICA, pero 5 de las 10 líneas celulares y 2 de los 5 tumores frescos previenen la expresión de este ligando de NKG2D en su superficie.

2. Impacto funcional sobre la citotoxicidad mediada por células NK

Con el objeto de investigar si la retención intracelular de MICA confiere resistencia a la lisis mediada por células NK, realizamos ensayos de citotoxicidad con células NK humanas como efectoras. Las distintas líneas celulares mostraron diferente susceptibilidad a la citotoxicidad (**Figura 15**), la que no se correlacionó con los niveles de expresión de MICA en superficie, NKG2DL o moléculas de clase I del HLA pero mostró una correlación significativa con el cociente entre los niveles de expresión de NKG2DL y de moléculas de clase I del HLA (**Figura 16**).

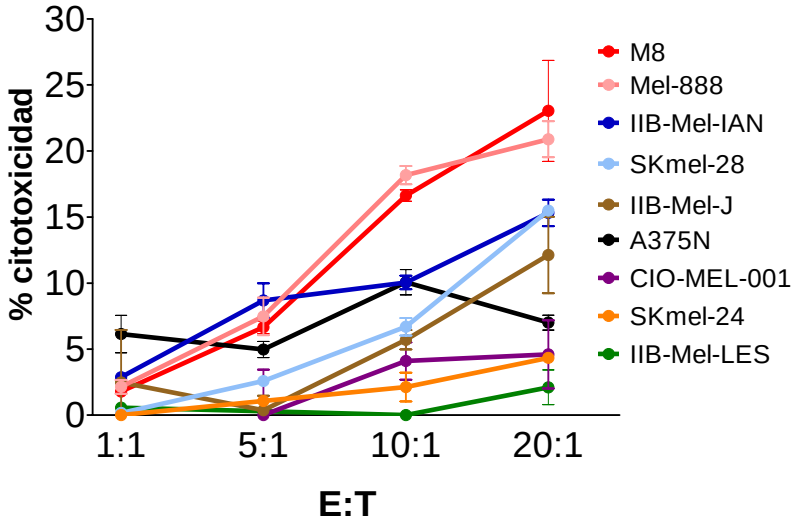


Figura 15: Susceptibilidad de las líneas de melanoma a la citotoxicidad mediada por células NK *in vitro*. Se realizaron ensayos de liberación de ^{51}Cr usando distintas relaciones E:T (indicadas en el eje de las x) de células NK humanas (células efectoras) y las líneas de melanoma humanas como células blanco. Se muestran las medias ± DE. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

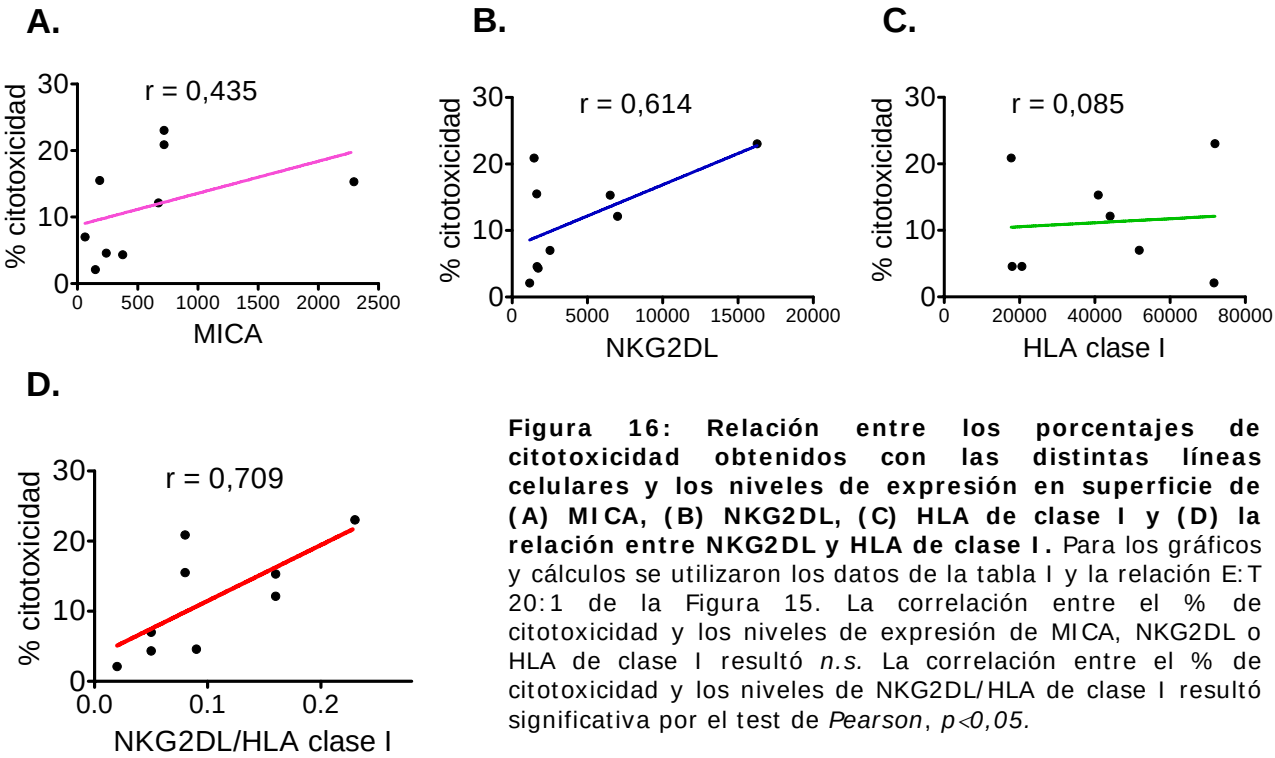


Figura 16: Relación entre los porcentajes de citotoxicidad obtenidos con las distintas líneas celulares y los niveles de expresión en superficie de (A) MICA, (B) NKG2DL, (C) HLA de clase I y (D) la relación entre NKG2DL y HLA de clase I. Para los gráficos y cálculos se utilizaron los datos de la tabla I y la relación E:T 20:1 de la Figura 15. La correlación entre el % de citotoxicidad y los niveles de expresión de MICA, NKG2DL o HLA de clase I resultó *n.s.* La correlación entre el % de citotoxicidad y los niveles de NKG2DL/HLA de clase I resultó significativa por el test de *Pearson*, $p<0,05$.

Como se mostró en la **figura 15**, IIB-MEL-LES fue resistente a la citotoxicidad mediada por células NK. En cambio, la lisis de M8 e IIB-MEL-IAN fue parcialmente dependiente de NKG2D ya que el bloqueo con el AcMo anti-NKG2D 1D11 produjo una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de lisis (**Figura 17**).

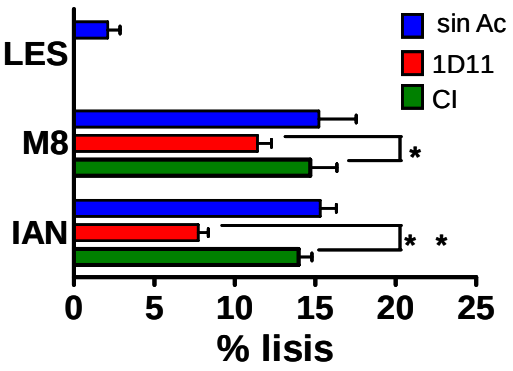


Figura 17: Citotoxicidad y bloqueo de NKG2D. Ensayo de citotoxicidad en presencia de un AcMo bloqueante anti-NKG2D, un AcMo CI o en ausencia de Ac utilizando células NK como efectoras y las líneas celulares indicadas a la izquierda del eje. Se utilizó una relación E:T de 20:1 . Se muestran las medias ± DE. *$p<0,05$; **$p<0,01$ *vs. CI*. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

La retención intracelular de MICA contribuye a la baja expresión en superficie de NKG2DL, lo que resulta en un bajo cociente entre los niveles de expresión de NKG2DL y de moléculas de clase I del HLA y una alta resistencia a la citotoxicidad mediada por células NK dependiente de NKG2D.

3. Restauración de la expresión de MICA en superficie celular

Para evaluar si es posible revertir el fenotipo caracterizado por la retención intracelular de MICA en melanomas que retienen a esta molécula como depósitos intracelulares, transfectamos la línea celular IIB-Mel-LES con un plásmido que codifica el gen completo MICA*001 clonado a partir de la línea celular HCT116. Empleando esta estrategia generamos 3 clones transfectados establemente que sobre-expresan MICA en superficie celular (**Figura 18**). De esta manera confirmamos que es posible revertir el fenómeno de retención intracelular por transfección.

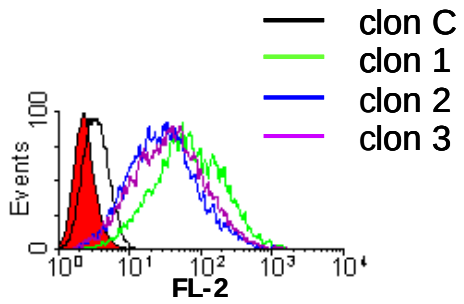


Figura 18: Expresión de MICA en superficie de los clones de la línea de melanoma IIB-Mel-LES transfectados en forma estable. La expresión de MICA fue ensayada por citometría de flujo. El histograma relleno corresponde a la marcación con el CI. El clon C corresponde al clon transfectado con el plásmido vacío, y los clones 1-3 son 3 clones transfectados con el gen completo de MICA.

Seguidamente, investigamos las consecuencias funcionales de esta sobre-expresión de MICA. En experimentos *in vitro* de citotoxicidad mediada por células NK observamos que la expresión ectópica de MICA restauró la susceptibilidad a la lisis (**Figura 19A**). Asimismo, estos 3 clones transfectados pero no así el clon C promovieron una alta secreción de IFN-γ por células NK humanas (**Figura 19B** y *no mostrado*).

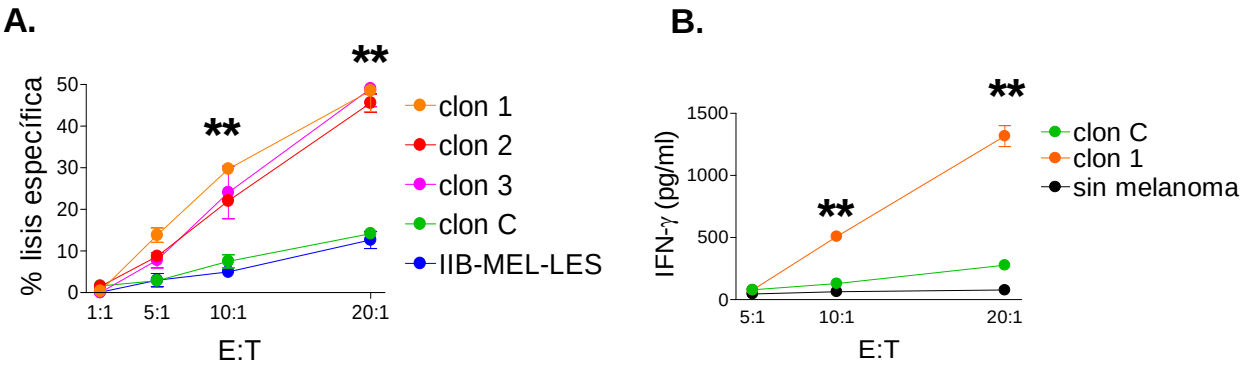


Figura 19: Ensayos de citotoxicidad y secreción de IFN-γ por células NK contra las células transfectadas. A) Ensayo de citotoxicidad (liberación de ^{51}Cr) mediada por células NK humanas (células efectoras) a distintas relaciones E:T, y los clones transfectados con MICA (clones 1-3), el clon control (C) y la línea parental IIB-Mel-LES como células blanco. **B**) Secreción de IFN-γ por células NK luego de un co-cultivo con el clon 1 durante 24 h (los clones 2 y 3 produjeron resultados similares, *datos no mostrados*). También se muestra la producción basal de IFN-γ por células NK en ausencia de melanoma. Se muestra la media ± DE $**p<0,01$ *vs.* clon C. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes

Para comprobar que este aumento en el porcentaje de lisis y en la producción de IFN-γ observados fueran dependientes de NKG2D, realizamos ensayos de bloqueo de la interacción de este receptor y sus ligandos empleando el AcMo anti-NKG2D 1D11 (**Figura 20A** y **B**). En estos experimentos observamos que en presencia de dicho AcMo, la citotoxicidad y la producción de IFN-γ retornaron a valores similares a los producidos por el clon C (transfectado con el plásmido vacío)

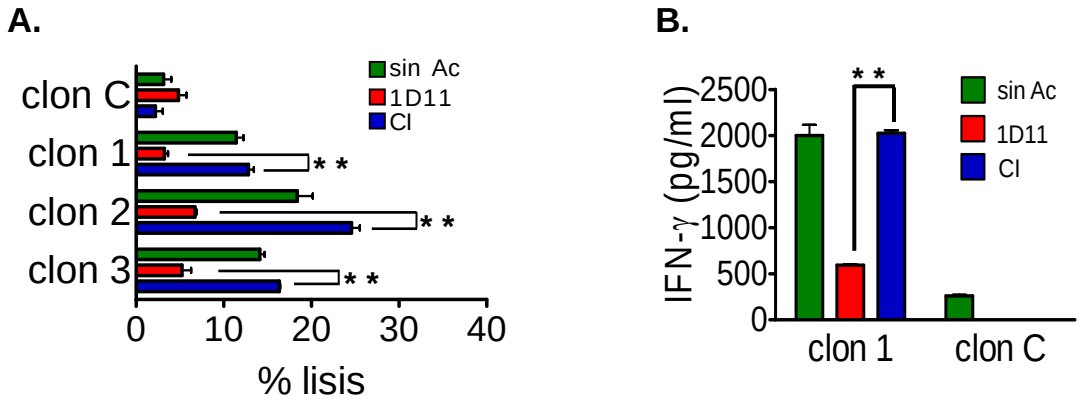


Figura 20: Ensayos de bloqueo de la citotoxicidad y secreción de IFN-γ por células NK A) Ensayo de citotoxicidad con células NK humanas contra los clones 1-3 y C en ausencia, en presencia del AcMo bloqueante anti-NKG2D 1D11 o en presencia del AcMo CI. La relación E:T utilizada fue de 20:1. **B**) Secreción de IFN-γ por células NK humanas durante el cultivo con el clon 1 o el clon C. Para ambos ensayos se utilizó una relación E:T de 20:1. Se muestra la media ± DE ***p< 0,01 vs.* clon C. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

Si bien observamos el desarrollo de citotoxicidad y liberación de IFN-γ por células NK contra aquellos clones generados por transfección con un plásmido de expresión de MICA y este fenómeno fue revertido por el bloqueo de NKG2D (lo que apunta a un efecto directo de MICA), existe la posibilidad de que estas funciones efectoras se deban a un efecto indirecto provocado por un aumento en la expresión de otro NKG2DL como consecuencia del proceso de transfección. Con el objeto de descartar esta opción, realizamos un análisis comparativo por citometría de flujo de la expresión de MICB, ULBP-1, -2 y -3 en la línea parental IIB-Mel-LES, el clon C y los clones 1, 2 y 3 (**Figura 21**). Tanto la línea parental IIB-MEL-LES como los 4 clones obtenidos no mostraron expresión de MICB ni ULBP-1 o -3, y todas las células analizadas presentaron una expresión baja y similar de ULBP-2.

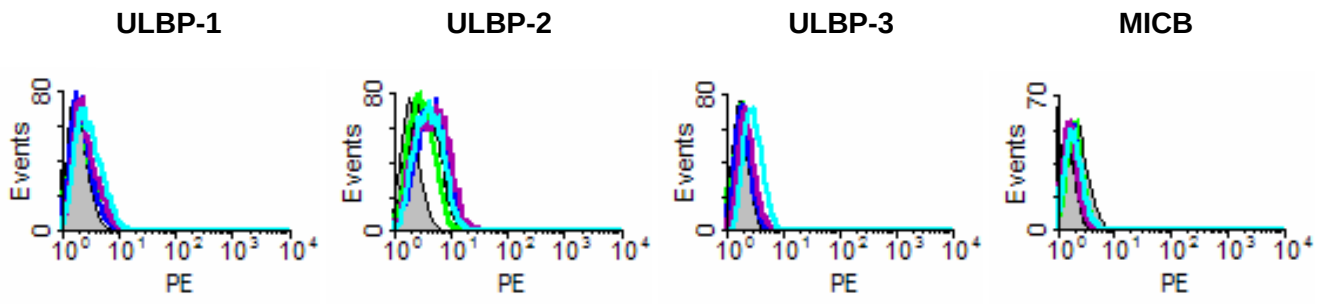


Figura 21: Expresión de otros NKG2DL en los clones transfectados y en la línea parental: Citometría de flujo para la expresión de ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 en la línea parental IIB-Mel-LES (negro) clon C (azul), clon 1 (verde), clon 2 (violeta) y clon 3 (celeste). Histograma gris: CI.

Por otra parte, la sobre-expresión de MICA podría proveer un péptido líder que estabilice e induzca un aumento concomitante en la expresión en superficie de HLA-E (59), que a su vez podría actuar como ligando del receptor activador de citotoxicidad CD94/NKG2C (58). Para evaluar esta posibilidad realizamos citometrías de flujo con el objeto de comparar la expresión de HLA-E en la superficie de los 4 clones y la línea parental. Sin embargo, en las células transfectadas generadas y utilizadas en este trabajo no se observaron modificaciones en los niveles de HLA-E con respecto a la línea celular parental (**Figura 22**), lo que descarta esta posibilidad y confirma que los resultados descriptos en la figura 19 son auténticamente debidos al aumento en la expresión de MICA.

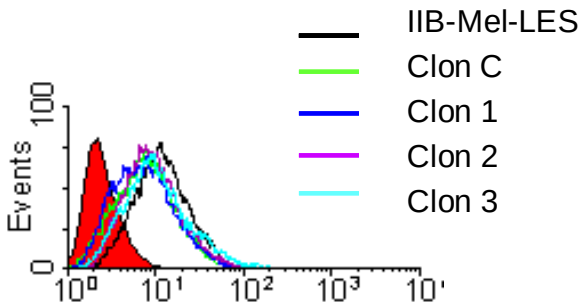


Figura 22: Expresión de HLA-E en células del melanoma IIB-Mel-LES transfectadas. La expresión de HLA-E fue ensayada por citometría de flujo en los clones transfectados derivados de la línea IIB-Mel-LES. El histograma relleno corresponde a la marcación con el CI. La expresión de HLA-E fue idéntica en el clon C (transfectado con plásmido vacío), en los clones 1-3 (transfectados con MICA) y en la línea parental IIB-Mel-LES.

La expresión ectópica de MICA confiere susceptibilidad a la citotoxicidad mediada por células NK dependiente de NKG2D e induce un aumento en la secreción de IFN-γ por estas células.

