

## Tesis Doctoral

# Eventos tempranos en la interfase tumor linfocito T y consecuencias sobre la actividad de las células NK

Domaica, Carolina Inés

2009

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](http://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](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Domaica, Carolina Inés. (2009). Eventos tempranos en la interfase tumor linfocito T y consecuencias sobre la actividad de las células NK. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Domaica, Carolina Inés. "Eventos tempranos en la interfase tumor linfocito T y consecuencias sobre la actividad de las células NK". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**EVENTOS TEMPRANOS EN LA INTERFASE TUMOR LINFOCITO T Y  
CONSECUENCIAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS NK**

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

**Lic. Carolina Inés Domaica**

Director de tesis: Dr Norberto Walter Zwirner

Consejero de Estudios: Dr Omar Adrián Coso

Lugar de trabajo: Laboratorio de Inmunogenética - Hospital de Clínicas "José de San Martín"

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

Buenos Aires, 2009

---

**RESUMEN****EVENTOS TEMPRANOS EN LA INTERFASE TUMOR LINFOCITO T Y  
CONSECUENCIAS SOBRE LA ACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS NK**

Las células NK secretan IFN- $\gamma$  y ejercen citotoxicidad contra tumores que expresan ligandos del receptor NKG2D (NKG2DLs, tales como MICA, MICB y las moléculas ancladas a residuos GPI ULBP-1 a -3) y de los receptores de citotoxicidad natural tales como NKp46 (NKp46Ls, de identidad desconocida). No obstante, desconocemos si las células T son capaces de regular la respuesta anti-tumoral mediada por células NK. En este trabajo, investigamos los eventos tempranos que ocurren la interfase tumor-linfocito T, y su impacto sobre la funcionalidad de células NK. En esta Tesis demostramos que luego del co-cultivo con una línea de melanoma que expresa MICA en superficie, linfocitos T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> activados o en reposo capturaron este NKG2DL de las células tumorales mediante un fenómeno que se denomina trogocitosis. Esta transferencia de membrana entre células fue confirmada mediante la utilización de células marcadas con los fluorocromos CFSE, DiOC<sub>18</sub> y PKH26 y fue dependiente del contacto celular. Sin embargo, no fuimos capaces de detectar la transferencia de proteínas ancladas a residuos GPI. Los linfocitos T que estuvieron en contacto con las células tumorales fueron resistentes a la lisis mediada por células NK, pero fueron capaces de promover su degranulación y la secreción de IFN- $\gamma$  en forma dependiente de NKG2D y NKp46, lo que sugiere que además de MICA, otros NKG2DLs y NKp46Ls son capturados por los linfocitos T activados desde la superficie de las células tumorales. Por lo tanto, células de la inmunidad adaptativa (linfocitos T) son capaces de estimular funciones efectoras en células de la inmunidad innata (células NK) a través de la captura de ligandos específicos y en forma independiente del TCR.

**Palabras clave:** células NK - linfocitos T - tumores - trogocitosis - MICA - NKG2D - NKp46

**ABSTRACT****EARLY EVENTS IN THE TUMOR-T CELL INTERFACE AND IMPACT ON THE NK CELL ACTIVITY**

NK cells trigger IFN- $\gamma$  secretion and cytotoxicity upon engagement of NKG2D or members of the NCR family such as NKp46 by ligands expressed on tumor cells (such as MICA, MICB, and the GPI-anchored molecules ULBP-1 to -3 for NKG2D, or ligands of unknown identity for NKp46). However, it remains uncertain whether T cells can regulate NK cell-mediated anti-tumor responses. Here, we investigated early events occurring during T lymphocyte-tumor cell interactions, and the impact on NK cell functions. Upon co-culture with MICA<sup>+</sup> melanomas, activated CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, or resting T cells displayed substantial amounts of cell surface MICA due to direct capture (trogocytosis) from the tumor cells. Such transfer was confirmed using CFSE-, PKH26- or DiOC<sub>18</sub>-labeled cells and required cell-to-cell contact. However, GPI-anchored NKG2DLs were not transferred. Tumor-experienced T lymphocytes remained resistant to NK cell-mediated cytotoxicity, but promoted degranulation and IFN- $\gamma$  secretion by NK cells in a NKG2D- and NKp46-dependent manner, suggesting that additional NKG2DLs and NKp46 ligands were captured by activated T lymphocytes from tumor cells. We conclude that cells from the adaptive immune response (T lymphocytes) support effector functions of innate immune cells (NK cells) through capture of specific ligands in a TCR-independent manner.

**Key words:** NK cells - T cells – tumor – trogocytosis – MICA – NKG2D – NKp46

## Agradecimientos

A todos ustedes que de una u otra manera me ayudaran a transitar este camino:

A Gaby, por su generosidad, por sus consejos, por sus palabras. Gracias por invitarnos a formar parte de Inmunopatología. Por transmitir tu pasión por la ciencia. Por hacerme saber que es alguien con quien puedo contar. Gracias por todo lo que hiciste y haces por nosotros.

A Norber, por formarme como científica, por ayudarme, aconsejarme, aguantarme y estar siempre que lo necesite. Por ser un excelente director y sin duda un gran tipo.

Al CONICET, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, la UBA, el Ministerio de Salud de la Nación y la fundación SALES por el apoyo económico.

Al director del Laboratorio de Inmunogenética Leonardo Fainboim y al director del IBYME Eduardo Charreau por brindar el espacio y la infraestructura necesaria para el desarrollo de mi trabajo de Tesis.

A mi papá y a mi mamá, que me enseñaron a luchar por lo que quiero, a no darme por vencida, porque siempre confiaron en mí, y por que los amo tal cual son.

A mi hermana María, mí cuñado Javier y mi sobrina Camilita, porque son como mis segundos papás, porque gracias a ellos hoy puedo estar defendiendo esta Tesis, porque siempre puedo contar con ellos, porque me dieron una sobrinita hermosa que amo a pesar de no poder estar con ella todo lo que me gustaría. Los quiero muchísimo a los tres.

A mis hermanos Mauri, Andre y Migue y mis cuñadas Flor y Laura, que de una u otra manera están al lado mío, y me dieron a Jula, Tomi, Joaco, Juani y Franchu. Los quiero muchísimo a todos, y me encanta tener una familia así de grande y tan linda como es.

A la familia Zdrojewski-Dabas-Perelman y mi cuñada Nati porque hace muchos años que me aguantan con mis cosas buenas y mis cosas malas, porque me hacen sentir una hija, una hermana, una sobrina más. Porque me dieron un lugar en su familia y yo lo tome sin dudarlo.

A mis abuelos, porque siempre me cuidaron. Sobre todo a mi abuelita Tita, que hace unos años que no la tengo conmigo, la extraño y la quiero mucho y se que estaría muy feliz por mi.

A los chicos de la facu (Florcita, Ari, Naty, Nouky, Mati, Ale, Marian, Dany, Luli, Ceci, Diego, Pafu, Nacho, Cata, May) porque me acompañaron en los años de estudio y encontré a muchos amigos.

A Tamarin que sin duda es mi amiga y fue mi compañera de estudios, que manera de tomar mate, comer tortas y sándwichitos. Porque me prestó a mamá Marta para que me cuidara un poquito a mi también.

A Paulita, porque me eligió como madrina de Luquis, porque es mi amiga y porque me entiende aunque mas no sea un poco mis locuras.

A Juancito, porque me escuchaste mil veces, porque me das concejos, porque me encanta que seas mi amigo y saber que puedo contar con vos.

A la gente que pasó o que está en el labo (Mer, Vicky, Lucas, Damián, Pancita, Marian, Yoni, Marta, JuanK, Sebas, Ger Spa, Tucu, Viqui, Tomas, Ger), gracias por hacerme divertir tanto mientras trabajo y que así sea tan lindo trabajar. Pancita, para vos tengo un agradecimiento especial porque me ayudaste un montón con los dibus y porque sos lo más. Luquis, no te me pongas celoso, a vos también te quiero y me encanta pelearme con vos. Y no puedo olvidarme de Lara por hacerlo muy feliz a mi amigo Lucas y por los momentos compartidos.

A la gente de Inmunogénética con los que compartí mis primeros años de trabajo y con los que también la pase espectacular, por los *afters*, por la hora municipal, porque fue lindo conocerlos.

A mis amigos de Neco, que hace mil que no veo, pero que los tengo en un cachito de mi corazón siempre.

A Chechu, a Naty y a Ile las quiero mucho y gracias por ser mis amigas. Ya hace tantos años que las conozco, que mejor no decirlos.

A los amigos de Nico que ahora son mis amigos (Mágico, Gaby, Andy, Benza y Sabri, Meji, Mati y Faby)

A Covacha por aguantarme con todos mis rayes, porque me cuida como ningún otro hombre lo hizo, porque me da mucho amor y porque aunque me haga renegar lo amo.

Parte o la totalidad de las siguientes publicaciones forman parte de la presente Tesis Doctoral.

**Intracellular Expression of MICA in Activated CD4 T Lymphocytes and Protection from NK Cell-Mediated MICA-Dependent Cytotoxicity.** Molinero, L.L.\*, C.I. Domaica\*, M.B. Fuertes, M.V. Girart, L.E. Rossi, and N.W. Zwirner. *Human Immunology*, Vol 67: 170-182 (2006). \*Ambos autores contribuyeron por igual a este trabajo.

**Tumour-experienced T cells promote NK cell activity through trogocytosis of NKG2D and NKp46 ligands.** Domaica C.I., M.B. Fuertes, L.E. Rossi, M.V. Girart, D.E. Avila, G.A. Rabinovich, N.W. Zwirner. *EMBO Reports*, Vol 10 (8): 908-915 (2009).

## INDICE

<b>ABREVIATURAS</b>	5
<b>INTRODUCCION</b>	6
1. Activación linfocitaria	6
2. Programas de activación y diferenciación celular	7
3. Señalización a través del receptor de IL-2	9
4. Familia de genes MIC	10
5. Genética y genómica de MICA	10
6. Transcripto y proteína de MICA	10
7. Polimorfismo	12
8. Patrón de expresión y modulación de MICA	13
9. MICA en tumores	14
10. Tumores	15
11. Células NK	21
12. Receptores de células NK	25
12.1. Receptores específicos de moléculas clase I del HLA:	26
12.1.1. Complejo de receptores leucocitarios (LRC)	26
12.1.1.a . Receptores KIR	26
12.1.1.b. Receptores ILT (o LIR)	27
12.1.2. Complejo de receptores de citotoxicidad natural (NKC): CD94/NKG2	27
12.2. Receptores no específicos de moléculas de clase I del HLA	28
12.2.1. Receptores asociados a ITAM	28
12.2.1.a. CD16 (Fc $\gamma$ RIII)	28
12.2.1.b. NCR	29
12.2.2. Receptores no asociados a ITAM	30
12.2.1.a. NKp80	30
12.2.1.b. NKG2D	30



---

13. Ligandos NKG2D	31
14. Fenómenos de transferencia de membrana	31
<b>OBJETIVOS</b>	35
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	36
1. Líneas celulares utilizadas	36
2. Reactivos, drogas y proteínas recombinantes	36
3. Aislamiento de distintas poblaciones celulares	37
3.1 Aislamiento de Células Mononucleares de Sangre Periférica	37
3.2 Aislamiento de linfocitos T CD4 <sup>+</sup>	37
3.3 Aislamiento de células NK, linfocitos T CD4 <sup>+</sup> y CD8 <sup>+</sup>	37
4. Activación de linfocitos	38
4.1 Fitohemaglutinina y citoquinas mitogénicas (IL-2, IL-4, e IL-15)	38
4.2 Estimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 e IL-4	38
4.3 PMA e Ionomicina	38
4.4 Polarización de células T CD4 <sup>+</sup> a perfiles Th1 o Th2	39
5. Ensayos de linfoproliferación	39
6. Extracción de proteínas	39
6.1. Lisados celulares	39
6.2. Cuantificación de proteínas	40
7. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y ensayos de <i>Western blot</i>	40
8. Marcación celular con fluorocromos (DiOC <sub>18</sub> , CFSE y PKH26)	41
9. Citometría de Flujo	41
9.1. Anticuerpos para inmunomarcación	41
9.2. Inmunomarcación de superficie	42
9.3. Inmunomarcación intracitoplasmática de IFN- $\gamma$	43
10. Ensayos de citotoxicidad y degranulación	43

10.1. Ensayo de citotoxicidad	43
10.2. Ensayo de degranulación de células NK	44
11. ELISA para detección de IFN- $\gamma$	44
12. Ensayos de trogocitosis o transferencia de moléculas de membrana	45
13. Estudios de las consecuencias funcionales de la transferencia de moléculas de membrana	46
13.1 Citotoxicidad	46
13.2 Degranulación de células NK	46
13.3 Producción de IFN- $\gamma$ por células NK y ensayos de bloqueo	46
14. Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal	47
15. Análisis estadístico de los datos	48
<b>RESULTADOS</b>	49
1. Rol de las citoquinas IL-4 e IL-15 sobre la expresión de MICA en linfocitos T.	49
2. Expresión de MICA en superficie de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados con PMA e Ionomicina.	51
3. Consecuencias funcionales de la expresión de MICA en superficie de linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados.	52
a. Citotoxicidad mediada por células NK.	52
b. Producción de IFN- $\gamma$ por células NK luego del co-cultivo con linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados.	53
4. Localización celular de MICA en linfocitos T CD4 <sup>+</sup> activados con PMA e Ionomicina.	54
5. MICA en linfocitos T luego del contacto con líneas de melanomas humanos.	55
6. Caracterización del fenómeno de transferencia de membrana en linfocitos T luego del contacto con melanomas humanos.	58
a. Requerimientos celulares.	58
b. Confirmación de la transferencia de MICA por microscopia confocal.	59
c. Cinética de la transferencia de MICA.	61
d. Dependencia del tipo celular.	62
e. Transferencia de otros NKG2DLs.	64
f. Intercambio de porciones de membrana entre células tumorales y linfocitos T.	66
g. Co-transferencia de porciones de membrana y MICA.	68
7. Consecuencias funcionales de la captura de moléculas de la superficie tumoral por linfocitos T.	71

a. Degranulación y citotoxicidad de células NK.	71
b. Producción de IFN- $\gamma$ por células NK y receptores involucrados.	75
<b>DISCUSION</b>	80
<b>CONCLUSIONES</b>	92
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	95

**ABREVIATURAS**

Ac: Anticuerpo

AcMo: Anticuerpo monoclonal

CCDA: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

CDs: Células dendríticas

CF: Citometría de flujo

CI: Control de isotipo

CMH: Complejo mayor de histocompatibilidad

CMSPs: Células mononucleares de sangre periférica

CTLs: Linfocitos T citotóxicos (*cytotoxic T lymphocytes*)

GPI: Glucofosfatidilinositol

HLA: Antígeno leucocitario humano

IFN: Interferón

Ig: Inmunoglobulina

IL: Interleuquina

ITAM: Motivo de activación basado en tirosina

ITIM: Motivo de inhibición basado en tirosina

LTCD4<sup>+</sup>: Linfocitos T CD4<sup>+</sup>

MICA/B: *MHC class I chain-related genes A and B*

NK: Asesina natural (*Natural killer*)

NKG2DL: Ligando de NKG2D

PHA: Fitohemaglutinina

PMA: Forbol-12-miristato-13 acetato

SMAC: Complejo supramolecular de activación (*Supra Molecular Activation Cluster*)

SI: Sinapsis inmunológica

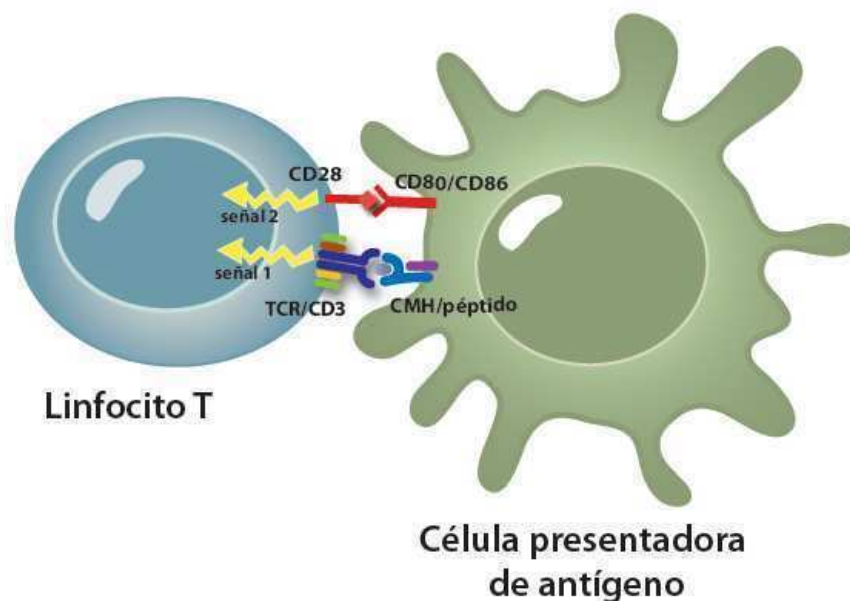
sMICA: MICA soluble

ULPBs: *UL16 binding proteins*

## INTRODUCCION

### 1. Activación linfocitaria

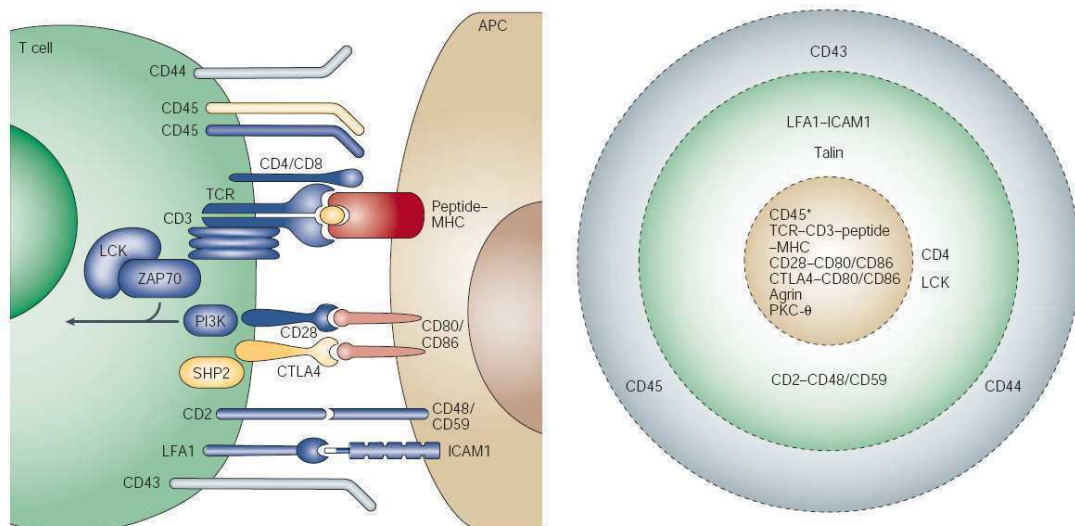
El desencadenamiento de la respuesta inmune depende de la cuidadosa regulación de la activación linfocitaria. Para este fin, los linfocitos T requieren de dos señales para activarse. La primera señal deriva de la interacción entre el receptor de las células T (TCR) y una molécula del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), que presenta a un péptido unido [1]. El TCR es un receptor clonotípico conformado por un heterodímero  $\alpha/\beta$  asociado a otras tres unidades invariantes diméricas:  $CD3\gamma\epsilon$ ,  $CD3\delta\epsilon$  y un homodímero  $CD3\xi$  [2, 3]. Este complejo CD3 es el encargado de transducir señales al interior de la célula luego de que el dímero  $\alpha/\beta$  interaccionó con el antígeno en el contexto de una molécula del CMH. Este efecto puede ser mimetizado por anticuerpos anti-receptor [3, 4]. La segunda señal denominada co-estimuladora, generalmente es provista por moléculas expresadas en la superficie de las células presentadoras de antígenos (CPA) tales como  $CD80/CD86$  que van a interaccionar con el receptor  $CD28$  presente en linfocitos T vírgenes (**Fig. 1**). La co-estimulación es crítica para la activación de los linfocitos T vírgenes, la inducción de la proliferación celular, la prevención de la anergia y/o apoptosis, la diferenciación a células efectoras y de memoria, y la cooperación célula-célula [5-7].



**Figura 1.** La activación del linfocito T requiere de la señal 1, derivada de la interacción del TCR con el complejo CMH-péptido, y de la señal 2 o co-estimuladora, proveniente de la interacción entre las moléculas  $CD28$  con  $CD80/CD86$ .

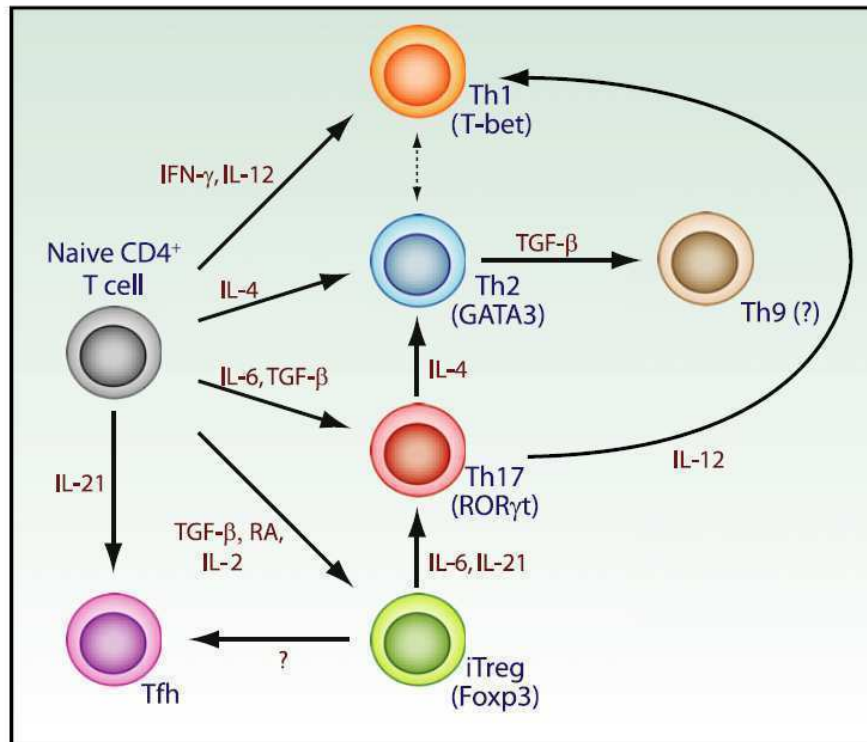
## 2. Programas de activación y diferenciación celular

El reconocimiento de complejos CMH-péptido específicos en la superficie de la CPA por el TCR del linfocito T conduce a la formación de una estructura especializada de señalización caracterizada por un reordenamiento molecular que involucra la segregación de moléculas de superficie y componentes de señalización, dicha estructura recibe el nombre de complejo supramolecular de activación (SMAC, *Supra Molecular Activation Cluster*). La zona de contacto entre las dos células se denomina sinapsis inmunológica (SI) [8-11]. El primer contacto entre el TCR y el complejo CMH-péptido específico se produce en la zona más periférica de la SI, a medida que la SI va madurando dichas moléculas se van trasladando hacia el centro. Luego de transcurridos 30 a 45 minutos la SI se encuentra madura pudiéndose diferenciar dos zonas: una zona central o cSMAC, enriquecida en el complejo CD3/TCR y otras moléculas señalizadoras, como CD28 y Lck, y una zona periférica o pSMAC, que contiene moléculas más implicadas en la adhesión como LFA-1 y talín (**Fig.2**) [12].



**Figura 2. Esquema de una SI madura.** a) Imagen esquemática mostrando una selección de las parejas receptor/ligando implicadas en el reconocimiento de las células T. El complejo CMH-péptido específico se muestra en rojo, las moléculas activadoras y co-estimuladoras se muestran en azul, las moléculas inhibitoras en amarillo, y las moléculas que no contribuyen a la señalización en gris. La flecha indica las señales que llevarán a la activación de la célula. b) Imagen que muestra la característica morfología en "ojo de buey" de la organización molecular del SMAC, el cSMAC en marrón, el anillo del pSMAC en verde y la región distal (dSMAC) en gris. También se muestran las parejas moleculares que están enriquecidas en cada región: CTLA4 (cytotoxic T lymphocyte antigen 4), ICAM1, LFA1, PI3K, SHP2 (*SRC homology 2-domain-containing protein tyrosine phosphatase 2*), TCR, ZAP70. \* CD45 entra en el cSMAC en fases tempranas. Tomado de [13]

La señalización en linfocitos T depende del tiempo que dure la interacción entre el linfocito T y la CPA [14, 15]. La duración de la estimulación a través del TCR representa el punto clave para la activación, la diferenciación y en última instancia la muerte del linfocito T [16]. Los linfocitos T vírgenes requieren un estímulo de unas 20 horas para establecer un fuerte compromiso proliferativo [17]. La formación de SMACs contribuye en la amplificación de los procesos de transducción de señales desencadenados por el TCR [18], lo que permite que el umbral de activación sea alcanzado más rápidamente y a menores dosis de antígeno que en ausencia de co-estimulación [16, 17]. A diferencia de los linfocitos T vírgenes, las células T de memoria tienen un bajo umbral de activación porque su maquinaria de transducción de señales está perfectamente acoplada [19, 20]. Por otro lado, una estimulación excesiva de linfocitos T conduce a una muerte celular inducida por activación, un estadio final que puede ser evitado por la microagregación de CD28, que aumenta los niveles de la molécula antiapoptótica Bcl-X<sub>L</sub> [21]. Después de completar el primer ciclo de mitosis, las células T activadas se dividen aproximadamente cada 10 horas, dando origen a un gran número de células. Mientras los linfocitos T se dividen en condiciones de continua estimulación a través del TCR y por citoquinas, las células se diferencian progresivamente y adquieren la capacidad de producir citoquinas efectoras [22, 23]. Esto lleva paulatinamente a la polarización de la respuesta hacia un perfil Th1 o Th2, la que es promovida por IFN- $\gamma$  e IL-12, e IL-4 respectivamente [24-28]. Durante la polarización del linfocito T se expresan factores de transcripción característicos de linaje, tales como T-bet para células Th1 o GATA3 y c-Maf para células Th2 [29-32]. Recientemente se caracterizó un nuevo perfil de diferenciación de células T efectoras que recibió el nombre de células Th17 debido a la capacidad que poseen estas células de producir IL-17, entre otras citoquinas [25]. Entre los factores claves involucrados en la generación de dichas células se encuentran los factores de diferenciación TGF- $\beta$  e IL-6 o IL-21, la IL-23 (que actúa como factor de crecimiento y estabilización) y los factores de transcripción STAT3, ROR $\gamma$ t y ROR $\alpha$  [25]. La participación de TGF- $\beta$  como factor clave en la diferenciación de células Th17 sitúa a dicho linaje celular en estrecha relación con células T regulatorias con fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (Tregs), dado que dentro de los órganos periféricos del sistema inmune TGF- $\beta$  induce la diferenciación de células T vírgenes en células Treg Foxp3<sup>+</sup> [33, 34]. En la **Figura 3** podemos observar los diferentes linajes de células T y los factores involucrados en la diferenciación de cada tipo celular.



**Figura 3: Linajes de células T.** Durante el reconocimiento de complejos CMH-péptido específico en la superficie de la CPA por el TCR del linfocito T  $CD4^+$  ( $LTCD4^+$ ), el perfil de citoquinas generado va a determinar la diferenciación y conversión de los  $LTCD4^+$  vírgenes en células Th1, Th2, Th17, Treg inducibles (iTreg) y Tfh (*follicular helper T cells*). Este programa de diferenciación está controlado por citoquinas producidas por células de la inmunidad innata, tales como IL-12 e IFN- $\gamma$  (para la diferenciación hacia un perfil Th1) o IL-4 (para la diferenciación hacia un perfil Th2). El TGF- $\beta$  junto con la IL-6 inducen la diferenciación hacia un perfil TH17, mientras que la diferenciación a células iTreg es inducida por TGF- $\beta$ , ácido retinoico (AR) e IL-2. Por otro lado, la IL-21 es necesaria para la diferenciación de células Tfh. También se han identificado los factores de transcripción específicos que instrumentan el programa de diferenciación hacia cada subtipo de células T colaboradoras: T-bet para células Th1, GATA3 para células Th2, ROR $\gamma$ t para células Th17 y Foxp3 para células iTreg. Hasta hace poco tiempo, se pensaba que las células T efectoras eran los linajes de diferenciación terminal, pero actualmente parece que existe una considerable plasticidad que permitiría la inter-conversión a otro fenotipo. Si bien las células Th1 y Th2 poseen un fenotipo más estable, bajo ciertas condiciones de citoquinas las células iTreg y Th17 pueden cambiar fácilmente a otro fenotipo de células T colaboradoras. Por ejemplo, bajo la estimulación con IL-6 e IL-21 las células iTreg pueden convertirse en células productoras de IL-17. Las células Treg también pueden transformarse en células Tfh, y para ello requieren de células B y de la interacción CD40-CD40L. Las células Th17 pueden convertirse en células Th1 productoras de IFN- $\gamma$  o en células Th2 productoras de IL-4, cuando son estimuladas con IL-12 o IL-4 respectivamente. Y por otro lado, existen evidencias que sugieren que las células Th2 pueden cambiar a células productoras de IL-9 en respuesta a TGF- $\beta$ , aunque no está claro si estas células "Th9" realmente representan un nuevo linaje celular. Tomado de [34].

### 3. Señalización a través del receptor de IL-2

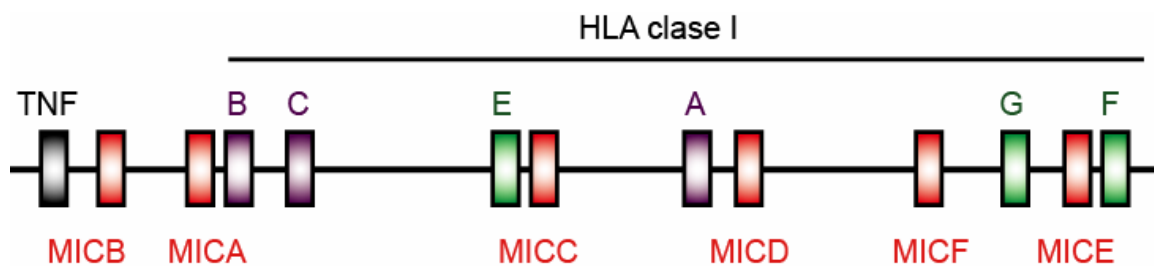
Uno de los eventos claves de la activación de los linfocitos T es la producción de la citoquina mitogénica interleuquina 2 (IL-2). IL-2 tiene un rol muy importante tanto en la proliferación celular como en la protección contra la muerte celular, por mecanismos que involucran la activación de mediadores anti-apoptóticos [35]. La IL-2 se une a su receptor específico (IL-2R), que está formado por las subunidades  $\alpha$  (CD25),  $\beta$  y  $\gamma_c$  [36]. Las



subunidades  $\beta$  y  $\gamma_c$ , que son componentes funcionales de otros receptores de citoquinas, forman un receptor de afinidad intermedia para IL-2 que está expresado en forma constitutiva en linfocitos T vírgenes [37]. Al asociarse con la subunidad  $\alpha$ , se ensambla el receptor de IL-2 de alta afinidad [38]. La expresión de la subunidad  $\alpha$  es inducida en linfocitos T vírgenes como consecuencia de la señalización a través del TCR, lo que aumenta la sensibilidad de la célula a IL-2, y la robustez de la respuesta inmune [39].

#### 4. 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 [40]. Esta familia se compone de dos genes (MICA y MICB) y 4 pseudogenes [40-42], cuya ubicación se muestra esquemáticamente en la **figura 4**.



**Figura 4:** 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 [40, 43]. Sin embargo, no se ha encontrado dicho gen en el genoma murino [40, 43]. No obstante, se ha descrito 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 [44, 45].

#### 5. 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 [46, 47]. Sin embargo, la estructura genómica general semeja aquella de los

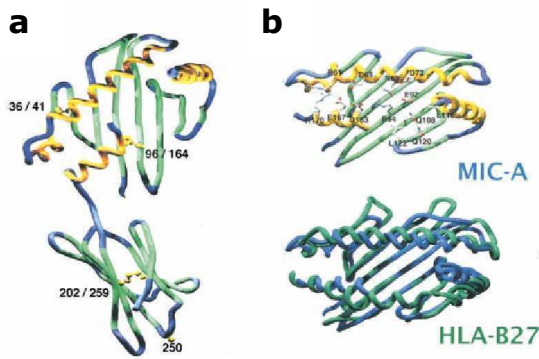
genes de clase I del CMH, donde cada dominio está codificado por un exón diferente [48]. MICA posee un primer intrón muy largo [40], donde existen sitios de unión para factores de transcripción como NF $\kappa$ B [49].

## 6. 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 [40]. Esta longitud varía de acuerdo al número de repeticiones de alanina del segmento transmembrana de diferentes alelos [50]. 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 [47]. La homología entre MICA y otros genes del HLA de clase I es muy baja, siendo de 15 a 21% en el dominio  $\alpha$ 1, 19 a 30% en el dominio  $\alpha$ 2 y 32 a 36% en el dominio  $\alpha$ 3 [40]. 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 endoplasmático (RE), tres dominios extracelulares  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3, un segmento hidrofóbico de transmembrana y una cola citoplasmática relativamente corta [40]. En células epiteliales polarizadas se observó que la cola citoplasmática dirige a esta molécula a la superficie basolateral [51]. El dominio  $\alpha$ 3 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 [40]. La proteína MICA nativa está altamente glicosilada, lo que incrementa su peso molecular de 43 kDa (péptido desnudo) a 65 kDa (proteína madura [52]). Además, no requiere de  $\beta$ <sub>2</sub>-microglobulina ni del procesamiento antigénico o de las proteínas TAP para su expresión en superficie [53, 54].

En 1999 se cristalizó la porción extracelular del alelo MICA\*001 (**Figura 5**, [55]) 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  $\beta$ <sub>2</sub>-microglobulina.



**Figura 5: Estructura cristalográfica de MICA:** a) La estructura de los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  responden a la estructura general de las moléculas de clase I del CMH, pero **b)** el bolsillo formado por los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$  es demasiado angosto para contener un péptido, comparado con la molécula clásica HLA-B27. Tomado de [55].

## 7. Polimorfismo

Al igual que los genes de clase I del HLA, MICA y MICB son polimórficos y se expresan de forma codominante [56], conociéndose hasta la fecha más de 60 alelos de MICA [57-61] y 30 alelos de MICB [62-64]. La mayoría de los sitios polimórficos varían en posiciones nucleotídicas no redundantes, con predominancia en los dominios  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ . Una lista actualizada de los alelos de MICA y MICB se encuentra en el sitio de Internet del *The Anthony Nolan Trust* (<http://www.anthonynolan.org.uk/research/hlainformaticsgroup/>).

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 [50]. Basado en el número de estas repeticiones, los alelos se denominaron A4 (4 repeticiones de la secuencia GCT), A5 (5 repeticiones de la secuencia GCT), A6 (6 repeticiones de la secuencia GCT), A9 (9 repeticiones de la secuencia GCT), A10 (10 repeticiones de la secuencia GCT) 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 [62]. 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 [65].