4. Consecuencias funcionales *in vivo*

Con el objeto de investigar las consecuencias de la restauración de la expresión de MICA en superficie sobre el crecimiento tumoral *in vivo,* desafiamos ratones *nude* con los clones obtenidos. Para esto, los ratones fueron inyectados por vía subcutánea en el flanco derecho con $5x10^6$ células de los distintos clones transfectados. El volumen tumoral se midió cada 2-3 días durante 75 días. Los ratones se consideraron libres de tumor hasta que desarrollaron tumores mayores a 500 mm^3, momento a partir del cual resulta altamente improbable que el tumor regresione espontáneamente por lo que alcanzan el estadío de morbilidad terminal (**Figura 23A**). Todos los ratones inyectados con las células transfectadas con el plásmido vacío (clon C) desarrollaron tumores que crecieron progresivamente y a los 40-45 días post-inoculación alcanzaron morbilidad terminal. A su vez, los ratones inoculados con el clon 1 alcanzaron la morbilidad terminal a los 63-73 días, los inoculados con el clon 2 a los 55-60 días y los inoculados con el clon 3 a los 66-75 días. Además, las diferencias en las tasas de crecimiento tumoral fueron estadísticamente significativas. El porcentaje de ratones libres de tumor se muestra en la **figura 23B** empleando un gráfico de Kaplan-Meier. Todos los animales que recibieron células que sobre-expresan MICA permanecieron libres de tumor al tiempo que un 50% de los animales que recibieron el clon control desarrollaron tumores de más de 500 mm^3 (alrededor del día 50). Por otra parte, al día 67 sólo el 50% de los animales que recibieron células que sobre-expresan MICA desarrollaron tumores de más de 2000 mm^3 al tiempo que todos los animales del grupo control ya habían desarrollado tumores de más de 2000 mm^3 (eutanasia).

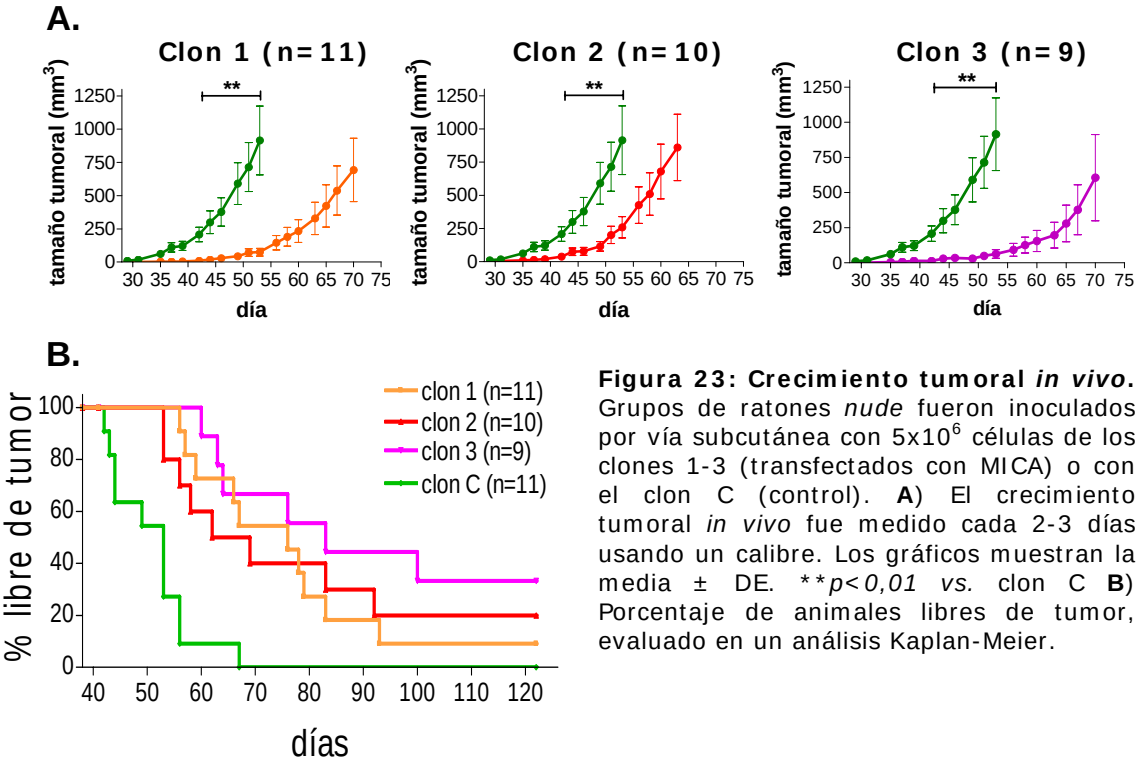


Figura 23: Crecimiento tumoral *in vivo*. Grupos de ratones *nude* fueron inoculados por vía subcutánea con $5x10^6$ células de los clones 1-3 (transfectados con MICA) o con el clon C (control). **A**) El crecimiento tumoral *in vivo* fue medido cada 2-3 días usando un calibre. Los gráficos muestran la media ± DE. $**p<0,01$ *vs.* clon C **B**) Porcentaje de animales libres de tumor, evaluado en un análisis Kaplan-Meier.

Con el objeto de descartar la posibilidad de que el efecto observado fuera debido a una inhibición del crecimiento de las células como consecuencia de la transfección, se evaluó la tasa de proliferación de células tumorales *in vitro* a diferentes periodos de tiempo por un método colorimétrico no radioactivo (MTS). En estos experimentos (**Figura 24)** observamos que tanto las células transfectadas con el vector control (clon C) como aquellas transfectadas con los plásmidos de expresión de MICA (clones 1, 2 y 3) mostraron tasas de proliferación similares, lo que sugiere que la sobre-expresión de MICA no afectó la velocidad de crecimiento intrínseca de las células de melanoma.

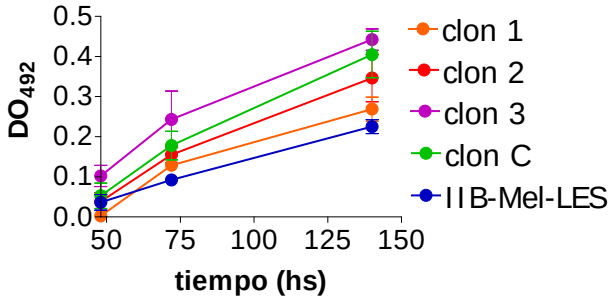


Figura 24: Proliferación *in vitro* de los clones transfectados. Proliferación de los clones 1-3, del clon C y de la línea parental IIB-Mel-LES, ensayada por el método no radiactivo MTS.

Al momento de la eutanasia de cada uno de los animales, se recuperaron los tumores con el objeto de evaluar la expresión de MICA por citometría de flujo. Para diferenciar las células tumorales de otras células murinas infiltrantesLos tumores recuperados de los animales desafiados con las células de los clones 1, 2 y 3 conservaron la expresión de MICA en su superficie (**Figura 25**), lo que podría ser crítico para mantener una respuesta inmune antitumoral NKG2D-dependiente, mediada por células NK a lo largo del tiempo.

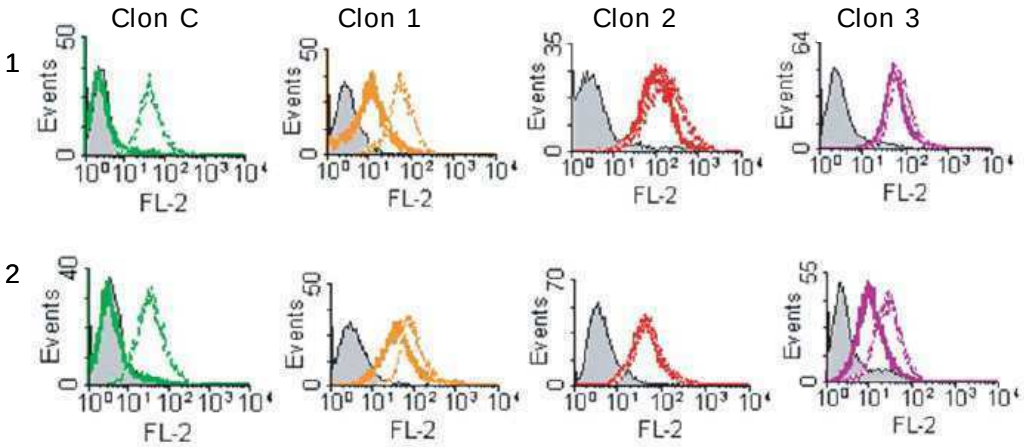


Figura 25: Expresión de MICA en los clones recuperados luego del crecimiento *in vivo*. Se analizó la expresión de MICA (marcación con el AcMo D7, linea continua) y HLA de clase I (AcMo W6/32, linea punteada) en la superficie de los tumores recuperados de los ratones al día de la eutanasia, por citometría de flujo. El histograma relleno corresponde al CI. Se muestran los resultados de 2 animales representativos de cada grupo ("1" y "2").

Aunque los tumores formados a partir de los clones 1, 2 y 3 conservaron la expresión de MICA, en los experimentos *in vivo* aproximadamente 2 meses después de la inoculación éstos alcanzaron la misma penetrancia que los tumores generados por inoculación de las células del clon control.

En el año 2002 dos grupos demostraron que algunos tumores son capaces de secretar el ectodominio de MICA como forma soluble (sMICA) al medio de cultivo (153). Esta variante de sMICA también puede ser detectada en el suero de pacientes (152). Se ha demostrado que esta secreción constituye un mecanismo de escape tumoral porque por un lado disminuye la expresión de MICA en la superficie de los tumores y por otra parte la unión de sMICA a NKG2D induce la endocitosis y degradación de este receptor en linfocitos T $CD8^+$ y células NK con la consiguiente disminución de sus funciones efectoras. Con el objeto de investigar si los tumores que sobre-expresan MICA promueven una disminución sistémica en la expresión de NKG2D que afecte la respuesta inmune mediada por las células NK (152), evaluamos la expresión de NKG2D en células NK de los bazos recuperados de los ratones inoculados con los distintos clones al momento de la eutanasia. Para ello aislamos las células del bazo de todos los ratones utilizados y realizamos una doble marcación con un AcMo anti-NKG2D de ratón marcado con FITC y con un AcMo contra CD49b (marcador de células NK de ratón) denominado DX5 marcado con PE. El análisis de la expresión de NKG2D en las células $DX5^+$ (**figura 26**) y el cálculo del índice de fluorescencia específico (*specific fluorescence index*, SFI) para NKG2D en cada una de las muestras analizadas permitió establecer que las células NK provenientes de aquellos ratones inoculados con las células que sobre-expresan MICA, expresaron niveles de NKG2D visiblemente menores que los de las células NK de bazos de ratones inoculados con el clon control. La diferencia fue estadísticamente significativa en el caso del clon 3. En el caso de los clones 1 y 2 si bien no mostraron una diferencia estadísticamente significativa, mostraron una clara tendencia a una menor expresión de NKG2D en células NK del bazo de los ratones inoculados con estas células.

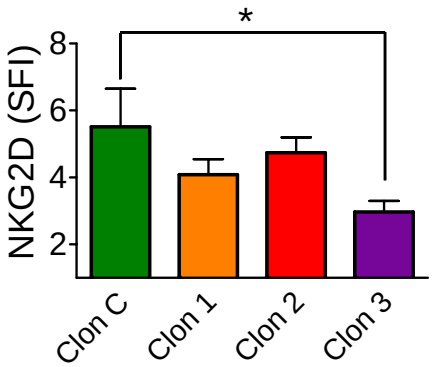


Figura 26: Expresión de NKG2D en células NK de bazo. Se analizó la expresión de NKG2D por citometría de flujo en células NK (población $DX5^+$) recuperadas de los ratones *nude* que recibieron los distintos clones (indicados en el eje de las *x*) al momento de la eutanasia de cada animal. Se muestra la media ± SEM * $p<0,05$ *vs.* clon C.

Para dilucidar la influencia de la sobre-expresión de MICA en el microambiente del tumor, realizamos ensayos de TUNEL sobre criosecciones de tumores de animales sacrificados al día 48 (en un estadío en el que los tumores de los animales control crecían exponencialmente). Como se puede observar en la **figura 27**, las secciones de tumores recuperados de ratones desafiados con células que sobre-expresan MICA mostraron mayores niveles de apoptosis que las secciones de tumores recuperados de ratones desafiados con células control. En concordancia con estos resultados, células NK aisladas de ratones singeneicos exhibieron mayor citotoxicidad contra los melanomas que sobre-expresan MICA que contra las células control (**Figura 28**).

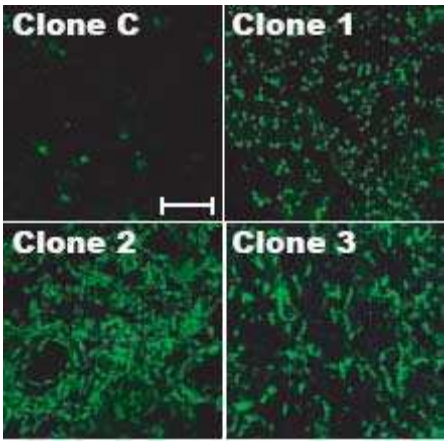
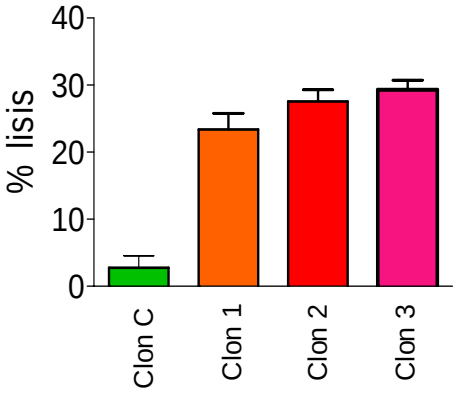


Figura 27: Apoptosis *in vivo*. Se investigó la apoptosis *in vivo* sobre criosecciones de los tumores recuperados de los ratones por un ensayo de TUNEL (fluorescencia verde) y las muestras se analizaron en un microscopio confocal. La barra corresponde a 50μm.

Figura 28: Citotoxicidad de células NK de ratón. Ensayo de citotoxicidad (liberación de ^{51}Cr) utilizando células NK de ratones *nude* como efectoras y los clones C, 1, 2 y 3 como células blanco. La relación E:T utilizada fue de 60:1. El gráfico muestra la media ± DE. ** *p< 0,01 vs.* clon C. Estos resultados fueron repetidos 3 veces obteniéndose resultados similares.



Con el objeto de investigar si el retardo en el crecimiento tumoral de los clones 1-3 respecto del clon C era debido a un efecto mediado por las células NK, decidimos evaluar el crecimiento tumoral en los clones en ratones *nude* depletados de células NK. En estos experimentos observamos que el crecimiento tumoral de los melanomas que sobre-expresan MICA en ratones depletados de células NK fue idéntico al crecimiento del clon control en los ratones no depletados (**Figura 29**), lo

que confirma que las células NK son las células efectoras primarias involucradas en el control del crecimiento tumoral *in vivo* en este sistema experimental.

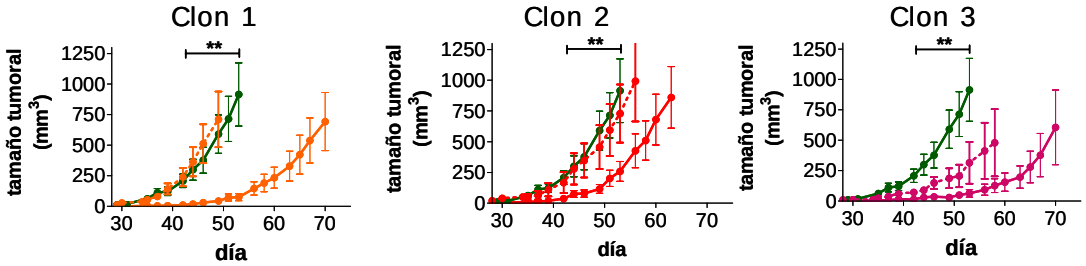


Figura 29: Crecimiento tumoral en ratones depletados de células NK. Grupos de ratones *nude* deficientes en células NK fueron inoculados por vía subcutánea con $5x10^6$ células de los clones 1-3 o con el clon C, y el crecimiento tumoral fue medido cada 2-3 días usando un calibre. Las líneas continuas muestran el crecimiento de los tumores en ratones que poseen células NK y las líneas punteadas, el crecimiento en ratones depletados de células NK. Los ratones deficientes en células NK fueron producidos mediante la inyección repetida de Ac anti-asialo GM1. Se muestra la media ± DE. $**p<0,01$ *vs.* clon C.

La restitución de la expresión de MICA en superficie por transfección confiere susceptibilidad a la apoptosis mediada por células NK y retrasa el crecimiento tumoral *in vivo* de las células de melanoma que naturalmente evitan la expresión en superficie de este NKG2DL. Este fenómeno podría constituir un novedoso mecanismo de escape tumoral a la respuesta inmune a través del bloqueo de la citotoxicidad y la secreción de IFN-γ mediadas por células NK.

5. Mecanismo de escape

5.1 Reciclaje de MICA

A continuación analizamos si la ausencia de MICA de superficie celular podía deberse a un rápido reciclaje de la molécula. Para esto, incubamos células de líneas de melanomas con citocalasina B (inhibe la formación de microfilamentos de actina y el tránsito intracelular), brefeldina A (inhibe la translocación de proteínas del RE al aparato de Golgi) o cloroquina (inhibe la acidificación de los endosomas). La **figura 30** muestra que los niveles de expresión de MICA no se vieron modificados por el tratamiento con ninguna de estas drogas, lo que descarta la posibilidad de una retención intracelular por rápido reciclaje en membrana.

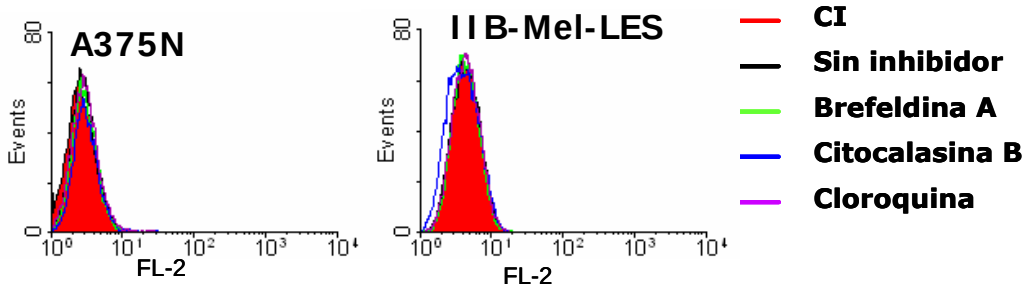


Figura 30. Expresión de MICA en superficie de células tratadas con inhibidores del tránsito intracelular. Citometría de flujo para MICA en líneas de melanoma cultivadas durante 48 hs en ausencia o presencia de brefeldina A, citocalasina B o cloroquina.

5.2 Clivaje de MICA de la superficie

Con el fin de investigar si los tumores empleados en nuestros experimentos secretan el ectodominio de MICA como sMICA (152, 153), empleamos un ELISA de captura con el fin de establecer si la ausencia de expresión de MICA en superficie en las líneas de melanoma podía deberse a tal secreción al medio de cultivo. Aunque optimizamos un ensayo con un límite de detección de 1 ng/ml (similar al descripto en la literatura) no detectamos sMICA, ni siquiera empleando sobrenadantes de cultivo de las distintas líneas concentrados 50 veces (**Figura 31**). Consecuentemente, concluimos que el clivaje proteolítico de MICA no constituye un mecanismo involucrado en la ausencia de expresión de MICA en superficie observada en algunas líneas de melanoma en nuestro modelo experimental.

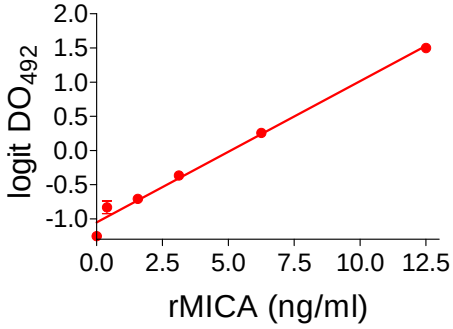


Figura 31: Curva estándar del ELISA de captura para detectar sMICA en sobrenadantes de cultivo de líneas de melanoma. Límite de detección: 1ng/ml. Los sobrenadantes de melanoma fueron concentrados 50 veces y ensayados para sMICA. Los sobrenadantes de todas las líneas de melanoma produjeron absorbancias por debajo del límite de detección.

5.3 Rol del TGF-β

TGF-β es una citoquina inmunosupresoras que es secretada por distintos tipos de tumores y es capaz de inducir una disminución en la expresión tanto de NKG2D como de MICA (156). Es por eso que analizamos si la ausencia de MICA de superficie en los melanomas se debía a la acción del TGF-β. Para ello, realizamos dos tipos de experimentos:

Primeramente investigamos si los melanomas usados en este estudio secretaban esta citoquina al medio de cultivo. Sin embargo, mediante un ELISA de captura para TGF-β humano (kit comercial), no detectamos la presencia de esta citoquina en el sobrenadante de cultivo de ninguno de los 10 melanomas analizados.

Este resultado no quita la posibilidad de que los niveles de TGF-β presentes en los sobrenadantes de cultivo sean tan bajos que se tornen indetectables para el ELISA de captura utilizado, y que aunque en mínima concentración, esta citoquina esté presente y afectando la expresión de MICA. Para investigar esta posibilidad, realizamos ensayos de neutralización cultivando las líneas celulares A375N, SKmel-24, Mel-888 e IIB-Mel-LES durante 48 hs en presencia de 5 µg/ml de un AcMo neutralizante anti-TGF-β, luego de lo cual se analizó la expresión de MICA en la superficie de estas células por citometría de flujo. Los resultados obtenidos mostraron que ninguna de las líneas celulares utilizadas presentó un cambio en la expresión de MICA al neutralizar TGF-β (**Figura 32**).

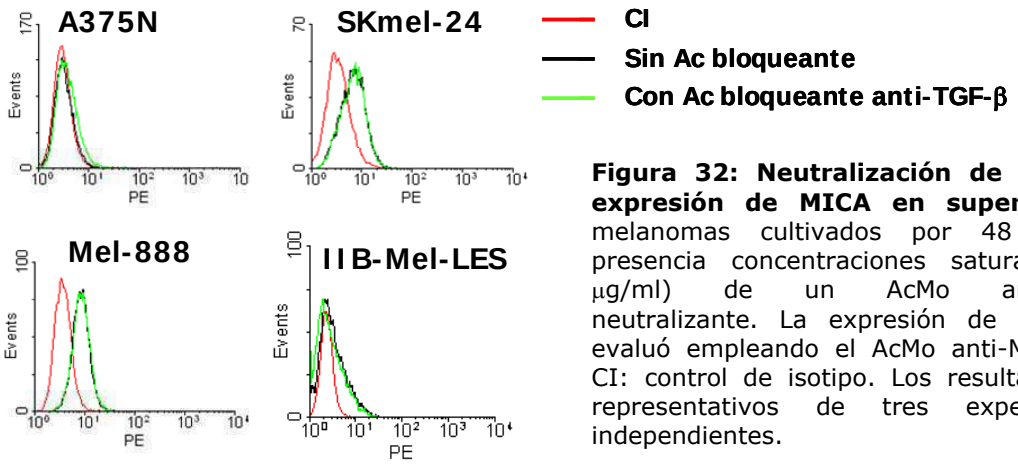


Figura 32: Neutralización de TGF-β y expresión de MICA en superficie de melanomas cultivados por 48 hs en presencia concentraciones saturantes (5 μg/ml) de un AcMo anti-TGF-β neutralizante. La expresión de MICA se evaluó empleando el AcMo anti-MICA D7. CI: control de isotipo. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

La ausencia de TGF-β en los sobrenadantes de cultivo sumado al hecho de que el cultivo de las células en presencia de un AcMo neutralizante de TGF-β no indujo un aumento en la expresión de MICA en superficie, nos permitió descartar la posibilidad de que el TGF-β sea responsable de la disminución de la expresión de MICA en la superficie de los melanomas utilizados en este estudio.

La falta de expresión de MICA en superficie de los melanomas no se debe a un rápido reciclaje de la proteína y tampoco puede explicarse mediante ningún mecanismo descripto hasta el momento.

5.4 Localización intracelular de MICA

Hasta este punto comprobamos que 5 de los 10 melanomas estudiados evitan la expresión de MICA en la superficie por un mecanismo distinto a los descriptos hasta el momento, y que retienen a esta molécula en un compartimiento intracelular no caracterizado. Por lo tanto, investigamos la localización intracelular de MICA en los melanomas mediante experimentos de colocalización y microscopía confocal. En la **figura 33** se muestran los resultados obtenidos con 2 líneas celulares que no expresan MICA en superficie celular (IIB-Mel-LES y A375N) y con 2 líneas celulares que expresan MICA en la superficie (IIB-Mel-IAN y M8).

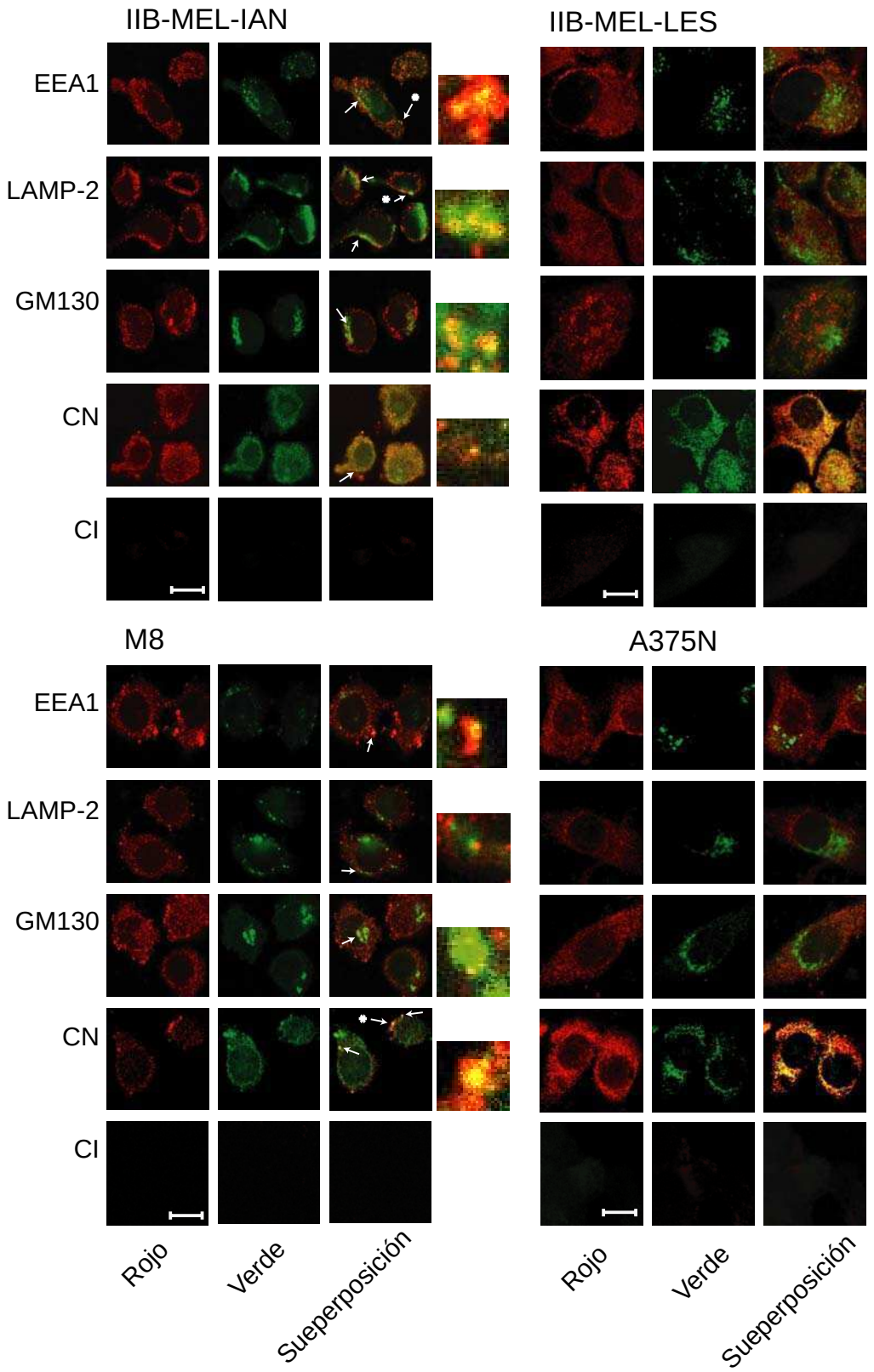


Figura 33. **Colocalización y microscopía confocal de MICA** en los melanomas IIB-Mel-IAN, M8, IIB-Mel-LES y A375N. Se marcó MICA con el AcMo anti-MICA y un Ac secundario conjugado a Cy3 (rojo). Los marcadores de colocalización se marcaron con AcMo específicos marcados con FITC (verde) anti-EEA1 (endosomas tempranos), anti-LAMP-2 (endosomas tardíos/lisosomas), anti-GM130 (aparato de Golgi) y anti-calnexina (CN, RE). Al superponer las imágenes, la colocalización se observa en color amarillo. CI: control de isotipo. La barra corresponde a 10 nm. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes. A la derecha se observan detalles de las líneas IIB-Mel-IAN y M8 donde se destaca la colocalización de MICA en endosomas tempranos, tardíos y aparato de Golgi

Tal como puede apreciarse en la **figura 33**, en IIB-Mel-IAN y M8 detectamos MICA en endosomas tempranos (EEA1), lisosomas (LAMP-2), aparato de Golgi (GM130) y en el RE (calnexina, CN). Este conjunto de moléculas de MICA serían parte de las que se encuentran en tránsito hacia la superficie celular y que una vez allí pueden ser detectadas por citometría de flujo (**Figura 8 y tabla I**). Contrariamente, en IIB-Mel-LES y A375N la mayor parte del *pool* intracelular de MICA se encontró retenido en el RE ya que se observó colocalización con CN casi exclusivamente. Estos resultados fueron confirmados por microscopía electrónica donde se observó que las partículas de oro que marcan MICA fueron detectadas en estrecha asociación con las cisternas del RE (**Figura 34**).

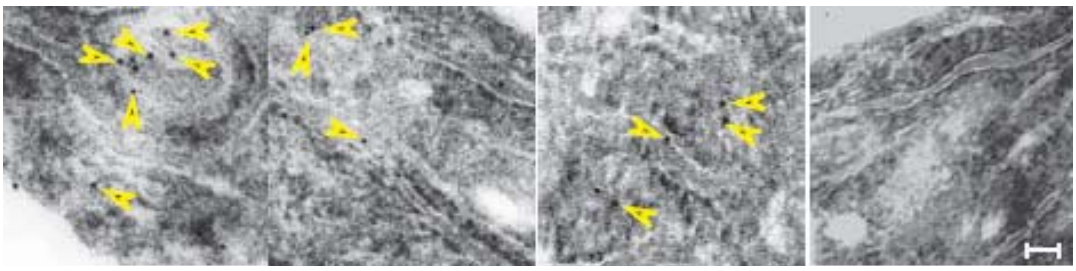


Figura 34: Microscopía electrónica de IIB-Mel-LES. Las células fueron marcadas con el AcMo D7 (las 3 imágenes de la izquierda) o un AcMo CI (imagen de la derecha). Las cabezas de flecha indican presencia de MICA en asociación con las cisternas del RE. Barra= 100 nm.

Con el fin de investigar que ocurre en las metástasis analizadas en la **figura 13** realizamos experimentos de colocalización y microscopía confocal utilizando cortes parafinados de dos metástasis de melanomas (ARA y JOR, **Figura 35**), en los que previamente no detectamos MICA en superficie (**Figura 13A**) pero que resultaron positivas para MICA por *Western blot* (**Figura 13B**). En ambos melanomas observamos colocalización de MICA con CN lo que indica que en metástasis aisladas de pacientes también se detecta la retención de este NKG2DL en el RE.

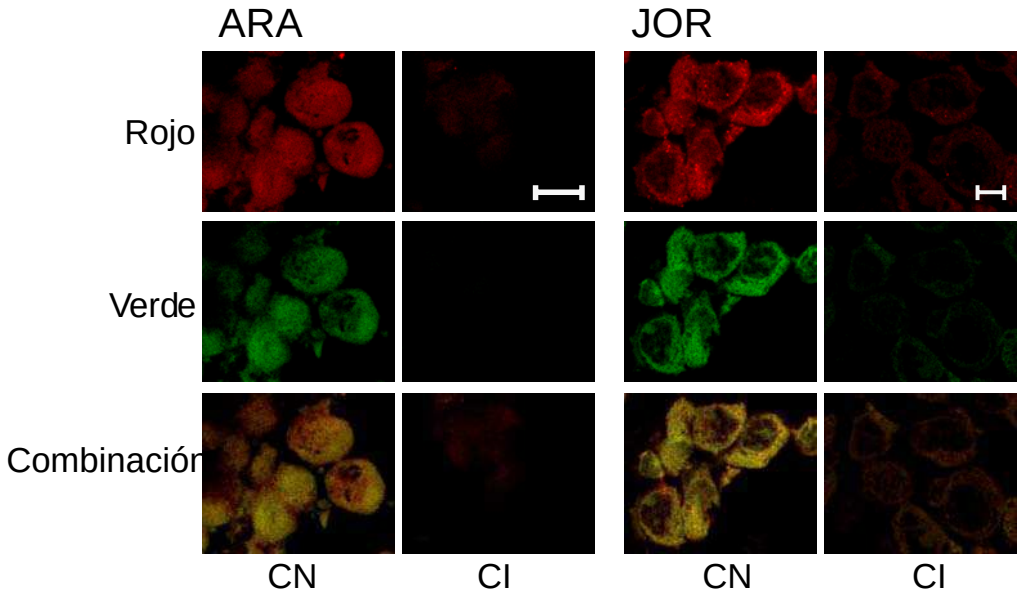


Figura 35: Colocalización y microscopía confocal de MICA en metástasis de melanoamas. Se marcó MICA con el AcMo anti-MICA y un Ac secundario conjugado a Cy3 (rojo) y un AcMo anti-CN (RE) marcado con FITC (verde). Al superponer las imágenes, la colocalización se observa en color amarillo. La barra corresponde a 10 nm.

MICA no se expresa en la superficie celular porque es retenida en el RE, lo que resulta en una resistencia a la citotoxicidad mediada por células NK. De acuerdo con estos resultados, postulamos que esta retención intracelular constituye un novedoso mecanismo de escape tumoral al reconocimiento por parte de células citotóxicas del sistema inmune.

5.5 Estructura primaria del polipéptido de MICA

La retención intracelular observada podría deberse a causas intrínsecas de la molécula de MICA codificada en cada una de las líneas celulares. Estas incluyen la acumulación de mutaciones en el gen respectivo que generen proteínas aberrantes o creen señales de retención específicas en el RE tales como las secuencias KDEL o similares (173-175). También es posible que la retención intracelular esté asociada con la expresión de algún o algunos alelos de MICA en particular. Por los tanto, para explorar estas posibilidades, secuenciamos el cDNA de MICA obtenido a partir de RNA aislado de las 10 líneas celulares de melanoma (**Tabla II**) y las

comparamos con las secuencias de todos los alelos conocidos de MICA compiladas en la base de datos del sitio http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/seq/nuc/text/mica_nt.txt. Sin embargo, no encontramos mutaciones puntuales o asociación entre expresión en superficie con posiciones polimórficas específicas o repeticiones de Ala en el dominio transmembrana (exón 5). Tampoco encontramos secuencias que por mutación generen señales de retención en el RE. Por otra parte los alelos expresados por los 5 melanomas que retienen a MICA dentro de la célula son alelos que se expresan normalmente en la superficie de otras células.

Ranking	Línea celular	Tipificación
1	M8	MICA*008/MICA*008
2	IIB-Mel-J	MICA*001/MICA*008
3	IIB-Mel-IAN	MICA*001/MICA*001
4	A375N	MICA*004/MICA*044
5	CIO-MEL-002	MICA*005/MICA*011
6	Skmel-24	MICA*008/MICA*027
7	CIO-MEL-001	MICA*001/MICA*001
8	Skmel-28	MICA*008/MICA*008
9	Mel-888	MICA*009/MICA*009
10	IIB-Mel-LES	MICA*001/MICA*011

Tabla II: Tipificación de alelos de MICA en las 10 líneas de melanoma estudiadas

5.6 Rol de calnexina

Habiendo comprobado que en IIB-Mel-LES, la mayor parte de las moléculas de MICA se retienen en el RE y no progresan hacia el aparato de Golgi, especulamos que alguna chaperona del RE podría estar involucrada en esta retención. CN es una lectina residente del RE con actividad de chaperona involucrada en el plegamiento de las proteínas destinadas a los compartimientos de las vías secretoria y endocítica (el RE, el aparato de Golgi y los endo-lisosomas), la membrana plasmática y secreción, a través de la unión a los polipéptidos nacientes (176). En metástasis de melanomas frecuentemente se observa una disminución en la expresión de la proteína CN, y no así de calreticulina (177). Por este motivo decidimos analizar si la falta de expresión de MICA en superficie podía deberse a diferencias en los niveles de expresión de CN. Para investigar si existe una

correlación entre la expresión de MICA en superficie y la expresión de CN, realizamos un análisis por *Western blot* de lisados celulares de las 10 líneas de melanoma y revelamos con un AcMo anti-CN (TO-5, **Figura 36A**). La intensidad de las bandas obtenidas se cuantificó utilizando el programa *Scion Image* como se describiera anteriormente, y los datos obtenidos para cada línea fueron comparados con los valores de ABC de cada línea mostrados en la tabla I (**Figura 36B**). Sin embargo, no encontramos correlación entre ambos parámetros.