Los alelos más frecuentes en diferentes grupos étnicos son MICA\*008, seguido por MICA\*002, MICA\*004 y MICA\*010, dependiendo de las poblaciones [66]. Los genes MIC parecen no ser esenciales para la vida, ya que por una delección 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 [67]. A diferencia de las graves consecuencias de la ausencia de genes funcionales de clase I o clase II del CMH, los individuos MIC<sup>-/-</sup> son aparentemente normales. Probablemente esto se deba a que NKG2D es un receptor promiscuo que reconoce a MICA, MICB y otros ligandos (que se detallaran más adelante).

## 8. Patrón de expresión y modulación de MICA

Hasta hace muy poco tiempo atrás se creía que MICA tenía un patrón de expresión restringido a células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, monocitos y epitelio gastrointestinal, y que no se expresaba en linfocitos T o B en reposo [52, 54, 68]. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que se puede detectar el ARNm tanto de MICA como MICB en una amplia variedad de tejidos (con excepción de las células del sistema nervioso central), lo que indica que existe la posibilidad de que se expresen dichas proteínas y en consecuencia puedan detectarse en la membrana celular [69].

En la región promotora 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, [52]) y en otros genes que se inducen frente a estímulos de estrés. Como era de esperar, MICA se induce por choque térmico [52] y estrés oxidativo [70] en líneas de carcinoma humanos. Por otro lado, fibroblastos y células endoteliales sometidas a un estrés biológico como lo es la infección con citomegalovirus humano (CMV) aumentan los niveles de expresión de MICA [71]. No obstante, se ha observado 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 [72]. Sin embargo, al inducir la expresión de MICA, el virus facilita el reconocimiento a través de NKG2D, lo que aumenta fuertemente la respuesta mediada por células citotóxicas T  $\alpha\beta$  CD8<sup>+</sup> específicas del virus [71]. No obstante, el aumento de MICA se ve contrarrestado por la proteína viral UL16, la que es capaz de inducir la degradación de MICA [73]. 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 *-natural killer-*), es resistente a esta degradación [73]. Por lo tanto, aquellas personas portadoras del alelo MICA\*008 serían más 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. Por otro lado, los linfocitos T  $\gamma\delta$  (V $\gamma$ 2V $\delta$ 2) que tienen la capacidad de expresar el receptor NKG2D, poseen un rol importante en la respuesta inmune contra la bacteria intracelular *Mycobacterium tuberculosis*. La infección de células dendríticas (CDs) y de líneas epiteliales con *Mycobacterium tuberculosis* también induce un aumento en la expresión de MICA en la superficie de dichas células tanto *in vivo* como *in vitro* [74] lo que las hace susceptibles al reconocimiento por NKG2D presente en linfocitos T  $\gamma\delta$  (V $\gamma$ 2V $\delta$ 2). 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 coestimuladora [74]. 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- $\gamma$  en la línea celular NKL [75].

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 [52, 71, 73, 76-78]. Este fenómeno, constituye un novedoso mecanismo de eliminación de células infectadas.

Nuestro grupo ha demostrado que MICA se induce en LTCD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> estimulados con células alogeneicas *in vitro*, proceso en el que interviene la microagregación del complejo TCR/CD3 y la molécula coestimuladora CD28 [79]. 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<sup>S6</sup> quinasa [80] y al factor de transcripción NF- $\kappa$ B [49].

En concordancia con nuestros resultados se ha observado que la expresión de distintos ligandos de NKG2D (NKG2DLs) se induce *in vitro* en LTCD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> estimulados con superantígeno, con células alogeneicas o antígenos específicos [81]. Tal activación promovió la fosforilación de la proteína *ataxia-telangiectasia mutated* (ATM), una de las quinasas requeridas para la expresión de NKG2DLs durante la respuesta de daño al DNA. Asimismo, la inhibición de la vía *ATM/Rad3-related kinase* (ATR) en linfocitos T bloqueó la inducción de MICA en un proceso dependiente de NF- $\kappa$ B [81].

## 9. MICA en tumores

La expresión de MICA también ha sido asociada a la neotransformación, debido a que se ha observado que carcinomas de mama, pulmón, ovario, próstata, colon, riñón y melanomas expresan altos niveles de MICA [82-84]. Asimismo, MICA se encuentra frecuentemente sobre-expresada en distintas líneas celulares tumorales [82]. Recientemente se 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. Si bien el anti-oncogen p53 está vinculado con la protección ante una transformación maligna [85], este supresor de tumores no parecería estar involucrado en la regulación de la expresión de MICA [86]. 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 [86].

De esta manera, estímulos genotóxicos que inducen la expresión de NKG2DLs hacen a los tumores susceptibles al ataque citotóxico por células NKG2D<sup>+</sup> [87].

### 10. 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 darviniano las células normales adquieren una serie de cambios genéticos que les confieren algún tipo de ventaja en el crecimiento celular, que finalmente conduce al desarrollo de los tumores y eventualmente el establecimiento de metástasis [88].

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 descrito 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, la que genera mayor número de muertes y cuya incidencia aumenta año tras año en los países Occidentales. 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 en 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".

Sin embargo, a pesar del rol del sistema inmune como efector de una respuesta inmune anti-tumoral, los tumores crecen en huéspedes inmunocompetentes debido a una gran variedad de mecanismos de escape y contra-ataque tumoral 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 [89].

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 [90]. 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 [91, 92]. De esta manera en los tumores que se generan bajo la presión del sistema inmune se seleccionan 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 [92].

Teniendo en cuenta tanto la acción protectora 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 [91]. 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, células NKT, linfocitos  $T\gamma\delta$ , macrófagos y 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- $\gamma$ . Este fenómeno puede provocar la muerte tumoral por arresto del ciclo celular y por mecanismos apoptóticos [93, 94]. Asimismo, las células tumorales y la reacción inflamatoria desencadenada inducen la producción local de quimoquinas tales como CXCL10 (proteína inducible por interferón-10, IP-10), CXCL9 (monoquina inducida por IFN- $\gamma$ , MIG) y CXCL11- $\alpha$  (quemoattractante 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 anti-angiogénicos, contribuyendo a los mecanismos de eliminación del tumor [95-97]. Los restos de células tumorales apoptóticas generados como consecuencia directa o indirecta del IFN- $\gamma$  sobre el tumor, pueden ser fagocitados por CDs locales, que luego migrarían a ganglios linfáticos drenantes y darían inicio a una respuesta inmune adaptativa anti-tumoral. Evidencias recientes sugieren que la expresión en superficie de la proteína pre-apoptótica calreticulina podría ejercer un fuerte impacto sobre la respuesta inmune [98]. Asimismo, la liberación de la proteína HMGB1 (*high mobility group box 1 protein*) durante etapas tardías de la apoptosis tumoral promueve el procesamiento de antígenos por CDs y por lo tanto contribuye a una presentación de antígeno eficiente y a la consecuente activación de linfocitos T citotóxicos (CTLs) [99]. En este sentido, las evidencias sugieren que el conjunto de señales generadas durante la apoptosis podrían desencadenar una respuesta inmune eficiente contra células tumorales que mueren en respuesta a agentes quimioterapéuticos o por acción de la radiación [98-100]. 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- $\gamma$ , 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 [91]. Las CDs que migraron a los ganglios linfáticos drenantes inducen la activación y diferenciación de los LTCD4<sup>+</sup> específicos de tumor hacia un perfil Th1, productor de IFN- $\gamma$ , que a su vez facilita la activación y diferenciación de LTCD8<sup>+</sup> citotóxicos específicos del tumor. Estos LTCD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> migran al foco tumoral, donde los CTLs destruyen a las células tumorales remanentes que expresan los antígenos tumorales específicamente reconocidos y cuya inmunogenicidad aumentó por la exposición al IFN- $\gamma$  producido localmente [92]. 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 [89, 90, 101], 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- $\gamma$  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 [91, 102].

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 descrito numerosas estrategias inmunosupresoras utilizadas por las células tumorales, las que recientemente han sido reseñadas en un artículo de Rabinovich y col [101]. Estos mecanismos incluyen defectos en la señalización luego de la estimulación del TCR, defectos en la maquinaria de presentación de antígenos, activación de señales coestimuladoras negativas en el microambiente tumoral (CTLA-4/B7, PD-1/PD-L1), secreción de factores inmunosupresores (IL-10, TGF- $\beta$ , galectina-1, gangliosidos, prostaglandina E2), activación de vías proapoptóticas en las células efectoras de la respuesta inmune anti-tumoral (FasL, TRAIL, RCAS1) e inhibición de la diferenciación y maduración de las CD8 (a través de factores reguladores negativos como VEGF, galectina-1 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 Tregs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, las células T regulatorias inducibles Tr1 productoras de IL-10, las células NKT productoras de IL-13 y distintas subpoblaciones de CD8 mieloides y plasmocitoides [101].

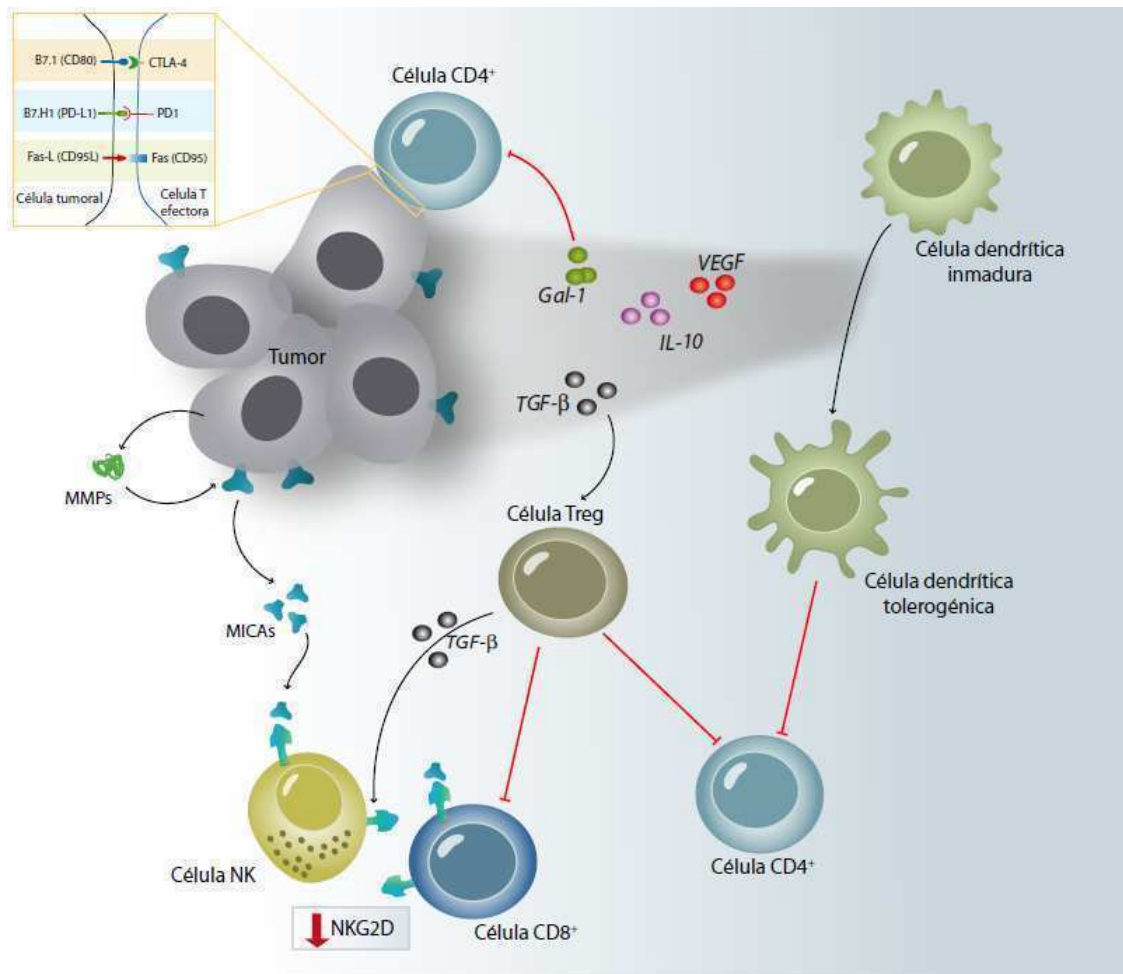
Sabemos que las poblaciones celulares linfocitarias efectoras de una respuesta anti-tumoral son los CTLs (con TCR  $\alpha\beta$  o TCR  $\gamma\delta$ ) y las células NK, las que forman parte de los infiltrados linfocitarios que se detectan en los tumores (TILs: *tumor infiltrating lymphocytes*). Recientemente 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 [103], 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. Dentro de los diferentes mecanismos de escape tumoral que

involucran al sistema NKG2DL-NKG2D 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 [104, 105]. El clivaje involucra la acción de metaloproteasas [105] 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 [106]. 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 LTCD8<sup>+</sup> 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- $\beta$ . Esta citoquina inmunosupresora [107] 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 [108] y por otro lado induce una disminución en la expresión de NKG2D en LTCD8<sup>+</sup> y células NK, lo que evita el reconocimiento y destrucción de distintos tipos celulares [109-112] sin afectar la expresión de perforina y FasL [113]. El TGF- $\beta$  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 [109]. En nuestro laboratorio, demostramos la existencia de otro mecanismo de escape que involucra al sistema MICA-NKG2D y que consiste en la retención intracelular de formas inmaduras de MICA en el retículo endoplásmico de células de melanoma, lo que confiere resistencia *in vitro* e *in vivo* a la actividad tumoricida de las células NK, proceso debido a un transporte retrógrado y una degradación de MICA en el proteasoma [114]. Los diferentes mecanismos de escape tumoral mencionados anteriormente se esquematizan en la **Figura 6**.

Como se mencionara más arriba, uno de los mecanismos efectores más efectivos de la respuesta inmune anti-tumoral es la activación de células citotóxicas (LTCD8<sup>+</sup> 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 [115]. 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, [116]). 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 [117]. En el segundo proceso, denominado mecanismo no secretorio participan miembros de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  tales como el ligando de Fas (FasL) y en forma secundaria en las células NK, TRAIL [118]. 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.

Hasta hace unos pocos años se creía que la principal respuesta biológica desencadenada por células NK sobre células infectadas con virus o células neoplásicas era su actividad citotóxica. Sin embargo, en la actualidad sabemos que la función más importante de las células NK es la secreción de citoquinas, en particular el IFN- $\gamma$  [119, 120]. De hecho, las células NK constituyen la primera fuente de IFN- $\gamma$  detectado luego de la infección con diferentes patógenos, proceso que se observa unas pocas horas después o durante los primeros días de producida la infección. Este IFN- $\gamma$  resulta crítico para perfilar la respuesta inmune innata y adaptativa, por lo que las células NK son realmente reguladores de la respuesta inmune contra una gran variedad de patógenos [121]. Por otro lado, se sabe que las células NK son capaces de establecer un diálogo recíproco con CD8 lo que también le permite regular la respuesta inmune adaptativa tanto en forma cualitativa como cuantitativa [121, 122]. 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 LTCD8<sup>+</sup>.



**Figura 6: Mecanismos de escape tumoral.** Se muestran mecanismos de escape tumoral que involucran interacciones celulares y secreción de diferentes moléculas por parte del tumor y células del sistema inmune. MICA es clivada de la superficie de ciertos tumores por metaloproteasas (MMPs) y junto con el TGF- $\beta$  (secretado por el tumor y/o por células Treg) induce una disminución en la expresión de NKG2D en LTCD8<sup>+</sup> 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. Por otro lado, la interacción establecida entre células tumorales y LTCD4<sup>+</sup> va a estar mediada por moléculas coestimuladoras negativas (CTLA-4/B7, PD-1/PD-L1), al mismo tiempo que se induce la activación de vías proapoptóticas en las células efectoras de la respuesta anti-tumoral por la interacción de las moléculas Fas-FasL. El tumor secreta factores inmunosupresores (IL-10, TGF- $\beta$ , VEGF y galectina-1) los cuales van a inhibir la diferenciación y maduración de las CDs, generando CDs tolerogénicas capaces de regular negativamente la funcionalidad de LTCD4<sup>+</sup>. Distintas poblaciones de células regulatorias reclutadas o inducidas por los tumores contribuyen a esta red inmunosupresora actuando directamente sobre LTCD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. Además, galectina-1 secretada por el tumor induce apoptosis en células Th1 [123]. En su conjunto, todos estos mecanismos van a contribuir al silenciamiento de la respuesta inmune.

## 11. 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<sup>+</sup> 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 [124]. 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 [124, 125]. Esta maduración puede ocurrir en ausencia de un timo funcional tanto en humanos como en ratones [126]. 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 [127]. Evidencias recientes en modelos murinos indican que el factor de transcripción E4BP4 (también conocido como NFIL3) es esencial para la generación del linaje de células NK [128, 129]. Este factor de transcripción constituye el primer factor de transcripción específico del linaje de células NK que se ha descrito.

Las células NK fueron descritas 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 le permitió a Klas Kärre proponer la hipótesis del *missing self*, en la que se planteaba que las células NK monitoreaban los niveles de expresión de moléculas de clase I del CMH sobre la célula y destruían a aquellas células que por diversos mecanismos habían dejado de expresar niveles normales de estas moléculas [125], 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 estas 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 hematopoyéticos deficientes en moléculas de clase I del CMH, e *in vitro* no pueden lisar fibroblastos de ratones deficientes en  $\beta$ 2-microglobulina que no expresan moléculas de clase I del CMH [130]. 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 [131]. 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 [132]. 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 de clase I del CMH y de receptores activadores que reconocen moléculas relacionadas con el CMH de clase I en las células blanco [133].

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 fenotípicamente maduras pero con una muy baja actividad citotóxica contra células blanco susceptibles [134]. 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. Evidencias recientes indican que las CD8 y/o los monocitos y macrófagos serían los responsables de promover tal activación [120, 121, 135]. 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 CD8 dependiendo del estado de activación de ambos tipos celulares [136, 137]. Este reconocimiento es mediado por el receptor activador NKp30 en la célula NK [138]. Recientemente se ha demostrado que la interacción *in vivo* entre CD8 y células NK juega un papel importante en la inducción de una respuesta inmune eficiente contra células infectadas con virus y células tumorales [139, 140].

Como consecuencia de este diálogo recíproco intenso establecido entre las CD8 y las células NK se produce una estimulación bidireccional, las CD8 adquieren capacidad de actuar como CPA's profesionales (que expresan moléculas coestimuladoras 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 CD8 [141] las células NK adquieren la capacidad de ejercer funciones efectoras citotóxicas contra distintas células tumorales y la capacidad de secretar citoquinas inmunoregulatorias (principalmente, IFN- $\gamma$ ). Las células NK se convertirían así en una fuente temprana de IFN- $\gamma$  necesaria para la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th1. Este programa de diferenciación es iniciado por la IL-12 liberada por CD8 maduras y requiere del factor de transcripción T-bet [142]. El IFN- $\gamma$  tiene un papel doble en la polarización hacia el perfil Th1, ya que por un lado induce un aumento en la producción de IL-12 por CD8 y por otra parte sinergiza con las señales transducidas a partir del TCR para maximizar la expresión de T-bet y consecuentemente el receptor de IL-12 en células T vírgenes inmunocompetentes.

Recientemente se ha propuesto una re-definición de lo que es una célula NK, teniendo en cuenta nuevos ensayos funcionales y análisis genómicos. Según esta definición "una célula NK es un linfocito NKp46<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> 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- $\gamma$  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 -MCMV- o agonistas de TLR-3)" [120].

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<sup>dim</sup>) y altos niveles del receptor de tipo IIIA para la porción Fc de la inmunoglobulina G CD16 (CD16<sup>bright</sup>). Estas células son las responsables de la citotoxicidad natural que las hace capaces de lisar células tumorales *in vitro* e *in vivo* [125, 143] y de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA, [125]). 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 [144]. Por el contrario, la subpoblación minoritaria de células NK de sangre periférica (10%) expresa altos niveles de CD56 (CD56<sup>bright</sup>) y niveles bajos o nulos de CD16 (CD16<sup>dim</sup> o CD16<sup>-</sup>). Esta población constituye una fuente importante de citoquinas inmunorregulatorias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$ , 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 [144]. Se ha demostrado que las CDs co-localizan con las células NK en las áreas T de los ganglios linfáticos [145]. En ensayos realizados *in vitro*, se ha observado que CDs fueron capaces de estimular la subpoblación de células NK CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> [145]. Por otro lado, el bloqueo de IL-12 suprimió la producción de IFN- $\gamma$  mediada por células NK e inducida por CDs, mientras que IL-15 unida a la membrana de CDs fue esencial para la proliferación y la supervivencia de estas células NK [145]. Por lo tanto, los resultados indican que los órganos linfáticos secundarios podrían ser un potencial sitio de interacción entre CDs y células NK y que las citoquinas IL-12 e IL-15 producidas por CDs ejercerían un rol importante en la activación de células NK.

Recientemente se ha demostrado que las células NK de la población CD56<sup>bright</sup> son precursores que dan lugar a las células CD56<sup>dim</sup> luego de ser activadas por citoquinas en sangre periférica [146].

Debido a sus características, las células NK se han considerado como células de la inmunidad innata. Sin embargo, descubrimientos recientes han puesto en duda esta clasificación [147]. En un modelo de hipersensibilidad inducida por contacto a un hapteno químico [148], y en un modelo de infección con MCMV [149] se demostró la existencia de células NK de "memoria", con capacidad de secretar IFN- $\gamma$  y degranular rápidamente luego de una re-estimulación con el antígeno específico [149]. Usando un sistema de transferencia adoptiva de células NK, donde podía realizarse un seguimiento con un

marcador congénito de las células NK que habían estado en contacto previamente con el antígeno, observaron que una subpoblación de células NK (caracterizadas por la expresión del receptor activador de ratón Ly49H) pueden experimentar una fuerte expansión celular, lo que conduce a células NK de "memoria" que pueden permanecer en el hospedador hasta varios meses después de la infección [149]. Es importante destacar que si bien todos estos hallazgos se realizaron en un modelo de infección viral, es posible pensar en el surgimiento de células NK de "memoria" durante el crecimiento tumoral. Otros investigadores observaron que cuando se transferían células NK activadas con citoquinas a ratones Rag<sup>-/-</sup> vírgenes de tratamiento alguno, estas células NK eran detectables entre los 7 y 22 días después de su transferencia adoptiva y que no producían IFN- $\gamma$  [150]. Sin embargo, cuando se re-estimularon las células NK transferidas empleando citoquinas se observó que eran capaces de producir altas cantidades de IFN- $\gamma$  [150]. En su conjunto, estos experimentos permitieron identificar células NK de "memoria" capaces de responder más eficientemente a una segunda estimulación.

## 12. 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 [151, 152]. Los receptores inhibidores poseen en su cola citoplasmática un dominio ITIM (motivo de inhibición basado en tirosina o *immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif*, cuya secuencia es V/IxYxxL/V), que luego de fosforilarse recluta fosfatasa 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 [143, 153]. Para llevar a cabo la señalización se asocian con diferentes moléculas adaptadoras, tales como CD3 $\zeta$ , Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  y DAP12, que poseen motivos ITAM (motivo de activación basado en tirosina o *immunoreceptor tyrosine-based activation motif*, cuya secuencia es YxxLx<sub>6-8</sub>YxxL/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 tirosín-quinasa intracelulares, que en última instancia llevan a la producción de citoquinas y la movilización de gránulos secretorios que contienen perforina y granzimas [154].



Como se mencionara, la actividad citotóxica de las células NK se encuentra finamente regulada por la integración de 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 [133, 155]. 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 CD8, monocitos y linfocitos [101] sino también a las células NK [156].

### **12.1. 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 comprenden mayoritariamente a miembros de la familia de genes NKG2 (CD94/NKG2A, -B, [157]).

#### **12.1.1. Complejo de receptores leucocitarios (LRC):**

##### **12.1.1.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 receptores KIR, basadas en el número de

dominios de la superfamilia de las inmunoglobulinas en la región extracelular de estas moléculas [158]. 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 [158]. Existe una excepción, el receptor KIR2DL4, que aunque posee dominio citoplasmático largo, con una secuencia ITIM, tiene función activadora [159].

En general, los KIR3D reconocen alelos HLA-A, y -B, mientras que los receptores KIR2D reconocen alelos HLA-C [160-162]. Los KIR inhibitorios se expresan además en linfocitos T activados [163] donde modulan sus funciones [153, 158].

#### **12.1.1.b. Receptores ILT (o LIR)**

La familia ILT/LIR se compone de 13 genes relacionados que codifican proteínas con 2 o 4 dominios extracelulares de la superfamilia de las inmunoglobulinas [158]. 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, células NK y en una subpoblación de células T, donde actúa como modulador negativo de sus funciones efectoras [153, 162].

#### **12.1.2. 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 [164, 165]. 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 [158, 166]. 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 [167], que señala en forma similar a la cadena CD3 $\zeta$ , mediante la activación de tirosín-quinasas luego de la fosforilación del motivo ITAM presente en su porción citoplasmática [168]. 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 [169]. La expresión de HLA-E en la superficie celular requiere de un péptido que deriva de la secuencia líder de cadenas  $\alpha$  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 [170]. 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 [153].

### **12.2. Receptores no específicos de moléculas de clase I del HLA**

La mayoría de los 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 de citotoxicidad natural (*Natural Cytotoxicity Receptors* –NCR-). Otro grupo de receptores está compuesto por moléculas asociadas a proteínas adaptadoras sin motivos ITAM. Entre éstos se encuentran los miembros de la familia de CD2, CD2 [171], 2B4 [172] y CRACC [173], NTB-A [174], DNAM-1 [175], Nkp80 [176] y el receptor NKG2D, que es el más estudiado [177].

#### **12.2.1. Receptores asociados a ITAM**

##### **12.2.1.a. CD16 (Fc $\gamma$ RIII)**

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 CD3 $\zeta$  y Fc $\epsilon$ RI $\gamma$ . Si bien CD16 es uno de los receptores activadores más importantes en la jerarquía de receptores de las células NK [178], 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. La importancia del receptor CD16 como mediador de la CCDA queda de manifiesto en la reciente demostración de su participación en los mecanismos efectores del Rituximab, un AcMo anti-CD20 humanizado empleado como tratamiento en determinados pacientes con leucemia linfocítica crónica (LLC) [179, 180]

### **12.2.1.b. NCR**

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 [181], NKp44 [182] y NKp30 [183] y constituyen los miembros de un grupo de receptores denominado NCR. Son glicoproteínas transmembrana de 46, 44 y 30 kDa respectivamente. Estos receptores están involucrados en el reconocimiento y la lisis de células tumorales humanas [154].

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 [120]. Su porción citoplasmática no contiene ningún motivo ITAM, pero la región transmembrana contiene un aminoácido cargado positivamente (R), que estaría involucrado en la estabilización de la interacción con las proteínas adaptadoras CD3 $\zeta$  y Fc $\epsilon$ RI $\gamma$  [181].

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 [182].

El receptor NKp30 se expresa selectivamente en todas las células NK. Se asocia con cadenas CD3 $\zeta$ , probablemente a través de un aminoácido cargado positivamente (R), presente en la región transmembrana [183].

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 [184, 185]. NKp30 está involucrado en el reconocimiento de CDs [138]. Además, NKp30, NKp44 y NKp46 son importantes para el reconocimiento y lisis de células tumorales [186]. Aunque recientemente se ha demostrado que proteoglicanos de heparán-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 [187, 188].

## 12.2.2. Receptores no asociados a ITAM

### 12.2.1.a. NKp80

NKp80 [176] 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, la lecitina de tipo C inducida por activación (AICL o CLEC-2B), 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 entre las células NK y las células mieloides y que esto puede influir en la iniciación y mantenimiento de la respuesta inmune [135].

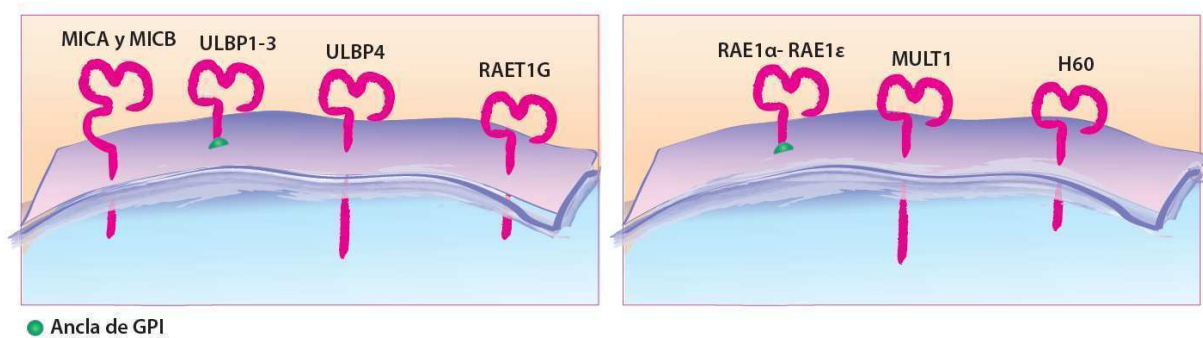
### 12.2.1.b. NKG2D

NKG2D fue identificado por primera vez en 1991 por Houchins y col, como un cDNA expresado por células NK humanas [165]. 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 gene A*, [76]). 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<sup>+</sup>. Este homodímero se une a la proteína adaptadora DAP10 en humanos y a DAP12 o DAP10 en ratones [189, 190]. 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, [189]) y a Grb [191], mientras que DAP12 contiene un motivo ITAM citoplasmático que recluta y activa a las tirosin-quinazas 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- $\alpha$  en células NK y por IL-15 en LTCD8<sup>+</sup> [152, 189, 192, 193]. NKG2D puede actuar como molécula coestimuladora 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 [178]. Esta función dual hace que NKG2D sea una molécula muy versátil [190, 194, 195], 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.

### 13. Ligandos NKG2D

NKG2D reconoce en ratón a las proteínas Rae1 [196], H60 [196] y MULT1 [197]. 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 [198, 199]. Este grupo de moléculas de superficie ancladas a GPI (glucofosfatidilinositol) se expresan en algunos tejidos normales, pero se ha observado que se expresan en mayores niveles en tumores de diversos fenotipos [198, 199]. Del mismo modo, se ha detectado la expresión de las proteínas integrales de membrana ULBP-4 (RAET1E) y RAET1G en diferentes líneas tumorales [200, 201]. En humanos, así como en varias especies de mamíferos pero no en ratón, existe otro grupo de NKG2DLs (las proteínas integrales de membrana denominadas MICA y MICB, [76]) que fueron descritos previamente en esta introducción. En la **Figura 7** se muestra una representación esquemática de los NKG2DL.

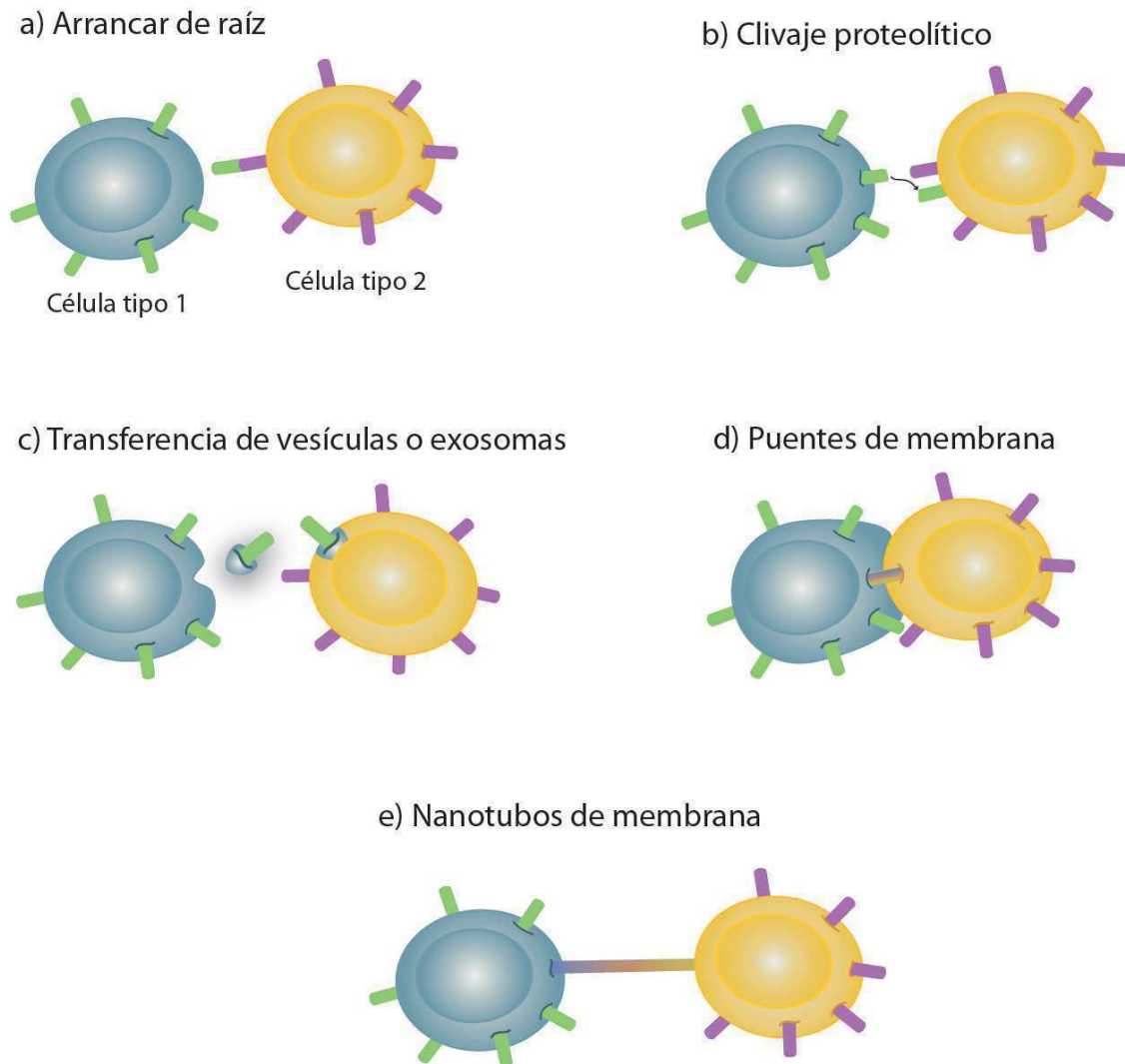


**Figura 7: Representación esquemática de los ligandos de NKG2D.** Tanto en humanos (izquierda) como en ratón (derecha) algunas de estas moléculas están ancladas a GPI y otras poseen dominios transmembrana. Adaptado de [202].