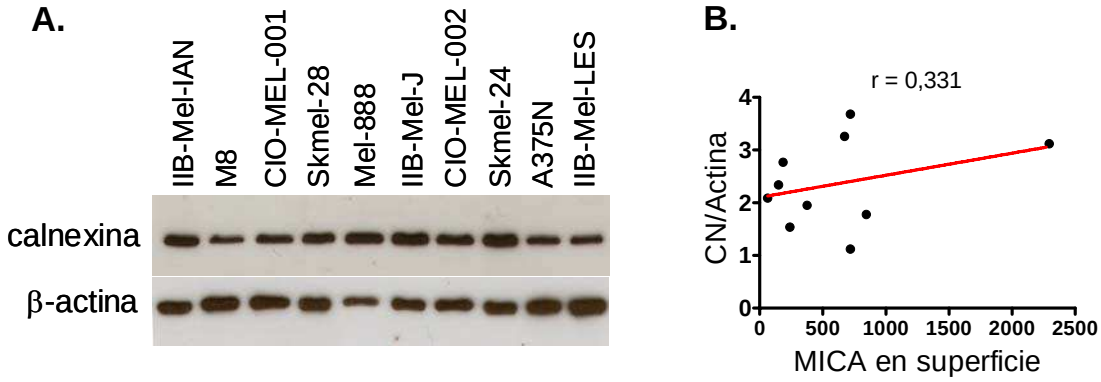


Figura 36: Expresión de CN en las líneas de melanoma y relación con los niveles de expresión de MICA en superficie. **A)** La expresión de CN en 10 líneas celulares derivadas de melanoma fue analizada por *Western blot* empleando el AcMo TO-5. Se muestra también la normalización con β-actina. **B)** Se realizó una correlación de Pearson utilizando los valores de ABC para MICA volcados en la tabla I y la cuantificación de las bandas obtenidas en el *Western Blot* normalizada con actina mediante el análisis con el programa *Scion*. *r de Pearson = 0,331, p=0,35 (n.s.).*

La ausencia de expresión de MICA de la superficie de algunos melanomas no se debe a mutaciones que podrían inducir una retención intracelular anormal del polipéptido, no está asociado a la expresión de algún alelo en particular y no correlaciona con los niveles de CN.

5.7 Retrotranslocación de MICA al citoplasma

Para determinar si existían depósitos de MICA en el citoplasma, realizamos centrifugaciones diferenciales que nos permitieron separar las proteínas de la fracción de membrana de las de la fracción de citoplasma. La expresión de MICA en estas fracciones fue analizada por *Western blot* (**Figura 37**). Para nuestra sorpresa, detectamos expresión de MICA tanto en la fracción de membrana como en la de citoplasma. Como control de pureza de las fracciones, analizamos la expresión de una proteína citoplasmática (hsp70) y una de membrana (moléculas

de clase I del HLA) en ambas fracciones observando que en cada fracción sólo detectamos la proteína esperable para dicha fracción (hsp70 en citoplasma y moléculas de clase I del HLA en membrana).

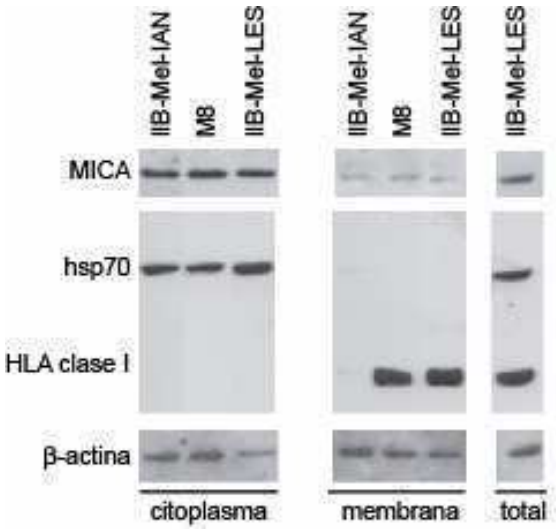


Figura 37: Expresión de MICA en fracciones citoplasmáticas y de membrana. La expresión de MICA en fracciones citoplasmáticas y de membrana, IIB-Mel-IAN, M8 e IIB-Mel-LES fue analizada por *Western blot* empleando sueros policlonales de conejo específicos anti-MICA. Como control de la técnica se emplearon AcMo anti-hsp70 (proteína citoplasmática) y anti-HLA de clase I (proteína de superficie). Se muestra también la normalización con β-actina. En cada calle se sembraron 20 μg de los lisados de las fracciones citoplasmáticas y 10 μg de los lisados de las fracciones de membrana, obtenidos por centrifugaciones diferenciales. La última calle corresponde al lisado total de IIB-Mel-LES donde se observa tanto la banda de hsp70 como la de HLA de clase I. En IIB-Mel-IAN no detectamos moléculas de clase I del HLA probablemente debido a falta de reactividad del Ac contra los alelos expresados por esa línea celular.

Sec61 es un canal multimérico que inserta polipéptidos de la vía secretoria o transmembrana co-traduccionalmente en el lumen del RE. Sin embargo, también puede operar en forma inversa, removiendo proteínas mal plegadas del RE, en lo que se denomina retrotranslocación. La AAA ATPasa p97 forma un anillo hexamérico que interactúa con aquellas proteínas que sufren retrotraslocación mediada por Sec61, e interactúa con Derlin-1, que también ha sido implicada en la retrotranslocación desde el RE (178). Una doble mutación puntual en el sitio ATPasa de p97 genera una mutante dominante negativa (DN) que la hace incapaz de liberar a los sustratos de retrotraslocación, atrapándolos en el lumen del RE (179). Con el objeto de analizar el rol de p97 y Sec61 en la retrotraslocación de MICA desde el RE al citoplasma, transfectamos en forma transiente las líneas IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN con plásmidos bicistrónicos que codifican para la forma salvaje de p97 o la mutante DN y la proteína fluorescente verde (EGFP). Este sistema permite la detección de aquellas células que expresan el p97 transfectado distinguiéndolas de las células no transfectadas. Los resultados obtenidos (**Figura 38)** indican que la transfección no produjo un cambio en los niveles de expresión de MICA en superficie de las células transfectadas ($EGFP^+$) con el plásmido que codifica para p97 salvaje *vs.* las células transfectadas con el plásmido que codifica

para la mutante DN de p97 o *vs.* las células EGFP$^-$ (no transfectadas). Estos datos sugieren que p97 y Sec61 no estarían involucradas en la retrotranslocación de MICA desde el RE al citoplasma.

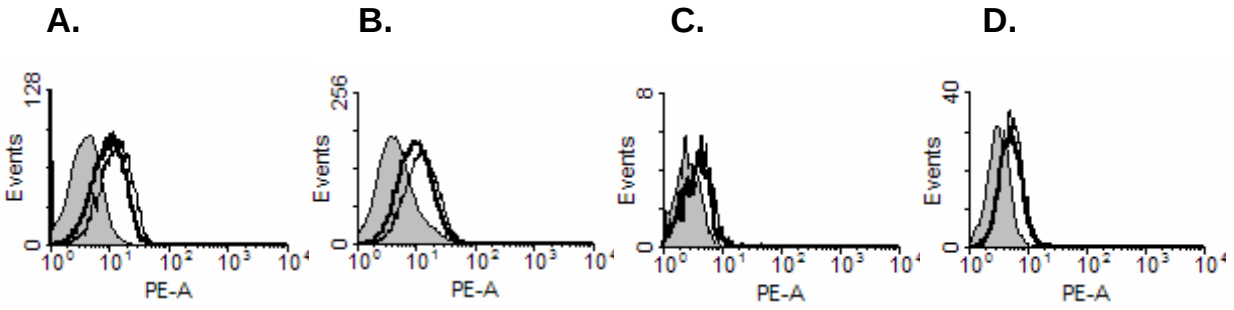


Figura 38: Expresión de MICA en células transfectadas con un plásmido de p97 o su forma DN. Transfección transiente de IIB-MEL-IAN (***A***, ***B***) e IIB-MEL-LES (***C***, ***D***) con el plásmido bicistrónico codificante para EGFP y p97 salvaje (líneas gruesas) o la forma DN de p97 (líneas finas). Los histgramas de las células transfectadas (EGFP$^+$) se muestran en ***A*** y ***C***, y los histogramas de las células no transfectadas (EGFP$^-$) se muestran en ***B*** y ***D***. El histograma gris corresponde al Ac CI.

5.8 Maduración de la proteína MICA en el RE

Las N-glicoproteínas de membrana son sintetizadas en el RE donde son glicosiladas en una sucesión de reacciones complejas pasando luego a las cisternas del aparato de Golgi donde completan su maduración. En el *trans*-Golgi, actúa una enzima llamada manosidasa II, que genera un oligosacárido "maduro" que es resistente a la digestión por la enzima endoglicosidasa H (endoH). Por lo tanto, el tratamiento de lisados celulares con esta enzima y análisis por *Western blot* con Ac específicos permite diferenciar aquellas glicoproteínas que transitaron por el aparato de Golgi, maduraron sus azúcares y adquirieron resistencia a la acción de endoH, de aquellas proteínas que aun no transitaron por el aparato de Golgi, no maduraron sus azúcares y permanecen sensibles a la acción de endoH.

Para investigar si la retención de MICA en el RE estaba asociada con la acumulación de formas inmaduras de este NKG2DL, realizamos digestiones de los lisados celulares de IIB-MEL-LES e IIB-Mel-IAN con endoH y analizamos la presencia de formas inmaduras (sensibles a la digestión con endoH) y maduras (resistentes a la acción de endoH) de MICA por *Western blot*.

Como se muestra en la **figura 39A,** IIB-Mel-LES exhibió un marcado incremento en formas de MICA sensibles a endoH (banda de 44 kDa de peso molecular) en comparación con IIB-Mel-IAN. Utilizando el programa *Scion Imager* se analizó la intensidad media de cada banda y se calculó el porcentaje de formas

de MICA degradadas y no degradadas (**Figura 39B**). Este resultado indica que gran parte del *pool* de moléculas de MICA transitó a través del aparato de Golgi en IIB-Mel-IAN, maduró sus azúcares y adquirió resistencia a la digestión con endo H, lo que constituye un paso ineludible para las proteínas que siguen la vía clásica de secreción en el camino hacia la superficie de la célula. En cambio, en IIB-Mel-LES se observó una marcada disminución de las formas maduras de MICA, lo que confirma que la retención de MICA en el RE se debe a la acumulación de formas inmaduras del polipéptido de MICA.

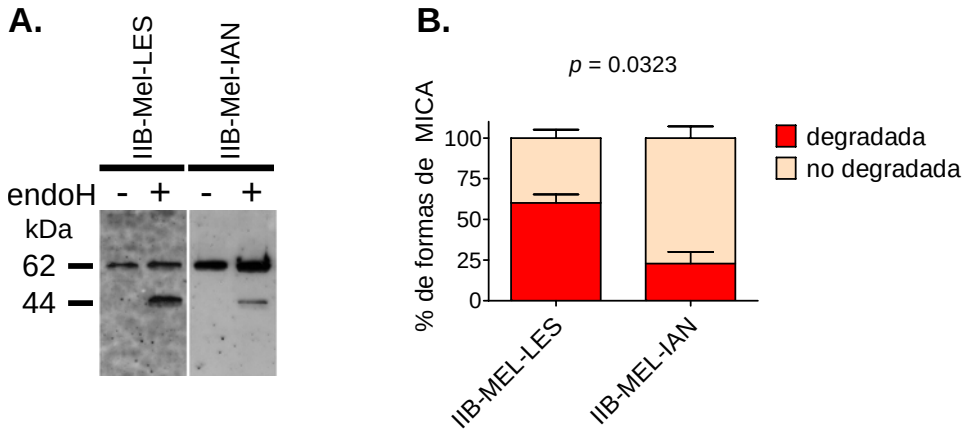


Figura 39: Expresión de MICA por en lisados celulares de IIB-MEL-LES e IIB-MEL-IAN tratados (+) o no (-) con endoH. A) *Western blot* representativo. Se detectó una forma no digerida *Mr* ~62 kDa y una forma digerida de *Mr* ~44 kDa de MICA en ambas líneas celulares en presencia de la enzima. **B**) Porcentaje medio de formas de MICA no degradadas (barras rosas) y degradadas (barras rojas) en ambas líneas celulares obtenidas en 3 experimentos independientes. Para los cálculos, las imágenes de las membranas fueron digitalizadas utilizando un *scanner* y analizadas con el programa Scion Image como se explica en *Materiales y Métodos*. Se muestra la media ± SEM. **p=0,0323* (*n*=3) para las formas digeridas de MICA en IIB-MEL-LES *vs.* formas digeridas de MICA en IIB-MEL-IAN.

5.9 Degradación de MICA en el proteosoma

En el RE existe un sistema de control de calidad del plegamiento de las proteínas que utiliza dos mecanismos para permitir la eliminación de proteínas aberrantes (176). Estos mecanismos son la degradación asociada al RE (ERAD por *endoplasmic reticulum-associated degradation*, 180) y la respuesta ante proteínas no plegadas (UPR por *unfolded protein response*, 181). En la mayor parte de los casos, la vía de ERAD de las proteínas que no pueden abandonar el RE involucra su retrotraslocación hacia el citoplasma, ubiquitinación y posterior degradación por el

proteosoma. En este punto, quisimos evaluar si en el caso de los melanomas que retienen a MICA en el RE se produce una retrotraslocación de esta proteína al citoplasma y posterior degradación por el proteosoma. Para ello realizamos cultivos de los melanomas IIB-Mel-LES, A375N (no expresan MICA en su superficie) e IIB-Mel-IAN (expresa MICA en su superficie) con el inhibidor del proteosoma Bortezomib durante 24 h. Posteriormente separamos la fracción citoplasmática de la fracción de membrana celular. Asimismo realizamos citometrías de flujo para detectar expresión de MICA en superficie. Si bien detectamos retrotranslocación de MICA al citoplasma (**figura 40A y B**) en las 3 líneas celulares estudiadas, observamos que sólo en IIB-Mel-LES (y en menor medida en A375N) pero no e IIB-Mel-IAN, se produjo una acumulación de MICA en el citoplasma como consecuencia del tratamiento con Bortezomib, lo que se vio acompañado de la aparición de una banda de mayor peso molecular que podría corresponder a formas ubiquitinadas de la proteína. Asimismo, la inhibición del proteosoma generó un aumento en la expresión de MICA en superficie solamente en las dos líneas celulares que no expresan este NKG2DL normalmente (IIB-Mel-LES y A375N) mientras que se observó un efecto apenas detectable en IIB-Mel-IAN y M8 (**Figura 40 C**). Por lo tanto, estos datos sugieren que en los melanomas estudiados, en mayor o menor medida se produce una retrotranslocación de MICA al citoplasma, pero sólo en aquellos que desarrollaron una maquinaria de retención intracelular esta retrotranslocación conduce a una degradación de la proteína que evita su expresión en superficie.

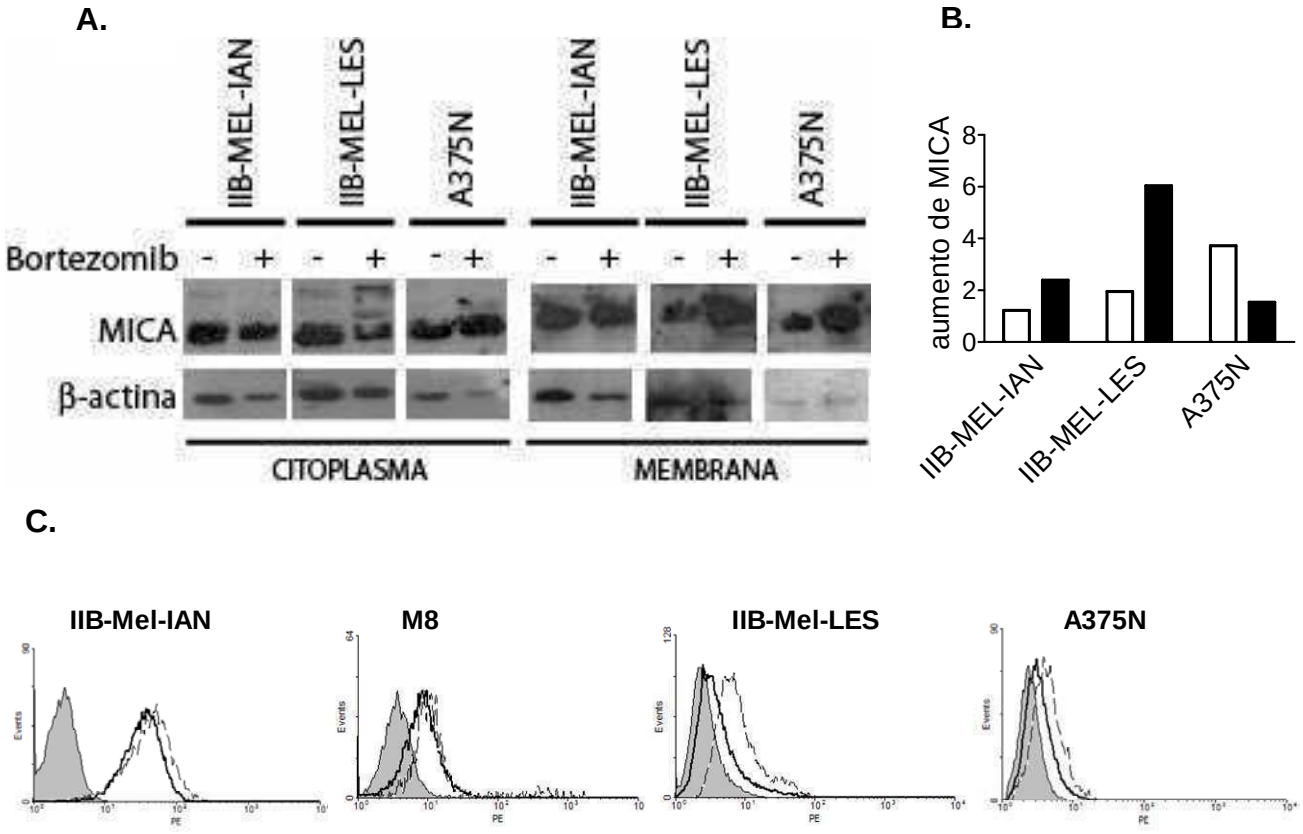


Figura 40: Expresión de MICA en células tratadas o no con Bortezomib. A) La expresión de MICA en fracciones citosólicas o de membrana de IIB-Mel-IAN, IIB-Mel-LES y A375N tratados o no con una dosis de 50nM de Bortezomib por 24 h fue ensayada por *Western blot*. **B**) Análisis del aumento en los niveles de expresión de MICA, en la fracción citoplasmática (barras blancas) y en la fracción de membrana (barras negras). El aumento de MICA se calculó de la siguiente manera: [intensidad de las bandas de MICA/intensidad de la banda de actina] con bortezomib/[intensidad de las bandas de MICA/intensidad de la banda de actina] sin bortezomib. **C**) La expresión de MICA en la superficie de IIB-Mel-IAN, M8, IIB-Mel-LES y A375N tratadas (línea fina) o no (línea gruesa) con Bortezomib. El histograma lleno corresponde al CI

En los melanomas estudiados, en mayor o menor medida, se produce una retrotranslocación de MICA al citoplasma (en la que no están involucradas Sec61 ni p97) pero sólo en aquellos que desarrollaron una maquinaria de retención intracelular se observa acumulación de formas inmaduras de MICA en el RE y su retrotranslocación conduce a una degradación de la proteína en el citoplasma que previene su expresión en superficie.

DISCUSION

De acuerdo a la teoría postulada por Robert Schreiber, el proceso de inmunoedición del cáncer puede dividirse en tres etapas denominadas eliminación, equilibrio y escape (5). Este modelo no sólo tiene en cuenta la función protectora del sistema inmune ante la aparición de tumores, sino que además incorpora la idea de que el tumor es capaz de escapar al reconocimiento por el sistema inmune y montar activamente mecanismos de contraataque. Es por lo tanto importante el estudio y conocimiento de los mecanismos de escape tumoral ya que esto facilitará el diseño de inmunoterapias que actúen en forma sinérgica con otros tratamientos y permitan erradicar al tumor.

Una de las poblaciones celulares más importantes para el control del crecimiento tumoral son las células NK, que no sólo poseen funciones efectoras citotóxicas contra los tumores, sino que además, a través de la liberación de citoquinas y del diálogo cruzado con CDs, son capaces de regular la respuesta inmune adaptativa (17, 18). Esto las hace doblemente atractivas para la realización de estudios tendientes al desarrollo de inmunoterapias para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer.

En los últimos años se han estudiado y descripto numerosas estrategias inmunosupresoras utilizadas por las células tumorales (11) muchas de las cuales involucran a las células NK y, más específicamente, al receptor activador de citotoxicidad NKG2D y sus ligandos (entre ellos, MICA, 45).

Teniendo en cuenta la importancia del sistema NKG2DL/NKG2D en la vigilancia inmunológica contra tumores, el objetivo central de esta tesis fue analizar el rol que juega este sistema en el reconocimiento de melanomas humanos por células NK y de qué manera la dinámica de expresión de MICA en la célula tumoral puede afectar el reconocimiento de los tumores por parte de las células NK y la calidad de la respuesta inmune anti-tumoral.

Para investigar la importancia biológica de la expresión de MICA en melanomas humanos, en primer lugar evaluamos su expresión en superficie de líneas celulares de melanomas y en metástasis de melanomas, aisladas de piel o de

ganglio linfático de pacientes. Además, realizamos una caracterización fenotípica exhaustiva de la expresión de ligandos de otros NKG2DL (ULBP-1, -2 y -3) y de las moléculas de clase I de HLA clásicas y no clásicas (HLA-E) en 10 líneas de melanoma humanos. Sorpresivamente, 5 de los 10 melanomas estudiados no expresaron MICA en superficie celular (**Figura 8**). De acuerdo a nuestros resultados, IIB-Mel-LES y M8 fueron los melanomas con menor y mayor nivel de expresión de NKG2DL, respectivamente (**Tabla I**). La ausencia o muy baja expresión de MICA en superficie celular en un alto porcentaje de las líneas analizadas nos llamó la atención debido a que se ha descripto en la literatura que MICA se expresa en una alta proporción de melanomas aunque este estudio fue realizado por inmunoistoquímica (134). Por este motivo, investigamos la posibilidad de que algunas de las células tumorales expresen MICA como depósitos intracelulares. Los resultados del análisis realizado por *Western blot* empleando lisados celulares de las líneas de melanoma (**Figura 9)** mostraron que efectivamente algunos melanomas poseen depósitos intracelulares pero no exponen a este NKG2DL en superficie. La falta de expresión de MICA en superficie celular no se debió a la baja expresión total de MICA ya que que los niveles de expresión de MICA en superficie no correlacionaron con los niveles totales de esta proteína (**Figura 11)** ni a falta de reactividad del AcMo contra los alelos de MICA expresados por algunos melanomas **(Figura 12)**. Un fenómeno similar pudo observarse en metástasis de melanomas aisladas de pacientes (**Figura 13**), lo que refuerza con resultados *ex vivo* la importancia de los resultados obtenidos *in vitro*. Asimismo, la expresión de MICA se detectó sólo en células tumorales pero no en nevos benignos (**Figura 14**). Por el contrario, y en concordancia con lo observado con las líneas celulares y las metástasis analizadas, observamos expresión de MICA en superficie de un melanoma maligno primario al momento de su aislamiento del paciente (diagnóstico). Estas evidencias sugieren fuertemente la existencia de un mecanismo desarrollado activamente por algunos melanomas destinado a prevenir la expresión de MICA en superficie durante su crecimiento *in vivo* y que tal mecanismo está destinado a evitar la citotoxicidad mediada por células NKG2D$^+$ y la secreción de IFN-γ por estas células. De esta manera, si bien los tumores no podrían evitar fácilmente la inducción de la expresión de NKG2DLs ya que este proceso está asociado a la activación de las vías de ATM y ATR durante la respuesta a estímulos de daño al ADN (136), nuestros resultados indican que algunos tumores podrían haber desarrollado la habilidad de retener a algunos de estos NKG2DLs en un compartimiento intracelular, haciéndolos inaccesibles a células NKG2D$^+$. Aunque no hemos realizado un estudio horizontal de progresión de un

mismo tumor y no contamos con un número suficientemente alto de muestras, nuestros resultados permiten inferir que las células premalignas (nevos benignos) no expresan MICA pero que luego de sufrir un proceso de neotransformación, entre otros fenómenos se induce la expresión de MICA. A medida que el tumor crece en el huésped inmunocompetente con la constante presión selectiva del sistema inmune, sobreviven aquellas variantes que pueden escapar al reconocimiento del mismo, por ejemplo evitando la expresión de MICA en superficie con el objeto de otorgar resistencia a mecanismos citotóxicos dependientes de NKG2D.

Las células NK reconocen a las células blanco utilizando una batería de receptores inhibidores y activadores de la citotoxicidad. Los receptores inhibidores reconocen generalmente moléculas de clase I del HLA y los activadores reconocen moléculas que no se expresan en células normales pero sí en células tumorales o infectadas, tales como los NKG2DLs. De acuerdo al balance entre las señales desencadenadas por ambos tipos de receptores se produce o no una respuesta citotóxica por parte de las células NK. La evaluación de la expresión de los diferentes NKG2DLs en las líneas de melanomas empleadas en este estudio mostró que la citotoxicidad de células NK no correlacionó con los niveles de expresión de MICA, NKG2DL o moléculas de clase I del HLA en superficie pero mostró una correlación significativa con el cociente entre los niveles de expresión de NKG2DL y de moléculas de clase I de HLA (**Figura 15 y 16**). En este contexto, una baja relación NKG2DL/HLA de clase I confiere resistencia a la citotoxicidad mediada por células NK y la retención intracelular de MICA observada en este estudio podría contribuir a generar un fenotipo celular con estas características de bajo cociente NKG2DL/HLA clase I. Si bien el análisis de la correlación resultó significativo, el coeficiente *r* de Pearson obtenido no fue muy elevado (0,709) probablemente a causa de que no analizamos la expresión de los ligandos de otros receptores activadores de células NK tales como los NCR (NKp30, NKp44 y NKp46). A pesar de ello, observamos que los melanomas IIB-Mel-LES y A375N, que presentaron una baja relación entre la expresión de NKG2DL con respecto a moléculas de clase I del HLA, fueron altamente resistentes a la citotoxicidad mediada por células NK en contraste con lo observado con los melanomas M8 y Mel-888, donde la citotoxicidad fue parcialmente dependiente de NKG2D (**Figura 17**). Asimismo, de acuerdo a la alta expresión de MICA en estas 2 líneas celulares, dicha susceptibilidad a la lisis por células NK fue parcialmente dependiente de NKG2D.

En base a estos resultados, nos preguntamos si sería posible revertir el fenotipo de retención intracelular de MICA en melanomas empleando estrategias de transfección con el objeto de conferir susceptibilidad a la lisis por células NK y promover una mayor liberación de IFN-γ por estas células, como paso previo indispensable al desarrollo de cualquier estrategia de inmunoterapia anti-tumoral basada en la sobre-expresión de MICA. La transfección de la línea celular IIB-Mel-LES (elegida por el hecho de que además de ser la de menor niveles de expresión de NKG2DLs en superficie, no expresa MICB, **Figura 10**) con un plásmido para expresión en células eucarióticas que codifica para la proteína MICA nos permitió restaurar la expresión de este NKG2DL en superficie celular (**Figura 18**). Estos resultados indican que es posible sobrepasar la capacidad de retención intracelular y habilidad intrínseca de los melanomas de retener a MICA dentro de la célula. Más importante aún, la restauración de la expresión de este NKG2DL en superficie del melanoma IIB-Mel-LES confirió susceptibilidad a la lisis mediada por células NK e indujo la secreción de IFN-γ *in vitro* (**Figura 19**). Confirmamos que la adquisición de susceptibilidad a la citotoxicidad mediada por células NK fue debida al aumento en la expresión de MICA mediante la realización de ensayos de bloqueo utilizando el AcMo anti-NKG2D 1D11 (**Figura 20**). En estos experimentos observamos que al interferir la unión de NKG2D a sus ligandos, la citotoxicidad y liberación de IFN-γ producida por células NK humanas contra los clones transfectados fueron idénticas a los obtenidos con las células de la línea parental y el clon control. Asimismo, el procedimiento de transfección no afectó los niveles de expresión de ULBP-1, -2 y -3 ni de MICB (**Figura 21**) por lo que también descartamos que el aumento en la susceptibilidad a lisis por células NK fuera debido a una posible alteración en la expresión de otros NKG2DL inducido por tal procedimiento. Por otra parte, la adquisición de susceptiblidad a la citotoxicidad por células NK podría deberse parcialmente a un efecto indirecto mediado por el proceso de sobre-expresión de MICA debido a que la síntesis de este polipéptido podría proveer un péptido líder que estabilice a la molécula HLA-E e induzca un aumento concomitante de su expresión en superficie (59), con el consiguiente reconocimiento por el receptor activador de citotoxicidad CD94/NKG2C (58). Sin embargo, en las células transfectadas generadas no se observaron modificaciones en los niveles de HLA-E con respecto a la línea celular parental (**Figura 22**), lo que descarta esta posibilidad.

Con el fin de investigar la relevancia *in vivo* de la restauración de la expresión de MICA en los melanomas humanos, las células transfectadas (que crecen a la misma tasa *in vitro* que la línea parental, **Figura 24**) fueron empleadas para

desafiar ratones *nude*. Tal como esperábamos, las células que sobre-expresan MICA exhibieron un retardo estadísticamente significativo en el crecimiento tumoral (**Figura 23**), acompañado por una apoptosis masiva observada en el foco tumoral (**Figura 27**). La aparición de morbilidad terminal se retrasó 20-21 días en los animales desafiados con los clones 1 y 3, y 14 días en los animales desafiados con el clon 2, en comparación con los animales desafiados con el clon control. Esa mayor apoptosis *in vivo* en estos tumores producidos por inoculación de los clones 1-3 *vs* el clon C sumada al aumento de la citotoxicidad *in vitro* por parte de células NK de ratón contra los clones 1-3 *vs* el clon C, demostró que los melanomas que sobre-expresan MICA fueron más susceptibles a las funciones efectoras de células NK que las células de melanoma control (**Figura 28**). Estos resultados fueron confirmados mediante la realización de experimentos de depleción de células NK con Ac anti-asialo GM1 y crecimiento tumoral *in vivo*, donde observamos que el crecimiento de los melanomas que sobre-expresan MICA en animales depletados de células NK fue idéntico al crecimiento del clon control en ratones no depletados de células NK (**Figura 29**). Por lo tanto, concluimos que las células NK son células efectoras críticas involucradas en el control del crecimiento tumoral *in vivo* en este sistema experimental.

Llamativamente, a pesar de que observamos un retardo en el crecimiento de los tumores que sobre-expresan MICA, no observamos inhibición completa del crecimiento tumoral. Aunque hasta el presente sólo podemos especular acerca de las causas de este fenómeno de penetrancia, creemos que el mismo se debe a que todos los clones y las células salvajes (no transfectadas) poseen mecanismos de escape tumoral adicionales que les permiten crecer en presencia de células NKG2D$^+$, afectar el control del sistema inmune y alcanzar la morbilidad terminal.

Por otra parte, es importante tener en cuenta que nuestro modelo experimental es xenogeneico (tumores humanos inoculados en ratones carentes de linfocitos T, donde la respuesta inmune antitumoral está mediada mayoritariamente por células NK). Probablemente, en un modelo singeneico las células NK serían responsables de la inmunovigilancia y el control inicial del crecimiento tumoral (logrando contener o demorar la progresión del mismo durante los primeros estadíos), lo que podría ampliar la ventana de tiempo que permite el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa más eficiente o de mayor envergadura mediada por linfocitos T.

Durante la realización de este trabajo de Tesis, se ha publicado un trabajo en el cual se observó que la expresión ectópica de MICA retarda el crecimiento de gliomas en ratones *nude*. Sin embargo, en este trabajo, las células tumorales recuperadas luego del crecimiento *in vivo* perdieron la expresión de MICA (145). La causa más probable de este hallazgo es el hecho de que en el modelo experimental empleado por estos autores probablemente haya ocurrido una selección *in vivo* de células no transfectadas ya que los tumores empleados en esos experimentos no eran clonados. En cambio, nosotros generamos y utilizamos clones que sobre-expresan MICA en forma estable y observamos que los tumores recuperados de los animales desafiados con cada uno de estos 3 clones conservaron la expresión de MICA en superficie inclusive al momento del crecimiento tumoral terminal (**Figura 25**). Vale la pena destacar que en los experimentos de evaluación de la expresión de MICA luego del crecimiento *in vivo* realizamos un análisis en paralelo de la expresión de moléculas de clase I del HLA (empleando el AcMo W6/32). Aunque esto aparece como trivial para el caso de los tumores que sobre-expresan MICA, resulta clave para poder identificar las células humanas (el tumor) en un contexto de un tejido de ratón en el caso de los animales desfiados con el clon control.

Por lo tanto, el crecimiento tumoral observado en nuestros experimentos *in vivo* no se debería a la selección de variantes MICA$^-$. Por el contrario, creemos que la causa de este crecimiento se debe principalmente a que los tumores inoculados podrían emplear otros mecanismos de escape tumoral para resistir el ataque citotóxico por parte de células NKG2D$^+$ (11). En tal sentido, otros autores demostraron que el ectodominio de MICA puede ser secretado *in vitro* al medio de cultivo y detectado *in vivo* en suero de pacientes con cáncer, (97, 98). Este clivaje, mediado por metaloproteasas (153), además de generar variantes tumorales con menor expresión de MICA, induce la internalización de NKG2D en células NK y linfocitos T CD8$^+$ produciendo una disminución de su expresión en superficie y, consecuentemente, de sus funciones efectoras anti-tumorales. La comparación de los niveles de expresión de NKG2D en las células NK de los bazos recuperados de los ratones inoculados con los distintos clones transfectados mostró una disminución estadísticamente significativa para el clon 3 y una clara tendencia a la disminución para los clones 1 y 2 en la expresión de este receptor, respecto de lo que se observó en células NK de los bazos recuperados de los ratones inoculados con el clon control (**Figura 26**). Presumiblemente, esta expresión disminuída de NKG2D podría ser inducida por sMICA liberado por los tumores durante su crecimiento *in vivo* en los ratones desafiados. Desafortunadamente, no podemos

analizar si este es el caso debido a que no hemos conservado el suero de los animales luego de la eutanasia. Independientemente, esta disminución sistémica en la expresión de NKG2D en las células NK de bazo podría contribuir al escape tumoral promovido por los clones que sobre-expresan MICA durante las fases tardías de crecimiento *in vivo*.

Hasta este punto, nuestros resultados sugieren que algunos melanomas humanos desarrollaron un mecanismo activo para prevenir la exposición en superficie de un ligando que confiere susceptibilidad a la citotoxicidad mediada por células NK. *In vivo*, bajo la presión del sistema inmune, este nuevo mecanismo de escape tumoral podría proveer una ventaja adaptativa que favorezca el crecimiento de variantes tumorales que hayan perdido la expresión de MICA en superficie, ya que les conferiría una resistencia a la citotoxicidad y secreción de IFN-γ por parte de células NK mediada por el receptor NKG2D. Este mecanismo podría representar una forma más eficiente que la secreción de MICA para lograr el escape tumoral al sistema inmune (152-154). Esto se debe a que para que la secreción / clivaje proteolítico de MICA sea operativa como mecanismo de escape tumoral se requieren altos niveles de expresión de MICA en superficie, una alta tasa de secreción de metaloproteasas y la expresión de la chaperona ERp5 por parte del tumor con el objeto de alcanzar una cierta concentración umbral de sMICA en suero y fluidos tisulares como para ejercer los efectos inmunosupresores locales y sistémicos descriptos previamente. Consecuentemente, este mecanismo de escape no será operativo en tumores que secreten bajos niveles de metaloproteasas, que no expresen ERp5 o que expresen niveles intermedios de MICA. Alternativamente, un mecanismo basado en la retención intracelular de MICA tal como el descripto en el presente trabajo será eficiente como mecanismo de escape tumoral independientemente de la localización de las células tumorales, la tasa de secreción de metaloproteasas y la síntesis de ERp5.

Por otra parte, la restauración de la expresión de MICA en células que desarrollaron una habilidad intrínseca de retener a este NKG2DL en un compartimiento intracelular y la promoción de funciones efectoras (citotoxicidad y secreción de IFN-γ) por parte de células NK indica que la regulación de la expresión de los ligandos de NKG2D en células tumorales constituye un enfoque eficiente para desencadenar una respuesta inmune capaz de superar los mecanismos de escape tumoral. Además, nuestros resultados son relevantes para el desarrollo de estrategias de inmunoterapia para el tratamiento del cáncer en humanos

considerando que se ha demostrado recientemente que las células NK juegan un rol crítico en la activación de CDs genéticamente modificadas, lo que repercute en la calidad de la respuesta inmune adaptativa contra tumores (182, 183).

Con el objeto de investigar posibles factores potencialmente involucrados en la retención intracelular de MICA en los melanomas estudiados, exploramos la posibilidad de que la falta de expresión de MICA en superficie de estos melanomas se deba a un rápido reciclado de esta proteína. Sin embargo, experimentos realizados con diferentes inhibidores farmacológicos del tránsito intracelular de proteínas, mostraron que su expresión en superficie no pudo ser restaurada en varios de los melanomas al inhibir la formación de microfilamentos de actina y el tránsito intracelular con citocalasina B, la translocación de proteínas del RE al aparato de Golgi con brefeldina A o la acidificación de los endosomas con cloroquina (**Figura 30**).