### 14. Fenómenos de transferencia de membrana.

Hace un poco más de 3 décadas se observaron resultados sorprendentes: proteínas consideradas específicas de un tipo celular se las encontraba presentes en la superficie de otros tipos celulares [203, 204]. La causa de estas observaciones se debía a un novedoso fenómeno que involucraba la transferencia de "parches" de membrana entre células del sistema inmune [205-207]. Para describir este fenómeno de transferencia de membranas que contenían proteínas Denis Hudrisier y colaboradores acuñaron el término **trogocitosis** [208], el cual deriva de la palabra griega "trogo" que significa morder. Actualmente se sabe que muchas moléculas pueden ser transferidas desde la superficie de diferentes tipos celulares (entre los que se incluyen células tumorales) a la superficie de linfocitos T, tales

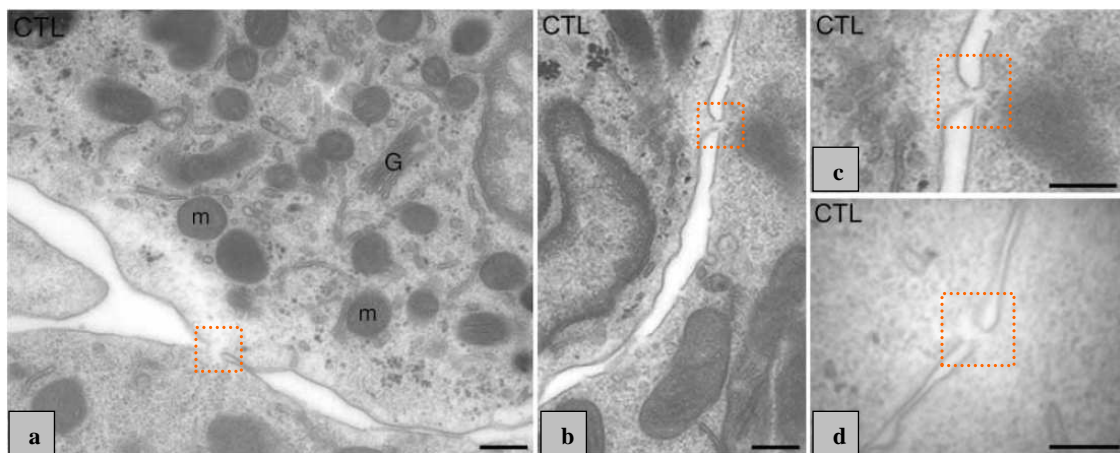
como moléculas co-estimuladoras [209-211], complejos de CMH clase I-péptidos [212], complejos de CMH clase II-péptidos [213] y HLA-G [214]. También se ha observado la transferencia de MICA y MICB a células NK [215, 216]. Sin embargo, la relevancia fisiológica de estos fenómenos se encuentra pobremente caracterizada [209, 212, 217-219]. Se ha demostrado que la transferencia de MICB a la superficie celular de células NK reduce la actividad citotóxica dependiente de NKG2D debido a la internalización de dicho receptor [215] mientras que la transferencia de MICA a células NK promueve la degranulación de células NK durante el contacto NK-NK, lo que podría promover la lisis de células NK vecinas que adquirieron este NKG2DL [216], lo que a su vez podría generar una atenuación en la magnitud de la respuesta inmune. Por otro lado, la captura de HLA-G por linfocitos T se ha asociado con la adquisición de un fenotipo supresor [214]. Hasta el momento, se descubrieron algunas moléculas en la superficie de linfocitos T y B que son capaces de mediar la trogocitosis [219]. En líneas generales, se ha concluido que el sistema es degenerado (múltiples moléculas de superficie median la trogocitosis). En linfocitos T, están involucrados algunos componentes del complejo TCR-CD3, moléculas co-receptoras y varias moléculas co-estimuladoras. Si bien todas las células hematopoyéticas analizadas son capaces de realizar trogocitosis, los receptores y los mecanismos involucrados varían en función del linaje celular involucrado en el fenómeno de transferencia de membrana [219]. Este hallazgo podría explicar por qué distintos tipos celulares pueden desencadenar diferentes efectos biológicos luego de la adquisición de porciones de membrana mediante el fenómeno de trogocitosis. A pesar de que el significado fisiológico de la trogocitosis no ha sido completamente dilucidado, principalmente debido a la falta de un modelo *in vivo* adecuado, bajo ciertas condiciones este fenómeno es capaz de amplificar la respuesta inmune, ya sea aumentando el potencial estimulador de linfocitos T o activando la producción de citoquinas en células efectoras vecinas [209, 210, 212, 213, 220]. Por otro lado, también es importante considerar que la adquisición de ciertas proteínas por el fenómeno de trogocitosis puede moderar la respuesta inmune ya sea causando la anergia celular, la adquisición de un fenotipo supresor en linfocitos T [214], o bien la inducción de fratricidio en CTLs [221]. A modo de esquema, en la **Figura 8** podemos ver diferentes mecanismos posibles de transferencia de proteínas entre diferentes tipos celulares.



**Figura 8: Mecanismos posibles de transferencia de proteínas entre células del sistema inmune.** **a)** Las proteínas pueden ser arrancadas de raíz de la membrana celular. No existen evidencias de que éste ocurra, pero consideraciones acerca de la energía que este proceso consumiría indican que podría ser posible. **b)** El clivaje proteolítico podría facilitar la transferencia intercelular de ectodominios de proteínas. Esto ocurre con algunas proteínas, tales como las proteínas de la familia MIC que se inducen por estímulos de estrés y que pueden ser clivadas de la superficie celular de tumores [104, 105] y en consecuencia podrían unirse y bloquear al receptor NKG2D presente en células T y células NK. **c)** La transferencia puede ser mediada por vesículas o grandes organelas presentes en las zonas de contacto intercelular. Este proceso puede involucrar la secreción de vesículas especializadas tales como exosomas. Sin embargo, existen evidencias que indican la existencia de un mecanismo particular, con características diferentes a la secreción de exosomas, que permite la transferencia de proteínas de membranas entre diferentes tipos celulares y que se lo denomina **trogocitosis**. Las bases moleculares de la trogocitosis todavía no están del todo claras. Este fenómeno puede involucrar, por ejemplo, la endocitosis de las dos membranas sinápticas o quizás una porción de membrana que es “arrancada” de la célula dadora por la célula aceptora. **d)** La fusión intercelular de membranas puede generar pequeños “puentes” de membrana que podrían facilitar la transferencia de proteínas. Se han observado por microscopía electrónica la existencia de “puentes” de membrana en la SI entre CTLs y sus respectivas células blanco pero no existen evidencias de que estos puentes faciliten el intercambio de proteínas entre células. **e)** Los nanotubos de membrana (posibles derivados de la fusión de membranas o de los “puentes” de membrana en los sitios de contacto intercelular) podrían facilitar la transferencia de proteínas entre células alejadas. Los nanotubos de membrana se observan comúnmente entre diferentes tipos celulares entre los que se incluyen las células inmunes, y son capaces de transportar bacterias, vesículas, calcio, moléculas citoplasmáticas, proteínas virales e incluso receptores activadores de células NK [222]. Adaptado de [207].



Como se mencionó anteriormente, se ha observado que CTLs establecen SI con sus respectivas células blanco donde ocurre la secreción vectorial del contenido de los gránulos citotóxicos [223]. El proceso parece involucrar la fusión de las membranas celulares del CTL y la célula blanco como consecuencia de la formación de la SI. A medida que las células blanco son eliminadas por los CTLs, éstos adquieren antígenos presentes en las células blanco lo que conduce a una disminución en la respuesta mediada por dichos linfocitos a causa del fratricidio. En este contexto, es importante destacar que la formación de las SI no sólo sería importante en la transducción de señales, sino también en la polarización de la secreción de los gránulos que median la lisis de las células blanco así como en la transferencia de proteínas presentes en las zonas de contacto entre ambas células. En la **Figura 9** podemos observar imágenes correspondientes a microscopías electrónicas (ME) de conjugados de CTLs con células blanco que se encuentran en proceso de separación. Sin embargo, todavía podemos ver algunos puntos de contacto entre ambas células, e incluso en las imágenes de mayor aumento (**Fig. 9c y d**) podemos observar que estas zonas de contacto corresponden a puntos en los que las membranas de ambas células están fusionadas formando “puentes” de membrana que permitirían no solo el intercambio de proteínas de membrana sino también el intercambio de proteínas citosólicas.



**Figura 9: “Puentes” de membrana establecidos entre linfocitos T citotóxicos y células blanco. a-d)** Se muestran secciones de la zona de contacto entre CTLs (cargados con HRP para marcar los gránulos líticos -GL-) y sus respectivas células blanco. Ambas células se encuentran en el proceso de separación. En los CTLs que se están separando de las células blanco, se puede ver la disposición desorganizada de las organelas y la ausencia de GL en los sitios de contacto **(a)**. Otros ejemplos de sitios de fusión membrana-membrana entre un CTL y una célula blanco que se están separando se muestran en **b-d)**. **c)** Es una imagen de mayor aumento de **b)**. **m:** mitocondria; **n:** núcleo; **G:** Complejo de Golgi; **CTL:** linfocitos T citotóxicos. Barra = 250nm. Los recuadros naranja muestran las zonas donde se observan los “puentes” de membrana. Tomado de [223].

## Objetivos

Los antecedentes descriptos revelan la importancia del sistema NKG2DL-NKG2D en la vigilancia inmunológica contra tumores. Por otro lado, existen múltiples interacciones celulares en el foco tumoral cuyas consecuencias determinan el rechazo o crecimiento tumoral. En este sentido, sabemos que las CDs establecen un diálogo recíproco con células NK que va a influir en el tipo de respuesta inmune desencadenada. Por otro lado, las células tumorales son capaces de activar a las células NK promoviendo la secreción de IFN- $\gamma$  y la citotoxicidad. Las CDs van a fagocitar los restos de células tumorales, van a migrar a los ganglios linfáticos y darán inicio a una respuesta inmune adaptativa anti-tumoral como consecuencia de su interacción con linfocitos T. Una vez desencadenada la respuesta inmune adaptativa, los linfocitos T específicos de tumor llevarán a cabo su función efectora. Sin embargo, desconocemos si existe algún tipo de regulación entre células NK y linfocitos T en el foco tumoral. Por otro lado, sabemos que existe transferencia de porciones de membrana entre células tumorales y células del sistema inmune, y que bajo ciertos estímulos activadores los linfocitos T son capaces de expresar MICA, pero desconocemos la relevancia fisiológica de la transferencia de membranas y de la expresión de dicha proteína en estas células. De esta manera, el estudio de los fenómenos que ocurren en la interfase tumor-linfocito T y cómo éstos influyen sobre la funcionalidad de las células NK nos permitirá hacer un aporte al esclarecimiento de nuevos mecanismos de regulación de la respuesta inmune anti-tumoral.

### Objetivos:

- 1.- Estudiar los diferentes estímulos activadores que promueven la expresión de MICA en linfocitos T y las consecuencias funcionales de esta expresión.
- 2.- Investigar fenómenos que ocurren en la interfase tumor-linfocito T y que involucran a MICA y a otros NKG2DLs como posibles reguladores de la respuesta inmune anti-tumoral, y estudiar la relevancia fisiológica de los fenómenos observados.

## Materiales y Métodos

### 1. Líneas celulares utilizadas

Se utilizaron las siguientes líneas celulares adherentes de melanoma de origen humano **M8** (provisto por la Dra. M. Pérez, Autoridad Regulatoria Nuclear -A.R.N.-, Comisión Nacional de Energía Atómica, Buenos Aires, [224]), **A375N** (cedido por la Dra. E. Medrano, Baylor College of Medicine, Houston, Texas, EEUU [225]), **IIB-MEL-LES** [226], **IIB-MEL-IAN** [226]), y **Mel-888** (provista por el Dr. O. Podhajcer, Fundación Instituto Leloir, Buenos Aires). También se utilizó un clon de la línea de melanoma **IIB-MEL-LES** transfectado establemente con el plásmido pCIneo-MICA (**clon 1**) o un clon control transfectado establemente con plásmido vacío (**clon C**), los que fueron generados en nuestro laboratorio [114].

Los melanomas fueron cultivados en medio RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, California, EEUU) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Invitrogen, Gaithersburg, Mariland, EEUU o Natocor, Río Cuarto, Córdoba, Argentina), 54 ng/ml de piruvato sódico, 0,292 mg/ml de glutamina, 50 U/ml de penicilina sódica y 50 mg/ml de estreptomycin (todos de Invitrogen) en estufa de atmósfera controlada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Al RPMI con todos los aditivos se lo denominó **medio RPMI completo**.

### 2. Reactivos, drogas y proteínas recombinantes

Se emplearon las drogas citocalasina B, brefeldina A y cloroquina (todas de Sigma, Saint Louis, Missouri, EEUU). La citocalasina B se usó a 1 µg/ml, la brefeldina A se usó a 5 ng/ml y la cloroquina se usó a 50 µM. Los fluorocromos de membrana utilizados fueron succinimidil ester de diacetato de carboxifluoresceina (CFSE, Invitrogen), perclorato de 3-3' dioctadeciloxacarboxianina (DiOC<sub>18</sub>, Invitrogen) y PKH26 (Sigma). El CFSE se usó a 10 µM, el DiOC<sub>18</sub> se usó a 30 µM y el PKH26 se usó a 2 µM.

La proteína recombinante soluble del alelo MICA\*008 (rMICA) fue producida y purificada en nuestro laboratorio de acuerdo al protocolo oportunamente publicado [227]. Para ello, se clonó el ARNm que codifica para la porción extracelular de MICA (exones 2 a 4, que corresponden a los dominios  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$ ) en el plásmido pET26b (Novagen, Madison, Wisconsin, EEUU). La proteína recombinante se produjo en bacterias BL21(DE3) mediante inducción con 1mM isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG, Calbiochem, San Diego, California, EEUU). La proteína rMICA fue purificada a partir de cuerpos de inclusión mediante cromatografía de afinidad en columna de níquel (*His•Bind purification kit*,

Novagen) y cuantificada mediante el reactivo comercial *MicroBCA Protein Assay Reagent* (Pierce, Rockford, Illinois, EEUU) de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante.

### **3. Aislamiento de distintas poblaciones celulares**

#### **3.1. Aislamiento de Células Mononucleares de Sangre Periférica**

Se extrajo sangre de donantes voluntarios sanos, se diluyó al medio con solución isotónica de cloruro de sodio a temperatura ambiente (t.a) y se sembró sobre un colchón de Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Se centrifugó a 2.000 rpm durante 20 min a t.a en una centrífuga de rotor basculante y se colectó la nube de células mononucleares de sangre periférica (CMSPs). Las células aisladas fueron lavadas con RPMI 1640 y resuspendidas en medio RPMI completo. Posteriormente se realizó el recuento de células con azul de Tripan en una cámara de Neubauer. Las células se sembraron a razón de  $10^6$  células/ml.

#### **3.2. Aislamiento de linfocitos T CD4<sup>+</sup>**

Se aislaron linfocitos T CD4<sup>+</sup> (LTCD4<sup>+</sup>) por selección positiva a partir de CMSPs empleando AcMo anti-CD4 acoplado a perlas magnéticas (Dynabeads, Dynal, Oslo, Noruega), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las perlas magnéticas fueron lavadas 2 veces con 2% de SFB en NaCl 150 mM, fosfatos 50 mM, pH=7,4 (PBS), adicionadas a la suspensión celular a razón de  $10^7$  células/ml e incubadas durante 20 min a t.a en un agitador orbital. Utilizando un dispositivo magnético, se separaron las células CD4<sup>+</sup> y se realizaron 3 lavados con 2% de SFB en PBS. Finalmente, las células se resuspendieron en medio RPMI completo si iban a ser utilizadas para cultivo celular, o en buffer de lisis, para análisis por Western Blot. La eficiencia de purificación fue siempre mayor al 95 % y fue determinada por citometría de flujo.

#### **3.3. Aislamiento de células NK, linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>**

Las células NK y los LTCD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> fueron aisladas de CMSPs de voluntarios humanos sanos utilizando el reactivo RosetteSep específico para cada tipo celular (Stem Cell Technologies, Vancouver, British Columbia, Canadá) y un gradiente de centrifugación en Ficoll-Paque™ PLUS. Las células NK y los LTCD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> aisladas fueron lavadas con RPMI 1640, y resuspendidos en medio RPMI completo. Las células NK fueron empleadas como células efectoras en ensayos de citotoxicidad o liberación de gránulos y co-cultivos para evaluar la liberación de IFN- $\gamma$ . En cuanto a los LTCD8<sup>+</sup> fueron utilizados en ensayos de trogocitosis (ver más adelante) con el objeto de evaluar la adquisición de MICA luego del

co-cultivo con distintas líneas de melanoma humano que expresan o no este NKG2DL. Los LTCD4<sup>+</sup> fueron utilizados en ensayos de trogocitosis al igual que los LTCD8<sup>+</sup>, como células blanco de células NK en ensayos de citotoxicidad o liberación de gránulos, y en co-cultivos para evaluar la liberación de IFN- $\gamma$  por parte de células NK.

## **4. Activación de linfocitos**

### **4.1. Fitohemaglutinina y citoquinas mitogénicas (IL-2, IL-4, e IL-15)**

La fitohemaglutinina (PHA, Sigma) se diluyó a 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en RPMI 1640 y se empleó a razón de 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  en medio RPMI completo con el objeto de estimular CMSPs o LTCD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en estufa de atmósfera controlada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 18 h. Posteriormente las células fueron lavadas 2 veces con PBS, resuspendidas en medio RPMI completo, y estimuladas con interleuquina (IL) -2 (R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, EEUU ) a razón de 8 ng/ml, o IL-4 (Becton Dickinson, San José, California, EEUU) a razón de 5 ng/ml, o IL-15 (PeproTech, Rocky Hill, New Jersey, EEUU) a razón de 10 ng/ml, según se indica en cada experimento. Las CMSPs o LTCD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> se cultivaron en presencia de las citoquinas antes mencionadas durante 3 días en estufa de atmósfera controlada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.2. Estimulación con anticuerpos monoclonales anti-CD3 e IL-4**

Para la estimulación con anticuerpos monoclonales (AcMo), se utilizó 25 ng/ml de AcMo de ratón estimulante anti-CD3 humano (clon SK7, Becton Dickinson), en ausencia o en presencia de 5 ng/ml de IL-4. Como control de isotipo (CI) se utilizó la dilución correspondiente del AcMo BI24 purificado (IgG<sub>2b</sub>, [228]). Las CMSPs fueron cultivadas durante 3 días en estufa de atmósfera controlada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

### **4.3. PMA e Ionomicina**

Para estimulación con dosis mitogénicas de forbol-12-miristato-13-acetato (PMA, Sigma) se utilizó una concentración final de 10 ng/ml (originalmente disuelto en DMSO a 25 ng/ $\mu\text{l}$ ) e ionomicina (Sigma) a 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  (a partir de una solución madre de 1 mg/ml en DMSO). Las CMSPs se cultivaron durante 3 días en estufa de atmósfera controlada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.4. Polarización de células T CD4<sup>+</sup> a perfiles Th1 o Th2

Para los experimentos de polarización, las CMSPs se cultivaron durante 6 días en condiciones de polarización a perfil Th1 con 1 µg/ml de PHA, 2 ng/ml de IL-12 (Becton Dickinson) y 100 ng/ml AcMo anti-IL-4 (Becton Dickinson), o bien en condiciones de polarización hacia un perfil Th2 con 1 µg/ml de PHA, 5 ng/ml de IL-4 (Sigma) y 2 µg/ml de AcMo anti-IL-12 (Becton Dickinson). Las células se cultivaron en estufa de atmósfera controlada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se corroboró por *Western blot* la polarización hacia un perfil Th1 o Th2 evaluando la expresión de los factores de transcripción T-bet y GATA3. Para la detección de GATA 3 se utilizó un Ac policlonal, mientras que para la detección de T-bet se utilizó un AcMo (ambos de Santa Cruz Biotech, Santa Cruz, California, EEUU).

### 5. Ensayos de linfoproliferación

Se cultivaron 10<sup>5</sup> CMSPs en 100 µl de medio RPMI completo en placas de 96 fosas de fondo en U durante 3 días y se agregó 1 µCi de [<sup>3</sup>H]-timidina (New England Nuclear Life Science, Boston, Massachusetts, EEUU) durante las últimas 18 h del cultivo. Se cosecharon las células en papel de lana de vidrio (Whatmann) en un cosechador de células Packard Filtermate (Packard Instruments, La Grange, Illinois, EEUU), se secó y se le agregó 2 ml de solución de centelleo (4 g de PPO y 100 mg de POPOP disueltos en 1.000 ml de tolueno). La radioactividad fue analizada en un contador de centelleo β (Beckton Dickinson) y los resultados expresados como cpm promedio de cultivos por triplicado ± desvío estándar.

### 6. Extracción de proteínas

#### 6.1. Lisados celulares

Un millón de células fueron lavadas 3 veces con PBS, centrifugadas a 2.000 rpm durante 10 min a 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°C, 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 mezclaron con 3 µl de 0,2 M de ditioneitol (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).

## 6.2. Cuantificación de proteínas

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

## 7. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y ensayos de *Western blot*

Se utilizó el método discontinuo en placa descrito por Hames [229], 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  $\mu$ l de una solución al 10% de persulfato de amonio, 4  $\mu$ l de TEMED y H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> c.s.p. 6 ml), y un gel de apilamiento de 3% de poliacrilamida (292,5  $\mu$ l de acrilamida: bisacrilamida 30:0,8, 550  $\mu$ l de *buffer* de apilamiento 4X -0,5 M de Tris-HCl, 0,4% de SDS pH 6,8-, 13  $\mu$ l de una solución al 10% de persulfato de amonio, 3  $\mu$ l de TEMED y H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> c.s.p. 2.200  $\mu$ l). Se sembraron marcadores de peso molecular Mark12™ MW Standard (Invitrogen) y 20  $\mu$ g 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<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> 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, California, EEUU). 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<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> 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 AcMo anti- $\beta$ -actina (Santa Cruz Biotech).

Las membranas fueron bloqueadas con leche descremada (Bio-Rad) al 5% en TBS durante 16 h a 4°C. 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 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](http://www.scioncorp.com), Scion Corporation, Frederick, Maryland, EEUU). En primer lugar se sustrajo el *background*, posteriormente se utilizó la herramienta “*thresholding*” con el objeto de 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 píxeles.

Los Ac utilizados en los ensayos de *Western blot* fueron los siguientes:

**Anti-MICA:** Se empleó 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 [54]), incubando las membranas durante 16 h. Como Ac secundario se utilizaron inmunoglobulinas (Ig) G de cabra anti-IgG de conejo conjugadas a HRP (Bio-Rad).

**Anti- $\beta$ -actina:** Se empleó una dilución 1/3000 del AcMo I-19 (Santa Cruz Biotech), incubando las membranas durante 1 a 16 h. Como Ac secundario se utilizaron IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugadas a HRP (Bio-Rad).

## 8. Marcación celular con fluorocromos (DiOC<sub>18</sub>, CFSE y PKH26)

Las líneas de melanoma M8, Mel-888, el clon 1 o los linfocitos T fueron marcados con CFSE, DiOC<sub>18</sub> o PKH26 de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante. Brevemente, las líneas celulares se marcaron adheridas a placa, mientras que los linfocitos T se marcaron en suspensión. Las células se incubaron en medio RPMI completo con una concentración final de 10  $\mu$ M de CFSE, 30  $\mu$ M de DiOC<sub>18</sub>, o 2  $\mu$ M de PKH26 durante 15 min, 1 h o 5 min respectivamente a 37°C en estufa de atmósfera controlada. Posteriormente las células se lavaron 2 veces con PBS y se mantuvieron en medio RPMI completo.

## 9. Citometría de Flujo

### 9.1. Anticuerpos para inmunomarcación

Para la detección de MICA/B por citometría de flujo (CF) se utilizaron 10 $\mu$ l de una solución de 10  $\mu$ g/ml del AcMo anti-MICA/B D7 generado en nuestro laboratorio (IgG<sub>2b, $\kappa$</sub> , [230]). 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 a 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. El AcMo anti-HLA-E, MEM-E08 fue de Santa Cruz Biotech.

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. Como Ac secundario se utilizó una dilución 1/40 de F(ab')<sub>2</sub> de cabra contra IgG de ratón, conjugadas a isotiocianato de fluoresceína (FITC -DAKO, Glostrup, Dinamarca-) o ficoeritrina (PE -DAKO-).

### 9.2. Inmunomarcación de superficie

Para las inmunomarcaciones indirectas se utilizaron 500.000 células por tubo. Las células se lavaron con PBS con 1% de SFB y 0,1% de NaN<sub>3</sub> (PBS/SFB/NaN<sub>3</sub>). Posteriormente se incubaron 15 min a 37°C con 10% de suero normal de cabra en PBS, con el objeto de bloquear las uniones inespecíficas, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min, se descartaron los sobrenadantes y se resuspendieron en 10 µl del Ac primario. Seguidamente las células se incubaron durante 30 min en hielo, se lavaron 2 veces con 200 µl de PBS/SFB/NaN<sub>3</sub>, se resuspendieron en 20 µl de una dilución 1/40 del Ac secundario conjugado con FITC o PE diluido en PBS/SFB/NaN<sub>3</sub> y se incubaron durante 30 min en hielo y oscuridad. Posteriormente las células se lavaron 2 veces con 200 µl de PBS/SFB/NaN<sub>3</sub> y se resuspendieron en 400 µl de PBS con 0,1% de NaN<sub>3</sub>. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACScalibur o FACSAria (Becton Dickinson) y los datos obtenidos se analizaron con el programa WinMDI 2.8 (<http://facs.scripps.edu>).

Para las inmunomarcaciones directas se utilizaron 500.000 células por tubo. Las células se lavaron con PBS/SFB/NaN<sub>3</sub>. Posteriormente se incubaron 15 min a 37°C con 10% de suero normal de ratón en PBS, con el objeto de bloquear las uniones inespecíficas, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min, se descartaron los sobrenadantes y se resuspendieron en 10 µl de PBS/SFB/NaN<sub>3</sub> sobre los que se agregaron 3 µl AcMo anti-CD3-SPRD (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, EEUU), o 3 µl AcMo anti-CD4-FITC (Southern Biotech), o 5 µl AcMo anti-CD56-FITC (Southern Biotech), según se indica en cada experimento. Seguidamente las células se incubaron durante 30 min en hielo, se lavaron 2 veces con 200 µl de PBS/SFB/NaN<sub>3</sub> y se resuspendieron en 400 µl de PBS con 0,1% de NaN<sub>3</sub>. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACScalibur o FACSAria (Becton Dickinson) y los datos obtenidos se analizaron con el programa WinMDI 2.8.

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

### 9.3. Inmunomarcación intracitoplasmática para IFN- $\gamma$

Se utilizaron  $10^6$  células por tubo. Las células se lavaron con 500  $\mu$ l de PBS/SFB/ $\text{NaN}_3$ . Posteriormente se incubaron 15 min a 37°C con 10% de suero normal de ratón en PBS, con el objeto de bloquear las uniones inespecíficas, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min, se descartaron los sobrenadantes, se resuspendieron en 10  $\mu$ l de PBS/SFB/ $\text{NaN}_3$  y se incubaron con 3  $\mu$ l de AcMo anti CD3-SPRD (Southern Biotech) y 5  $\mu$ l de AcMo anti CD56-FITC (Southern Biotech) durante 30 min en hielo. Posteriormente, las células se lavaron 2 veces con 200  $\mu$ l de PBS/SFB/ $\text{NaN}_3$ , se fijaron con 100  $\mu$ l de 4% de paraformaldehído en PBS a pH 7,4 (pfa) durante 20 min a t.a, se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 min y se lavaron con 1 ml de PBS. Luego las células se resuspendieron en 100  $\mu$ l de *buffer* de permeabilización (BP: 0,5 ml de 10% de saponina, 9,5 ml de PBS/SFB/ $\text{NaN}_3$ ), se incubaron durante 15 min a t.a, se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 min y se lavaron con 1 ml de BP. Las células se resuspendieron en 50  $\mu$ l de BP y se agregaron 10  $\mu$ l de AcMo anti-IFN- $\gamma$ -PE (IQProducts, Holanda) o CI IgG1-PE (IQProducts). Las células se incubaron durante 30 min a t.a, se lavaron con 1 ml de PBS/SFB/ $\text{NaN}_3$ , se resuspendieron en 100  $\mu$ l de PBS/SFB/ $\text{NaN}_3$  y se agregaron 100  $\mu$ l de 2% de pfa pH 7,4. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACScalibur y los datos obtenidos se analizaron con el programa WinMDI 2.8.

## 10. Ensayos de citotoxicidad y degranulación

### 10.1. Ensayo de citotoxicidad

Las relaciones efector:blanco (E:B) utilizadas fueron 20:1, 10:1 y 5:1 (células NK humanas). Se realizó la incubación de las células blanco (líneas celulares de melanomas humanos o LTCD4<sup>+</sup> activados con PHA e IL-2 que habían estado o no previamente en contacto durante 1 h con el clon C o el clon 1; ver sección "Ensayos de trogocitosis o transferencia de moléculas de membrana") con cromato de sodio radioactivo en solución acuosa (<sup>51</sup>Cr, Amersham Biosciences) a razón de 0,1 mCi/1x10<sup>6</sup> células, durante 1 h en baño de agua a 37°C. Se lavaron las células 3 veces con medio RPMI completo y se incubaron con distintos números de células efectoras durante 5 h en estufa de atmósfera controlada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> (volumen total: 200 $\mu$ l) en placa de 96 fosas con fondo en U. Posteriormente se cosecharon 100 $\mu$ l de los sobrenadantes de cultivo y se cuantificó la radiación en un contador  $\gamma$  (Clinigamma, LKB, Wallac, Turku, Finland). Los resultados obtenidos fueron transformados en % de lisis, utilizando la fórmula:

$$\% \text{ de lisis} = \frac{cpm_X - cpm_{LE}}{cpm_{MAX} - cpm_{LE}} \times 100$$

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 blanco marcadas, con el AcMo bloqueante anti-HLA de clase I W6/32 (ascitis diluida 1/1000) o su correspondiente CI durante 30 min a t.a. A continuación, estas células blanco fueron incubadas con las células efectoras como fue descrito previamente y los resultados fueron expresados como % de lisis.

### **10.2. Ensayo de degranulación de células NK**

Se sembraron 500.000 células NK en ausencia o en presencia de 500.000 células estimuladoras (LTCD4<sup>+</sup> activados con PHA e IL-2 que habían estado o no previamente en contacto durante 1 h con el clon C o el clon 1; ver sección "Ensayos de trogocitosis o transferencia de moléculas de membrana"). Las células fueron incubadas 18 h en estufa de atmósfera controlada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Como control positivo de degranulación se utilizaron células NK activadas durante 5 h con PMA a una concentración final de 250 ng/ml e inomicina a una concentración final de 0,5 µg/ml. Durante las últimas 4 h de cultivo se agregaron 5 µl de AcMo anti-CD107a-FITC (Becton Dickinson) o 5 µl del correspondiente CI. A continuación se lavaron las células y se agregaron 5 µl de AcMo anti-CD3-PE (Southern Biotech) y 1 µl de AcMo anti CD56-PE-Cy5 (Beckman Coulter - Immunotech, Marsella, Francia), y se incubaron durante 30 min a 4°C en oscuridad. Posteriormente, se lavaron las células con 500 µl de PBS/SFB/NaN<sub>3</sub> y se resuspendieron en 300 µl de PBS/SFB/NaN<sub>3</sub>. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSaria y los datos obtenidos se analizaron con el programa WinMDI 2.8.

### **11. ELISA para detección de IFN-γ**

Se realizaron co-cultivos en estufa de atmósfera controlada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> a una relaciones E:B 1:1 de células NK y células estimuladoras (LTCD4<sup>+</sup> activados con PHA e IL-2 que habían estado o no previamente en contacto durante 1 h con el clon C o el clon 1; ver sección "Ensayos de trogocitosis o transferencia de moléculas de membrana"). Luego de 18 h 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 de 96 fosas de fondo plano Maxisorp (NUNC, Rochester, Nueva Cork, EEUU). El IFN-γ capturado fue detectado usando un AcMo anti-IFN-γ biotinilado

(Pierce) y avidina marcada con HRP (Pierce), revelándose luego con o-fenildiamina (OPD, Sigma) o 3, 3', 5, 5'- tetrametisbenzidina (TMB, Sigma). Se obtuvo una curva estándar empleando IFN- $\gamma$  recombinante (eBioscience, San Diego, California, EEUU).

Se midieron las absorbancias a 492 nm (OPD) o 450 nm (TMB) utilizando un lector Titertek Multiscan MK II ELISA (Labsystems, Helsinki, Finlandia).

## 12. Ensayos de trogocitosis o transferencia de moléculas de membrana

Previa a la realización de los ensayos de trogocitosis, se sembraron 50000 células/fosa del clon C, el clon 1, o las líneas IIB-MEL-IAN, M8, o Mel888 (según se indican en cada experimento) en medio RPMI completo en placas de 24 fosas. Una vez que las líneas de melanoma alcanzaron un 90-95% de confluencia se realizaron co-cultivos, durante diferentes tiempos, con  $10^6$  linfocitos T humanos presentes en CMSPs sin estimular o activados con mitógenos (PMA + Ionomicina) o citoquinas (PHA e IL-2), LTCD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> aislados y activados con PHA e IL-2, linfocitos T diferenciados *in vitro* hacia un perfil Th1 o Th2, o células NK estimuladas con IL-15. Se separaron las células no adherentes por resuspensión (separación física de los melanomas adherentes), se lavaron con PBS/SFB/NaN<sub>3</sub> y se centrifugaron 5 min a 2000 rpm. Posteriormente se realizaron las marcaciones en superficie como se describió en la **sección 9.2**. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACScalibur o FACSAria (Becton Dickinson) y los datos obtenidos se analizaron con el programa WinMDI 2.8.

A los fines de estudiar la transferencia de porciones de membrana desde la superficie de melanomas a la superficie de linfocitos T y viceversa, se marcaron las líneas de melanoma M8, Mel-888 o el clon 1 adheridas a placa o linfocitos T activados con PHA e IL-2, con los fluorocromos CFSE o DiOC<sub>18</sub>. Posteriormente, se realizaron co-cultivos de 1 h de los melanomas marcados con linfocitos T activados sin marcar o de los linfocitos T activados marcados con el clon 1 sin marcar. Seguidamente, las células se lavaron 2 veces con 200  $\mu$ l de PBS/SFB/NaN<sub>3</sub>, y se resuspendieron en 400  $\mu$ l de PBS con 0,1% de NaN<sub>3</sub>. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACScalibur o FACSAria (Becton Dickinson) y los datos obtenidos se analizaron con el programa WinMDI 2.8.

Por otro lado con el fin de evaluar la transferencia de porciones de membrana en las que se encontraba MICA desde la superficie de melanomas a la superficie de linfocitos T, se realizaron co-cultivos de 1h de linfocitos T presentes en CMSP activados con PHA e IL-2 con el clon 1 que previamente fue marcado con DiOC<sub>18</sub> o CFSE. Se separaron los linfocitos por resuspensión, se lavaron con PBS/SFB/NaN<sub>3</sub> y se centrifugaron 5 min a 2000 rpm. Posteriormente se realizó la inmunomarcación en superficie para MICA/B como se describió en la **sección 9.2**. Seguidamente las células se lavaron 2 veces con 200  $\mu$ l de PBS/SFB/NaN<sub>3</sub> y se agregaron 3  $\mu$ l AcMo anti-CD3-SPRD (Southern Biotech). Por último las

células se lavaron 2 veces con 200  $\mu$ l de PBS/SFB/ $\text{NaN}_3$ , y se resuspendieron en 400  $\mu$ l de PBS con 0,1% de  $\text{NaN}_3$ . Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSAria (Becton Dickinson) y los datos obtenidos se analizaron con el programa WinMDI 2.8.