Hasta el momento se han descripto diversos mecanismos que contribuyen en el escape a la respuesta inmune mediada por células NK. Dos de estos mecanismos involucran una disminución en la expresión MICA lo que facilita la sobrevida de los tumores en individuos inmunocompetentes ya que evitan el reconocimiento y destrucción mediados por NKG2D. En primer lugar, como se mencionara anteriormente se demostró que algunos tumores son capaces de secretar sMICA lo que además produce una disminución de la expresión de NKG2D en la superficie de células NK y linfocitos T $CD8^+$ (**Figura 7**). Sin embargo, empleando un ELISA de captura desarrollado por nuestro grupo, con un límite de detección similar al reportado en la literatura, no detectamos sMICA en los sobrenadantes de cultivo de las 10 líneas de melanoma utilizadas en este trabajo (**Figura 31**). Este resultado parecería contradictorio con las observaciones *in vivo*, donde si bien no observamos una disminución significativa en los niveles de expresión de MICA en los tumores recuperados luego del crecimiento en los ratones *nude*, observamos una disminución en los niveles de expresión de NKG2D en las células de bazo de los animales desafiados con los tumores que sobre-expresan MICA. Esta aparente contradicción puede explicarse considerando que podrían existir diferencias en la detectabilidad de los ensayos de ELISA empleados en nuestro laboratorio y los desarrollados por otros autores (152, 153). También es posible que exista algún mecanismo adicional que esté operando *in vivo* pero no *in vitro*. El segundo mecanismo de escape que involucra una disminución en la expresión de MICA en los tumores es mediado por TGF-β. Esta citoquina

inmunosupresora (155) tiene un doble efecto sobre el sistema NKG2DL-NKG2D. Por un lado regula negativamente la expresión de MICA y otros NKG2DL en la superficie de células tumorales (156) y por otro lado induce una disminución en la expresión de NKG2D en linfocitos T $CD8^+$ y células NK, lo que evita el reconocimiento y destrucción de distintos tipos celulares (**Figura 7**) (151, 156-158). Utilizando un kit comercial, tampoco detectamos secreción de TGF-β en los sobrenadantes de cultivo de las líneas estudiadas. Asimismo, la neutralización de posibles trazas de TGF-β en estos sobrenadantes no permitió restaurar la expresión de MICA en la superficie de las células de melanoma usadas en este estudio (**Figura 32**). Por lo tanto, la modulación de la expresión de MICA mediada por TGF-β tampoco parecería estar involucrada en la ausencia de expresión de este NKG2DL en la superficie celular de los melanomas empleados en este estudio. Estos resultados sugieren que el mecanismo responsable de la retención intracelular de MICA en los melanomas descripto en los experimentos realizados a lo largo de esta Tesis constituye un mecanismo novedoso no descripto previamente en la literatura.

Con el objeto de investigar el compartimiento intracelular en el cual MICA es retenida, realizamos ensayos de colocalización y microscopía (**Figura 33**). En estos experimentos observamos claramente que melanomas que expresan MICA en superficie celular (tales como IIB-Mel-IAN y M8) existe colocalización de este NKG2DL en cada uno de los compartimientos involucrados en el transporte de diversas moléculas hacia la superficie celular (endosomas tempranos, endosomas tardíos/lisosomas, aparato de Golgi, RE). En cambio, en los melanomas que no expresan MICA en superficie celular pero que poseen depósitos intracelulares de este NKG2DL observamos colocalización de MICA casi con exclusividad en el RE (resultado que fue corroborado por microscopia electrónica, **Figura 34**). La colocalización de MICA en RE también fue observada en 2 metástasis de melanoma aisladas de pacientes que no expresan MICA en superficie (ARA y JOR, **Figura 35**). Por lo tanto, el fenómeno de retención intracelular de MICA en el RE, que conduce a una resistencia a la citotoxicidad dependiente de NKG2D mediada por células NK, es un proceso desarrollado activamente por algunos melanomas humanos que permite la acumulación de MICA en el RE, constituyendo un novedoso mecanismo de escape tumoral a la respuesta inmune.

Teniendo en cuenta que los tumores frecuentemente desarrollan mutaciones que contribuyen al fenotipo tumoral al otorgar alguna ventaja para el crecimiento descontrolado en el huésped inmunocompetente (184-187), especulamos que la acumulación de mutaciones puntuales podría generar señales de retención

intracelular en el polipéptido de MICA. Más concretamente, pensamos que por mutación se podrían generar motivos KDEL o similares que promuevan la retención de MICA en el RE (173-175). Notablemente, encontramos que una secuencia dentro del gen de MICA podría potencialmente generar, por una mutación puntual una secuencia KEDL, una secuencia alternativa que también es capaz de promover la retención intracelular (174). Sin embargo, la secuenciación del ARNm de MICA en cada una de las líneas de melanoma mostró que no existen tales mutaciones puntuales.

Descartada esta posibilidad, sospechamos que algún alelo específico de MICA expresado por las líneas de melanomas podría expresarse en bajos niveles en la superficie celular debido a factores intrínsecos a la secuencia primaria del polipéptido, por lo que la baja expresión de MICA en superficie de las líneas de melanoma podría estar asociada con la expresión de este alelo en particular. Por ejemplo, MICA*010 es un alelo inestable debido a un polimorfismo particular que genera una proteína que se degrada rápidamente dentro de la célula y no alcanza a expresarse en la superficie celular (114). Sin embargo, ninguna de las líneas celulares utilizadas en nuestros experimentos expresó el alelo MICA*010. Por el contrario, todas las células utilizadas codifican para alelos expresados en altos niveles en superficie de otras células, tales como MICA*008 (98, 123), MICA*027 (123), MICA*001 y MICA*004 (100, 123, 153), y MICA*011 (188) y resultados propios. Más aún, la línea CIO-Mel-001 que expresa niveles muy bajos de MICA en superficie es homocigota para el alelo MICA*001 al igual que la línea IIB-Mel IAN, que expresa niveles muy altos de MICA en superficie. Además utilizando una estrategia de transfección logramos expresar MICA*001 en la superficie del melanoma IIB-Mel-LES, lo que indica que al menos uno de sus alelos endógenos puede ser expresado eficientemente en superficie, superando la capacidad intrínseca de este melanoma de retener a MICA dentro de la célula. Estas observaciones indican que la retención en el RE no se debe a características intrínsecas del polipéptido de MICA y son compatibles con la existencia de una chaperona que podría estar involucrada en la retención intracelular, la que se saturaría cuando MICA es sobre-expresada utilizando un plásmido que dirige la expresión de este NKG2DL bajo el control del promotor fuerte como el del virus SV40 (el promotor que dirige la expresión en el plásmido empleado en las transfecciones). Esta situación sería comparable a la descripta para Erd2, un receptor que retiene en el RE proteínas que llevan la secuencia KDEL, pero sólo hasta que se alcanza el punto de saturación (189).

En metástasis de melanomas frecuentemente se observa una disminución en la expresión de la proteína chaperona CN en el RE pero no así de la chaperona calreticulina y se ha postulado que esto contribuye con el escape tumoral (177). Esto nos hizo especular que CN podía estar involucrada en la retención intracelular de MICA. Sin embargo, la falta de expresión de MICA en superficie no se debió a diferencias en los niveles de expresión de CN ya que no encontramos correlación entre los niveles de expresión de ambas proteínas (**Figura 36**).

Por otro lado, la acumulación de polipéptidos en el RE puede causar efectos tóxicos sobre las células. Para evitar esto, en el RE existe un sistema de control de calidad del plegamiento de las proteínas que utiliza dos mecanismos para permitir la eliminación de proteínas aberrantes. Estos mecanismos son la degradación asociada al RE (ERAD por *endoplasmic reticulum-associated degradation*) y la respuesta ante proteínas no plegadas (UPR por *unfolded protein response*). En la mayor parte de los casos, la vía de ERAD de las proteínas que no pueden abandonar el RE involucra su retrotraslocación hacia el citoplasma, ubiquitinación y posterior degradación por el proteosoma. Por ello, investigamos la posible retrotraslocación de MICA al citoplasma y observamos la presencia de MICA en las fracciones citoplasmáticas no sólo de la línea IIB-Mel-LES sino también de IIB-Mel-IAN y M8 (**Figura 37**). Se ha demostrado que aún en condiciones normales, la eficiencia de plegamiento de ciertas proteínas (entre las cuales el regulador transmembrana de la fibrosos quística, CFTR, es un ejemplo paradigmático, 190) puede ser tan baja como el 20%. Esto explicaría por qué aún las células que expresan MICA en superficie poseen depósitos de esta proteína en el citoplasma (como es el caso de IIB-Mel-IAN y M8).

Con el objeto de analizar las proteínas involucradas en la retrotranslocación de MICA pensamos en dos candidatos. El primero es un canal multimérico llamado Sec61, capaz de remover proteínas mal plegadas del RE, realizando una retrotranslocación al citoplasma (191). El segundo, es la AAA ATPasa p97, que forma un anillo hexamérico que interactúa con aquellas proteínas que sufren retrotraslocación mediada por Sec61 (178). Sin embargo, en nuestro sistema p97 y Sec61 no estarían involucradas en la retrotranslocación de MICA desde el RE al citoplasma debido a que la transfección transiente de las líneas IIB-Mel-LES e IIB-Mel-IAN con plásmidos que codifican para la forma salvaje de p97 o la mutante doble negativa (incapaz de liberar a los sustratos de retrotraslocación, atrapándolos

en el lumen del RE, (179) no produjo un cambio en los niveles de expresión de MICA (**Figura 38**).

Las N-glicoproteínas de membrana tales como MICA son sintetizadas en el RE donde son glicosiladas en una sucesión de reacciones complejas. En primer lugar y de manera co-transcripcional, al péptido recién sintetizado se le transfiere en una asparragina un oligosacárido preformado que consta de 14 azúcares (2 N-acetilglucosaminas, 9 manosas y 3 glucosas). Luego de esta transferencia se produce un procesamiento secuencial, inicialmente en el RE y luego en las distintas cisternas del aparato de Golgi. En este procesamiento intervienen transferasas y glicosilasas que transfieren o remueven azúcares, respectivamente. Durante la maduración en el *trans*-Golgi, actúa una enzima llamada manosidasa II, que remueve 2 manosas del complejo oligosacarídico generando un oligosacárido "maduro". A partir de este momento, la glicoproteína no puede ser atacada por la enzima endoH. Por lo tanto, la sensibilidad a esta enzima se utiliza como criterio para diferenciar entre proteínas maduras y proteínas inmaduras. Utilizando ensayos de digestión con endoH, observamos una acumulación de formas inmaduras del polipéptido de MICA en el melanoma IIB-Mel-LES en comparación con lo observado en IIB-Mel-IAN (**Figura 39**). Estos resultados apoyan la hipótesis de retención de MICA en el RE por acumulación de formas inmaduras. En consecuencia, la ausencia de expresión de MICA en superficie celular de los melanomas se debería a un bloqueo en el proceso de maduración de los oligosacáridos que se incorporan al polipéptido naciente lo que impediría el tránsito de este NKG2DL hacia los compartimientos celulares siguientes en su ruta hacia la superficie celular.

Con el objeto de investigar si la retrotranslocación de MICA al citoplasma conlleva una degradación del polipéptido en el proteosoma, analizamos la expresión de MICA en ausencia y en presencia de un inhibidor farmacológico del proteosoma. En estos experimentos observamos que sólo IIB-Mel-LES (y en menor medida en A375N) pero no IIB-Mel-IAN acumula MICA en el citoplasma como consecuencia del tratamiento con el inhibidor Bortezomib, lo que se vio acompañado de la aparición de bandas de mayor peso molecular que podrían corresponder a formas ubiquitinadas de la proteína. Asimismo, la inhibición del proteosoma generó un aumento en la expresión de MICA en superficie solamente en las dos líneas celulares que no expresan este NKG2DL normalmente (IIB-Mel-LES y A375N) mientras que se observó un efecto apenas detectable en IIB-Mel-IAN y M8 (**Figura 40**). Por lo tanto, estos datos sugieren que en los melanomas estudiados, en mayor

o menor medida se produce una retrotranslocación de MICA al citoplasma, pero sólo en aquellos que desarrollaron una maquinaria de retención intracelular esta retrotranslocación conduce a una degradación de la proteína que previene su expresión en superficie. Es interesante destacar el hecho de que el tratamiento con el inhibidor del proteosoma Bortezomib fue capaz de restaurar la expresión de MICA en superficie, lo que sugiere que las estrategias de quimioterapia en humanos que utilizan este compuesto podrían promover indirectamente la expresión de MICA en aquellos tumores que retiene a este NKG2DL en el RE y así potenciar la actividad anti-tumoral dependiente de NKG2D mediada por células NK por un efecto hasta ahora ignorado.

Aunque se ha descripto la retención intracelular de MICB, ULBP-1 y ULBP-2 en el RE y en el *cis*-Golgi de fibroblastos infectados con CMV (121, 122), este mecanismo no se ha observado previamente en tumores. Por lo tanto, los resultados descriptos en el presente trabajo de Tesis describen un mecanismo de escape tumoral novedoso. En última instancia, la retención de formas inmaduras de MICA en el RE podría deberse a la asociación con chaperonas, a modificaciones post-traduccionales inducidas por las maquinarias de control de calidad del RE tales como las UPR y ERAD (192) o a un estado rédox alterado que podría afectar la estabilidad de la proteína dentro del RE (193). Por ejemplo, se ha reportado que MICA posee la capacidad de asociarse con chaperonas específicas tales como ERp5, lo que participa en el clivaje de este NKG2DL de la superficie de células tumorales y en la generación de las formas solubles de MICA detectables en suero de pacientes con cáncer (154).

Otro dato interesante lo constituye el hecho de que la masa molecular relativa (*Mr*) de MICA detectada por *Western blot* en lisados de células de melanoma que retienen esta molécula en RE fue indistinguible de la *Mr* de la proteína detectada en las células de melanoma que expresan MICA en la superficie (alrededor de 65kDa), indicando que la incorporación de oligosacáridos en el polipéptido de MICA sintetizado tiene lugar mayoritariamente en el RE, y que el recorte y posterior procesamiento que ocurre en el aparato de Golgi (194) no altera visiblemente la *Mr* de la proteína MICA. Una contribución importante de un transporte retrógrado de MICA desde el aparato de Golgi hacia el RE parece improbable en nuestro sistema dado que no detectamos un *pool* de moléculas de MICA que colocalicen con el marcador de *cis*-Golgi GM130 en los melanomas IIB-Mel-LES y A375N, a diferencia de lo encontrado en los melanomas IIB-Mel-IAN y M8. Por lo tanto, es posible que

la retención intracelular de MICA se deba a la asociación con una chaperona desconocida dentro del RE o a otras modificaciones post-traduccionales (la investigación de estas hipótesis está actualmente en curso en nuestro laboratorio). Por ejemplo comenzamos a estudiar la asociación de MICA con posibles chaperonas por medio de experimentos de proteómica.

Un mejor entendimiento de los mecanismos que utiliza el tumor para escapar al reconocimiento por el sistema inmune, nos permitirá hacer un uso más efectivo de la inmunoterapia que, junto con los tratamientos convencionales, nos ayudará a prevenir, controlar y/o erradicar los tumores establecidos. Dado que en humanos MICA es un ligando activador de la citotoxicidad mediada por células NK, nuestro trabajo constituye un progreso importante en el intento de trasladar el conocimiento básico sobre la inmunobiología y la dinámica de expresión de ligandos de NKG2D al tratamiento del cáncer en humanos.

CONCLUSIONES

En esta Tesis doctoral hemos demostrado que:

- 10 líneas de melanoma y 5 de 6 metástasis de melanoma expresan MICA, pero 5 de las 10 líneas celulares y 2 de los 5 tumores frescos previenen la expresión de este ligando de NKG2D en su superficie.

-la retención intracelular de MICA contribuye a la baja expresión en superficie de NKG2DLs, lo que provoca que tales células tengan un bajo cociente entre los niveles de expresión de NKG2DL y de moléculas de clase I del HLA, y consecuentemente, una alta resistencia a la citotoxicidad mediada por células NK dependiente de NKG2D.

- la expresión ectópica de MICA por transfección estable revierte el fenotipo de retención intracelular ya que permite restaurar la expresión de MICA en superficie celular,confiere susceptibilidad a la citotoxicidad mediada por células NK y promueve una alta secreción de IFN-γ por estas células, ambos fenómenos dependientes de NKG2D.

- las células tumorales que sobre-expresan MICA exhibieron un retardo en el crecimiento tumoral *in vivo* acompañado por una apoptosis masiva observada en el foco tumoral.

- el retardo en el crecimiento tumoral se debe aun mecanismo dependiente de células NK.

- la ausencia de expresión de MICA en superficie de los melanomas no puede explicarse mediante ningun mecanismo descripto hasta el momento sino que el fenómeno de retención de MICA observado constituye un novedoso mecanismo de escape tumoral a la respuesta inmune.

- la retención de MICA en el RE no se debe a la acumulación de mutaciones puntuales en el gen de MICA que generen secuencias de retención y no esta ligada a la expresión de algún alelo en particular de esta proteína.

- empleando estrategias de transfección pudimos expresar en superficie celular uno de los alelos endógenos de uno de los melanomas caracterizados por no expresar MICA en superficie, sobrepasando la capacidad del melanoma de retener a esta proteína en el RE.

- la ausencia de expresión de MICA en superficie celular de los melanomas se debería a un bloqueo en el proceso de maduración de los oligosacáridos que se incorporan al polipéptido naciente

- en los melanomas estudiados, en mayor o menor medida se produce una retrotranslocación de MICA al citoplasma (en la que no están involucradas Sec61 ni p97), pero sólo en aquellos que desarrollaron una maquinaria de retención intracelular esta retrotranslocación conduce a una degradación de la proteína que previene su expresión en superficie.

- Por lo tanto la retención intracelular de MICA por acumulación de formas inmaduras del polipéptido en el RE (proceso que creemos fue adquirido por estos tumores durante su crecimiento *in vivo* en el huésped inmunocompetente) constituye un novedoso mecanismo de escape tumoral que confiere privilegio inmunológico que previene los mecanismos efectores anti-tumorales de las células NK.