### **13. Estudios de las consecuencias funcionales de la transferencia de moléculas de membrana**

#### **13.1 Citotoxicidad**

Se incubaron durante 2 h en baño de agua a 37°C LTCD4<sup>+</sup> activados con PHA e IL-2, que habían estado o no previamente en contacto durante 1 h con el clon C o el clon 1, con cromato de sodio radioactivo en solución acuosa (<sup>51</sup>Cr). Se lavaron las células 3 veces con medio RPMI completo y se incubaron con distintos números de células efectoras durante 5 h en estufa de atmósfera controlada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se evaluó la citotoxicidad mediada por células NK como se detalló en la **sección 10.1**.

#### **13.2 Degranulación de células NK**

Se sembraron 500.000 células NK en ausencia o en presencia de 500.000 LTCD4<sup>+</sup> activados con PHA e IL-2 que habían estado o no previamente en contacto durante 1 h con el clon C o el clon 1. Las células fueron incubadas 18 h en estufa de atmósfera controlada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Se evaluó la degranulación de células NK como se detalló en la **sección 10.2**.

#### **13.3 Producción de IFN- $\gamma$ por células NK y ensayos de bloqueo**

Se realizaron co-cultivos a una relaciones E:B 1:1 de células NK y LTCD4<sup>+</sup> activados con PHA e IL-2 que habían estado o no previamente en contacto durante 1 h con el clon C, el clon 1, IIB-MEL-IAN, M8 o Mel-888 en estufa de atmósfera controlada a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 18 h se cosecharon los sobrenadantes de cultivo y se utilizaron para evaluar la presencia de IFN- $\gamma$  por ELISA de captura como se detalló en la **sección 11**.

En algunos ensayos se preincubaron las células NK con el AcMo bloqueante anti-NKG2D humano, 1D11 (eBioscience) o su correspondiente CI (IgG<sub>2b</sub>) a 10  $\mu$ g/ml, o con los AcMo bloqueantes anti-NKp30 (F252), anti-NKp44 (KS38), anti-NKp46 (KL247; cedidos gentilmente por el Dr Alessandro Moretta, University de Génova, Génova, Italia [231]) o sus correspondientes CI (IgM) a una dilución 1/1, 1/8 y 1/2, respectivamente, durante 30 min a t.a. A continuación estas células fueron incubadas con las células estimuladoras como se describió previamente con el objeto de evaluar la secreción de IFN- $\gamma$  por ELISA.

#### 14. Inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal

Con el objeto de estudiar la localización intracelular de MICA en LTCD4<sup>+</sup> activados se realizó la siguiente marcación. Se utilizaron 500.000 LTCD4<sup>+</sup> aislados y activados con PMA e Ionomicina, los que se lavaron con PBS/SFB/NaN<sub>3</sub>, se incubaron 15 min a 37°C con 10% de suero normal de cabra en PBS, se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 min, se resuspendieron en 50 µl una dilución 1/1000 de líquido ascítico del AcMo W6/32. (como Ac CI se utilizó una dilución equivalente del AcMo BI24) y se incubaron durante 30 min en hielo. Seguidamente las células se lavaron 2 veces con 200 µl de PBS/SFB/NaN<sub>3</sub>, se resuspendieron en 30 µl de una dilución 1/50 del Ac secundario marcado con Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories, West Grove, PA) diluido en PBS/SFB/NaN<sub>3</sub> y se incubaron durante 30 min en hielo y oscuridad. Posteriormente las células se lavaron 2 veces con 200 µl de PBS/SFB/NaN<sub>3</sub>, y se resuspendieron en 150 µl medio RPMI-1640. Seguidamente, las células se sembraron sobre cubreobjetos que habían sido previamente cubiertos con polilisina (con el fin de facilitar la adherencia de los linfocitos T a los cubreobjetos). Se incubaron durante 40 min a t.a, se lavaron 1 vez con PBS, y se fijaron con 100 µl de 4% de pfa durante 20 min a t.a. Posteriormente las células se lavaron con PBS, se incubaron durante 10 min a t.a en una solución de PBS con 10 mM de Glicina, se lavaron nuevamente con PBS y se incubaron 30 min a t.a en 150 µl de *buffer* de permeabilización (BP: PBS, 0,2% BSA-seroalbúmina bovina-, 0,05% saponina). A continuación, las células fueron incubadas durante 45 min a t.a con 50 µl de una solución de 200 µg/ml del AcMo anti-MICA D7 biotinilado o con el correspondiente AcMo CI diluido en BP. El Ac unido fue detectado incubando las células con 50 µl de una dilución 1/50 de estreptavidina-FITC (Pierce) durante 30 min a t.a. Posteriormente se lavaron suavemente las células con BP, luego con PBS y por último con H<sub>2</sub>O destilada. A continuación, los cubreobjetos se montaron con DABCO y se observaron 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 (Nikon, Kawasaki, Kanagawa, Japón).

Con el fin de investigar la transferencia de MICA a LTCD4<sup>+</sup> activados con PHA e IL-2, se realizó la siguiente marcación. Se cultivaron las líneas de melanoma en *chamber slides* (NUNC) hasta que alcanzaron un 80-90% de confluencia, se fijaron con 2% pfa en PBS durante 5 min a t.a y se bloquearon los sitios inespecíficos con suero normal de cabra diluido 1/20 en PBS durante 30 min a t.a. A continuación, las células fueron incubadas con 50 µg/ml del AcMo anti-MICA/B D7 o con el AcMo CI durante 30 min a t.a. El Ac unido fue detectado incubando las células con IgG de burro anti-IgG de ratón marcado con Cy3 (Jackson Immunoresearch Laboratories) durante 30 min a t.a. Posteriormente se realizó un co-cultivo durante 1 h de las líneas de melanoma marcadas, con LTCD4<sup>+</sup> que habían sido marcados previamente con AcMo anti-CD4-FITC. Se separaron los linfocitos por resuspensión (separación física de los melanomas adherentes) y se sembraron sobre cubreobjetos que habían sido previamente cubiertos con polilisina. Se incubaron durante 40

min a t.a, se lavaron 1 vez con PBS y se fijaron con 100  $\mu$ l de 4% de pfa durante 20 min a t.a. Tanto para las líneas tumorales como para los linfocitos T, 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 (Nikon).

Por otro lado con el objeto de evaluar la co-transferencia de porciones de membrana y de MICA desde la superficie de melanomas a la superficie de linfocitos T se realizaron co-cultivos de 1 h de LTCD4<sup>+</sup> aislados y activados con PHA e IL-2, con el clon 1 que fue primeramente marcado con DiOC<sub>18</sub> o PKH26 y luego marcado con AcMo anti-MICA/B D7 (como se describió anteriormente). Posteriormente se lavaron suavemente las células para evitar la ruptura de las sinapsis inmunológicas, se montaron los portaobjetos con DABCO y se observaron 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 (Nikon).

### **15. Análisis estadístico de los datos**

En los ensayos de linfoproliferación el análisis estadístico fue realizado aplicando el test de análisis de varianza (ANOVA) con la corrección de Bonferroni.

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

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

En todos los casos, el análisis se hizo empleando el programa de computación GraphPad InStat version 3.05 para Windows 95 (GraphPad Software, San Diego, California, EEUU).

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

## Resultados

### 1. Rol de las citoquinas IL-4 e IL-15 sobre la expresión de MICA en linfocitos T.

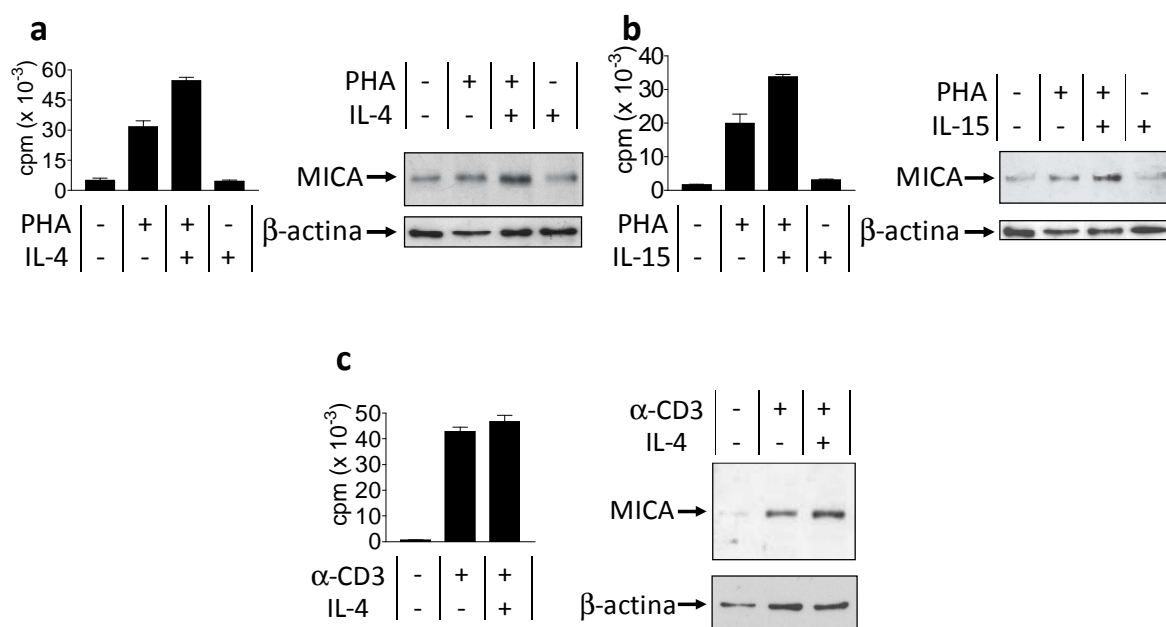
Los linfocitos T vírgenes requieren dos señales para su activación: la señal 1, desencadenada por la interacción entre el complejo mayor de histocompatibilidad-péptido (CMH-p) y el complejo TCR/CD3, y la señal 2 o coestimuladora, de la cual la interacción entre las moléculas CD28 y CD80/CD86 es la mejor estudiada [18].

Un evento clave para la progresión en el ciclo celular del linfocito T activado por las señales 1 y 2 es la síntesis y secreción de IL-2. Previamente en nuestro laboratorio se demostró que IL-2 es capaz de potenciar la expresión de MICA en linfocitos T estimulados con AcMo anti-CD3, mientras que el agregado de IL-2 en ausencia de otro estímulo induce más lentamente la expresión de MICA en dichas células [232]. Este fenómeno se debe a que linfocitos T en reposo expresan bajos niveles de la subunidad  $\alpha$  (CD25) del receptor de IL-2 [232]. Debido a que los linfocitos T activados con PHA son capaces de incrementar los niveles de expresión de CD25, consecuentemente aumentan la expresión de MICA en respuesta a IL-2 a niveles comparables a los generados por la estimulación con AcMo anti-CD3 [232]. No obstante, si bien IL-2 fue capaz de inducir los niveles totales de MICA, no fue suficiente para inducir la expresión de MICA en la superficie celular de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (LTCD4<sup>+</sup>) purificados y pre-activados con PHA [232].

A los fines de evaluar si otras citoquinas mitogénicas que comparten la cadena  $\gamma$  de su receptor con el receptor de IL-2 (tales como IL-4 e IL-15) pueden inducir la expresión de MICA en linfocitos T presentes en CMSPs, CMSPs aisladas, fueron estimuladas a distintos tiempos con diferentes dosis de IL-4 e IL-15. A diferencia de lo observado con IL-2, no se observó ningún aumento en la respuesta proliferativa o en la expresión de MICA a todas las dosis (5-25 ng/ml) y tiempos analizados (5-10 días, datos no mostrados). Aunque los linfocitos T vírgenes expresan bajos niveles del receptor de IL-4, su expresión aumenta rápidamente luego de la activación linfocitaria [233, 234]. Por tal motivo, se preactivaron CMSPs con PHA durante 18 h, se lavaron y se incubaron con IL-4 o IL-15. Al cabo de 48 h se analizó la respuesta proliferativa por incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina y la expresión de MICA por *Western blot*. Se observó que tanto la adición de IL-4 como de IL-15 produjeron un incremento en la respuesta proliferativa (**Fig. 10a** y **10b** respectivamente, paneles izquierdos) y en los niveles totales de MICA (**Fig. 10a** y



**10b** respectivamente, paneles derechos). Posteriormente, se evaluó la capacidad de IL-4 de potenciar la expresión de MICA en linfocitos T activados con AcMo anti-CD3. Se observó que el tratamiento conjunto con AcMo anti-CD3 e IL-4 no incrementó significativamente la respuesta proliferativa (**Fig. 10c**, panel izquierdo), pero aumentó la expresión de MICA. (**Fig. 10b**, panel derecho). Por lo tanto, IL-4 e IL-15 son capaces de inducir la expresión de MICA en CMSPs activadas. De manera similar a lo ocurrido con IL-2, cuando se evaluó por citometría de flujo (CF) la expresión de MICA en superficie de linfocitos T activados con los estímulos antes mencionados, dicha proteína fue detectada en niveles muy bajos (datos no mostrados). Por otra parte, diferentes dosis de citoquinas no mitogénicas tales como IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$  no fueron capaces de inducir la expresión de MICA en linfocitos T activados a distintos tiempos (datos no mostrados).

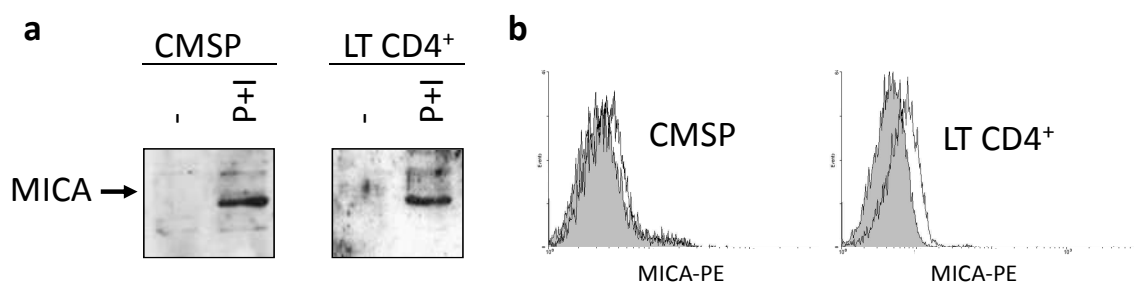


**Figura 10. Efectos de IL-4 e IL-15 sobre la expresión de MICA en CMSPs activadas.** Efecto de IL-4 e IL-15 sobre la respuesta proliferativa (panel izquierdo) y la expresión de MICA (panel derecho) en CMSPs preactivadas con PHA. Se incubaron CMSPs sin y con PHA durante 18 h, se lavaron e incubaron durante 48 h en ausencia o en presencia de **a)** 5 ng/ml de IL-4, o **b)** 10 ng/ml IL-15. **c)** Efecto de IL-4 sobre la respuesta proliferativa (panel izquierdo) y la expresión de MICA (panel derecho) en CMSPs estimuladas con AcMo anti-CD3 durante 72 h en ausencia o presencia de 5 ng/ml de IL-4. Se midió la respuesta proliferativa por incorporación de [ $^3$ H]-timidina y la expresión de MICA por *Western blot*. La flecha superior indica la posición de la banda de 65 kDa correspondiente a MICA, mientras que la flecha inferior indica la posición de la banda correspondiente a  $\beta$  actina (control de carga de proteínas). Los resultados presentados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados con CMSPs de diferentes dadores sanos.

IL-4 e IL-15 son capaces de inducir la expresión de MICA en CMSPs activadas.

## 2. Expresión de MICA en superficie de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados con PMA e Ionomicina.

Previamente, se demostró que linfocitos T activados con estímulos que promueven la microagregación de receptores de superficie inducen solamente niveles muy bajos de MICA en superficie celular [54, 79]. Con el fin de independizarnos de posibles efectos mediados o atribuibles a receptores de superficie, evaluamos el efecto de las drogas PMA e ionomicina (P+I), estímulos mitogénicos que simulan los procesos desencadenados a través de las moléculas CD3 y CD28 [235], sobre la expresión de MICA en CMSPs y en LTCD4<sup>+</sup> aislados. Se estimularon CMSPs o LTCD4<sup>+</sup> aislados por selección positiva con perlas magnéticas con P+I durante 72 h. Posteriormente se evaluó la expresión total de MICA por *Western blot* (**Fig. 11a**) y la expresión de MICA en superficie celular por CF utilizando un AcMo anti-MICA/B (D7) generado en nuestro laboratorio [114] (**Fig. 11b**). Se observó que la estimulación de las células con P+I fue capaz de inducir la expresión total de MICA tanto en CMSPs como en LTCD4<sup>+</sup> aislados (**Fig. 11a**), mientras que solo se detectaron niveles bajos de expresión de MICA en la superficie celular (**Fig. 11b**). Cabe aclarar que si bien el AcMo D7 también es capaz de reconocer a MICB, esta proteína no fue detectada en la superficie de linfocitos T activados cuando se uso un AcMo anti-MICB específico (datos no mostrados).



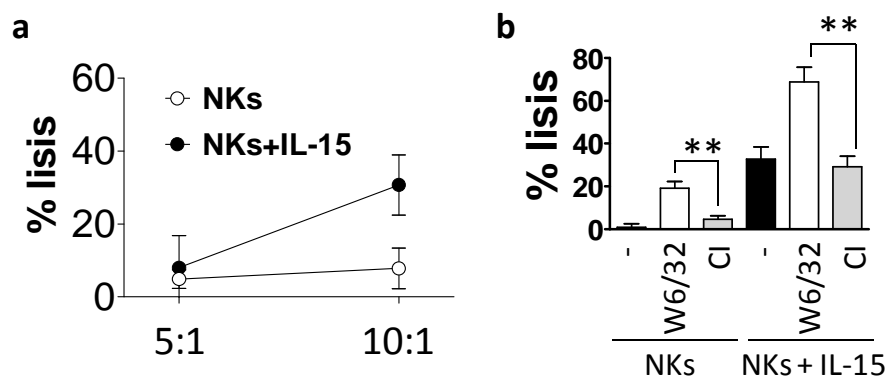
**Figura 11. Expresión de MICA en superficie de linfocitos T CD4<sup>+</sup> aislados o presentes en CMSPs estimulados con PMA e Ionomicina.** a) Se analizó por *Western blot* la expresión de MICA en linfocitos presentes en CMSPs y LTCD4<sup>+</sup> aislados con perlas magnéticas, cultivados en ausencia (-) o en presencia de 10 ng/ml de PMA y 1 µg/ml de Ionomicina (P+I) durante 72 h. La flecha indica la posición de la banda de 65 kDa correspondiente a MICA. b) Se analizó por CF la expresión de MICA en superficie de CMSPs o LTCD4<sup>+</sup> estimulados durante 72 h con 10 ng/ml de PMA y 1 µg/ml de Ionomicina, las células se marcaron con el AcMo anti-MICA/B D7 y se reveló con anti-Ig de ratón marcadas con ficoeritrina (PE, línea llena). Los histogramas grises corresponden a la marcación con Ac control de isotipo (CI). Los resultados presentados corresponden a un experimento representativo de tres experimentos independientes realizados con CMSPs y LTCD4<sup>+</sup> de diferentes dadores sanos.

Estímulos mitogénicos tales como P+I son capaces de inducir la expresión total de MICA pero los niveles de este NKG2DL detectados en superficie de linfocitos T son llamativamente bajos.

### 3. Consecuencias funcionales de la expresión de MICA en superficie de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados.

#### a. Citotoxicidad mediada por células NK.

Debido que la estimulación con P+I fue capaz de inducir niveles bajos de expresión de MICA en superficie de LTCD4<sup>+</sup>, se evaluó si dichas células adquirirían susceptibilidad a la lisis mediada por células NK. Para ello se realizaron ensayos de liberación de <sup>51</sup>Cr empleando LTCD4<sup>+</sup> aislados y activados como células blanco. En estos experimentos observamos que las células NK presentes en CMSPs sin estimular no indujeron la lisis de LTCD4<sup>+</sup> singeneicos en reposo (datos no mostrados) o activados con P+I durante 72 h (**Fig. 12a** y **12b**). El bloqueo de la interacción entre las moléculas de clase I del CMH y los receptores inhibitorios KIR mediante el AcMo anti-HLA de clase I W6/32 permitió observar un incremento en la lisis de LTCD4<sup>+</sup> activados (**Fig. 12b**). Asimismo, evaluamos el efecto de las células NK aisladas y activadas durante 3 días con IL-15 como efectoras de lisis contra LTCD4<sup>+</sup> activados con P+I durante 72 h (**Fig. 12a** y **12b**). En este caso observamos que las células NK activadas fueron capaces de lisar a los LTCD4<sup>+</sup> activados, y que dichas células se volvieron más susceptibles a la lisis cuando se bloqueó la interacción entre las moléculas de clase I del CMH y los receptores inhibitorios KIR mediante el AcMo anti-HLA de clase I W6/32.



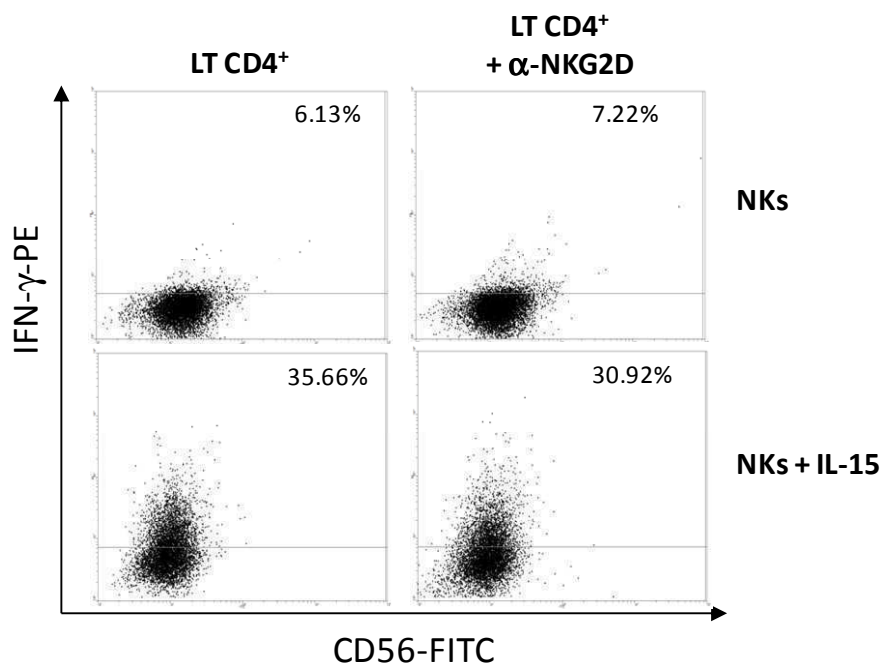
**Figura 12. Citotoxicidad de células NK en reposo y activadas contra linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados con PMA e Ionomicina.** a) Se aislaron LTCD4<sup>+</sup> con perlas magnéticas, se estimularon durante 72 h con 10 ng/ml de PMA y 0,5 µg/ml de Ionomicina y se utilizaron como células blanco de células NK singeneicas no estimuladas (NKs) o estimuladas con IL-15 durante 3 días (NKs + IL-15) a una relación Efecto:Blanco de 5:1 y 10:1 según se indica en el gráfico. b) LTCD4<sup>+</sup> aislados y activados como en (a) se utilizaron como células blanco de citotoxicidad mediada por células NK singeneicas no estimuladas (NKs) o estimuladas con IL-15 durante 3 días (NKs + IL-15) en ausencia o en presencia del AcMo anti-HLA clase I (W6/32) o un Ac CI. Las barras corresponden a la media ± SD de cada grupo de datos. \*\* p < 0,01

Además, el bloqueo del receptor NKG2D utilizando un AcMo anti-NKG2D 1D11 no fue capaz de restaurar la resistencia a la lisis de los LTCD4<sup>+</sup>, lo que sugiere que NKG2D no estaría involucrado en la lisis de LTCD4<sup>+</sup> activados mediada por células NK activadas con IL-15 cuando se bloquea la interacción de los receptores inhibitorios KIR con sus respectivos ligandos (datos no mostrados).

LTCD4<sup>+</sup> activados son sensibles a la destrucción por células NK activadas pero no por células NK en reposo y se vuelven más susceptibles a la lisis cuando se bloquea la interacción entre las moléculas de clase I del CMH y los receptores inhibitorios KIR.

**b. Producción de IFN- $\gamma$  por células NK luego del co-cultivo con linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados.**

Se ha demostrado que la unión del receptor NKG2D a su ligando dispara no sólo la citotoxicidad sino también la secreción de IFN- $\gamma$  por células NK [76-78]. Con el objeto de investigar si la interacción entre MICA presente en LTCD4<sup>+</sup> activados y NKG2D modula la producción de IFN- $\gamma$  en células NK en reposo o activadas se realizaron co-cultivos de LTCD4<sup>+</sup> estimulados con P+I durante 72 h, y células NK en reposo o estimuladas con IL-15 durante 72h. Luego de un co-cultivo de 18 h se realizó una triple marcación con AcMo anti-CD3, anti-IFN- $\gamma$  y anti-CD56 con el fin de analizar por CF la expresión intracelular de IFN- $\gamma$  en células NK. No se observó producción de IFN- $\gamma$  en células NK en reposo o activadas cuando fueron incubadas en ausencia de LTCD4<sup>+</sup> activados (datos no mostrados). Sin embargo, cuando las células NK fueron co-cultivadas con LTCD4<sup>+</sup> activados se indujo la producción de IFN- $\gamma$ , siendo mayor en células NK activadas (6,13% vs 35,66% de células IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> en la población de células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>; **Fig. 13**). Por otro lado, el bloqueo de NKG2D utilizando el AcMo anti-NKG2D 1D11 no fue capaz de inhibir la producción de IFN- $\gamma$  por parte de células NK en reposo y mostró una leve inhibición en el caso de células NK activadas (**Fig. 13**).



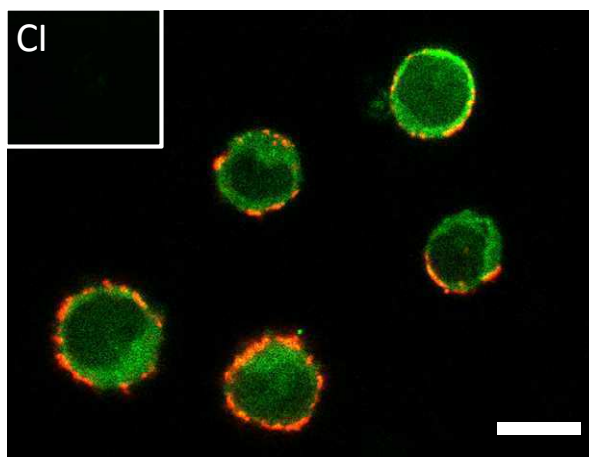
**Figura 13. Producción de IFN- $\gamma$  por células NK en reposo o activadas con IL-15 luego del co-cultivos con linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados.** Se aislaron LTCD4<sup>+</sup> con perlas magnéticas, se estimularon con P+I durante 72 h, y se cultivaron durante 18 h con células NK singeneicas no estimuladas (panel superior) o estimuladas durante 72 h con IL-15 (panel inferior) en ausencia (panel izquierdo) o en presencia de AcMo anti-NKG2D (panel derecho). Se evaluó por CF la presencia de IFN- $\gamma$  intracelular en células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>. Los resultados presentados corresponden a un experimento representativo de 3 experimentos independientes realizados con células de diferentes dadores sanos.

Existe una regulación de la producción de IFN- $\gamma$  por células NK activadas cuando son co-cultivadas con LTCD4<sup>+</sup> activados, pero no hemos podido demostrar que la interacción entre MICA y NKG2D esté involucrada en esta respuesta biológica.

#### 4. Localización celular de MICA en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados con PMA e Ionomicina.

Los resultados expuestos en esta Tesis hasta el momento y resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que MICA se expresa en linfocitos T activados [49, 79, 232]. Sin embargo, esta expresión parece jugar un rol menor en la modulación de las funciones efectoras de células NK. Así mismo, los datos de CF y *Western blot* sugieren que MICA podría quedar retenido dentro del linfocito T activado como depósito intracelular. Con el objeto de confirmar esta idea analizamos la expresión de MICA en LTCD4<sup>+</sup> activados con P+I durante 72 h por microscopia confocal (**Fig. 14**). Observamos que efectivamente, MICA se ubicó casi

exclusivamente en el interior del linfocito T dado que la fluorescencia verde correspondiente a MICA se detectó mayoritariamente en el citoplasma y no en la superficie celular ni en el núcleo. Tal localización intracitoplasmática de MICA fue claramente distinguible de la localización de superficie observada para el CMH de clase I (en color rojo).



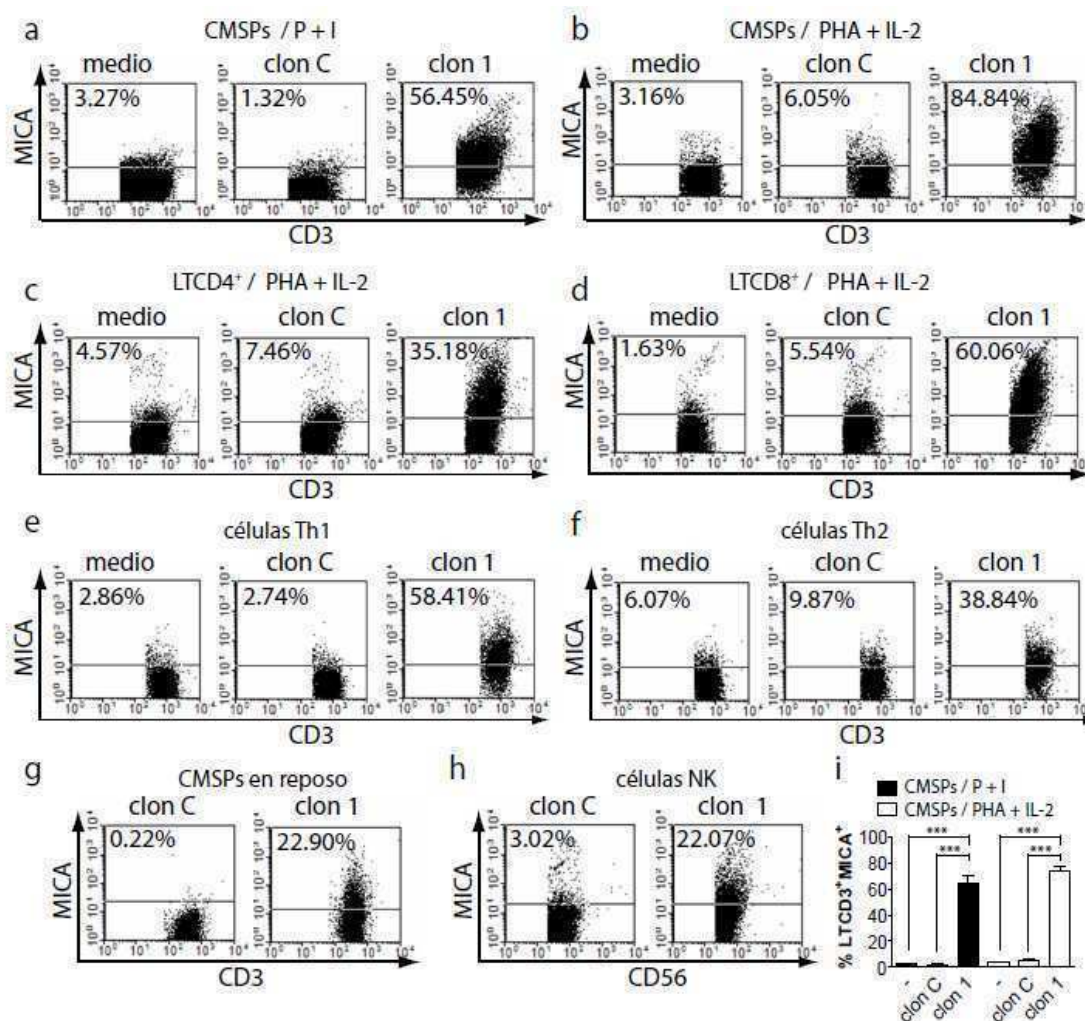
**Figura 14. Localización citoplasmática de MICA en linfocitos T activados.** Se aislaron LTCD4<sup>+</sup> con perlas magnéticas, se estimularon con P+I durante 72 h, se marcaron en superficie con AcMo anti-HLA de clase I W6/32 y con anti-IgG de ratón marcadas con Cy3. Posteriormente los LTCD4<sup>+</sup> se fijaron, permeabilizaron y se marcaron con AcMo D7 biotinilado, y estreptavidina-FITC. Las células fueron analizadas por microscopia confocal. La imagen corresponde a un aumento de 60X. **Inserto:** imagen de fluorescencia producida por los AcMo CI. Los resultados presentados corresponden a un experimento representativo de 3 experimentos independientes realizados con LTCD4<sup>+</sup> de diferentes dadores sanos. Barra = 10  $\mu$ m.

La mayor parte del conjunto de moléculas de MICA permanece como depósitos intracelulares en LTCD4<sup>+</sup> activados. Desde un punto de vista funcional, esto le otorga a los linfocitos T la capacidad de prevenir la lisis mediada por células NK dependiente de NKG2D, tal como lo indican los resultados de la **Fig.12**.

## 5. MICA en linfocitos T luego del contacto con líneas de melanomas humanos.

Habiendo demostrado que la expresión de MICA se induce en linfocitos T activados, pero que este NKG2DL se localiza mayoritariamente en compartimientos intracelulares, nos propusimos investigar si los tumores pueden promover la expresión de MICA en linfocitos T y regular la respuesta inmune anti-tumoral a través de la promoción del contacto con células NK en forma dependiente de NKG2D. A los fines de evaluar esta hipótesis analizamos si el contacto de linfocitos

T activados con células de melanomas humanos podría afectar la expresión y localización celular de MICA. Para ello elegimos como modelo experimental el cultivo de linfocitos T activados con un clon de la línea de melanoma IIB-MEL-LES transfectado con un plásmido de expresión de MICA (**clon 1**) que expresa altos niveles de MICA en superficie celular, y un clon de la misma línea transfectado con plásmido vacío (clon control o **clon C**) que no expresa MICA en superficie celular. Ambos clones fueron generados y caracterizados previamente en nuestro laboratorio [114]. Se eligió trabajar con IIB-MEL-LES debido a que este melanoma no expresa MICA ni MICB en superficie [114]. Se realizaron co-cultivos de 1 h del clon C o el clon 1 con linfocitos T humanos presentes en CMSPs activados con P+I (**Fig. 15a y 15i**), o con PHA e IL-2 (**Fig. 15b y 15i**), LTCD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> aislados por selección negativa y activados con PHA e IL-2 (**Fig. 15c y 15d** respectivamente), células diferenciadas *in vitro* hacia un perfil Th1 o Th2 (**Fig. 15e y 15f** respectivamente), CMSPs en reposo (**Fig. 15g**), o células NK estimuladas con IL-15 (**Fig. 15h**). Luego de estos co-cultivos cosechamos las células no adherentes y analizamos la expresión de MICA en superficie de células CD3<sup>+</sup> (**Fig. 15a-g y 15i**) o CD56<sup>+</sup> (**Fig. 15h**) por CF. En todos los casos analizados, solo detectamos altos niveles de MICA sobre la superficie de linfocitos T luego del co-cultivo con el clon 1, pero no luego del co-cultivo con el clon C o en ausencia de células tumorales. Curiosamente, luego del co-cultivo con el clon 1 detectamos MICA inclusive en la superficie de linfocitos T en reposo y células NK, células que carecen de depósitos intracelulares de MICA (**Fig. 15g y 15h** respectivamente), por lo que concluimos que quizás este NKG2DL podría provenir de las células tumorales y ser adquirido por las células linfoides por algún mecanismo de transferencia directa de moléculas de membrana celular entre células durante el co-cultivo de 1 h. Un análisis de la literatura publicada nos permitió conocer que hace algunos años se describió un novedoso fenómeno que involucra la transferencia de componentes de la membrana celular entre células del sistema inmune [206] y que posteriormente este fenómeno recibió el nombre de trogocitosis [207, 208].



**Figura 15. Detección de MICA en la superficie de linfocitos T o células NK luego del co-cultivo con una línea de melanoma que sobre-expresa MICA.** CMSPs estimuladas con P+I (a) o PHA e IL-2 (b), LTCD4<sup>+</sup> (c) o LTCD8<sup>+</sup> aislados y estimulados con PHA e IL-2 (d), células diferenciadas *in vitro* hacia un perfil Th1 (e) o Th2 (f), CMSPs en reposo (g) o células NK estimuladas con IL-15 (h) fueron co-cultivadas durante 1 h en ausencia (medio) o en presencia de la línea de melanoma IIB-MEL-LES transfectada con un plásmido vacío (clon C) o con un plásmido de expresión de MICA (clon 1). Se separaron las células linfoides por resuspensión (separación física de los melanomas que son adherentes), se marcaron con el AcMo anti-MICA/B D7 y con anti-IgG de ratón marcadas con PE. Luego se marcaron con un AcMo anti-CD3-SPRD o anti-CD56-FITC. Para analizar la expresión de MICA por CF en linfocitos T o en células NK aisladas, se seleccionó la región correspondiente a las células linfoides de acuerdo a sus parámetros de FSC y SSC (denominada R1). Luego se seleccionó la región correspondiente a las células CD3<sup>+</sup> o CD56<sup>+</sup> presentes en R1 (denominada R2), y por último se evaluó la expresión de MICA en las células presentes en R2. Los números presentes en los dot plots corresponden a los porcentajes de células positivas para MICA (el punto de corte fue determinado marcando las células con un AcMo CI. Los resultados presentados corresponden a un experimento representativo de 4 experimentos independientes. La media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes llevados a cabo con CMSPs de diferentes dadores sanos se muestra en i). Las barras negras corresponden a CMSPs estimuladas con P+I, las barras blancas corresponden a CMSPs estimuladas con PHA e IL-2. \*\*\*,  $p < 0.001$ .

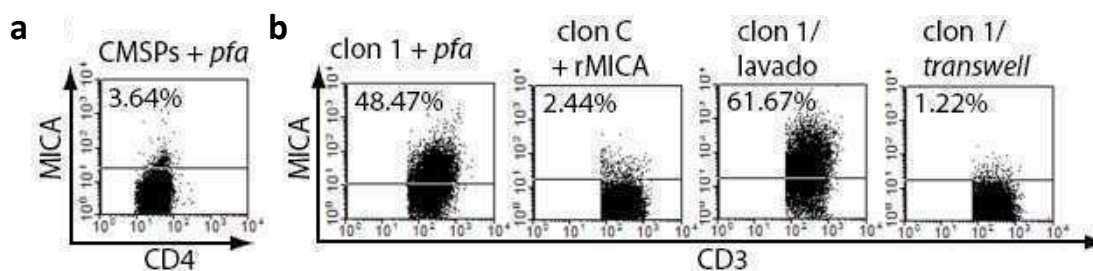


El co-cultivo de una línea de melanoma humano que sobre-expresa MICA en superficie con células linfoides en reposo o activadas promueve la aparición de células linfoides positivas para este NKG2DL, aún cuando éstas carecen de depósitos intracelulares de MICA. Consecuentemente, estos resultados indican que estaríamos ante un mecanismo de transferencia directa de moléculas de membrana entre células que se denomina trogocitosis.

## 6. Caracterización del fenómeno de transferencia de membrana en linfocitos T luego del contacto con melanomas humanos.

### a. Requerimientos celulares.

Los resultados obtenidos hasta el momento nos motivaron a estudiar los requerimientos celulares involucrados en este fenómeno de transferencia de moléculas de membrana. Con tal fin, realizamos experimentos de co-cultivo de CMSPs activadas y fijadas con pfa con células de melanoma viables (**Fig. 16a**) o de células de melanoma fijadas con pfa con CMSPs activadas y viables (**Fig. 16b**). En estos experimentos observamos que el proceso de transferencia de MICA fue activamente inducido por el linfocito T ya que experimentos realizados con células fijadas mostraron que MICA se transfiere de células tumorales viables o fijadas a linfocitos T viables (**Fig. 16b**) pero no a linfocitos T fijados (**Fig. 16a**). Asimismo el conjunto de moléculas de MICA detectado en superficie del linfocito T no se debió a una captura de MICA soluble liberada por el tumor ya que co-cultivos con el clon C en presencia de MICA recombinante soluble (rMICA) no mimetizaron el efecto (**Fig. 16b**). Por otro lado, el fenómeno de transferencia de MICA fue dependiente del contacto celular y no fue mediado por la captura de exosomas secretados por el tumor, ya que la transferencia sólo se previno al separar las células mediante dispositivos de *transwell* pero no por lavado exhaustivo del medio de cultivo en el que se encuentran las células tumorales (**Fig. 16b**). Asimismo, la molécula de adhesión CD54 (ICAM-1) no estuvo involucrada en el proceso de captura de MICA, ya que la utilización de un AcMo anti-CD54 bloqueante [236, 237] en experimentos similares no previno la captura de MICA por parte de los linfocitos T (datos no mostrados).

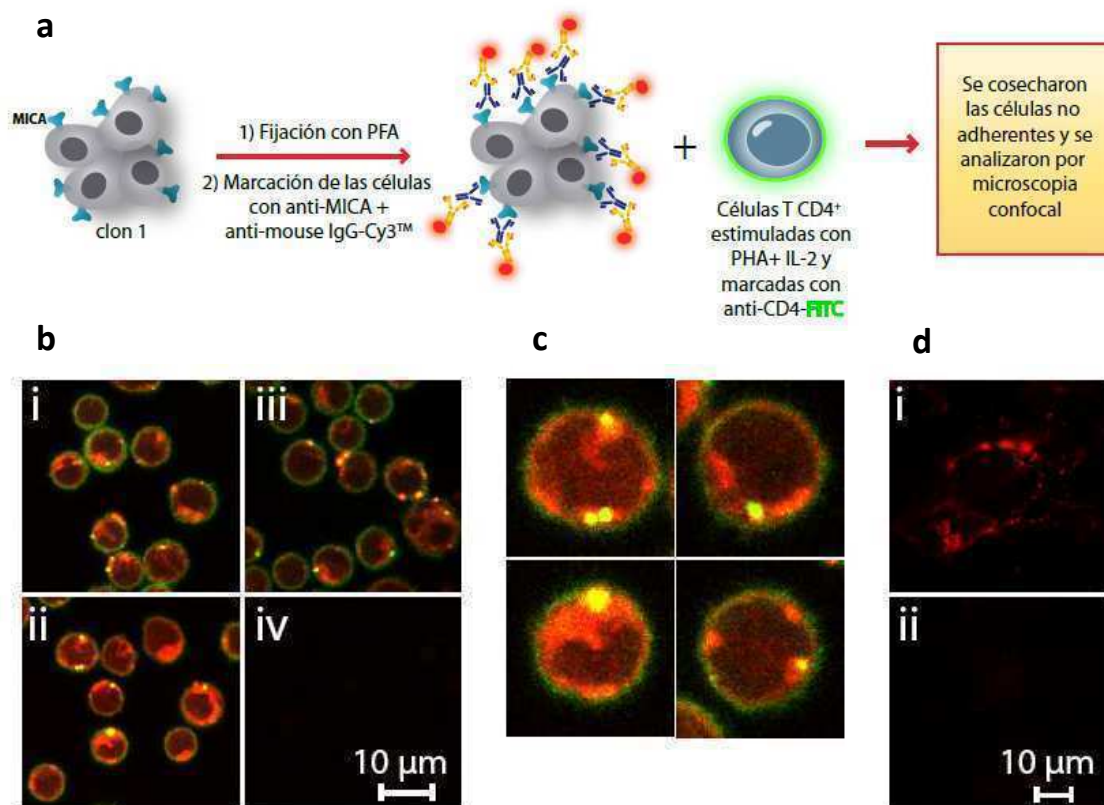


**Figura 16. Requerimientos celulares para la detección de MICA en la superficie de linfocitos T luego del co-cultivo con una línea de melanoma que sobre-expresa MICA.** (a) CMSPs fueron estimuladas con PHA e IL-2, fijadas con pfa al 2% y co-cultivadas durante 1 h con el clon 1. Se cosecharon las células no adherentes y se analizó la expresión de MICA en LTCD4<sup>+</sup> como se explicó en la Figura 15, solo que en lugar de utilizar un AcMo anti-CD3-SPRD para marcar las células linfoides se utilizó un AcMo anti-CD4-FITC. (b) CMSPs estimuladas con P+I fueron co-cultivadas durante 1 h con el clon 1 previamente fijado con pfa (clon 1 + pfa), con el clon C en presencia de MICA recombinante soluble (clon C + rMICA), con el clon 1 lavado exhaustivamente para eliminar factores solubles y exosomas previo al agregado de las CMSP activadas (clon 1/lavado), o con el clon 1 separado por dispositivos de *transwell* de las CMSP para evitar el contacto célula-célula (clon1/*transwell*). Se cosecharon las células no adherentes y se analizó la expresión de MICA en LTCD3<sup>+</sup> como se explicó en la Figura 15. Los números en los *dot plots* corresponden a los porcentajes de células positivas para MICA (el punto de corte fue determinado marcando las células con un AcMo CI). Los resultados presentados corresponden a un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

La transferencia de MICA depende estrictamente de la viabilidad del linfocito T y del contacto celular, por lo que se trataría de un proceso activo inducido por el linfocito T.

### b. Confirmación de la transferencia de MICA por microscopia confocal.

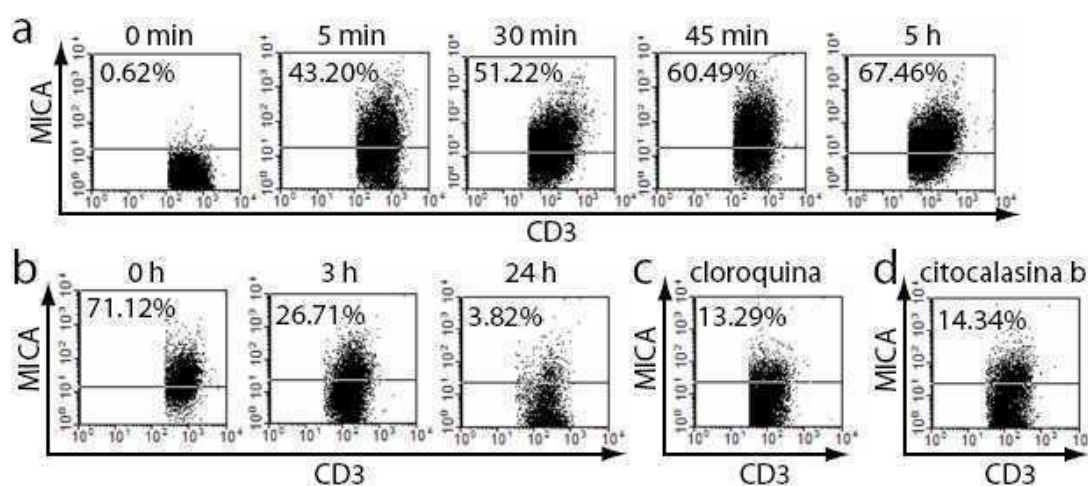
Con el objeto de confirmar el fenómeno de transferencia de MICA marcamos el conjunto de moléculas de MICA de superficie del clon 1 utilizando el AcMo D7 y un conjugado anti-IgG de ratón marcado con Cy3 (rojo). Simultáneamente, marcamos LTCD4<sup>+</sup> activados con PHA e IL-2 con AcMo anti-CD4-FITC, los co-cultivamos con las células tumorales marcadas y realizamos un análisis por microscopia confocal (de acuerdo al esquema experimental que se muestra en la **Fig. 17a**). Los resultados de estos experimentos mostraron que los LTCD4<sup>+</sup>, mayoritariamente teñidos de verde en superficie celular, exhibieron regiones de color amarillo en superficie celular que corresponden a las moléculas de MICA transferidas desde el tumor y que colocalizan con la molécula CD4 de superficie del linfocitos T, y regiones de color rojo con localización intracelular que corresponden a un conjunto de moléculas de MICA que el linfocito T capturó de la superficie del tumor pero que fueron rápidamente endocitadas (**Fig. 17b y 17c**). Como era de esperar, también observamos expresión de MICA en superficie del clon 1 por microscopia confocal (**Fig. 17d**).



**Figura 17. Transferencia de MICA desde la superficie de células tumorales a linfocitos T.** **a)** Esquema de la estrategia experimental utilizada para confirmar la transferencia de MICA desde la superficie celular del clon 1 a LTCD4<sup>+</sup> por microscopia confocal. **b)** El clon 1 fue fijado con pfa 2%, luego fue marcado con el AcMo D7 y revelado con anti-IgG de ratón marcadas con Cy3. Luego se realizaron co-cultivos de 1 h del clon 1 marcado, con LTCD4<sup>+</sup> que habían sido marcados previamente con AcMo anti-CD4-FITC. Se cosecharon las células no adherentes y se analizaron por microscopia confocal (ver esquema experimental que se detalla en **a**). En i-iii se muestran LTCD4<sup>+</sup> activados con PHA e IL-2 marcados con AcMo anti-CD4-FITC luego del co-cultivo con el clon 1 marcado con AcMo D7 revelado con anti-Ig de ratón marcadas con Cy3. En iv se muestran LTCD4<sup>+</sup> activados con PHA e IL-2 marcados con un AcMo CI-FITC luego del co-cultivo con el clon 1 marcado con un AcMo CI revelado con anti-Ig de ratón marcadas con Cy3. **c)** Imágenes ampliadas de algunos LTCD4<sup>+</sup> provenientes de **b)**. **d)** El clon 1 fue marcado con el AcMo D7 (i) o un AcMo CI (ii) y se reveló con anti-Ig de ratón marcadas con Cy3. Los resultados presentados corresponden a un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

### c. Cinética de la transferencia de MICA.

A los fines de evaluar la dinámica y el destino de las moléculas de MICA transferidas a la superficie del linfocito T, analizamos la cinética de este proceso. Para ello, realizamos co-cultivos (a distintos tiempos) del clon 1 con CMSPs activadas (**Fig. 18a**). Los resultados de estos experimentos mostraron que MICA se transfirió rápidamente a la superficie del linfocito T. Cinco minutos de co-cultivo fueron suficientes para detectar un alto porcentaje de linfocitos T CD3<sup>+</sup>MICA<sup>+</sup>. Además, MICA se detectó en la superficie de las células linfoides aún luego de 72 h de co-cultivo (datos no mostrados), por lo que dicha proteína persiste en superficie de los linfocitos T en tanto y en cuanto éstas permanezcan en contacto con el clon 1. Por otra parte, cuando los linfocitos T fueron co-cultivados durante 1 h con el melanoma que sobre-expresa MICA en superficie, separados de dichas células y cultivados en medio fresco sin células tumorales, se observó una disminución del porcentaje de células CD3<sup>+</sup>MICA<sup>+</sup> (**Fig. 18b**). Observamos que cuando se evaluó la expresión de MICA en células linfoides que recién habían sido separadas del co-cultivo con el clon 1 ("0 h", **Fig 18b**) el porcentaje de células CD3<sup>+</sup>MICA<sup>+</sup> fue 71,12% mientras que a las 3 h post-co-cultivo el porcentaje de células CD3<sup>+</sup>MICA<sup>+</sup> fue 26,71% lo que indica que hubo una disminución de aproximadamente el 40% en el porcentaje de células CD3<sup>+</sup>MICA<sup>+</sup>. De manera similar, a las 24 h luego del co-cultivo los niveles de MICA presentes en células linfoides fueron casi nulos (se detectaron menos del 4% de células CD3<sup>+</sup>MICA<sup>+</sup>). Sin embargo, en presencia de inhibidores de la endocitosis tales como cloroquina (**Fig. 18c**) o citocalasina b (**Fig. 18d**) se observó que los niveles de MICA en la superficie de linfocitos T a las 24 h se mantuvieron a niveles comparables a los que tenían a las 3 h post-cocultivo en ausencia de inhibidor, lo que sugiere que la disminución de los niveles de MICA en superficie de los linfocitos T se podría deber a un fenómeno de endocitosis. Esta idea está en concordancia con la detección de depósitos intracelulares de MICA capturado observados por microscopia confocal (**Fig. 17b y 17c**).



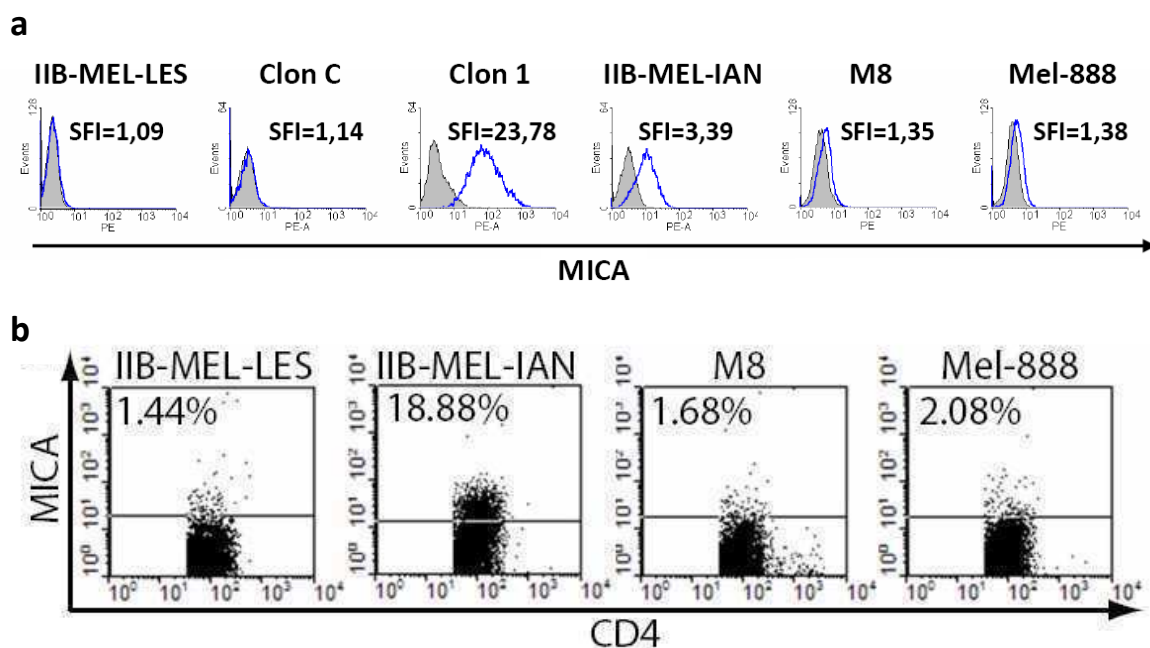
**Figura 18. Cinética de la transferencia de MICA y endocitosis de MICA capturada de la superficie de melanomas por los linfocitos T.** (a) Análisis cinético de MICA en la superficie de linfocitos T presentes en CMSPs estimuladas con P+I durante 72h, co-cultivadas con el clon 1 durante diferentes periodos de tiempos (indicados en la parte superior de cada *dot plot*). “0 min”: MICA en linfocitos T activados que no fueron co-cultivados con el clon1. Las células no adherentes fueron cosechadas y se analizó la expresión de MICA en LTCD3<sup>+</sup> como se explicó en la Figura 15. (b) CMSP estimuladas con PHA + IL-2 fueron co-cultivadas durante 1 h con el clon 1, cosechadas y cultivadas en ausencia de células tumorales durante 3 o 24 h. Posteriormente se analizó la expresión de MICA en LTCD3<sup>+</sup> como se explica en la Figura 15. “0 h”: MICA en linfocitos T activados que fueron co-cultivados durante 1 h con el clon 1 y en los que se analizó la expresión de MICA inmediatamente después del co-cultivo. (c, d) Efectos del cultivo con cloroquina (c) o citocalasina b (d) durante 24 h sobre la expresión de MICA en linfocitos T activados y cultivados como en (b). Se analizó la expresión de MICA en LTCD3<sup>+</sup> como se explicó en la Figura 15. Los números presentes en los *dot plots* corresponden a los porcentajes de células positivas para MICA (el punto de corte fue determinado marcando las células con un AcMo CI). Los resultados presentados corresponden a un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Mientras los linfocitos T permanecen en contacto con el clon 1 capturan y endocitan continuamente MICA, permitiendo su detección en la superficie de células T, y también como depósitos intracelulares.

#### d. Dependencia del tipo celular.

Con el objeto de estudiar si el fenómeno de transferencia observado es específico de la línea de melanoma que utilizamos o si es un fenómeno extensivo a otras líneas tumorales que sobre-expresan MICA en superficie, evaluamos si linfocitos T activados son capaces de adquirir MICA de otras líneas tumorales que expresan este NKG2DL en su superficie en forma endógena [114]. En primer lugar comparamos los niveles de expresión de MICA en las líneas de melanoma con las que trabajamos en nuestro laboratorio (**Fig. 19a**), y observamos que no todas las líneas celulares estudiadas expresan los mismos niveles de este NKG2DL en superficie, siendo el clon 1 y IIB-MEL-IAN los melanomas que expresaron mayores

niveles de MICA. Posteriormente, realizamos co-cultivos de 1 h de CMSPs activadas con PHA e IL-2 con las líneas de melanoma antes estudiadas (**Fig. 19b**). En estos experimentos observamos que la detección de MICA en superficie de linfocitos T activados fue un fenómeno que se observó también con el melanoma IIB-MEL-IAN pero no con los melanomas Mel-888 y M8, por lo que no es un fenómeno limitado a un melanoma en particular o a células transfectadas pero tampoco es un fenómeno generalizado observado con cualquier melanoma o tumor. Teniendo en cuenta que el clon 1 y IIB-MEL-IAN son las líneas que expresan mayores niveles de MICA en superficie, esta selectividad en la capacidad de transferencia de MICA podría deberse a las diferencias en las cantidades de esta proteína en la superficie de las células tumorales. Debido a que la línea de melanoma IIB-MEL-IAN expresa además de MICA a MICB, y teniendo en cuenta que el AcMo utilizado en nuestros experimentos reconoce ambos NKG2DL, es posible que MICB también sea transferida a la superficie de los linfocitos T activados.



**Figura 19. Detección de MICA en superficie de linfocitos T luego del co-cultivo con diferentes líneas de melanoma.** (a) Se analizó por CF la expresión en superficie de MICA/B en líneas de melanoma humano y en los clones C y 1 utilizando el AcMo D7 y anti-IgG de ratón marcadas con PE. Los histogramas grises corresponden a la marcación con Ac Cl. Cada línea celular tiene indicado el SFI. (b) CMSPs activadas con PHA e IL-2 fueron co-cultivadas durante 1 h con IIB-MEL-LES, IIB-MEL-IAN, M8 o Mel-888. Se cosecharon las células no adherentes y se analizó la expresión de MICA en LTCD4<sup>+</sup> como se explicó en la Figura 15, solo que en lugar de utilizar un AcMo anti-CD3-SPRD para marcar las células linfoides se utilizó un AcMo anti-CD4-FITC. Los números presentes en los dot plots corresponden a los porcentajes de células positivas para MICA (el punto de corte fue determinado marcando las células con un AcMo Cl). Los resultados presentados corresponden a un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

El fenómeno de transferencia de MICA no es un fenómeno limitado a un melanoma en particular o a células transfectadas pero tampoco es un fenómeno generalizado observado con cualquier melanoma o tumor.

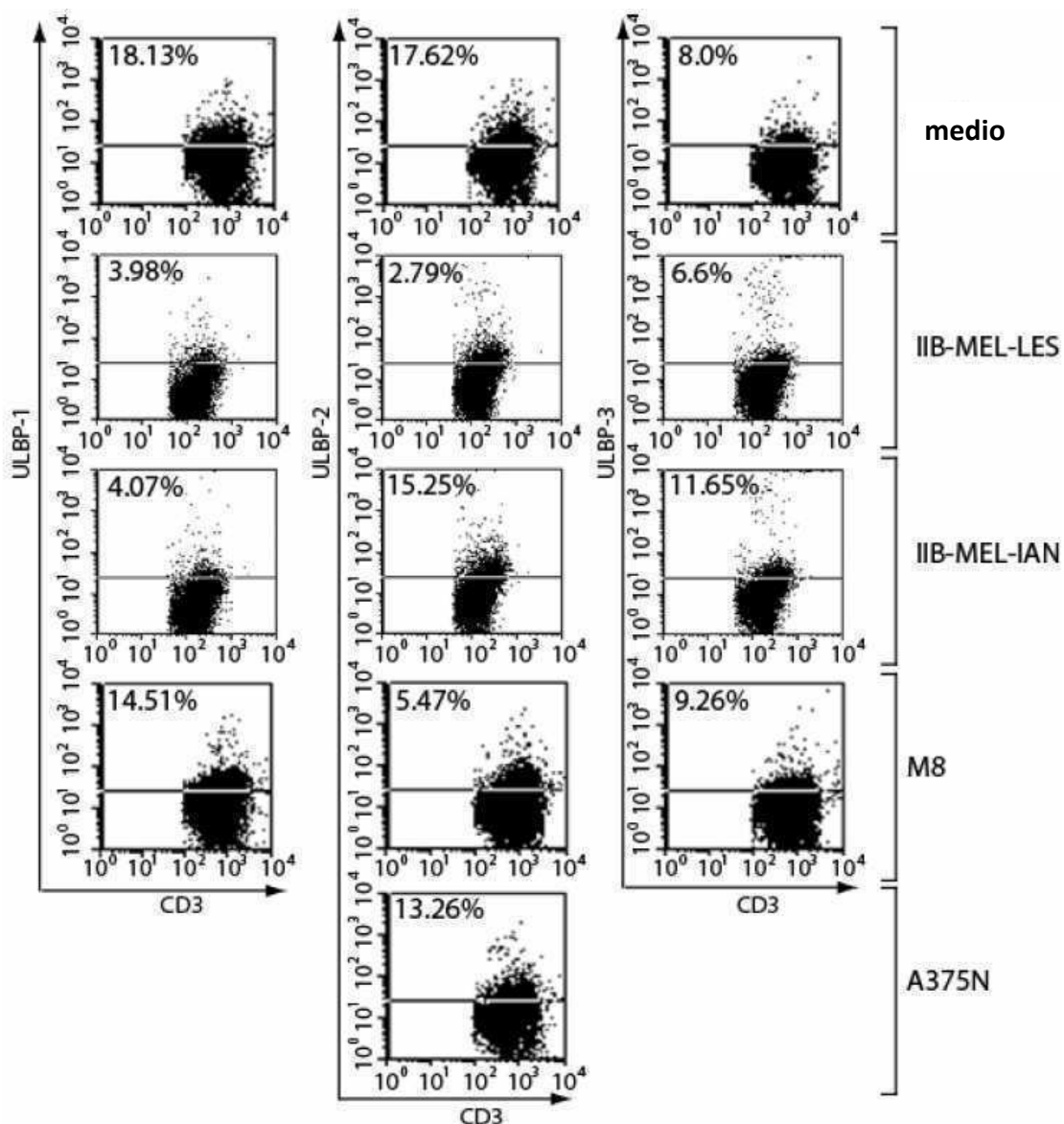
#### e. Transferencia de otros NKG2DLs.

Como se describió en la introducción, en humanos los NKG2DLs comprenden a las proteínas integrales de membrana MICA, MICB, ULBP-4 y RAET1G, y a las moléculas de superficie ancladas a la membrana celular por residuos de glucofosfatidilinositol (GPI) ULBPs-1 a -3 [202]. Con el objeto de investigar si los NKG2DLs anclados a residuos de GPI pueden ser transferidos a la superficie de linfocitos T activados, se utilizó una estrategia experimental similar a la empleada en la **Fig. 15** para evaluar la presencia de ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3 en la superficie de linfocitos T activados (**Fig. 20**). En estos experimentos observamos que ni la línea M8 o IIB-MEL-IAN, que expresan los tres ULBPs, ni IIB-MEL-LES o A375N, que solo expresan ULBP-2 (**Tabla 1**) fueron capaces de transferir estos NKG2DLs a la superficie de linfocitos T activados.

**Tabla 1:** Niveles de expresión de NKG2DLs en superficie de líneas de melanoma humano.

Líneas celulares	ULBP-1 <sup>a</sup>	ULBP-2 <sup>a</sup>	ULBP-3 <sup>a</sup>
IIB-MEL-LES	1	2	1,2
IIB-MEL-IAN	4	12,4	17,4
M8	3,1	19,7	2,6
A375N	1	4,4	1,1

**a:** Los valores mostrados corresponden al índice de fluorescencia específica (SFI) calculado como se detalla en la sección de Materiales y Métodos.



**Figura 20. Detección de ULBPs en superficie de linfocitos T activados luego del co-cultivo con diferentes melanomas.** CMSPs activadas con PHA e IL-2 fueron co-cultivadas durante 1 h en ausencia de células tumorales (medio) o con las líneas de melanoma IIB-MEL-LES, IIB-MEL-IAN, M8 o A375N. Se cosecharon las células no adherentes y se analizó la expresión de ULBP-1, -2 y -3 en LTCD3<sup>+</sup> como se explicó en la Figura 15. Los números presentes en los *dot plots* corresponden a los porcentajes de células positivas para ULBP (el punto de corte fue determinado marcando las células con un AcMo CI). Los resultados presentados corresponden a un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Solo detectamos transferencia de NKG2DLs que son proteínas integrales de membrana.

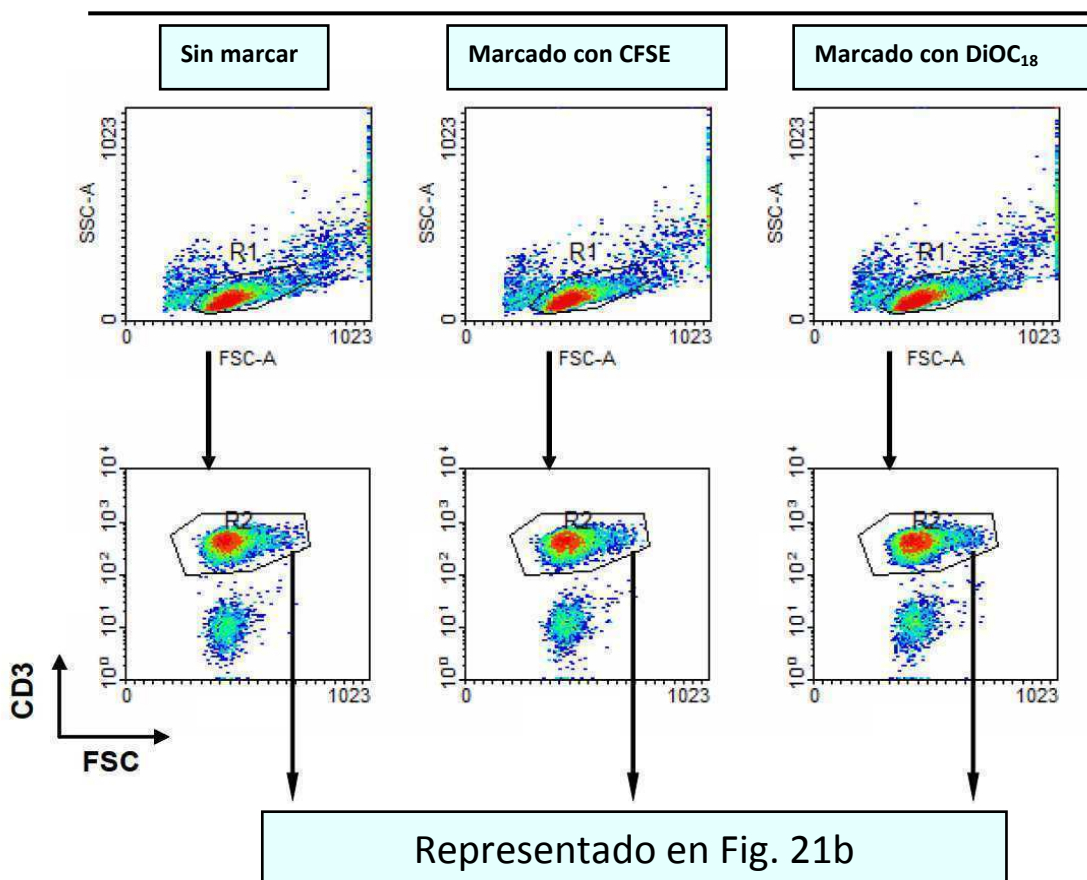


**f. Intercambio de porciones de membrana entre células tumorales y linfocitos T.**

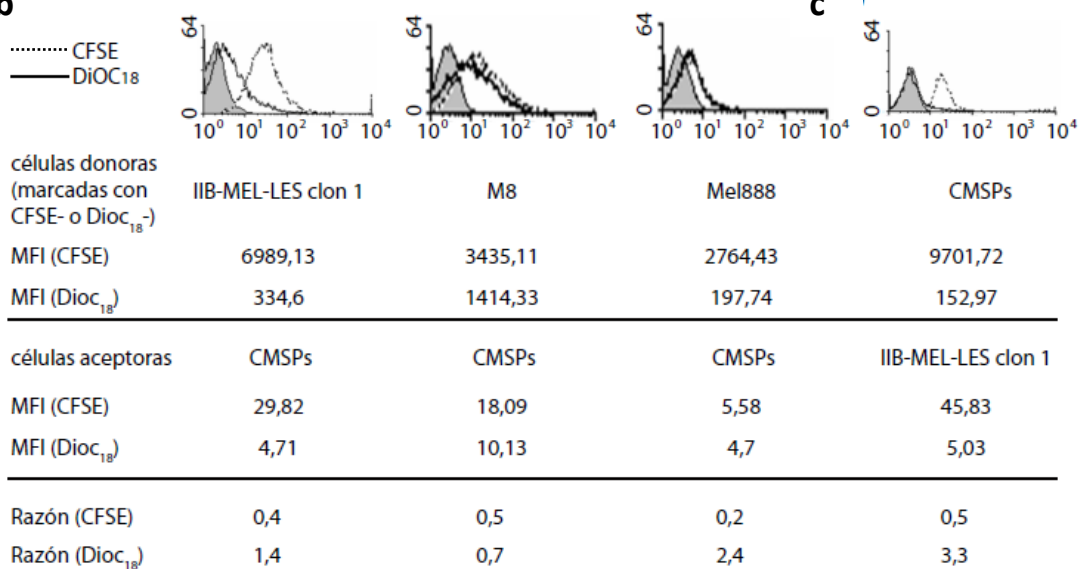
A la luz de los resultados obtenidos hasta el momento, nos propusimos confirmar la existencia del fenómeno de transferencia de membrana mediante una estrategia experimental diferente. Para ello, se marcaron diferentes líneas de melanoma humano con un fluorocromo de membrana (DiOC<sub>18</sub>) o con un fluorocromo que se conjugan covalentemente a proteínas citoplasmáticas y a los dominios intracelulares de diferentes proteínas de superficie celular (CFSE). Posteriormente se realizaron co-cultivos durante 1 h de dichas líneas con linfocitos T activados no marcados y se evaluó por CF la adquisición de fluorescencia por parte de los linfocitos T (**Fig. 21a**). Mediante este esquema experimental confirmamos que linfocitos T activados adquirieron porciones de membrana de las líneas tumorales marcadas con ambos fluorocromos (**Fig. 21b**). Simultáneamente, evaluamos si el fenómeno de transferencia de membrana era un fenómeno bidireccional, es decir si linfocitos T activados eran capaces de transferir porciones de membrana a las células tumorales. Para ello se utilizó la misma estrategia experimental que se detalla en la **Fig. 21a**, pero en este caso se marcaron linfocitos T activados presentes en CMSPs con DiOC<sub>18</sub> o CFSE y se co-cultivaron durante 1 h con el clon 1 sin marcar (**Fig. 21c**). En estos experimentos pudimos observar que la transferencia de porciones de membrana también ocurrió desde el linfocito T a las células tumorales, por lo que este fenómeno de trogocitosis es bidireccional. Como en el caso de la transferencia de MICA, fue necesario el contacto célula-célula para observar el fenómeno de trogocitosis, ya que no detectamos fluorescencia en las células aceptoras (células no marcadas) cuando fueron separadas de las células donoras (células marcadas con fluorocromos) mediante dispositivos de *transwell* (datos no mostrados). La evaluación del grado de trogocitosis reveló que el fluorocromo DiOC<sub>18</sub> fue transferido más eficientemente que el CFSE (tabla inferior a la **Fig 21**).

a

CMSPs activadas co-cultivadas con el clon 1



b



c

**Figura 21. Transferencia de membrana entre linfocitos T activados y melanomas.** **a)** Se muestran los gráficos de los parámetros de FSC vs SSC de CMSPs activadas con PHA e IL-2 y las regiones (R1 –células linfoides- y R2 –células CD3<sup>+</sup>-) que se realizaron para analizar la fluorescencia transferida a células CD3<sup>+</sup> que habían sido previamente co-cultivadas durante 1 h con el clon 1 sin marcar (panel izquierdo), el clon 1 marcado con CFSE (panel central) o el clon 1 marcado con DiOC<sub>18</sub> (panel derecho). Posteriormente se cosecharon las células no adherentes y se analizó por CF la fluorescencia presente en células no adherentes CD3<sup>+</sup>. **b-c)** Células aceptoras sin marcar (CMSPs activadas con PHA e IL-2 en **b** y el clon 1 en **c**) fueron co-cultivadas durante 1 h con células donoras marcadas con DiOC<sub>18</sub> o CFSE (clon 1, M8 o Mel888 en **b** y CMSPs activadas con PHA e IL-2 en **c**). Se determinó por CF la fluorescencia presente en células no adherentes CD3<sup>+</sup> en **b** o células tumorales luego de remover las CMSPs en **c**. Los histogramas grises corresponden al control negativo: linfocitos T activados que fueron co-cultivados con el clon 1, M8 o Mel888 sin marcar en **b** o el clon 1 co-cultivado con linfocitos T activados sin marcar en **c**. Los números representan el MFI de las células donoras marcadas con CFSE o DiOC<sub>18</sub>, o de células aceptoras que capturaron porciones de membrana marcadas con los fluorocromos antes mencionados. El grado de trogocitosis se calculó para cada fluorocromo como la razón entre el MFI de las células aceptoras y el MFI de las células donoras multiplicado por 100. Los resultados presentados corresponden a un experimento representativo de 3 experimentos independientes. El incremento en la fluorescencia en células aceptoras luego del co-cultivo con las células donoras marcadas con DiOC<sub>18</sub> o CFSE fue estadísticamente significativo, comparado con las células aceptoras cultivadas solas ( $p < 0.05$ ).