BIBLIOGRAFIA

1. **Hanahan, D., and R. A. Weinberg**. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70.
2. **Gray-Schopfer, V., C. Wellbrock, and R. Marais**. 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445:851-857.
3. **Igney, F. H., and P. H. Krammer**. 2002. Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack. *J Leukoc Biol* 71:907-920.
4. **Restifo, N. P., P. A. Antony, S. E. Finkelstein, W. W. Leitner, D. P. Surman, M. R. Theoret, and C. E. Touloukian**. 2002. Assumptions of the tumor 'escape' hypothesis. *Semin Cancer Biol* 12:81-86.
5. **Dunn, G. P., A. T. Bruce, H. Ikeda, L. J. Old, and R. D. Schreiber**. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-998.
6. **Shankaran, V., H. Ikeda, A. T. Bruce, J. M. White, P. E. Swanson, L. J. Old, and R. D. Schreiber**. 2001. IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107-1111.
7. **Bromberg, J. F., C. M. Horvath, Z. Wen, R. D. Schreiber, and J. E. Darnell, Jr.** 1996. Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:7673-7678.
8. **Strieter, R. M., S. L. Kunkel, D. A. Arenberg, M. D. Burdick, and P. J. Polverini**. 1995. Interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10), a member of the C-X-C chemokine family, is an inhibitor of angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 210:51-57.
9. **Farber, J. M.** 1997. Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes. *J Leukoc Biol* 61:246-257.
10. **Gasperini, S., M. Marchi, F. Calzetti, C. Laudanna, L. Vicentini, H. Olsen, M. Murphy, F. Liao, J. Farber, and M. A. Cassatella**. 1999. Gene expression and production of the monokine induced by IFN-gamma (MIG), IFN-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC), and IFN-gamma-inducible protein-10 (IP-10) chemokines by human neutrophils. *J Immunol* 162:4928-4937.
11. **Rabinovich, G. A., D. Gabrilovich, and E. M. Sotomayor**. 2007. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 25:267-296.
12. **Koebel, C. M., W. Vermi, J. B. Swann, N. Zerafa, S. J. Rodig, L. J. Old, M. J. Smyth, and R. D. Schreiber**. 2007. Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450:903-907.
13. **Lieberman, J.** 2003. The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat Rev Immunol* 3:361-370.
14. **Veugelers, K., B. Motyka, I. S. Goping, I. Shostak, T. Sawchuk, and R. C. Bleackley**. 2006. Granule-mediated killing by granzyme B and perforin requires a mannose 6-phosphate receptor and is augmented by cell surface heparan sulfate. *Mol Biol Cell* 17:623-633.
15. **Barry, M., and R. C. Bleackley**. 2002. Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2:401-409.
16. **Hersey, P., and X. D. Zhang**. 2001. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer* 1:142-150.
17. **Ferlazzo, G., M. Pack, D. Thomas, C. Paludan, D. Schmid, T. Strowig, G. Bougras, W. A. Muller, L. Moretta, and C. Munz**. 2004. Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:16606-16611.
18. **Martin-Fontecha, A., L. L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto**. 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat Immunol* 5:1260-1265.
19. **Shibuya, A., K. Nagayoshi, K. Nakamura, and H. Nakauchi**. 1995. Lymphokine requirement for the generation of natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 85:3538-3546.
20. **Cooper, M. A., T. A. Fehniger, and M. A. Caligiuri**. 2001. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 22:633-640.

21. **Dorshkind, K., S. B. Pollack, M. J. Bosma, and R. A. Phillips**. 1985. Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (scid). *J Immunol* 134:3798-3801.
22. **Sanchez, M. J., M. O. Muench, M. G. Roncarolo, L. L. Lanier, and J. H. Phillips**. 1994. Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus. *J Exp Med* 180:569-576.
23. **Zijlstra, M., H. Auchincloss, Jr., J. M. Loring, C. M. Chase, P. S. Russell, and R. Jaenisch**. 1992. Skin graft rejection by beta 2-microglobulin-deficient mice. *J Exp Med* 175:885-893.
24. **Routes, J. M.** 1992. IFN increases class I MHC antigen expression on adenovirus-infected human cells without inducing resistance to natural killer cell killing. *J Immunol* 149:2372-2377.
25. **Caligiuri, M. A., A. Zmuidzinas, T. J. Manley, H. Levine, K. A. Smith, and J. Ritz**. 1990. Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors. *J Exp Med* 171:1509-1526.
26. **Bryceson, Y. T., M. E. March, H. G. Ljunggren, and E. O. Long**. 2006. Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells. *Immunol Rev* 214:73-91.
27. **Fernandez, N. C., E. Treiner, R. E. Vance, A. M. Jamieson, S. Lemieux, and D. H. Raulet**. 2005. A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules. *Blood* 105:4416-4423.
28. **Walzer, T., S. Jaeger, J. Chaix, and E. Vivier**. 2007. Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses. *Curr Opin Immunol* 19:365-372.
29. **Welte, S., S. Kuttruff, I. Waldhauer, and A. Steinle**. 2006. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat Immunol* 7:1334-1342.
30. **Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra, and G. Trinchieri**. 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195:327-333.
31. **Piccioli, D., S. Sbrana, E. Melandri, and N. M. Valiante**. 2002. Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195:335-341.
32. **Ferlazzo, G., M. L. Tsang, L. Moretta, G. Melioli, R. M. Steinman, and C. Munz**. 2002. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 195:343-351.
33. **Andrews, D. M., C. E. Andoniou, A. A. Scalzo, S. L. van Dommelen, M. E. Wallace, M. J. Smyth, and M. A. Degli-Esposti**. 2005. Cross-talk between dendritic cells and natural killer cells in viral infection. *Mol Immunol* 42:547-555.
34. **Ghiringhelli, F., L. Apetoh, F. Housseau, G. Kroemer, and L. Zitvogel**. 2007. Links between innate and cognate tumor immunity. *Curr Opin Immunol* 19:224-231.
35. **Lucas, M., W. Schachterle, K. Oberle, P. Aichele, and A. Diefenbach**. 2007. Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity* 26:503-517.
36. **Mullen, A. C., F. A. High, A. S. Hutchins, H. W. Lee, A. V. Villarino, D. M. Livingston, A. L. Kung, N. Cereb, T. P. Yao, S. Y. Yang, and S. L. Reiner**. 2001. Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection. *Science* 292:1907-1910.
37. **Lanier, L. L.** 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23:225-274.
38. **Robertson, M. J.** 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol* 71:173-183.
39. **Romagnani, C., K. Juelke, M. Falco, B. Morandi, A. D'Agostino, R. Costa, G. Ratto, G. Forte, P. Carrega, G. Lui, R. Conte, T. Strowig, A. Moretta, C. Munz, A. Thiel, L. Moretta, and G. Ferlazzo**. 2007. CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation. *J Immunol* 178:4947-4955.
40. **Cerwenka, A., and L. L. Lanier**. 2001. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat Rev Immunol* 1:41-49.
41. **Moser, J. M., A. M. Byers, and A. E. Lukacher**. 2002. NK cell receptors in antiviral immunity. *Curr Opin Immunol* 14:509-516.

42. **Long, E. O.** 1999. Regulation of immune responses through inhibitory receptors. *Annu Rev Immunol* 17:875-904.
43. **Moretta, A., C. Bottino, M. Vitale, D. Pende, C. Cantoni, M. C. Mingari, R. Biassoni, and L. Moretta**. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytolysis. *Annu Rev Immunol* 19:197-223.
44. **Ravetch, J. V., and L. L. Lanier**. 2000. Immune inhibitory receptors. *Science* 290:84-89.
45. **Zwirner, N. W., M. B. Fuertes, M. V. Girart, C. I. Domaica, and L. E. Rossi**. 2007. Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system. *Cytokine Growth Factor Rev* 18:159-170.
46. **Trowsdale, J.** 2001. Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes. *Immunity* 15:363-374.
47. **Natarajan, K., N. Dimasi, J. Wang, R. A. Mariuzza, and D. H. Margulies**. 2002. Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination. *Annu Rev Immunol* 20:853-885.
48. **Faure, M., and E. O. Long**. 2002. KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential. *J Immunol* 168:6208-6214.
49. **Winter, C. C., J. E. Gumperz, P. Parham, E. O. Long, and N. Wagtmann**. 1998. Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition. *J Immunol* 161:571-577.
50. **Long, E. O.** 2002. Tumor cell recognition by natural killer cells. *Semin Cancer Biol* 12:57-61.
51. **Bakker, A. B., J. Wu, J. H. Phillips, and L. L. Lanier**. 2000. NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals. *Hum Immunol* 61:18-27.
52. **Vilches, C., and P. Parham**. 2002. KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Immunol* 20:217-251.
53. **Glienke, J., Y. Sobanov, C. Brostjan, C. Steffens, C. Nguyen, H. Lehrach, E. Hofer, and F. Francis**. 1998. The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics* 48:163-173.
54. **Houchins, J. P., T. Yabe, C. McSherry, and F. H. Bach**. 1991. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 173:1017-1020.
55. **Borrego, F., M. Masilamani, A. I. Marusina, X. Tang, and J. E. Coligan**. 2006. The CD94/NKG2 family of receptors: from molecules and cells to clinical relevance. *Immunol Res* 35:263-278.
56. **Lanier, L. L., B. Corliss, J. Wu, and J. H. Phillips**. 1998. Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 8:693-701.
57. **Lanier, L. L., B. C. Corliss, J. Wu, C. Leong, and J. H. Phillips**. 1998. Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells. *Nature* 391:703-707.
58. **Braud, V. M., D. S. Allan, C. A. O'Callaghan, K. Soderstrom, A. D'Andrea, G. S. Ogg, S. Lazetic, N. T. Young, J. I. Bell, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and A. J. McMichael**. 1998. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature* 391:795-799.
59. **Braud, V. M., D. S. Allan, D. Wilson, and A. J. McMichael**. 1998. TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr Biol* 8:1-10.
60. **Spruyt, L. L., M. J. Glennie, A. D. Beyers, and A. F. Williams**. 1991. Signal transduction by the CD2 antigen in T cells and natural killer cells: requirement for expression of a functional T cell receptor or binding of antibody Fc to the Fc receptor, Fc gamma RIIIA (CD16). *J Exp Med* 174:1407-1415.
61. **Sivori, S., S. Parolini, M. Falco, E. Marcenaro, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta**. 2000. 2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation. *Eur J Immunol* 30:787-793.
62. **Bouchon, A., M. Cella, H. L. Grierson, J. I. Cohen, and M. Colonna**. 2001. Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family. *J Immunol* 167:5517-5521.
63. **Bottino, C., M. Falco, S. Parolini, E. Marcenaro, R. Augugliaro, S. Sivori, E. Landi, R. Biassoni, L. D. Notarangelo, L. Moretta, and A. Moretta**. 2001. NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to

the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J Exp Med* 194:235-246.

64. **Shibuya, A., D. Campbell, C. Hannum, H. Yssel, K. Franz-Bacon, T. McClanahan, T. Kitamura, J. Nicholl, G. R. Sutherland, L. L. Lanier, and J. H. Phillips**. 1996. DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes. *Immunity* 4:573-581.
65. **Vitale, M., M. Falco, R. Castriconi, S. Parolini, R. Zambello, G. Semenzato, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta**. 2001. Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells. *Eur J Immunol* 31:233-242.
66. **Upshaw, J. L., and P. J. Leibson**. 2006. NKG2D-mediated activation of cytotoxic lymphocytes: unique signaling pathways and distinct functional outcomes. *Semin Immunol* 18:167-175.
67. **Bryceson, Y. T., M. E. March, H. G. Ljunggren, and E. O. Long**. 2006. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107:159-166.
68. **Pessino, A., S. Sivori, C. Bottino, A. Malaspina, L. Morelli, L. Moretta, R. Biassoni, and A. Moretta**. 1998. Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity. *J Exp Med* 188:953-960.
69. **Cantoni, C., C. Bottino, M. Vitale, A. Pessino, R. Augugliaro, A. Malaspina, S. Parolini, L. Moretta, A. Moretta, and R. Biassoni**. 1999. NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily. *J Exp Med* 189:787-796.
70. **Vitale, M., C. Bottino, S. Sivori, L. Sanseverino, R. Castriconi, E. Marcenaro, R. Augugliaro, L. Moretta, and A. Moretta**. 1998. NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med* 187:2065-2072.
71. **Pende, D., S. Parolini, A. Pessino, S. Sivori, R. Augugliaro, L. Morelli, E. Marcenaro, L. Accame, A. Malaspina, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta**. 1999. Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med* 190:1505-1516.
72. **Arnon, T. I., M. Lev, G. Katz, Y. Chernobrov, A. Porgador, and O. Mandelboim**. 2001. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur J Immunol* 31:2680-2689.
73. **Mandelboim, O., N. Lieberman, M. Lev, L. Paul, T. I. Arnon, Y. Bushkin, D. M. Davis, J. L. Strominger, J. W. Yewdell, and A. Porgador**. 2001. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409:1055-1060.
74. **Byrd, A., S. C. Hoffmann, M. Jarahian, F. Momburg, and C. Watzl**. 2007. Expression Analysis of the Ligands for the Natural Killer Cell Receptors NKp30 and NKp44. *PLoS ONE* 2:e1339.
75. **Hershkovitz, O., S. Jivov, N. Bloushtain, A. Zilka, G. Landau, A. Bar-Ilan, R. G. Lichtenstein, K. S. Campbell, T. H. van Kuppevelt, and A. Porgador**. 2007. Characterization of the recognition of tumor cells by the natural cytotoxicity receptor, NKp44. *Biochemistry* 46:7426-7436.
76. **Bloushtain, N., U. Qimron, A. Bar-Ilan, O. Hershkovitz, R. Gazit, E. Fima, M. Korc, I. Vlodavsky, N. V. Bovin, and A. Porgador**. 2004. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46. *J Immunol* 173:2392-2401.
77. **Bauer, S., V. Groh, J. Wu, A. Steinle, J. H. Phillips, L. L. Lanier, and T. Spies**. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727-729.
78. **Wu, J., Y. Song, A. B. Bakker, S. Bauer, T. Spies, L. L. Lanier, and J. H. Phillips**. 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285:730-732.
79. **Diefenbach, A., E. Tomasello, M. Lucas, A. M. Jamieson, J. K. Hsia, E. Vivier, and D. H. Raulet**. 2002. Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol* 3:1142-1149.
80. **Chang, C., J. Dietrich, A. G. Harpur, J. A. Lindquist, A. Haude, Y. W. Loke, A. King, M. Colonna, J. Trowsdale, and M. J. Wilson**. 1999. Cutting edge: KAP10, a

novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties. *J Immunol* 163:4651-4654.

81. **Roberts, A. I., L. Lee, E. Schwarz, V. Groh, T. Spies, E. C. Ebert, and B. Jabri**. 2001. NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J Immunol* 167:5527-5530.
82. **Ho, E. L., J. W. Heusel, M. G. Brown, K. Matsumoto, A. A. Scalzo, and W. M. Yokoyama**. 1998. Murine Nkg2d and Cd94 are clustered within the natural killer complex and are expressed independently in natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:6320-6325.
83. **Long, E. O.** 2002. Versatile signaling through NKG2D. *Nat Immunol* 3:1119-1120.
84. **Gilfillan, S., E. L. Ho, M. Cella, W. M. Yokoyama, and M. Colonna**. 2002. NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol* 3:1150-1155.
85. **Diefenbach, A., A. M. Jamieson, S. D. Liu, N. Shastri, and D. H. Raulet**. 2000. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 1:119-126.
86. **Carayannopoulos, L. N., O. V. Naidenko, D. H. Fremont, and W. M. Yokoyama**. 2002. Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol* 169:4079-4083.
87. **Cosman, D., J. Mullberg, C. L. Sutherland, W. Chin, R. Armitage, W. Fanslow, M. Kubin, and N. J. Chalupny**. 2001. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14:123-133.
88. **Sutherland, C. L., N. J. Chalupny, K. Schooley, T. VandenBos, M. Kubin, and D. Cosman**. 2002. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* 168:671-679.
89. **Eagle, R. A., and J. Trowsdale**. 2007. Promiscuity and the single receptor: NKG2D. *Nat Rev Immunol* 7:737-744.
90. **Bahram, S., M. Bresnahan, D. E. Geraghty, and T. Spies**. 1994. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:6259-6263.
91. 1999. Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium. *Nature* 401:921-923.
92. **Leelayuwat, C., D. C. Townend, M. A. Degli-Esposti, L. J. Abraham, and R. L. Dawkins**. 1994. A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. *Immunogenetics* 40:339-351.
93. **Steinle, A., V. Groh, and T. Spies**. 1998. Diversification, expression, and gamma delta T cell recognition of evolutionarily distant members of the MIC family of major histocompatibility complex class I-related molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12510-12515.
94. **Kasahara, M., Y. Watanabe, M. Sumasu, and T. Nagata**. 2002. A family of MHC class I-like genes located in the vicinity of the mouse leukocyte receptor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13687-13692.
95. **Bahram, S., N. Mizuki, H. Inoko, and T. Spies**. 1996. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 44:80-81.
96. **Bahram, S., T. Shiina, A. Oka, G. Tamiya, and H. Inoko**. 1996. Genomic structure of the human MHC class I MICB gene. *Immunogenetics* 45:161-162.
97. **Barclay, A. N.** 1999. Ig-like domains: evolution from simple interaction molecules to sophisticated antigen recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14672-14674.
98. **Molinero, L. L., M. B. Fuertes, M. V. Girart, L. Fainboim, G. A. Rabinovich, M. A. Costas, and N. W. Zwirner**. 2004. NF-kappa B regulates expression of the MHC class I-related chain A gene in activated T lymphocytes. *J Immunol* 173:5583-5590.
99. **Suemizu, H., M. Radosavljevic, M. Kimura, S. Sadahiro, S. Yoshimura, S. Bahram, and H. Inoko**. 2002. A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2971-2976.
100. **Groh, V., S. Bahram, S. Bauer, A. Herman, M. Beauchamp, and T. Spies**. 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12445-12450.
101. **Groh, V., A. Steinle, S. Bauer, and T. Spies**. 1998. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 279:1737-1740.

102. **Zwirner, N. W., M. A. Fernandez-Vina, and P. Stastny**. 1998. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes. *Immunogenetics* 47:139-148.
103. **Li, P., S. T. Willie, S. Bauer, D. L. Morris, T. Spies, and R. K. Strong**. 1999. Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand. *Immunity* 10:577-584.
104. **Molinero, L. L., C. Y. Marcos, F. Mirbaha, L. Fainboim, P. Stastny, and N. W. Zwirner**. 2002. Codominant expression of the polymorphic MICA alloantigens encoded by genes in the HLA region. *Eur J Immunogenet* 29:315-319.
105. **Fodil, N., L. Laloux, V. Wanner, P. Pellet, G. Hauptmann, N. Mizuki, H. Inoko, T. Spies, I. Theodorou, and S. Bahram**. 1996. Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 44:351-357.
106. **Katsuyama, Y., M. Ota, H. Ando, S. Saito, N. Mizuki, J. Kera, S. Bahram, Y. Nose, and H. Inoko**. 1999. Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons, 2, 3 and 4 of the MICA gene. *Tissue Antigens* 54:178-184.
107. **Visser, C. J., M. G. Tilanus, Z. Tatari, A. W. van der Zwan, R. Bakker, E. H. Rozemuller, V. Schaeffer, R. Tamouza, and D. Charron**. 1999. Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes. *Immunogenetics* 49:561-566.
108. **Quiroga, I., D. Sweeney, P. M. Sutton, T. Ahmad, R. Walton, M. C. Barnardo, and S. V. Fuggle**. 2006. The identification of three novel MICA alleles by sequence-based typing. *Tissue Antigens* 67:321-325.
109. **Ando, H., N. Mizuki, M. Ota, M. Yamazaki, S. Ohno, K. Goto, Y. Miyata, K. Wakisaka, S. Bahram, and H. Inoko**. 1997. Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB). *Immunogenetics* 46:499-508.
110. **Visser, C. J., M. G. Tilanus, V. Schaeffer, Z. Tatari, R. Tamouza, A. Janin, and D. Charron**. 1998. Sequencing-based typing reveals six novel MHC class I chain-related gene B (MICB) alleles. *Tissue Antigens* 51:649-652.
111. **Pellet, P., M. Renaud, N. Fodil, L. Laloux, H. Inoko, G. Hauptmann, P. Debre, S. Bahram, and I. Theodorou**. 1997. Allelic repertoire of the human MICB gene. *Immunogenetics* 46:434-436.
112. **Mizuki, N., M. Ota, M. Kimura, S. Ohno, H. Ando, Y. Katsuyama, M. Yamazaki, K. Watanabe, K. Goto, S. Nakamura, S. Bahram, and H. Inoko**. 1997. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1298-1303.
113. **Ota, M., Y. Katsuyama, N. Mizuki, H. Ando, K. Furihata, S. Ono, P. Pivetti-Pezzi, K. F. Tabbara, G. D. Palimeris, B. Nikbin, F. Davatchi, H. Chams, Z. Geng, S. Bahram, and H. Inoko**. 1997. Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. *Tissue Antigens* 49:448-454.
114. **Li, Z., V. Groh, R. K. Strong, and T. Spies**. 2000. A single amino acid substitution causes loss of expression of a MICA allele. *Immunogenetics* 51:246-248.
115. **Petersdorf, E. W., K. B. Shuler, G. M. Longton, T. Spies, and J. A. Hansen**. 1999. Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics* 49:605-612.
116. **Komatsu-Wakui, M., K. Tokunaga, Y. Ishikawa, K. Kashiwase, S. Moriyama, N. Tsuchiya, H. Ando, T. Shiina, D. E. Geraghty, H. Inoko, and T. Juji**. 1999. MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype. *Immunogenetics* 49:620-628.
117. **Zwirner, N. W., K. Dole, and P. Stastny**. 1999. Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes. *Hum Immunol* 60:323-330.
118. **Yamamoto, K., Y. Fujiyama, A. Andoh, T. Bamba, and H. Okabe**. 2001. Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim Biophys Acta* 1526:10-12.
119. **Groh, V., R. Rhinehart, J. Randolph-Habecker, M. S. Topp, S. R. Riddell, and T. Spies**. 2001. Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2:255-260.
120. **Yewdell, J. W., and A. B. Hill**. 2002. Viral interference with antigen presentation. *Nat Immunol* 3:1019-1025.

121. **Wu, J., N. J. Chalupny, T. J. Manley, S. R. Riddell, D. Cosman, and T. Spies**. 2003. Intracellular retention of the MHC class I-related chain B ligand of NKG2D by the human cytomegalovirus UL16 glycoprotein. *J Immunol* 170:4196-4200.
122. **Rolle, A., M. Mousavi-Jazi, M. Eriksson, J. Odeberg, C. Soderberg-Naucler, D. Cosman, K. Karre, and C. Cerboni**. 2003. Effects of human cytomegalovirus infection on ligands for the activating NKG2D receptor of NK cells: up-regulation of UL16-binding protein (ULBP)1 and ULBP2 is counteracted by the viral UL16 protein. *J Immunol* 171:902-908.
123. **Zou, Y., W. Bresnahan, R. T. Taylor, and P. Stastny**. 2005. Effect of human cytomegalovirus on expression of MHC class I-related chains A. *J Immunol* 174:3098-3104.
124. **Das, H., V. Groh, C. Kuijl, M. Sugita, C. T. Morita, T. Spies, and J. F. Bukowski**. 2001. MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* 15:83-93.
125. **Tieng, V., C. Le Bouguenec, L. du Merle, P. Bertheau, P. Desreumaux, A. Janin, D. Charron, and A. Toubert**. 2002. Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:2977-2982.
126. **Molinero, L. L., M. B. Fuertes, G. A. Rabinovich, L. Fainboim, and N. W. Zwirner**. 2002. Activation-induced expression of MICA on T lymphocytes involves engagement of CD3 and CD28. *J Leukoc Biol* 71:791-797.
127. **Molinero, L. L., M. B. Fuertes, L. Fainboim, G. A. Rabinovich, and N. W. Zwirner**. 2003. Up-regulated expression of MICA on activated T lymphocytes involves Lck and Fyn kinases and signaling through MEK1/ERK, p38 MAP kinase, and calcineurin. *J Leukoc Biol* 73:815-822.
128. **Molinero, L. L., C. I. Domaica, M. B. Fuertes, M. V. Girart, L. E. Rossi, and N. W. Zwirner**. 2006. Intracellular expression of MICA in activated CD4 T lymphocytes and protection from NK cell-mediated MICA-dependent cytotoxicity. *Hum Immunol* 67:170-182.
129. **Cerboni, C., A. Zingoni, M. Cippitelli, M. Piccoli, L. Frati, and A. Santoni**. 2007. Antigen-activated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK- cell lysis. *Blood* 110:606-615.
130. **Maasho, K., J. Opoku-Anane, A. I. Marusina, J. E. Coligan, and F. Borrego**. 2005. NKG2D is a costimulatory receptor for human naive CD8+ T cells. *J Immunol* 174:4480-4484.
131. **Pende, D., P. Rivera, S. Marcenaro, C. C. Chang, R. Biassoni, R. Conte, M. Kubin, D. Cosman, S. Ferrone, L. Moretta, and A. Moretta**. 2002. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* 62:6178-6186.
132. **Pende, D., C. Cantoni, P. Rivera, M. Vitale, R. Castriconi, S. Marcenaro, M. Nanni, R. Biassoni, C. Bottino, A. Moretta, and L. Moretta**. 2001. Role of NKG2D in tumor cell lysis mediated by human NK cells: cooperation with natural cytotoxicity receptors and capability of recognizing tumors of nonepithelial origin. *Eur J Immunol* 31:1076-1086.
133. **Groh, V., R. Rhinehart, H. Secrist, S. Bauer, K. H. Grabstein, and T. Spies**. 1999. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6879-6884.
134. **Vetter, C. S., V. Groh, P. thor Straten, T. Spies, E. B. Brocker, and J. C. Becker**. 2002. Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. *J Invest Dermatol* 118:600-605.
135. **Vousden, K. H., and X. Lu**. 2002. Live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev Cancer* 2:594-604.
136. **Gasser, S., S. Orsulic, E. J. Brown, and D. H. Raulet**. 2005. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436:1186-1190.
137. **Ward, S., D. Casey, M. C. Labarthe, M. Whelan, A. Dalgleish, H. Pandha, and S. Todryk**. 2002. Immunotherapeutic potential of whole tumour cells. *Cancer Immunol Immunother* 51:351-357.
138. **Foss, F. M.** 2002. Immunologic mechanisms of antitumor activity. *Semin Oncol* 29:5-11.

139. **Busche, A., T. Goldmann, U. Naumann, A. Steinle, and S. Brandau**. 2006. Natural killer cell-mediated rejection of experimental human lung cancer by genetic overexpression of major histocompatibility complex class I chain-related gene A. *Hum Gene Ther* 17:135-146.
140. **Swann, J. B., and M. J. Smyth**. 2007. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest* 117:1137-1146.
141. **Perez-Diez, A., and F. M. Marincola**. 2002. Immunotherapy against antigenic tumors: a game with a lot of players. *Cell Mol Life Sci* 59:230-240.
142. **Dudley, M. E., J. R. Wunderlich, P. F. Robbins, J. C. Yang, P. Hwu, D. J. Schwartzentruber, S. L. Topalian, R. Sherry, N. P. Restifo, A. M. Hubicki, M. R. Robinson, M. Raffeld, P. Duray, C. A. Seipp, L. Rogers-Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, D. E. White, and S. A. Rosenberg**. 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298:850-854.
143. **Diefenbach, A., E. R. Jensen, A. M. Jamieson, and D. H. Raulet**. 2001. Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 413:165-171.
144. **Cerwenka, A., J. L. Baron, and L. L. Lanier**. 2001. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11521-11526.
145. **Friese, M. A., M. Platten, S. Z. Lutz, U. Naumann, S. Aulwurm, F. Bischof, H. J. Buhring, J. Dichgans, H. G. Rammensee, A. Steinle, and M. Weller**. 2003. MICA/NKG2D-mediated immunogene therapy of experimental gliomas. *Cancer Res* 63:8996-9006.
146. **Smyth, M. J., J. Swann, E. Cretney, N. Zerafa, W. M. Yokoyama, and Y. Hayakawa**. 2005. NKG2D function protects the host from tumor initiation. *J Exp Med* 202:583-588.
147. **Wiemann, K., H. W. Mittrucker, U. Feger, S. A. Welte, W. M. Yokoyama, T. Spies, H. G. Rammensee, and A. Steinle**. 2005. Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo. *J Immunol* 175:720-729.
148. **Maccalli, C., D. Nonaka, A. Piris, D. Pende, L. Rivoltini, C. Castelli, and G. Parmiani**. 2007. NKG2D-Mediated Antitumor Activity by Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Antigen-Specific T-Cell Clones Isolated from Melanoma Patients. *Clin Cancer Res* 13:7459-7468.
149. **Glick, A. B.** 2004. TGFbeta1, back to the future: revisiting its role as a transforming growth factor. *Cancer Biol Ther* 3:276-283.
150. **Rouas-Freiss, N., S. Bruel, C. Menier, C. Marcou, P. Moreau, and E. D. Carosella**. 2005. Switch of HLA-G alternative splicing in a melanoma cell line causes loss of HLA-G1 expression and sensitivity to NK lysis. *Int J Cancer* 117:114-122.
151. **Ghiringhelli, F., C. Menard, M. Terme, C. Flament, J. Taieb, N. Chaput, P. E. Puig, S. Novault, B. Escudier, E. Vivier, A. Lecesne, C. Robert, J. Y. Blay, J. Bernard, S. Caillat-Zucman, A. Freitas, T. Tursz, O. Wagner-Ballon, C. Capron, W. Vainchencker, F. Martin, and L. Zitvogel**. 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 202:1075-1085.
152. **Groh, V., J. Wu, C. Yee, and T. Spies**. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419:734-738.
153. **Salih, H. R., H. G. Rammensee, and A. Steinle**. 2002. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 169:4098-4102.
154. **Kaiser, B. K., D. Yim, I. T. Chow, S. Gonzalez, Z. Dai, H. H. Mann, R. K. Strong, V. Groh, and T. Spies**. 2007. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* 447:482-486.
155. **Wahl, S. M., J. Wen, and N. Moutsopoulos**. 2006. TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege. *Immunol Rev* 213:213-227.
156. **Friese, M. A., J. Wischhusen, W. Wick, M. Weiler, G. Eisele, A. Steinle, and M. Weller**. 2004. RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res* 64:7596-7603.
157. **Castriconi, R., C. Cantoni, M. Della Chiesa, M. Vitale, E. Marcenaro, R. Conte, R. Biassoni, C. Bottino, L. Moretta, and A. Moretta**. 2003. Transforming growth

factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4120-4125.

158. **Smyth, M. J., M. W. Teng, J. Swann, K. Kyparissoudis, D. I. Godfrey, and Y. Hayakawa**. 2006. CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer. *J Immunol* 176:1582-1587.
159. **Lee, J. C., K. M. Lee, D. W. Kim, and D. S. Heo**. 2004. Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J Immunol* 172:7335-7340.
160. **Groh, V., K. Smythe, Z. Dai, and T. Spies**. 2006. Fas-ligand-mediated paracrine T cell regulation by the receptor NKG2D in tumor immunity. *Nat Immunol* 7:755-762.
161. **Paul, P., N. Rouas-Freiss, I. Khalil-Daher, P. Moreau, B. Riteau, F. A. Le Gal, M. F. Avril, J. Dausset, J. G. Guillet, and E. D. Carosella**. 1998. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4510-4515.
162. **Reed, J. A., E. Bales, W. Xu, N. A. Okan, D. Bandyopadhyay, and E. E. Medrano**. 2001. Cytoplasmic localization of the oncogenic protein Ski in human cutaneous melanomas in vivo: functional implications for transforming growth factor beta signaling. *Cancer Res* 61:8074-8078.
163. **Kairiyama, C., I. Slavutsky, I. Larripa, V. Morvillo, A. I. Bravo, L. Bover, O. L. Podhajcer, and J. Mordoh**. 1995. Biologic, immunocytochemical, and cytogenetic characterization of two new human melanoma cell lines: IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN. *Pigment Cell Res* 8:121-131.
164. **Guerra, L., J. Mordoh, I. Slavutsky, I. Larripa, and E. E. Medrano**. 1989. Characterization of IIB-MEL-J: a new and highly heterogenous human melanoma cell line. *Pigment Cell Res* 2:504-509.
165. **Hames, B.** 1981. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*:1-86.
166. **Zwirner, N. W. a. S. P.** 1997. Production of polyclonal antibodies against MICB, a novel polymorphic HLA-related antigen, and preliminary characterization of its pattern of expression. *Hum. Immunol* 55:Poster.
167. **Ogino, T., X. Wang, S. Kato, N. Miyokawa, Y. Harabuchi, and S. Ferrone**. 2003. Endoplasmic reticulum chaperone-specific monoclonal antibodies for flow cytometry and immunohistochemical staining. *Tissue Antigens* 62:385-393.
168. **Stam, N. J., H. Spits, and H. L. Ploegh**. 1986. Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus heavy chains permit biochemical characterization of certain HLA-C locus products. *J Immunol* 137:2299-2306.
169. Fuertes, M. B. 2003. Anticuerpos monoclonales aplicados al estudio de MICA y su contribución a la citotoxicidad de melanomas mediada por células NK. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
170. **Goldbaum, F. A., J. Leoni, J. C. Wallach, and C. A. Fossati**. 1993. Characterization of an 18-kilodalton Brucella cytoplasmic protein which appears to be a serological marker of active infection of both human and bovine brucellosis. *J Clin Microbiol* 31:2141-2145.
171. **Zwirner, N. W., C. Y. Marcos, F. Mirbaha, Y. Zou, and P. Stastny**. 2000. Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients. *Hum Immunol* 61:917-924.
172. **Ackerman, A. L., A. Giodini, and P. Cresswell**. 2006. A role for the endoplasmic reticulum protein retrotranslocation machinery during crosspresentation by dendritic cells. *Immunity* 25:607-617.
173. **Lewis, M. J., and H. R. Pelham**. 1992. Ligand-induced redistribution of a human KDEL receptor from the Golgi complex to the endoplasmic reticulum. *Cell* 68:353-364.
174. **Netherton, C., I. Rouiller, and T. Wileman**. 2004. The subcellular distribution of multigene family 110 proteins of African swine fever virus is determined by differences in C-terminal KDEL endoplasmic reticulum retention motifs. *J Virol* 78:3710-3721.
175. **Andres, D. A., J. D. Rhodes, R. L. Meisel, and J. E. Dixon**. 1991. Characterization of the carboxyl-terminal sequences responsible for protein retention in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 266:14277-14282.
176. **Ellgaard, L., and A. Helenius**. 2001. ER quality control: towards an understanding at the molecular level. *Curr Opin Cell Biol* 13:431-437.

177. **Dissemond, J., M. Busch, T. Kothen, J. Mors, T. K. Weimann, A. Lindeke, M. Goos, and S. N. Wagner**. 2004. Differential downregulation of endoplasmic reticulum-residing chaperones calnexin and calreticulin in human metastatic melanoma. *Cancer Lett* 203:225-231.
178. **Ye, Y., Y. Shibata, C. Yun, D. Ron, and T. A. Rapoport**. 2004. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429:841-847.
179. **Ye, Y., H. H. Meyer, and T. A. Rapoport**. 2001. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414:652-656.
180. **Ruddock, L. W., and M. Molinari**. 2006. N-glycan processing in ER quality control. *J Cell Sci* 119:4373-4380.
181. **Zhang, K., and R. J. Kaufman**. 2006. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology* 66:S102-109.
182. **Miller, G., S. Lahrs, V. G. Pillarisetty, A. B. Shah, and R. P. DeMatteo**. 2002. Adenovirus infection enhances dendritic cell immunostimulatory properties and induces natural killer and T-cell-mediated tumor protection. *Cancer Res* 62:5260-5266.
183. **Wargo, J. A., L. Y. Schumacher, B. Comin-Anduix, V. B. Dissette, J. A. Glaspy, W. H. McBride, L. H. Butterfield, J. S. Economou, and A. Ribas**. 2005. Natural killer cells play a critical role in the immune response following immunization with melanoma-antigen-engineered dendritic cells. *Cancer Gene Ther* 12:516-527.
184. **Zambetti, G. P.** 2007. The p53 mutation "gradient effect" and its clinical implications. *J Cell Physiol* 213:370-373.
185. **Seliger, B., M. J. Maeurer, and S. Ferrone**. 1997. TAP off--tumors on. *Immunol Today* 18:292-299.
186. **Hicklin, D. J., D. V. Dellaratta, R. Kishore, B. Liang, T. Kageshita, and S. Ferrone**. 1997. Beta2-microglobulin gene mutations in human melanoma cells: molecular characterization and implications for immune surveillance. *Melanoma Res* 7 Suppl 2:S67-74.
187. **Croce, C. M.** 2008. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 358:502-511.
188. **Marsh, S. G., J. G. Bodmer, E. D. Albert, W. F. Bodmer, R. E. Bontrop, B. Dupont, H. A. Erlich, J. A. Hansen, B. Mach, W. R. Mayr, P. Parham, E. W. Petersdorf, T. Sasazuki, G. M. Schreuder, J. L. Strominger, A. Svejgaard, and P. I. Terasaki**. 2001. Nomenclature for factors of the HLA system, 2000. *Hum Immunol* 62:419-468.
189. **Llewellyn, D. H., H. L. Roderick, and S. Rose**. 1997. KDEL receptor expression is not coordinatedly up-regulated with ER stress-induced reticuloplasmin expression in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 240:36-40.
190. **Kopito, R. R.** 1999. Biosynthesis and degradation of CFTR. *Physiol Rev* 79:S167-173.
191. **Pilon, M., R. Schekman, and K. Romisch**. 1997. Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *EMBO J* 16:4540-4548.
192. **Travers, K. J., C. K. Patil, L. Wodicka, D. J. Lockhart, J. S. Weissman, and P. Walter**. 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101:249-258.
193. **Young, J., L. P. Kane, M. Exley, and T. Wileman**. 1993. Regulation of selective protein degradation in the endoplasmic reticulum by redox potential. *J Biol Chem* 268:19810-19818.
194. **Trombetta, E. S.** 2003. The contribution of N-glycans and their processing in the endoplasmic reticulum to glycoprotein biosynthesis. *Glycobiology* 13:77R-91R.