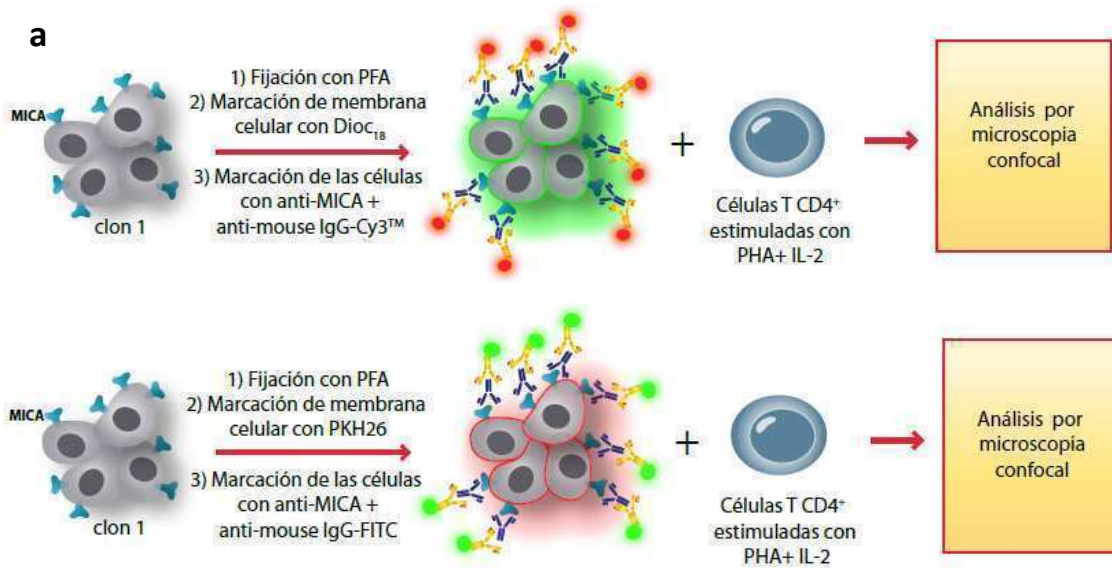
En función de los resultados obtenidos, confirmamos que linfocitos T activados son capaces de adquirir porciones de membrana provenientes de células tumorales mediante un proceso conocido como trogocitosis, este fenómeno depende del contacto celular y se trata de una transferencia bidireccional de porciones de membrana.

#### **g. Co-transferencia de porciones de membrana y MICA.**

Con el fin de demostrar la co-transferencia de porciones de membrana y de MICA, realizamos la marcación del clon 1 con fluorocromos de membrana tales como DiOC<sub>18</sub> (verde) o PKH26 (rojo). Seguidamente, realizamos la marcación de MICA en estas células utilizando el AcMo D7 y un conjugado anti-IgG de ratón marcado con Cy3 (rojo) o un conjugado anti-IgG de ratón marcado con FICT (verde). Posteriormente, realizamos co-cultivos durante 1 h del clon 1 (doblemente marcado) con LTCD4<sup>+</sup> activados con PHA e IL-2 sin marcar y analizamos las células por microscopia confocal (de acuerdo al esquema experimental que se muestra en la **Fig. 22a**). En las imágenes obtenidas (**Fig. 22b** y **22c**) observamos LTCD4<sup>+</sup> verdes y rojos para ambas combinaciones de marcación de las células tumorales (membrana tumoral marcada en verde y MICA marcado en rojo, o membrana tumoral marcada en rojo y MICA marcado en verde). En estos experimentos también pudimos observar claramente la co-transferencia de porciones de membrana donde se encuentra MICA desde la célula tumoral hacia los LTCD4<sup>+</sup>. Los

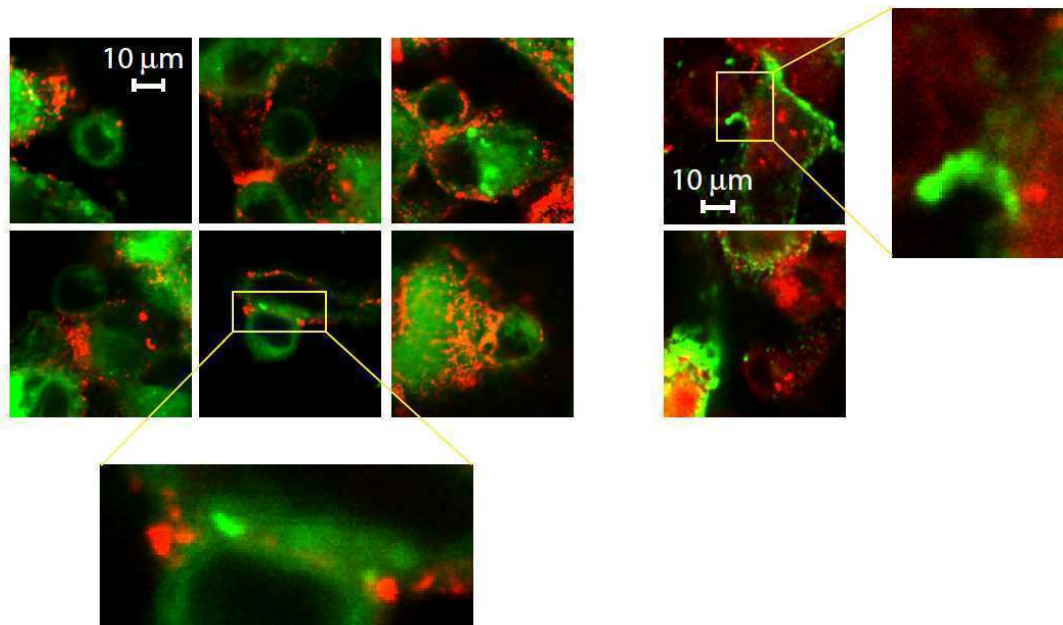
recuadros de las **Fig. 22 b y 22c** muestran una ampliación de la imagen que permite visualizar puntos de contacto entre ambas células donde está ocurriendo el fenómeno de transferencia de membrana (trogocitosis) desde la célula tumoral hacia el LTCD4<sup>+</sup>. Con el objeto de demostrar mediante otra estrategia experimental la co-transferencia de porciones de membrana y de MICA, realizamos la marcación del clon 1 con fluorocromos de membrana tales como DiOC<sub>18</sub> o CFSE. Posteriormente se realizaron co-cultivos durante 1 h del clon 1 marcado, con linfocitos T presentes en CMSPs activadas con PHA e IL-2 y se evaluó por CF la transferencia de MICA marcando las células linfoides con el AcMo D7 y la adquisición de fluorescencia por parte de los linfocitos T (**Fig. 22d**). Observamos que luego del co-cultivo detectamos linfocitos T que exhibieron fluorescencia verde correspondiente a CFSE o DiOC<sub>18</sub> y simultáneamente exhibieron fluorescencia roja correspondiente a MICA. El conjunto de estos resultados confirmó que linfocitos T adquieren MICA y otras moléculas de superficie de las células tumorales por trogocitosis durante el contacto íntimo que se establece durante el co-cultivo de ambas poblaciones celulares.

**Figura 22. Co-transferencia de porciones de membrana y MICA desde la superficie de células tumorales a linfocitos T.** **a)** Esquema de la estrategia experimental utilizada para confirmar la co-transferencia de porciones de membrana y de MICA desde la superficie celular del clon 1 a LTCD4<sup>+</sup> por microscopia confocal. **b-c)** El clon 1 fue fijado con pfa 2%, marcado con DiOC<sub>18</sub> (verde, **b**) o PKH26 (rojo, **c**), luego marcado con el AcMo D7 y revelado con anti-IgG de ratón marcadas con Cy3 (**b**) o con anti-Ig de ratón marcadas con FITC (**c**). A continuación se realizaron co-cultivos durante 1 h del clon 1 doblemente marcado con LTCD4<sup>+</sup> activados con PHA e IL-2 sin marcar y se analizaron los preparados por microscopia confocal. Las zonas ampliadas (recuadros) muestran la sinapsis entre las células tumorales y los LTCD4<sup>+</sup>. Aumento: 60X. **d)** CMSPs activadas con PHA e IL-2 fueron co-cultivadas durante 1 h con el clon 1 sin marcar o marcado con DiOC<sub>18</sub> o CFSE. Las células no adherentes fueron cosechadas y se analizó por CF la adquisición de fluorescencia verde y la expresión de MICA en LTCD3<sup>+</sup> como se explicó en la Figura 15. Los números en los *dot plots* corresponden a los porcentajes de células dobles positivas, es decir células que capturaron MICA y DiOC<sub>18</sub> o CFSE proveniente de la membrana celular del clon 1 marcado con los fluorocromos (los cuadrantes fueron establecidos con linfocitos T que no estuvieron en contacto con el clon 1 y marcados con un AcMo CI). Los resultados presentados corresponden a un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

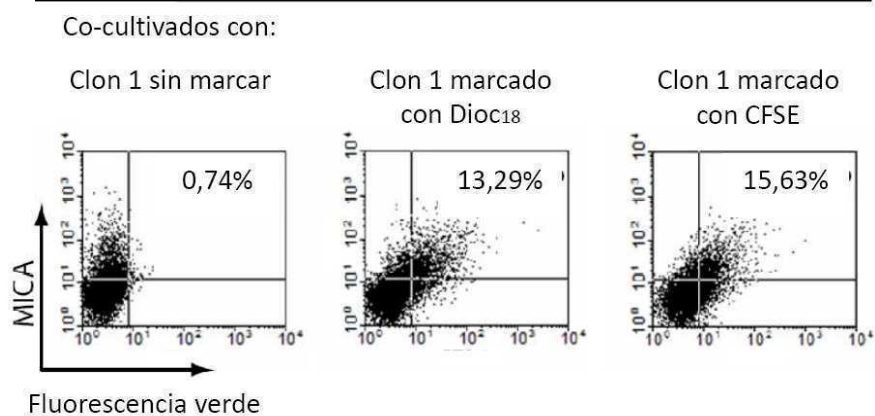


**b** Verde: DiOC<sub>18</sub>; Rojo: MICA

**c** Rojo: PKH26; Verde: MICA



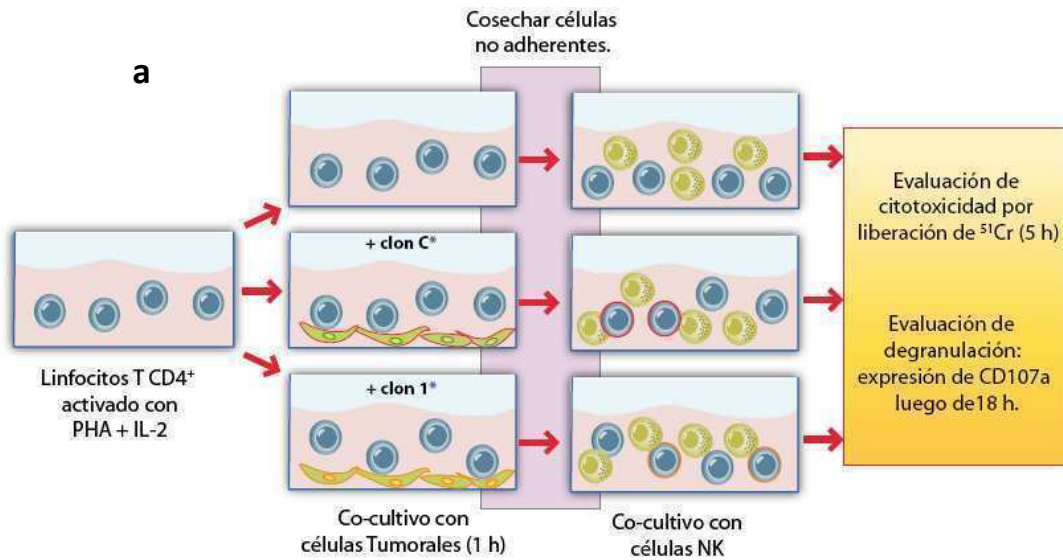
**d** Linfocitos T



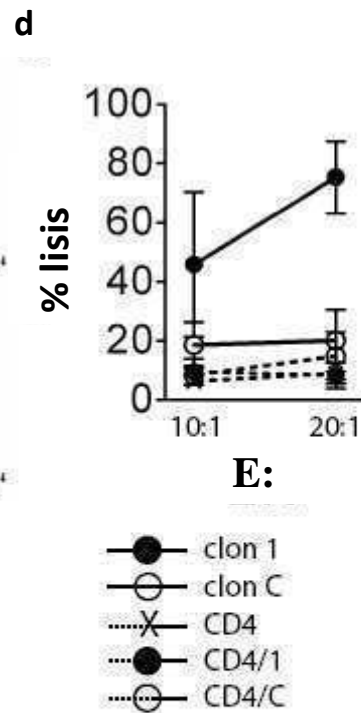
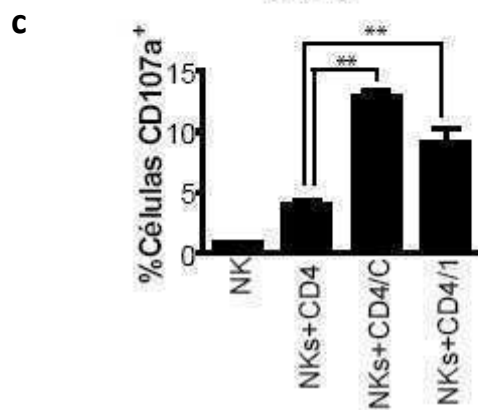
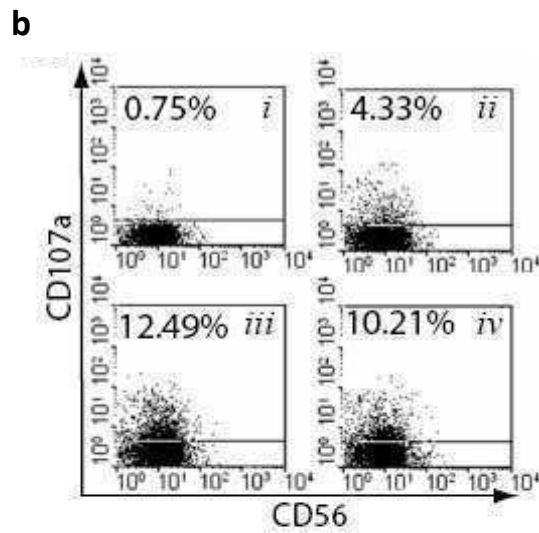
## 7. Consecuencias funcionales de la captura de moléculas de la superficie tumoral por linfocitos T.

### a. Degranulación y citotoxicidad de células NK.

Con el objeto de evaluar si las moléculas capturadas de la superficie de las células tumorales por los linfocitos T (tales como MICA) promueven la citotoxicidad mediada por células NK, realizamos co-cultivos de 18 h de células NK con LTCD4<sup>+</sup> activados que habían estado o no en contacto previamente durante 1 h con el clon C o el clon 1. Posteriormente cosechamos las células y realizamos una marcación con AcMo específicos acoplados a distintos fluorocromos, con el objeto de determinar el porcentaje de células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> (**Fig. 23a**). Observamos que el co-cultivo de células NK con LTCD4<sup>+</sup> que habían estado previamente en contacto con el clon C o el clon 1 produjo un aumento en el porcentaje de células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup> de un 4% a un 10-12% (**Fig. 23b** y **23c**). Sin embargo, cuando investigamos la citotoxicidad mediada por células NK mediante ensayos de liberación de <sup>51</sup>Cr observamos que los LTCD4<sup>+</sup> activados que nunca habían estado en contacto con células tumorales o aquellos que capturaron porciones de membrana del clon C o el clon 1 no eran susceptibles a la lisis mediada por células NK, mientras que el clon 1 (que expresa altos niveles de MICA en superficie) si era susceptible a la lisis (**Fig. 23d**). La pureza de los LTCD4<sup>+</sup> utilizados en los co-cultivos con células NK fue del 98,98±0,53% (LTCD4<sup>+</sup> solos, *n*=3), 99,02±0,21% (LTCD4<sup>+</sup> co-cultivados con el clon C, *n*=3) y 99,62±0,48% (LTCD4<sup>+</sup> co-cultivados con el clon 1, *n*=2). Estos valores nos permitieron descartar la posibilidad de que la degranulación de células NK observada fuera inducida por células tumorales contaminantes.



\* Los linfocitos T capturan moléculas tumorales de estas células

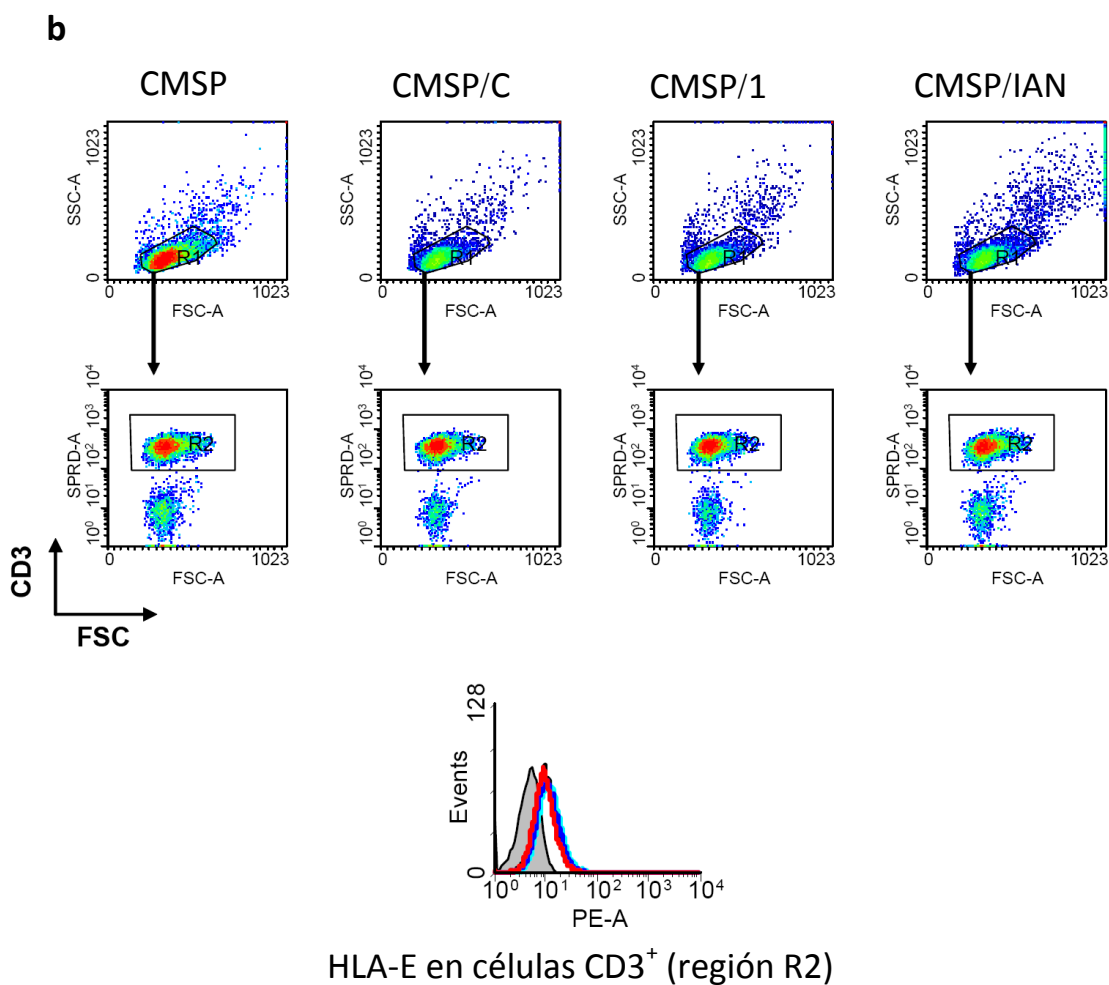
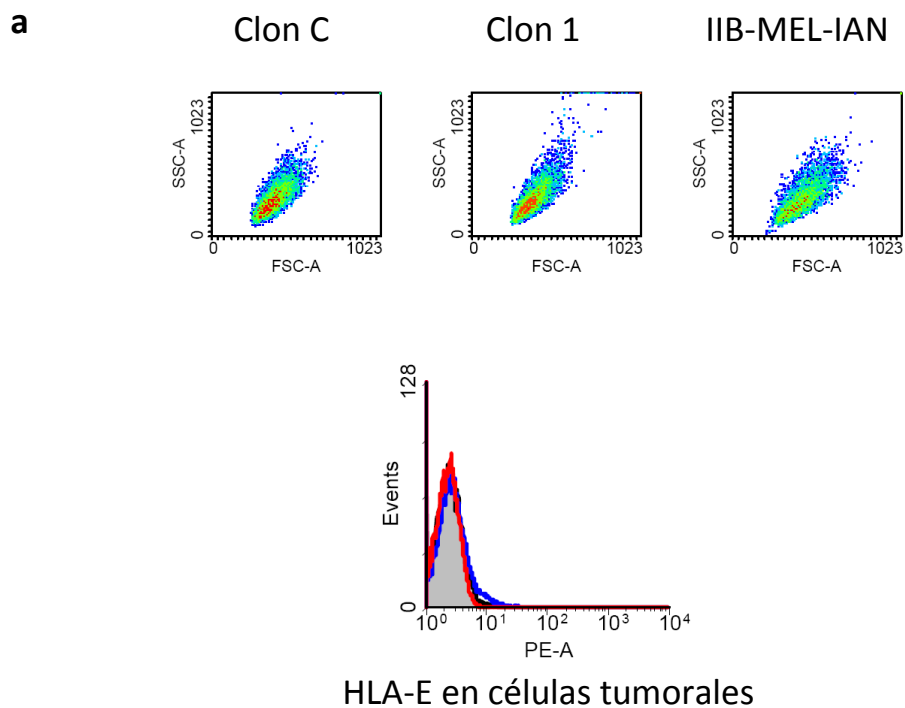


**Figura 23: Degranulación y citotoxicidad mediada por células NK.** a) Esquema de la estrategia experimental utilizada para evaluar la degranulación y la citotoxicidad mediada por células NK co-cultivadas con LTCD4<sup>+</sup> que habían estado o no previamente en contacto con células tumorales. b) Se co-cultivaron durante 18 h células NK aisladas por selección negativa con LTCD4<sup>+</sup> aislados y activados con PHA e IL-2 que habían estado durante 1 h previamente en presencia del clon C (iii), el clon 1 (iv) o en ausencia de células tumorales (ii). Células NK cultivadas en ausencia de LTCD4<sup>+</sup> activados se muestra en (i). Se cosecharon las células, se marcaron con AcMo anti-CD3-SPRD, anti-CD56-PE-Cy5 y anti-CD107a-FITC y se analizó por CF el porcentaje de células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>CD107a<sup>+</sup>. La media  $\pm$  SEM de 4 experimentos independientes llevados a cabo con células NK y LTCD4<sup>+</sup> activados con PHA e IL-2 de diferentes dadores sanos se muestra en c). \*\*,  $p < 0,01$ . d) Se realizaron ensayos de liberación de <sup>51</sup>Cr utilizando como células blanco el clon C, el clon 1, o LTCD4<sup>+</sup> aislados y activados con PHA e IL-2 que habían sido co-cultivadas durante 1 h previamente con el clon C (CD4/C), el clon 1 (CD4/1) o en ausencia de células tumorales (CD4). Relación Efector:Blanco 10:1 y 20:1. Los resultados presentados corresponden a un experimento representativo de 4 experimentos independientes realizados con células de distintos donantes sanos. Se muestra la media  $\pm$  SEM.

En función de los resultados obtenidos podemos concluir que LTCD4<sup>+</sup> que capturaron porciones de membrana de células tumorales son capaces de promover la degranulación de células NK, pero permanecen resistentes a la lisis mediada por dichas células.

La resistencia de los LTCD4<sup>+</sup> activados que habían experimentado contacto con el clon C o el clon 1 a la lisis mediada por células NK podría deberse a una expresión aumentada de la molécula HLA-E, un ligando del receptor inhibitorio CD94/NKG2A expresado principalmente en células NK. Con el objeto de evaluar esta posibilidad analizamos la expresión de HLA-E en superficie de células tumorales y de linfocitos T activados que estuvieron o no en contacto con células tumorales (**Fig. 24a** y **24b**). En las tres líneas de melanoma analizadas observamos que los niveles de expresión de HLA-E fueron casi nulos (**Fig. 24a**), mientras que los linfocitos T que estuvieron o no en contacto con células tumorales expresaron HLA-E en superficie en niveles similares entre sí (**Fig. 24b**). En función de estos resultados podríamos especular que la resistencia a la lisis medida por células NK que observamos con los LTCD4<sup>+</sup> podría deberse en parte a los mayores niveles de expresión de HLA-E que tendría la posibilidad de desencadenar señales inhibitorias al unirse a CD94/NKG2A.



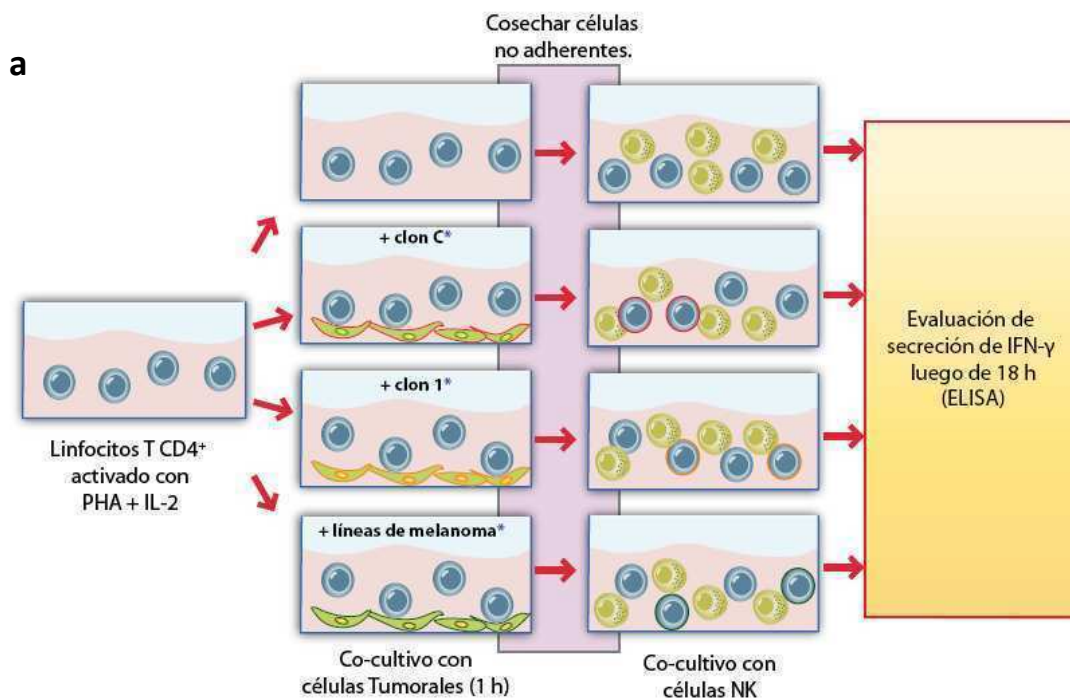


**Figura 24: Expresión diferencial de HLA-E en células tumorales y linfocitos T.** **a)** Se evaluó por CF la expresión de HLA-E en superficie del clon C (línea llena negra), clon 1 (línea llena azul) y del melanoma IIB-MEL-IAN (línea llena roja). Las células fueron cosechadas, marcadas con el AcMo anti-HLA-E MEM-E08 y con anti-IgG de ratón marcadas con PE. Los tres gráficos muestran los parámetros de FSC y SSC de las líneas tumorales. Los histogramas muestran los niveles de expresión de HLA-E en dichas líneas. **b)** CMSPs activadas con PHA e IL-2 fueron co-cultivadas durante 1 h en ausencia de células tumorales (línea llena celeste) o en presencia del clon C (línea llena negra), el clon 1 (línea llena azul), o la línea celular IIB-MEL-IAN (línea llena roja). Se cosecharon las células no adherentes y se analizó la expresión de HLA-E en LTCD3<sup>+</sup>. Para analizar la expresión de HLA-E en linfocitos T presentes en CMSPs, se seleccionó la región correspondiente a las células linfoides de acuerdo a sus parámetros de FSC vs SSC (indicado con R1 en los cuatro primeros gráficos). Luego se seleccionó la región correspondiente a las células CD3<sup>+</sup> presentes en R1 (indicado como R2 en los cuatro gráficos siguientes), y por último se evaluó la expresión de HLA-E en las células presentes en R2. Los histogramas grises corresponden a la marcación con AcMo CI. Los resultados presentados corresponden a un experimento representativo de 3 experimentos independientes realizados con células de distintos donantes sanos.

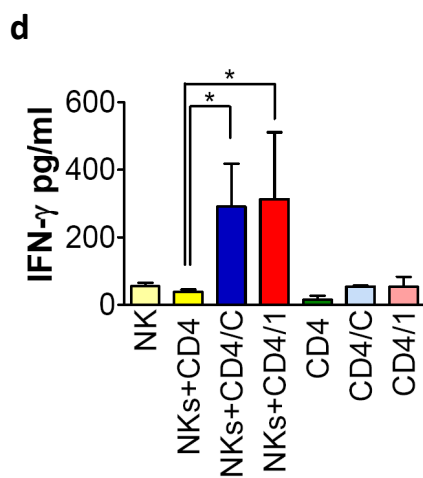
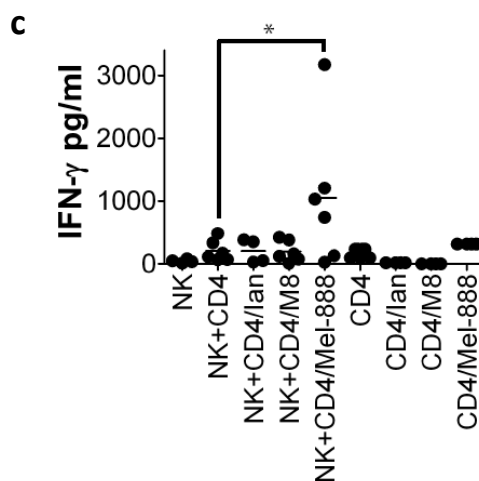
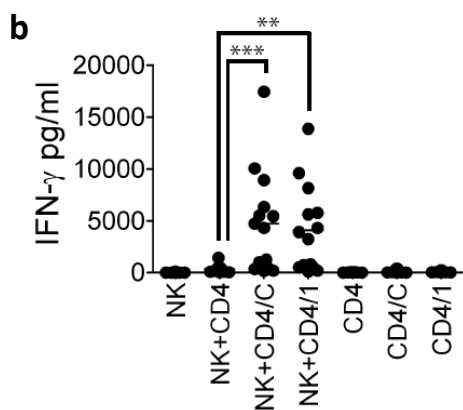
### **b. Producción de IFN- $\gamma$ por células NK y receptores involucrados.**

A continuación, nos propusimos estudiar si los LTCD4<sup>+</sup> activados que experimentaron un contacto con las células tumorales son capaces de regular la secreción de IFN- $\gamma$  por células NK. Para ello, realizamos co-cultivos de 18 h de células NK con LTCD4<sup>+</sup> activados que previamente habían estado o no en contacto durante 1 h con el clon C o el clon 1, colectamos los sobrenadantes de dichos co-cultivos y cuantificamos la producción de IFN- $\gamma$  por ELISA (**Fig. 25a**). Esta estrategia experimental nos permitió evaluar el papel funcional de la interacción de receptores de células NK con sus ligandos originalmente presentes en células tumorales y que fueron capturados por los LTCD4<sup>+</sup> pero evitando un contacto directo de las células NK con las células tumorales. Como podemos observar en la **Fig. 25b** los LTCD4<sup>+</sup> que estuvieron previamente en contacto con las células tumorales fueron capaces de promover la secreción de IFN- $\gamma$  por células NK de 14 donantes distintos en comparación con aquellos LTCD4<sup>+</sup> que no estuvieron en contacto con células tumorales. Resultados similares se obtuvieron con células NK y LTCD4<sup>+</sup> singeneicos (**Fig. 25d**). Llamativamente, no se detectaron grandes diferencias en la producción de IFN- $\gamma$  por células NK que estuvieron en contacto con LTCD4<sup>+</sup> que fueron co-cultivados previamente con el clon C, comparado con la producción de IFN- $\gamma$  por células NK que estuvieron en contacto con LTCD4<sup>+</sup> que fueron co-cultivados previamente con el clon 1. Asimismo, la producción de IFN- $\gamma$  detectada por ELISA en el sobrenadante de cultivo provino de la células NK, ya que sólo se detectaron células CD3<sup>-</sup>CD56<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> por CF luego de los co-cultivos correspondientes (datos no mostrados). Anteriormente demostramos que el

melanoma IIB-MEL-IAN pero no los melanomas Mel-888 y M8 son capaces de transferir MICA a LTCD4<sup>+</sup> activados. Con el objeto de evaluar si los LTCD4<sup>+</sup> que estuvieron en contacto con dichos melanomas también son capaces de promover la producción de IFN- $\gamma$  por células NK, utilizamos la misma metodología experimental que se describió en la **Fig. 25a**. El análisis de producción de IFN- $\gamma$  por células NK mostró que aquellos LTCD4<sup>+</sup> que estuvieron en contacto previamente con el melanoma Mel-888 fueron capaces de estimular la producción de IFN- $\gamma$ , mientras que los LTCD4<sup>+</sup> que estuvieron en contacto previamente con los otros melanomas no fueron capaces de estimular dicha producción (**Fig. 25c**). Cabe aclarar que la pureza de los LTCD4<sup>+</sup> utilizados en los co-cultivos con células NK fue del 99,73 $\pm$ 0,04% (LTCD4<sup>+</sup> solos,  $n=3$ ), 99,67 $\pm$ 0,01% (LTCD4<sup>+</sup> co-cultivados con el clon C,  $n=4$ ) y 99,73 $\pm$ 0,19% (LTCD4<sup>+</sup> co-cultivados con el clon 1,  $n=3$ ). Estos valores nos permitieron descartar la posibilidad de que la producción de IFN- $\gamma$  por células NK fuera inducida por células tumorales contaminantes.



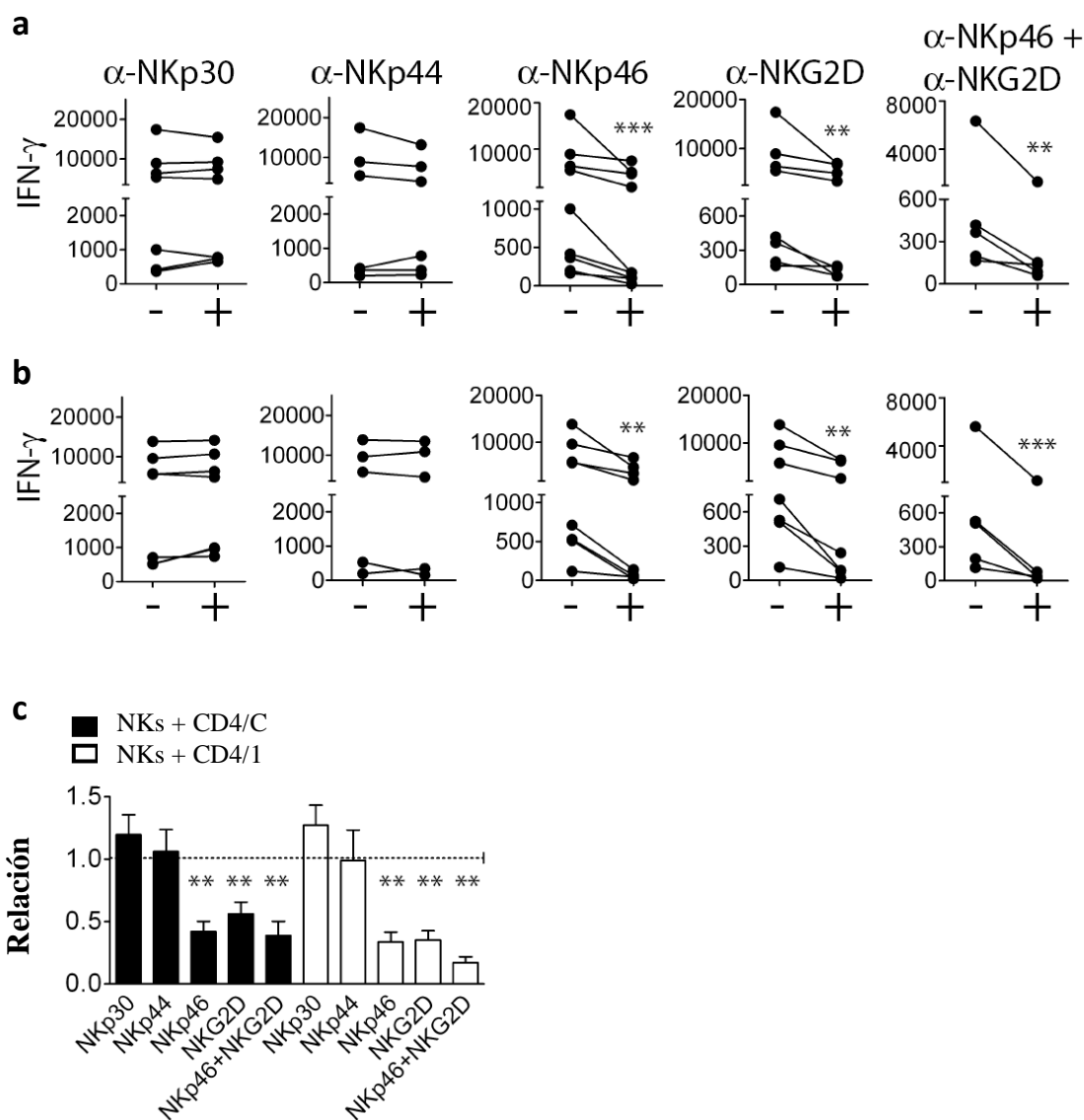
\* Los linfocitos T capturan moléculas tumorales de estas células



**Figura 25: Secreción de IFN- $\gamma$  por células NK.** **a)** Esquema experimental utilizado para evaluar la producción de IFN- $\gamma$  por ELISA en sobrenadantes de cultivo de células NK co-cultivadas con LTCD4<sup>+</sup> que previamente habían estado o no en contacto con células tumorales. **b-d)** Se co-cultivaron durante 18 h células NK aisladas por selección negativa con LTCD4<sup>+</sup> alogeneicos aislados y activados con PHA e IL-2 que previamente habían estado o no en contacto durante 1 h con distintas líneas de melanomas humanos. Posteriormente se cosecharon los sobrenadantes de cultivo y se analizó la producción de IFN- $\gamma$  por ELISA. NK: NK solas, NK + CD4: células NK que estuvieron en contacto con LTCD4<sup>+</sup> activados que no estuvieron en contacto previo con ningún tumor, NK + CD4/C, NK + CD4/1, NK + CD4/Ian, NK + CD4/M8 y NK + CD4/Mel888: células NK que estuvieron en contacto con LTCD4<sup>+</sup> activados que previamente estuvieron en contacto durante 1 h con el clon C, el clon 1, IIB-MEL-IAN, M8 o Mel-888 respectivamente. CD4, CD4/C, CD4/1, CD4/Ian, CD4/M8, CD4/Mel888: LTCD4<sup>+</sup> cultivados en ausencia o presencia del clon C, clon 1, IIB-MEL IAN, M8 o Mel-888 respectivamente. Cada punto en **b** y **c** representa los resultados obtenidos con células de diferentes donantes sanos. En los gráficos se muestra la media  $\pm$  SEM de experimentos independientes llevados a cabo con células de 5 a 14 donantes diferentes. **d)** Se co-cultivaron durante 18 h células NK aisladas por selección negativa con LTCD4<sup>+</sup> singeneicos aislados y activados con PHA e IL-2 que habían estado o no previamente en contacto durante 1 h con el clon C o el clon 1. Posteriormente se cosecharon los sobrenadantes de cultivo y se analizó la producción de IFN- $\gamma$  por ELISA. En el gráfico se muestra la media  $\pm$  SEM de experimentos independientes llevados a cabo con células de 3 donantes diferentes NS: no significativo; \*,  $p < 0,05$ , \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ .

El conjunto de estos resultados indica que LTCD4<sup>+</sup> que adquirieron porciones de membrana de células tumorales son capaces de regular la producción de IFN- $\gamma$  por células NK.

Finalmente, con el objeto de investigar qué receptores están involucrados en la producción de IFN- $\gamma$  por células NK realizamos ensayos de bloqueo empleando AcMo específicos contra NKG2D, NKp30, NKp44 y NKp46 (los receptores activadores de células NK mejor caracterizados y de mayor relevancia fisiológica). En estos experimentos observamos que tanto el bloqueo de NKG2D como el bloqueo de NKp46, en forma individual o combinada, pero no el bloqueo de NKp30 o NKp44, redujeron la producción de IFN- $\gamma$  por células NK (**Fig. 26a** y **26b**). Con el fin de independizarnos de la heterogeneidad observada en los niveles de IFN- $\gamma$  producido por células NK de diferentes donantes, se calculó la relación de IFN- $\gamma$  producido en presencia vs. en ausencia de cada AcMo bloqueante utilizado (**Fig. 26c**).



**Figura 26: Receptores involucrados en la secreción de IFN- $\gamma$  por células NK.** **a y b)** Células NK aisladas por selección negativa fueron co-cultivadas durante 18 h con LTCD4<sup>+</sup> aislados y activados con PHA e IL-2 que habían estado previamente en contacto durante 1 h con el clon C (**a**) o con el clon 1 (**b**) en ausencia (-) o presencia (+) de los AcMo bloqueantes indicados. Posteriormente se cosecharon los sobrenadantes de cultivo y se analizó la producción de IFN- $\gamma$  por ELISA. **c)** Con el objeto de independizarnos de la heterogeneidad observada en los niveles de IFN- $\gamma$  producido por células NK de diferentes donantes, se calculó y graficó la relación de IFN- $\gamma$  producido en presencia vs. en ausencia de cada AcMo bloqueante indicado. Cada punto de **a** y **b** representa los resultados obtenidos con células de diferentes donantes sanos. En los gráficos se muestra la media  $\pm$  SEM de experimentos independientes llevados a cabo con células de 5 a 8 donantes diferentes. NS: no significativo; \*\*,  $p < 0,01$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ .

Ligandos de NKG2D y NKp46 capturados por los LTCD4<sup>+</sup> durante el co-cultivo con las líneas tumorales estarían involucrados en el desencadenamiento de la producción de IFN- $\gamma$  por células NK.

## Discusión

Previamente en nuestro laboratorio se demostró que distintos estímulos mitogénicos entre los que se encuentra la IL-2 inducen la expresión de MICA en linfocitos T [79, 232]. Por lo tanto decidimos investigar el efecto que ejercían otras citoquinas mitogénicas que comparten la cadena  $\gamma$  de su receptor con el receptor de IL-2, tales como IL-4 e IL-15 [238] sobre la expresión de MICA. Observamos que ambas citoquinas fueron capaces de inducir la expresión de MICA en linfocitos T presentes en CMSPs (**Fig. 10**), a diferencia de lo observado con citoquinas no mitogénicas tales como IFN- $\alpha$  y TNF- $\alpha$ . Consecuentemente, concluimos que la expresión de MICA en linfocitos T estaría regulada por citoquinas mitogénicas.

Como se mencionó anteriormente, las células NK juegan un papel fundamental durante la respuesta inmune contra células infectadas con virus y células tumorales. El reconocimiento de MICA por el receptor activador NKG2D es capaz de desencadenar la lisis de células tumorales o células infectadas con virus que sobre-expresan este NKG2DL, así como la secreción de IFN- $\gamma$  mediada por células NK [78, 82, 239]. Por otro lado, se ha demostrado que linfocitos T activados con estímulos mitogénicos son susceptibles a la lisis mediada por células NK de manera dependiente de NKG2D [78, 81, 240], y que las células NK estimuladas con IL-2 promueven la secreción de IFN- $\gamma$  por LTCD4<sup>+</sup> [241]. Sin embargo, en este trabajo no se investigó si los LTCD4<sup>+</sup> eran capaces de promover la producción de IFN- $\gamma$  por células NK. En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio y en experimentos llevados a cabo durante el desarrollo de esta tesis observamos que a pesar de detectar un aumento en la expresión de MICA y de su ARNm en linfocitos T activados con diferentes estímulos mitogénicos o fisiológicos, detectamos una mínima expresión de MICA en la superficie de dichas células ([54, 79, 232] y **Fig.11** respectivamente). Esto podría constituir un mecanismo de prevención de la lisis mediada por células NK en un microambiente tumoral o inflamatorio [232]. No obstante como se mencionó anteriormente, otros autores detectaron expresión de MICA en superficie tanto de LTCD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> lo que los hizo susceptibles a la lisis mediada por células NK autólogas, y han sugerido que este proceso limitaría la respuesta T [81, 82]. Esta discrepancia con nuestros resultados puede explicarse por la utilización de distintos tiempos y estímulos para activar a los linfocitos T. Por otro lado, con el fin de independizarnos del entrecruzamiento con receptores de

superficie necesarios para desencadenar la activación celular, evaluamos el efecto de las drogas PMA e ionomicina (P+I), que son considerados estímulos mitogénicos que simulan los procesos desencadenados a través de las moléculas CD3 y CD28 [235], sobre la expresión de MICA en CMSPs y en LTCD4<sup>+</sup> aislados. Observamos que la estimulación de las células con P+I fue capaz de inducir la expresión total de MICA tanto en CMSPs como en LTCD4<sup>+</sup> aislados (**Fig. 11**), pero no fue capaz de inducir la expresión de altos niveles de MICA en superficie celular (**Fig. 11**) en comparación a los niveles detectados en diferentes células tumorales [83, 114, 242]. Por otro lado, tampoco se detectó la expresión de otros NKG2DLs tales como MICB, ULBP-1, -2 y -3 en superficie de linfocitos T activados con P+I.

Con el objeto de estudiar las consecuencias funcionales de la expresión de MICA en LTCD4<sup>+</sup> activados con P+I, analizamos su susceptibilidad a la lisis mediada por células NK y la producción de IFN- $\gamma$  por células NK luego del co-cultivo con LTCD4<sup>+</sup> activados. Observamos que los LTCD4<sup>+</sup> activados se volvieron susceptibles a la lisis mediada por células NK estimuladas con IL-15 pero que eran resistentes a la lisis mediada por células NK en reposo (**Fig.12**). Es interesante destacar que el bloqueo de la interacción entre MICA y NKG2D utilizando un AcMo anti-NKG2D no fue capaz de inhibir la lisis de los LTCD4<sup>+</sup> por las células NK activadas, lo que sugiere que MICA no estaría involucrada en la lisis de LTCD4<sup>+</sup> activados mediada por estas células. Del mismo modo, observamos que células NK estimuladas con IL-15 produjeron mayor cantidad de IFN- $\gamma$  que células NK en reposo luego del co-cultivo con LTCD4<sup>+</sup> activados con P+I (**Fig.13**) y que MICA no parece estar involucrado en este proceso.

Nuestros resultados indican que la baja expresión de MICA en la superficie de LTCD4<sup>+</sup> activados podría ser un mecanismo de protección contra la lisis mediada por células NK en reposo, que podría ser de importancia especialmente durante el desarrollo de una respuesta inmune dependiente de células T. Tales niveles de expresión de MICA no son lo suficientemente altos como para superar el efecto protector ejercido por los altos niveles de expresión de distintas moléculas de clase I del CMH que actúan como ligandos de receptores inhibitorios tales como KIR2DLs, KIR3DLs y miembros de la familia ILT/LIR [157, 163]. Concordantemente, cuando se bloqueó la interacción entre las moléculas de clase I del CMH y los receptores inhibitorios mediante el empleo del AcMo anti-HLA de clase I W6/32 se observó un incremento en la lisis de LTCD4<sup>+</sup> activados (**Fig. 12**) pero nuevamente, no observamos una dependencia de NKG2D en este proceso. La baja expresión de



MICA en superficie celular de linfocitos T activados y su fácil detección por *Western blot* de lisados celulares nos llevó a pensar que MICA debía encontrarse como depósitos intracelulares en estos LTCD4<sup>+</sup> activados. Esta hipótesis fue confirmada por microscopia confocal (**Fig. 14**), lo que sugiere que los LTCD4<sup>+</sup> activados tendrían el potencial de adquirir susceptibilidad a la lisis dependiente de NKG2D, en presencia de estímulos capaces de promover la movilización de dichos depósitos intracelulares y aumentar la expresión de MICA en superficie por encima del umbral impuesto por la expresión de las moléculas de clase I del CMH. Es posible que este fenómeno de retención intracelular constituya un mecanismo que les permita a los LTCD4<sup>+</sup> activados resistir la citotoxicidad mediada por células NK en un ambiente inflamatorio, en un tejido infectado con virus o en un microambiente tumoral, donde las células NK y los LTCD4<sup>+</sup> activados son reclutados y estimulados con citoquinas que se producen localmente. Dentro de los microambientes antes descritos, la resistencia a la citotoxicidad mediada por células NK de los LTCD4<sup>+</sup> activados podría ser importante para prevenir una eliminación ineficiente del antígeno y una temprana terminación de la respuesta inmune.

El crecimiento tumoral en un individuo inmunocompetente es el resultado de un complejo balance que involucra los mecanismos de escape tumoral y la presión inmunológica ejercida por células NK y linfocitos T [101, 156]. Los mecanismos de escape tumoral están mediados por factores solubles secretados por el tumor y moléculas de superficie celular que promueven la acumulación de CDs tolerogénicas, macrófagos activados, células mieloides supresoras y linfocitos T regulatorios, lo que promueve un efecto inmunosupresor local y sistémico, creando un sitio de inmunoprivilegio que facilita el crecimiento tumoral y el establecimiento de metástasis [101]. Por otro lado, trabajos previos demostraron que es necesaria la presencia de células accesorias tales como monocitos, macrófagos y CDs para que las células NK sean capaces de desencadenar sus funciones efectoras, lo que ocurre a través del establecimiento de un diálogo recíproco entre dichas células que repercute en el perfil de citoquinas secretado y el tipo de respuesta inmune desencadenada [121]. Las células NK pueden interactuar con las CDs en un foco inflamatorio o en los ganglios linfáticos, y las consecuencias de dicha interacción son múltiples [122, 243]. En presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (PMAPs) capaces de estimular CDs inmaduras y células NK, o en presencia de células tumorales que estimulan células NK a través de receptores tales como NKG2D y NCR (NKp30, NKp44 y NKp46) , las células NK son capaces de

desencadenar una respuesta citotóxica contra las células tumorales y secretar IFN- $\gamma$ . Dicha citoquina promueve la maduración de las CDs y en consecuencia la secreción de citoquinas tales como IL-12, IL-15 e IL-18, promoviendo así una mayor activación de las células NK y el establecimiento de un diálogo recíproco NK-CDs que involucra a NKp30 [138, 156]. Por otro lado, la generación de un entorno inflamatorio favorece a una maduración óptima de las CDs, las que secretan mayores cantidades de IL-12, IL-15 e IL-18, promoviendo así un aumento en la producción de IFN- $\gamma$  por parte de las células NK. Además, las células NK poseen la capacidad de lisar CDs inmaduras lo cual podría prevenir la aparición de señales tolerogénicas responsables de silenciar la respuesta inmune adaptativa. Por otro lado, durante el desarrollo de una respuesta inmune anti-tumoral se generan restos de células tumorales como consecuencia directa [244] o indirecta [101, 244, 245] del IFN- $\gamma$  sobre el tumor, los que son fagocitados por CDs locales, que luego migran a los ganglios linfáticos drenantes y dan inicio a una respuesta inmune adaptativa anti-tumoral. Las CDs que migraron a los ganglios linfáticos drenantes inducen la activación y diferenciación de los LTCD4<sup>+</sup> específicos de tumor hacia un perfil Th1, productor de IFN- $\gamma$ , que a su vez facilita la activación y diferenciación de LTCD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTLs) específicos del tumor. Estos LTCD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> migran al foco tumoral, donde los CTLs destruyen a las células tumorales que expresan antígenos tumorales específicamente reconocidos. En consecuencia, dentro del microambiente tumoral se establecen interacciones complejas entre células tumorales y células del sistema inmune que afectan la progresión del tumor. Como se mencionó anteriormente, en nuestro laboratorio demostramos que MICA permanece como depósitos intracelulares en linfocitos T activados, confiriéndoles a estas células resistencia a la citotoxicidad dependiente de NKG2D mediada por células NK [49, 79, 80, 232]. Basándonos en el conjunto de estas evidencias, nos preguntamos si era posible que células tumorales fueran capaces de regular la expresión de MICA en linfocitos T activados y en consecuencia los linfocitos T pudieran regular la funcionalidad de las células NK.

Con el objeto de evaluar esta hipótesis, estudiamos los niveles de MICA en la superficie de linfocitos T activados luego del co-cultivo con un clon de la línea de melanoma humano IIB-MEL-LES transfectado con un plásmido de expresión de MICA que expresa altos niveles de MICA en superficie celular (**clon 1**) y un clon de la misma línea transfectado con plásmido vacío que no expresa MICA en superficie celular (**clon C**). Se eligió trabajar con IIB-MEL-LES debido a que este melanoma

casi no expresa NKG2DLs en superficie (solo expresa bajos niveles de ULBP-2, [114]). Mediante esta aproximación experimental observamos que linfocitos T humanos presentes en CMSPs activados con P+I, o con PHA e IL-2, LTCD4<sup>+</sup> o LTCD8<sup>+</sup> aislados por selección negativa y activados con PHA e IL-2, células T diferenciadas *in vitro* hacia un perfil Th1 o Th2, CMSPs en reposo o células NK estimuladas con IL-15 presentaron altos niveles de MICA en superficie luego del co-cultivo con el clon 1 pero no con el clon C (**Fig. 15**). Dado que los linfocitos T en reposo y las células NK carecen de depósitos intracelulares de MICA [232], y que estas células luego de un breve contacto con el clon 1 exhibieron altos niveles de este NKG2DL en superficie, pensamos en la ocurrencia de un fenómeno de transferencia de MICA desde las células tumorales hacia las células linfoides. Por otro lado, descartamos la posibilidad de que los niveles de MICA detectados en la superficie de los linfocitos T provinieran de MICA soluble secretada al medio de cultivo por la actividad proteolítica de metaloproteasas [105], o de exosomas u otras microvesículas derivadas del tumor que poseen NKG2DLs [246], ya que el fenómeno de transferencia no pudo ser mimetizado con el clon C y rMICA soluble y fue completamente evitado cuando ambos tipos celulares fueron separados por dispositivos de *transwell* (**Fig. 16**). Además, la transferencia de MICA fue estrictamente dependiente de la viabilidad del linfocito T (**Fig. 16**). Estos resultados nos permitieron demostrar por primera vez que los linfocitos T dirigieron activamente el fenómeno de trogocitosis, el cual ocurrió rápidamente.

Por otro lado, observamos que una vez que los linfocitos T dejaron de estar en contacto con el clon 1, los niveles de MICA presentes en superficie disminuyeron paulatinamente a causa del fenómeno de endocitosis (**Fig.17 y 18**). Aunque no hemos investigado esta hipótesis, existe la posibilidad de que una vez que MICA fue endocitada podría ser degradada en los endosomas de los linfocitos T y en consecuencia péptidos de MICA proveniente del tumor podrían ser cargados en moléculas de clase II del HLA, para su posterior presentación a LTCD4<sup>+</sup> específicos. La existencia de un mecanismo de presentación de péptidos de MICA por LTCD4<sup>+</sup> a otros LTCD4<sup>+</sup> podría tener un papel en la regulación de la respuesta inmune anti-tumoral. Con el objeto de estudiar tal fenómeno se requiere de la obtención de clones T CD4<sup>+</sup> humanos específicos de péptidos de MICA. Actualmente nos encontramos en el proceso de obtención de dichos clones. Por otro lado, mientras los linfocitos T permanecieron en contacto con las células tumorales continuamente capturaron MICA de la superficie de las células tumorales, y en consecuencia se

detectaron altos niveles de MICA en su superficie así como depósitos intracelulares en LTCD4<sup>+</sup> activados (**Fig. 17 y 18**).

El fenómeno de transferencia de MICA también fue observado con la línea de melanoma IIB-MEL-IAN que expresa naturalmente MICA en su superficie (**Fig. 19**), así como con otro lote de la línea de melanoma M8 que fue gentilmente cedido por el Dr Edgardo Carosella y que expresa naturalmente altos niveles de MICA en su superficie, por lo que no se trata de un fenómeno limitado a células transfectadas. Por otro lado, la transferencia de MICA no fue un fenómeno generalizado a todas las líneas estudiadas, ya que no fuimos capaces de detectar la presencia de MICA en linfocitos T activados luego del co-cultivo con las líneas de melanoma Mel-888 y M8 (**Fig. 19**). Aunque MICA es polimorfica y existen alelos con diferencias en los dominios transmembrana [50] la selectividad o dependencia del tipo celular en la transferencia de MICA no es atribuible a la existencia de diferencias en el largo del dominio transmembrana de diferentes alelos de MICA presentes en las distintas células analizadas, ya que IIB-MEL-LES, IIB-MEL-IAN y Mel-888 naturalmente expresan alelos de MICA con un dominio de transmembrana completo y el clon 1 fue generado transfectando establemente la línea de melanoma IIB-MEL-LES con la secuencia completa del alelo MICA\*001 [114]. Es más probable que la selectividad en la transferencia de MICA se deba a los niveles absolutos de MICA expresados en superficie de las distintas líneas celulares y/o a características propias de las moléculas presentes en la superficie de cada célula tumoral que las podrían tornar permisivas a la transferencia de diferentes moléculas hacia la superficie de los linfocitos T. Desde que se descubrió el fenómeno de trogocitosis se han descrito múltiples moléculas de superficie del linfocito T promotoras de dicho fenómeno [219]. A pesar de que no examinamos todas las moléculas que podrían estar involucradas en los fenómenos observados en nuestros experimentos, podemos descartar la participación del complejo TCR/CD3, CD28, y las moléculas de clase I y II del HLA ya que en nuestros experimentos empleamos linfocitos T activados en forma policlonal, y las líneas de melanoma empleadas no expresan las moléculas de clase II del HLA o CD80/CD86. También descartamos la participación de la molécula de adhesión CD54 (ICAM-1) en el proceso de captura de MICA.

A diferencia del fenómeno de trogocitosis observado con MICA, no fuimos capaces de detectar transferencia de moléculas ancladas a residuos GPI tales como ULBP-1, -2 y -3 a la superficie de linfocitos T (**Fig. 20**). Esto podría atribuirse a una diferente ubicación de dichas moléculas dentro de distintos microdominios

presentes en la superficie de las células tumorales y/o al tipo de asociación que poseen estas proteínas con la membrana plasmática. En tal sentido, ha sido reportado que ULBP-3, a diferencia de MICA, fue detectado en fracciones de membrana resistentes a detergentes probablemente debido a su fuerte asociación con los microdominios antes mencionados [247]. Por consiguiente, una asociación débil de MICA a los microdominios de la membrana plasmática de células tumorales podría permitir su transferencia a la superficie de los linfocitos T. No obstante, si bien no pudimos detectar la transferencia de ULBP-1, -2 y -3 a la superficie de los linfocitos T, probablemente durante este fenómeno de trogocitosis observado, MICA no sea la única molécula que está siendo transferida al linfocito T [207].

Ensayos de transferencia de membrana llevados a cabo con células marcadas con fluorocromos tales como CFSE y DiOC<sub>18</sub> confirmaron la existencia del fenómeno de trogocitosis, y además que la transferencia de membrana entre células tumorales y linfocitos T era bidireccional (**Fig. 21**). Cabe aclarar que los ensayos realizados para medir el grado de trogocitosis revelaron que DiOC<sub>18</sub> se transfirió más eficientemente que el CFSE (**Fig. 21 y 22**). Ésto se debe a que el CFSE es un marcador de proteínas citoplasmáticas que se une a grupos aminos de proteínas citoplasmáticas y eventualmente de los dominios citoplasmáticos de las proteínas de transmembrana, mientras que el DiOC<sub>18</sub> es un compuesto lipofílico que se asocia directamente a la membrana plasmática.

En cuanto a la relevancia fisiológica de este fenómeno, podemos especular que la transferencia de MICA desde las células tumorales a la superficie de los linfocitos T podría imprimir una marca en dichas células de manera tal de volverlas susceptibles a la citotoxicidad mediada por células NK dependiente de NKG2D, lo que podría generar una disminución o atenuación en la magnitud de la respuesta inmune mediada por linfocitos T específica contra el tumor dentro del microambiente tumoral. En este escenario la transferencia de MICA podría considerarse un mecanismo de contra-ataque tumoral tendiente a alterar la respuesta inmune. Otra alternativa es que la captura de MICA por los linfocitos T podría constituir una estrategia mediada por estas células tendiente a muestrear antígenos tumorales con el objeto de regular la respuesta inmune anti-tumoral. Como se mencionó previamente, el fenómeno de trogocitosis observado fue continuo mientras las células linfoides permanecieron en contacto con las células tumorales, dependiente del contacto célula-célula, rápido y activamente dirigido por el linfocito T. Desde el punto de vista funcional, linfocitos T activados que

estuvieron en contacto con el clon C o el clon 1 fueron capaces de promover la degranulación de células NK pero no se volvieron susceptibles a la lisis mediada por estas células (**Fig. 23**). Una posibilidad que podría explicar tal resistencia a la lisis es la alta expresión de HLA-E en linfocitos T (**Fig. 24**), la que podría desencadenar señales inhibitorias en células NK a través del receptor CD94/NKG2A. Sin embargo, debido a que los linfocitos T que estuvieron en contacto con el clon C o el clon 1 promovieron la degranulación de células NK, la hipótesis de la participación de HLA-E y su receptor CD94/NKG2A es improbable. Alternativamente, esta resistencia a la lisis de los LTCD4<sup>+</sup> activados que estuvieron previamente en contacto con las células tumorales podría deberse a una alta expresión del inhibidor de granzima B (grB) llamado *proteinase inhibitor 9* (PI-9), el cual tiene la capacidad de prevenir la apoptosis mediada por grB en LTCD4<sup>+</sup>, LTCD8<sup>+</sup> y en células NK [248]. En este trabajo, se demostró que la expresión de PI-9 aumenta en CTLs en respuesta a la producción de grB y a la degranulación, que PI-9 se encuentra asociado con los gránulos que contienen grB tanto en células NK como en CTLs activados, y que la sobre-expresión de PI-9 incrementa la capacidad citotóxica de CTLs.

Por otro lado, linfocitos T que estuvieron en contacto con células tumorales fueron capaces de promover la secreción de IFN- $\gamma$  por células NK (**Fig. 25**), en forma dependiente de NKG2D y NKp46 pero no de NKp30 y NKp44 (**Fig. 26**), lo que sugiere que no solamente ligandos de NKG2D sino también ligandos de NKp46 estarían siendo capturados de la superficie de células tumorales por los linfocitos T durante el contacto establecido entre ambas poblaciones celulares. Por lo tanto, estas moléculas capturadas por los linfocitos T les confirieron la capacidad de desencadenar funciones efectoras mediadas por células NK. En concordancia con los resultados observados se ha demostrado que melanomas humanos expresan ligandos de NKp46 [249], los que de acuerdo con nuestros resultados podrían ser capturados por los LTCD4<sup>+</sup> activados. Además, nuestros experimentos constituyen la primera demostración de que ligandos de NKp46 son transferidos por trogocitosis a la superficie de linfocitos T, aunque todavía desconocemos la identidad de dichos ligandos. Dado que el contacto de los linfocitos T con el clon C (que no expresa MICA ni MICB ni niveles importantes de ULBPs) también promovió la degranulación y la secreción de IFN- $\gamma$  por células NK, podemos especular que otros ligandos de NKG2D tales como ULBP-4/Raet1E y/o Raet1G (todas proteínas con dominios transmembrana [201]) podrían también ser capturados por los linfocitos T. Un hallazgo que sustenta esta hipótesis es la demostración de que Raet1E se expresa

en células de melanoma humano [200]. Sin embargo, esta hipótesis solo podrá ser evaluada una vez que se encuentren disponibles AcMo específicos para los ligandos de NKG2D antes mencionados. En su conjunto, los resultados expuestos en esta Tesis nos indican que la captura de moléculas de la superficie tumoral por los linfocitos T no generaría una disminución en la respuesta inmune mediada por linfocitos T dentro del microambiente tumoral, sino que por el contrario constituiría una estrategia mediada por dichas células para muestrear antígenos tumorales que le permitirían, entre otras cosas, mejorar o mantener en el tiempo la respuesta inmune anti-tumoral mediada por células NK.

Trabajos previos han demostrado que la transferencia de MICA desde células tumorales a células NK fue dependiente del contacto celular y ocurrió luego de que esta molécula se acumulara en la sinapsis inmunológica (SI, [216]). En este trabajo también se observó que las moléculas de MICA transferidas a las células NK interactuaron con NKG2D presentes en células vecinas, induciendo su internalización y la consecuente disminución de su expresión en superficie. Más aún, las moléculas de MICA capturadas desde las células tumorales pudieron transferirse posteriormente a otras células NK y fueron capaces de inducir su degranulación pero no la producción de IFN- $\gamma$  [216]. Otros autores observaron que NKG2D y MICB fueron transferidos en forma bidireccional en las SI establecidas entre las células NK y sus células blanco. Tal expresión de MICB en superficie de las células blanco fue capaz de inducir la microagregación de NKG2D en los cSMAC y promover la transferencia de NKG2D desde las células NK hacia las células blanco. Además, dicha transferencia de MICB a células NK redujo su capacidad citotóxica [215]. Por otra parte, trabajos realizados por el grupo del Dr. Joel LeMaout han demostrado que la molécula de clase I no clásica HLA-G fue capturada por LTCD4<sup>+</sup> y LTCD8<sup>+</sup> activados. Tal adquisición de HLA-G por parte de los LTCD4<sup>+</sup> cambió su función de células efectoras a células regulatorias, capaces de inhibir la proliferación de otras células T inducida por CMSPs alogénicas. De este modo la adquisición de HLA-G mediante el fenómeno de trogocitosis condujo a la generación de un nuevo tipo de células regulatorias, que actúan a través de moléculas de superficie que no expresan naturalmente y que solo las exponen en superficie por un corto plazo [214]. De los antecedentes expuestos se puede concluir que la transferencia de distintas moléculas a la superficie de células del sistema inmune conduce a la generación de células con funciones efectoras disminuidas o un fenotipo supresor.

El IFN- $\gamma$  ejercer distintas actividades pleiotrópicas que contribuyen en la inmunidad anti-tumoral tales como la inhibición del crecimiento de células tumorales, la inhibición de la angiogénesis, la activación de CTLs específicos de tumor y la activación de células de la inmunidad innata tales como células NK y macrófagos [94, 250-252]. Con el objeto de investigar cuál es la función que ejerce *in vivo* el IFN- $\gamma$  durante el desarrollo tumoral un grupo de investigadores evaluó el número de metástasis generadas en ratones salvajes, deficientes para IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma^{-/-}$ ) o el receptor de IFN- $\gamma$  (IFN- $\gamma R^{-/-}$ ) a los que se les había inyectado previamente por vía intravenosa células de la línea de melanoma murino B16. En estos estudios observaron que el número de metástasis generadas en ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  fue significativamente mayor que los que observaron en ratones salvajes o IFN- $\gamma R^{-/-}$ , lo que demostró que la actividad anti-metastásica que ejerció el IFN- $\gamma$  no estuvo mediada por la activación de células efectoras del sistema inmune. Sin embargo, cuando evaluaron los efectos del IFN- $\gamma$  sobre el crecimiento de tumores sólidos inyectando ratones por vía subcutánea con células de la línea de melanoma murino B16 observaron un crecimiento tumoral aumentado y una disminución en la supervivencia de los ratones IFN- $\gamma^{-/-}$  y IFN- $\gamma R^{-/-}$  en comparación con los ratones salvajes. Estos resultados demostraron que en el caso de los tumores sólidos, el IFN- $\gamma$  previene el crecimiento tumoral a través de la activación de células del sistema inmune. El conjunto de estas evidencias demuestra la existencia de al menos dos mecanismos diferentes a través de los cuales el IFN- $\gamma$  ejerce su función anti-tumoral *in vivo*: en forma **directa** previniendo la formación de metástasis por su acción sobre el crecimiento tumoral, y en forma **indirecta** inhibiendo el crecimiento de tumores sólidos mediante la activación de células efectoras del sistema inmune [244].

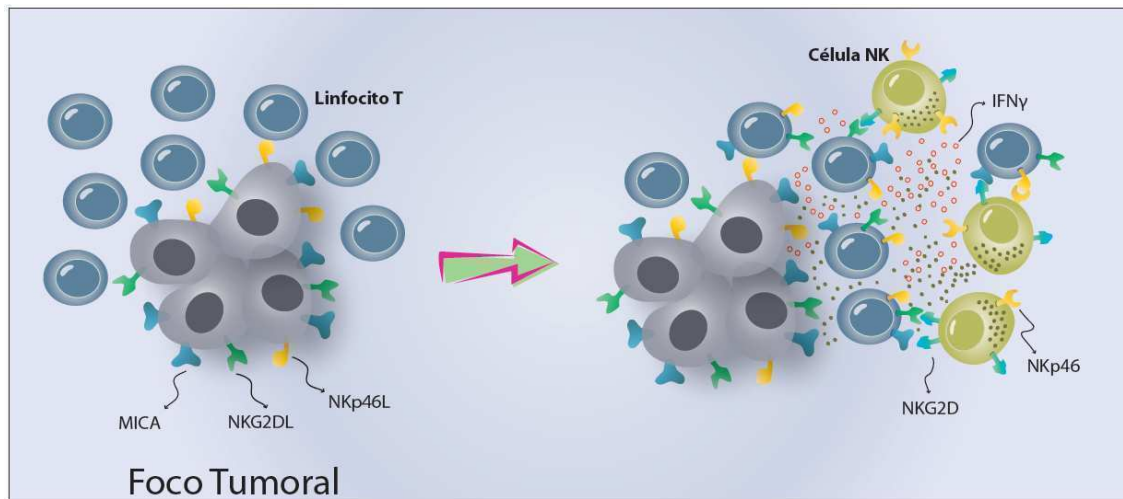
Si bien existen claras evidencias acerca de la importancia que tiene el IFN- $\gamma$  en la inmunidad tumoral, poco se sabe acerca de cuáles son las fuentes de esta citoquina y como se induce su secreción durante el desencadenamiento de la respuesta inmune anti-tumoral. Trabajos realizados en otros laboratorios demostraron mediante la utilización de ratones quiméricos (ratones IFN- $\gamma^{+/-}$  o IFN- $\gamma^{-/-}$  irradiados, repoblados con médula ósea de ratones IFN- $\gamma^{+/-}$ , IFN- $\gamma^{-/-}$  o Rag1 $^{-/-}$ ) desafiados con células tumorales que para promover un eficiente rechazo tumoral es necesaria la presencia de linfocitos T, células NK e IFN- $\gamma$ . Las células NK y los macrófagos fueron capaces de producir cantidades suficientes de IFN- $\gamma$  para contribuir al rechazo tumoral. Por otro lado, la colaboración de LTCD4 $^{+}$  fue



necesaria para desencadenar la producción de IFN- $\gamma$  por parte de células de la inmunidad innata, pero no fue necesaria la producción de esta citoquina por LTCD4<sup>+</sup> con el fin de promover el rechazo tumoral [253, 254]. Estos resultados demuestran la cooperación entre linfocitos T y células de la inmunidad innata para promover el rechazo tumoral mediado por IFN- $\gamma$  e indican que el IFN- $\gamma$  derivado de los LTCD4<sup>+</sup> podría ser dispensable. En otro modelo tumoral de ratón se ha observado que LTCD4<sup>+</sup> pero no LTCD8<sup>+</sup> juegan un rol fundamental en el rechazo tumoral luego de la vacunación con células tumorales irradiadas [254]. Sorprendentemente los LTCD4<sup>+</sup> que reconocen específicamente al tumor produjeron IL-10 pero no IL-4 e IFN- $\gamma$ . Tal producción de IL-10 fue fundamental para el rechazo tumoral, ya que no se observó un eficiente rechazo tumoral en ratones deficientes para IL-10. Por lo tanto, en este modelo LTCD4<sup>+</sup> contribuyeron a una eficiente inmunidad anti-tumoral de manera dependiente de IL-10, sin la necesidad de secretar IFN- $\gamma$  e IL-4 pero dependiente de la presencia de células NK [254]. Recientemente, se ha demostrado en un modelo *in vivo* que durante el inicio de la respuesta inmune (*priming*) la eliminación de células tumorales que expresan NKG2DLs es dependiente de células NK y requiere de la presencia de LTCD4<sup>+</sup> pero no de LTCD8<sup>+</sup> para generar una respuesta anti-tumoral secundaria [255]. Sin embargo, la colaboración que ejercen los LTCD4<sup>+</sup> durante el *priming* de la respuesta inmune es independiente de IFN- $\gamma$  e IL-12 (citoquinas típicas de linfocitos Th1) [255]. Más aún, estudios previos revelaron que para que ocurra una fuerte respuesta inmune anti-tumoral se requiere la presencia de LTCD4<sup>+</sup> e IFN- $\gamma$  [92, 256], mientras que en modelos de carcinogénesis química inducida con metilclorantreno (MCA) en ratones se demostró que es necesaria la colaboración entre los linfocitos y la vía de señalización IFN- $\gamma$ /STAT1 tanto para favorecer los mecanismos que suprimen el crecimiento tumoral, así como para modelar el fenotipo inmunogénico de los tumores [92]. Basándonos en las evidencias expuestas hasta el momento, podemos concluir que en algunos de los modelos estudiados, parecería que el IFN- $\gamma$  fue secretado por las células NK, mientras que los linfocitos T ayudarían al inicio o a la inducción de la respuesta anti-tumoral.

En función de estos antecedentes y los resultados presentados en esta Tesis (basados a partir de evidencia obtenida *in vitro*) podemos especular que podría existir una cooperación entre células NK y linfocitos T que capturaron porciones de membrana de las células tumorales donde podrían existir ligandos de diferentes receptores de células NK. La interacción entre ambas células linfoides podría

promover la degranulación y un aumento en la secreción de IFN- $\gamma$  por parte de las células NK lo que podría contribuir a sostener una respuesta inmune anti-tumoral por efectos directos [244] o indirectos [101, 244, 245]. Estas conclusiones se resumen en el modelo presentado en la **Fig. 27** que fue construido a partir de los resultados presentados en esta Tesis.



**Figura 27. Modelo propuesto de las interacciones y respuestas celulares desencadenadas por la transferencia de NKG2DLs y NKp46L en el foco tumoral.** Linfocitos T presentes en el foco tumoral capturarían rápidamente de la superficie de las células tumorales NKG2DLs (tales como MICA) y ligandos de NKp46. En consecuencia, estos linfocitos T que estuvieron en contacto con el tumor podrían adquirir la capacidad de estimular las funciones efectoras de células NK tales como la degranulación y la secreción de IFN- $\gamma$  de manera dependiente de NKG2D y NKp46, lo que podría promover la inmunidad anti-tumoral.

## Conclusiones

En esta Tesis doctoral hemos demostrado que:

- ✓ Las citoquinas con actividad mitogénica sobre linfocitos T IL-4 e IL-15 son capaces de inducir la expresión de MICA en CMSPs activadas.
- ✓ Aunque diversos estímulos mitogénicos son capaces de inducir la expresión total de MICA en linfocitos T, los niveles de este NKG2DL detectados en superficie son llamativamente bajos.
- ✓ Linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados son sensibles a la citotoxicidad mediada por células NK activadas pero no por células NK en reposo, y dicha susceptibilidad aumenta cuando se bloquea la interacción entre las moléculas de clase I del CMH y los receptores inhibitorios KIR. No obstante, NKG2D no está involucrado en esta respuesta biológica.
- ✓ Linfocitos T CD4<sup>+</sup> estimulan la producción de IFN- $\gamma$  por células NK activadas pero NKG2D no parece estar involucrado en esta respuesta biológica.
- ✓ La mayor parte del conjunto de moléculas de MICA permanece como depósitos intracelulares en linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados, lo que desde un punto de vista funcional, le otorga a los linfocitos T la capacidad de prevenir la lisis mediada por células NK dependiente de NKG2D.
- ✓ El co-cultivo de una línea de melanoma humano que sobreexpresa MICA en superficie (clon 1) con células linfoides en reposo o activadas promueve la aparición de linfocitos T que exhiben altos niveles de este NKG2DL en superficie celular. Este fenómeno se observó inclusive con linfocitos T en reposo (que carecen de depósitos intracelulares de MICA) por lo que

estaríamos ante un mecanismo de transferencia directa de moléculas de membrana entre células denominado trogocitosis.

- ✓ La transferencia de MICA depende estrictamente de la viabilidad del linfocito T y del contacto celular, por lo que sería un proceso activamente inducido por el linfocito T.
- ✓ Mientras los linfocitos T permanecen en contacto con el clon 1 capturan y endocitan continuamente MICA, permitiendo su detección en la superficie de células T, aunque también exhiben depósitos intracelulares.
- ✓ El fenómeno de transferencia de MICA no es un fenómeno limitado a un melanoma en particular o a células transfectadas pero tampoco es un fenómeno generalizado observado con cualquier melanoma o tumor.
- ✓ Sólo observamos transferencia de NKG2DLs que son proteínas integrales de membrana.
- ✓ Linfocitos T activados son capaces de adquirir porciones de membrana provenientes de células tumorales mediante un proceso bidireccional denominado trogocitosis.
- ✓ Linfocitos T CD4<sup>+</sup> que experimentaron un contacto con las células tumorales y que durante ese contacto capturaron porciones de membrana de células tumorales son capaces de promover la degranulación de células NK, pero permanecen resistentes a la lisis mediada por dichas células.
- ✓ Linfocitos T CD4<sup>+</sup> que experimentaron un contacto con las células tumorales y que durante ese contacto adquirieron porciones de membrana de células tumorales son capaces de regular la producción de IFN- $\gamma$  por células NK.
- ✓ Esta producción de IFN- $\gamma$  involucra a los receptores NKG2D y NKp46 pero no a NKp30 ni a NKp44 por lo que los ligandos de NKG2D y NKp46 son capturados por estos linfocitos T CD4<sup>+</sup>

durante el co-cultivo con las células tumorales y desencadenan la secreción de dicha citoquina por células NK.

- ✓ Nuestros resultados constituyen la primera demostración acerca de la capacidad de célula de la inmunidad adaptativa (linfocitos T) de estimular funciones efectoras en células de la inmunidad innata (células NK). Este mecanismo de regulación podría ser de relevancia durante la respuesta inmune anti-tumoral aunque también podría ser de relevancia en otras inmunopatologías.

## Bibliografía

1. NW Zwirner, L Fainboim. **Estructura y función del complejo mayor de histocompatibilidad.** En: L Fainboim, J Geffner.: *Introducción a la inmunología humana.* Editorial Panamericana 2005 (quinta edición) , capítulo 4; pag 93-138.
2. J Alberola-Ila, S Takaki, JD Kerner, RM Perlmutter: **Differential signaling by lymphocyte antigen receptors.** *Annu Rev Immunol* 1997, **15**:125-54.
3. JE Smith-Garvin, GA Koretzky, MS Jordan: **T cell activation.** *Annu Rev Immunol* 2009, **27**:591-619.
4. JP Abastado, YC Lone, A Casrouge, G Boulot, P Kourilsky: **Dimerization of soluble major histocompatibility complex-peptide complexes is sufficient for activation of T cell hybridoma and induction of unresponsiveness.** *J Exp Med* 1995, **182**:439-47.
5. KA Frauwirth, CB Thompson: **Activation and inhibition of lymphocytes by costimulation.** *J Clin Invest* 2002, **109**:295-9.
6. LP Kane, J Lin, A Weiss: **It's all Rel-ative: NF-kappaB and CD28 costimulation of T-cell activation.** *Trends Immunol* 2002, **23**:413-20.
7. JJ Goronzy, CM Weyand: **T-cell co-stimulatory pathways in autoimmunity.** *Arthritis Res Ther* 2008, **10 Suppl 1**:S3.
8. SK Bromley, WR Burack, KG Johnson, K Somersalo, TN Sims, C Sumen, MM Davis, AS Shaw, PM Allen, ML Dustin: **The immunological synapse.** *Annu Rev Immunol* 2001, **19**:375-96.
9. A Trautmann, S Valitutti: **The diversity of immunological synapses.** *Curr Opin Immunol* 2003, **15**:249-54.
10. S Valitutti: **Immunological synapse: center of attention again.** *Immunity* 2008, **29**:384-6.
11. A Grakoui, SK Bromley, C Sumen, MM Davis, AS Shaw, PM Allen, ML Dustin: **The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation.** *Science* 1999, **285**:221-7.
12. CR Monks, BA Freiberg, H Kupfer, N Sciaky, A Kupfer: **Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells.** *Nature* 1998, **395**:82-6.
13. JB Huppa, MM Davis: **T-cell-antigen recognition and the immunological synapse.** *Nat Rev Immunol* 2003, **3**:973-83.
14. S Valitutti, M Dessing, K Aktories, H Gallati, A Lanzavecchia: **Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton.** *J Exp Med* 1995, **181**:577-84.
15. S Valitutti, A Lanzavecchia: **Serial triggering of TCRs: a basis for the sensitivity and specificity of antigen recognition.** *Immunol Today* 1997, **18**:299-304.
16. A Lanzavecchia, G Lezzi, A Viola: **From TCR engagement to T cell activation: a kinetic view of T cell behavior.** *Cell* 1999, **96**:1-4.
17. G lezzi, K Karjalainen, A Lanzavecchia: **The duration of antigenic stimulation determines the fate of naive and effector T cells.** *Immunity* 1998, **8**:89-95.
18. ML Alegre, KA Frauwirth, CB Thompson: **T-cell regulation by CD28 and CTLA-4.** *Nat Rev Immunol* 2001, **1**:220-8.
19. Z Cai, H Kishimoto, A Brunmark, MR Jackson, PA Peterson, J Sprent: **Requirements for peptide-induced T cell receptor downregulation on naive CD8+ T cells.** *J Exp Med* 1997, **185**:641-51.
20. MF Bachmann, A Gallimore, S Linkert, V Cerundolo, A Lanzavecchia, M Kopf, A Viola: **Developmental regulation of Lck targeting to the CD8 coreceptor controls signaling in naive and memory T cells.** *J Exp Med* 1999, **189**:1521-30.
21. A Kerstan, T Hunig: **Cutting edge: distinct TCR- and CD28-derived signals regulate CD95L, Bcl-xL, and the survival of primary T cells.** *J Immunol* 2004, **172**:1341-5.
22. AV Gett, PD Hodgkin: **Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, **95**:9488-93.
23. JJ Bird, DR Brown, AC Mullen, NH Moskowitz, MA Mahowald, JR Sider, TF Gajewski, CR Wang, SL Reiner: **Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle.** *Immunity* 1998, **9**:229-37.

24. TR Mosmann, RL Coffman: **TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.** *Annu Rev Immunol* 1989, **7**:145-73.
25. T Korn, E Bettelli, M Oukka, VK Kuchroo: **IL-17 and Th17 Cells.** *Annu Rev Immunol* 2009, **27**:485-517.
26. G Trinchieri: **Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity.** *Adv Immunol* 1998, **70**:83-243.
27. RA Seder, WE Paul: **Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells.** *Annu Rev Immunol* 1994, **12**:635-73.
28. A O'Garra: **Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets.** *Immunity* 1998, **8**:275-83.
29. Q Yu, A Sharma, SY Oh, HG Moon, MZ Hossain, TM Salay, KE Leeds, H Du, B Wu, ML Waterman, et al: **T cell factor 1 initiates the T helper type 2 fate by inducing the transcription factor GATA-3 and repressing interferon-gamma.** *Nat Immunol* 2009, **10**:992-9.
30. M Afkarian, JR Sedy, J Yang, NG Jacobson, N Cereb, SY Yang, TL Murphy, KM Murphy: **T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells.** *Nat Immunol* 2002, **3**:549-57.
31. IC Ho, D Lo, LH Glimcher: **c-maf promotes T helper cell type 2 (Th2) and attenuates Th1 differentiation by both interleukin 4-dependent and -independent mechanisms.** *J Exp Med* 1998, **188**:1859-66.
32. SJ Szabo, ST Kim, GL Costa, X Zhang, CG Fathman, LH Glimcher: **A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment.** *Cell* 2000, **100**:655-69.
33. SZ Josefowicz, A Rudensky: **Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance.** *Immunity* 2009, **30**:616-25.
34. L Zhou, MM Chong, DR Littman: **Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation.** *Immunity* 2009, **30**:646-55.
35. JM Ellery, PJ Nicholls: **Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2002, **13**:27-40.
36. MT Kasaian, CA Biron: **The activation of IL-2 transcription in L3T4+ and Lyt-2+ lymphocytes during virus infection in vivo.** *J Immunol* 1989, **142**:1287-92.
37. T Takeshita, K Ohtani, H Asao, S Kumaki, M Nakamura, K Sugamura: **An associated molecule, p64, with IL-2 receptor beta chain. Its possible involvement in the formation of the functional intermediate-affinity IL-2 receptor complex.** *J Immunol* 1992, **148**:2154-8.
38. N Arima, M Kamio, M Okuma, G Ju, T Uchiyama: **The IL-2 receptor alpha-chain alters the binding of IL-2 to the beta-chain.** *J Immunol* 1991, **147**:3396-401.
39. MJ May, S Ghosh: **Signal transduction through NF-kappa B.** *Immunol Today* 1998, **19**:80-8.
40. S Bahram, M Bresnahan, DE Geraghty, T Spies: **A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1994, **91**:6259-6263.
41. **Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium.** *Nature* 1999, **401**:921-3.
42. C Leelayuwat, DC Townend, MA Degli-Esposti, LJ Abraham, RL Dawkins: **A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I.** *Immunogenetics* 1994, **40**:339-51.
43. A Steinle, V Groh, T Spies: **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 USA* 1998, **95**:12510-12515.
44. M Kasahara, Y Watanabe, M Sumasu, T Nagata: **A family of MHC class I-like genes located in the vicinity of the mouse leukocyte receptor complex.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:13687-13692.
45. BA Rabinovich, RR Ketchum, M Wolfson, L Goldstein, M Skelly, D Cosman: **A role for the MHC class I-like Mill molecules in nutrient metabolism and wound healing.** *Immunol Cell Biol* 2008, **86**:489-96.
46. S Bahram, N Mizuki, H Inoko, T Spies: **Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene.** *Immunogenetics* 1996, **44**:80-1.
47. S Bahram, T Shiina, A Oka, G Tamiya, H Inoko: **Genomic structure of the human MHC class I MICB gene.** *Immunogenetics* 1996, **45**:161-2.

48. AN Barclay: **Ig-like domains: evolution from simple interaction molecules to sophisticated antigen recognition.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:14672-4.
49. LL Molinero, MB Fuertes, MV Girart, L Fainboim, GA Rabinovich, MA Costas, NW Zwirner: **NF-kappaB Regulates Expression of the MHC Class I-Related Chain A Gene in Activated T Lymphocytes.** *J Immunol* 2004, **173**:5583-5590.
50. N Mizuki, M Ota, M Kimura, S Ohno, H Ando, Y Katsuyama, M Yamazaki, K Watanabe, K Goto, S Nakamura, et al: **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* 1997, **94**:1298-303.
51. H Suemizu, M Radosavljevic, M Kimura, S Sadahiro, S Yoshimura, S Bahram, H Inoko: **A basolateral sorting motif in the MICA cytoplasmic tail.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:2971-2976.
52. V Groh, S Bahram, S Bauer, A Herman, M Beauchamp, T Spies: **Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**:12445-12450.
53. V Groh, A Steinle, S Bauer, T Spies: **Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells.** *Science* 1998, **279**:1737-1740.
54. NW Zwirner, MA Fernandez-Vina, P Stastny: **MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes.** *Immunogenetics* 1998, **47**:139-148.
55. P Li, ST Willie, S Bauer, DL Morris, T Spies, RK Strong: **Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand.** *Immunity* 1999, **10**:577-584.
56. LL Molinero, CY Marcos, F Mirbaha, L Fainboim, P Stastny, NW Zwirner: **Codominant expression of the polymorphic MICA alloantigens encoded by genes in the HLA region.** *Eur J Immunogenet* 2002, **29**:315-319.
57. N Fodil, L Laloux, V Wanner, P Pellet, G Hauptmann, N Mizuki, H Inoko, T Spies, I Theodorou, S Bahram: **Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene.** *Immunogenetics* 1996, **44**:351-7.
58. Y Katsuyama, M Ota, H Ando, S Saito, N Mizuki, J Kera, S Bahram, Y Nose, H Inoko: **Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons, 2, 3 and 4 of the MICA gene.** *Tissue Antigens* 1999, **54**:178-84.
59. CJ Visser, MG Tilanus, Z Tatari, AW van der Zwan, R Bakker, EH Rozemuller, V Schaeffer, R Tamouza, D Charron: **Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes.** *Immunogenetics* 1999, **49**:561-6.
60. I Quiroga, D Sweeney, PM Sutton, T Ahmad, R Walton, MC Barnardo, SV Fuggle: **The identification of three novel MICA alleles by sequence-based typing.** *Tissue Antigens* 2006, **67**:321-5.
61. ST Cox, HA Stephens, R Fernando, J Grant, JA Madrigal, AM Little: **Two novel MICA alleles, MICA\*054 and MICA\*056.** *Tissue Antigens* 2009, **73**:85-7.
62. H Ando, N Mizuki, M Ota, M Yamazaki, S Ohno, K Goto, Y Miyata, K Wakisaka, S Bahram, H Inoko: **Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB).** *Immunogenetics* 1997, **46**:499-508.
63. CJ Visser, MG Tilanus, V Schaeffer, Z Tatari, R Tamouza, A Janin, D Charron: **Sequencing-based typing reveals six novel MHC class I chain-related gene B (MICB) alleles.** *Tissue Antigens* 1998, **51**:649-52.
64. P Pellet, M Renaud, N Fodil, L Laloux, H Inoko, G Hauptmann, P Debre, S Bahram, I Theodorou: **Allelic repertoire of the human MICB gene.** *Immunogenetics* 1997, **46**:434-6.
65. Z Li, V Groh, RK Strong, T Spies: **A single amino acid substitution causes loss of expression of a MICA allele.** *Immunogenetics* 2000, **51**:246-248.
66. EW Petersdorf, KB Shuler, GM Longton, T Spies, JA Hansen: **Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene.** *Immunogenetics* 1999, **49**:605-12.
67. M Komatsu-Wakui, K Tokunaga, Y Ishikawa, K Kashiwase, S Moriyama, N Tsuchiya, H Ando, T Shiina, DE Geraghty, H Inoko, et al: **MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype.** *Immunogenetics* 1999, **49**:620-8.



68. NW Zwirner, K Dole, P Stastny: **Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes.** *Hum Immunol* 1999, **60**:323-330.
69. S Schrambach, M Ardizzone, V Leymarie, J Sibilia, S Bahram: **In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer.** *PLoS One* 2007, **2**:e518.
70. K Yamamoto, Y Fujiyama, A Andoh, T Bamba, H Okabe: **Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2).** *Biochim Biophys Acta* 2001, **1526**:10-2.
71. V Groh, R Rhinehart, J Randolph-Habecker, MS Topp, SR Riddell, T Spies: **Costimulation of CD8alpha T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells.** *Nat Immunol* 2001, **2**:255-260.
72. JW Yewdell, AB Hill: **Viral interference with antigen presentation.** *Nat Immunol* 2002, **3**:1019-25.
73. Y Zou, W Bresnahan, RT Taylor, P Stastny: **Effect of Human Cytomegalovirus on Expression of MHC Class I-Related Chains A.** *J Immunol* 2005, **174**:3098-3104.
74. H Das, V Groh, C Kuijl, M Sugita, CT Morita, T Spies, JF Bukowski: **MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function.** *Immunity* 2001, **15**:83-93.
75. V Tieng, C Le Bouguenec, L du Merle, P Bertheau, P Desreumaux, A Janin, D Charron, A Toubert: **Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2002, **99**:2977-2982.
76. S Bauer, V Groh, J Wu, A Steinle, JH Phillips, LL Lanier, T Spies: **Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA.** *Science* 1999, **285**:727-729.
77. D Pende, P Rivera, S Marcenaro, C-C Chang, R Biassoni, R Conte, M Kubin, D Cosman, S Ferrone, L Moretta, et al: **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* 2002, **62**:6178-6186.
78. D Pende, C Cantoni, P Rivera, M Vitale, R Castriconi, S Marcenaro, M Nanni, R Biassoni, C Bottino, A Moretta, et al: **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* 2001, **31**:1076-1086.
79. LL Molinero, MB Fuertes, GA Rabinovich, L Fainboim, NW Zwirner: **Activation-induced expression of MICA on T lymphocytes involves engagement of CD3 and CD28.** *J Leukoc Biol* 2002, **71**:791-797.
80. LL Molinero, MB Fuertes, L Fainboim, GA Rabinovich, NW Zwirner: **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* 2003, **73**:815-822.
81. C Cerboni, A Zingoni, M Cippitelli, M Piccoli, L Frati, A Santoni: **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* 2007, **110**:606-615.
82. D Pende, P Rivera, S Marcenaro, CC Chang, R Biassoni, R Conte, M Kubin, D Cosman, S Ferrone, L Moretta, et al: **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* 2002, **62**:6178-6186.
83. V Groh, R Rhinehart, H Secrist, S Bauer, KH Grabstein, T Spies: **Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:6879-6884.
84. CS Vetter, V Groh, P thor Straten, T Spies, EB Brocker, JC Becker: **Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma.** *J Invest Dermatol* 2002, **118**:600-605.
85. KH Vousden, X Lu: **Live or let die: the cell's response to p53.** *Nat Rev Cancer* 2002, **2**:594-604.
86. S Gasser, S Orsulic, EJ Brown, DH Raulet: **The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor.** *Nature* 2005, **436**:1186-1190.
87. DH Raulet, N Guerra: **Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors.** *Nat Rev Immunol* 2009, **9**:568-80.
88. D Hanahan, RA Weinberg: **The hallmarks of cancer.** *Cell* 2000, **100**:57-70.

89. FH Igney, PH Krammer: **Immune escape of tumors: apoptosis resistance and tumor counterattack.** *J Leukoc Biol* 2002, **71**:907-20.
90. NP Restifo, PA Antony, SE Finkelstein, WW Leitner, DP Surman, MR Theoret, CE Touloukian: **Assumptions of the tumor 'escape' hypothesis.** *Semin Cancer Biol* 2002, **12**:81-86.
91. GP Dunn, AT Bruce, H Ikeda, LJ Old, RD Schreiber: **Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape.** *Nat Immunol* 2002, **3**:991-998.
92. V Shankaran, H Ikeda, AT Bruce, JM White, PE Swanson, LJ Old, RD Schreiber: **IFNgamma and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity.** *Nature* 2001, **410**:1107-11.
93. JF Bromberg, CM Horvath, Z Wen, RD Schreiber, JE Darnell, Jr.: **Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**:7673-8.
94. H Ikeda, LJ Old, RD Schreiber: **The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2002, **13**:95-109.
95. RM Strieter, SL Kunkel, DA Arenberg, MD Burdick, PJ Polverini: **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* 1995, **210**:51-7.
96. JM Farber: **Mig and IP-10: CXC chemokines that target lymphocytes.** *J Leukoc Biol* 1997, **61**:246-57.
97. S Gasperini, M Marchi, F Calzetti, C Laudanna, L Vicentini, H Olsen, M Murphy, F Liao, J Farber, MA Cassatella: **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* 1999, **162**:4928-37.
98. T Panaretakis, O Kepp, U Brockmeier, A Tesniere, AC Bjorklund, DC Chapman, M Durchschlag, N Joza, G Pierron, P van Endert, et al: **Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death.** *EMBO J* 2009, **28**:578-90.
99. DR Green, T Ferguson, L Zitvogel, G Kroemer: **Immunogenic and tolerogenic cell death.** *Nat Rev Immunol* 2009, **9**:353-63.
100. O Kepp, A Tesniere, F Schlemmer, M Michaud, L Senovilla, L Zitvogel, G Kroemer: **Immunogenic cell death modalities and their impact on cancer treatment.** *Apoptosis* 2009, **14**:364-75.
101. GA Rabinovich, E Sotomayor, D Gabrilovich: **Immunosuppressive Strategies that Are Mediated by Tumor Cells.** *Annu Rev Immunol* 2007, **25**:267-296.
102. CM Koebel, W Vermi, JB Swann, N Zerafa, SJ Rodig, LJ Old, MJ Smyth, RD Schreiber: **Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state.** *Nature* 2007, **450**:903-907.
103. C Maccalli, D Nonaka, A Piris, D Pende, L Rivoltini, C Castelli, G Parmiani: **NKG2D-mediated antitumor activity by tumor-infiltrating lymphocytes and antigen-specific T-cell clones isolated from melanoma patients.** *Clin Cancer Res* 2007, **13**:7459-7468.
104. V Groh, J Wu, C Yee, T Spies: **Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation.** *Nature* 2002, **419**:734-738.
105. HR Salih, H-G Rammensee, A Steinle: **Down-Regulation of MICA on Human Tumors by Proteolytic Shedding.** *J Immunol* 2002, **169**:4098-4102.
106. BK Kaiser, D Yim, IT Chow, S Gonzalez, Z Dai, HH Mann, RK Strong, V Groh, T Spies: **Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands.** *Nature* 2007, **447**:482-486.
107. SM Wahl, J Wen, N Moutsopoulos: **TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege.** *Immunol Rev* 2006, **213**:213-27.
108. MA Friese, J Wischhusen, W Wick, M Weiler, G Eisele, A Steinle, M Weller: **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* 2004, **64**:7596-7603.
109. F Ghiringhelli, C Menard, M Terme, C Flament, J Taieb, N Chaput, PE Puig, S Novault, B Escudier, E Vivier, et al: **CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner.** *J Exp Med* 2005, **202**:1075-1085.

110. MA Friese, J Wischhusen, W Wick, M Weiler, G Eisele, A Steinle, M Weller: **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* 2004, **64**:7596-7603.
111. R Castriconi, C Cantoni, M Della Chiesa, M Vitale, E Marcenaro, R Conte, R Biassoni, C Bottino, L Moretta, A Moretta: **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 USA* 2003, **100**:4120-4125.
112. MJ Smyth, MWL Teng, J Swann, K Kyparissoudis, DI Godfrey, Y Hayakawa: **CD4+CD25+ T Regulatory Cells Suppress NK Cell-Mediated Immunotherapy of Cancer.** *J Immunol* 2006, **176**:1582-1587.
113. JC Lee, KM Lee, DW Kim, DS Heo: **Elevated TGF- $\beta$ 1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients.** *J Immunol* 2004, **172**:7335-7340.
114. MB Fuertes, MV Girart, LL Molinero, CI Domaica, LE Rossi, MM Barrio, J Mordoh, GA Rabinovich, NW Zwirner: **Intracellular Retention of the NKG2D Ligand MHC Class I Chain-Related Gene A in Human Melanomas Confers Immune Privilege and Prevents NK Cell-Mediated Cytotoxicity.** *J Immunol* 2008, **180**:4606-4614.
115. J Lieberman: **The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal.** *Nat Rev Immunol* 2003, **3**:361-70.
116. K Veugelers, B Motyka, IS Goping, I Shostak, T Sawchuk, RC Bleackley: **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* 2006, **17**:623-33.
117. M Barry, RC Bleackley: **Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death.** *Nat Rev Immunol* 2002, **2**:401-9.
118. P Hersey, XD Zhang: **HOW MELANOMA CELLS EVADE TRAIL-INDUCED APOPTOSIS.** *Nature Reviews Cancer* 2001, **1**:142-150.
119. A Martin-Fontecha, LL Thomsen, S Brett, C Gerard, M Lipp, A Lanzavecchia, F Sallusto: **Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- $\gamma$  for T(H)1 priming.** *Nat Immunol* 2004, **5**:1260-1265.
120. T Walzer, S Jaeger, J Chaix, E Vivier: **Natural killer cells: from CD3(-)NKp46(+) to post-genomics meta-analyses.** *Curr Opin Immunol* 2007, **19**:365-372.
121. KC Newman, EM Riley: **Whatever turns you on: accessory-cell-dependent activation of NK cells by pathogens.** *Nat Rev Immunol* 2007, **7**:279-91.
122. G Ferlazzo, M Pack, D Thomas, C Paludan, D Schmid, T Strowig, G Bougras, WA Muller, L Moretta, C Munz: **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* 2004, **101**:16606-16611.
123. MA Toscano, GA Bianco, JM Ilarregui, DO Croci, J Correale, JD Hernandez, NW Zwirner, F Poirier, EM Riley, LG Baum, et al: **Differential glycosylation of T(H)1, T(H)2 and T(H)17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death.** *Nat Immunol* 2007, **8**:825-834.
124. A Shibuya, K Nagayoshi, K Nakamura, H Nakauchi: **Lymphokine requirement for the generation of natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells.** *Blood* 1995, **85**:3538-46.
125. MA Cooper, TA Fehniger, MA Caligiuri: **The biology of human natural killer-cell subsets.** *Trends Immunol* 2001, **22**:633-640.
126. K Dorshkind, SB Pollack, MJ Bosma, RA Phillips: **Natural killer (NK) cells are present in mice with severe combined immunodeficiency (scid).** *J Immunol* 1985, **134**:3798-801.
127. MJ Sanchez, MO Muench, MG Roncarolo, LL Lanier, JH Phillips: **Identification of a common T/natural killer cell progenitor in human fetal thymus.** *J Exp Med* 1994, **180**:569-76.
128. DM Gascoyne, E Long, H Veiga-Fernandes, J de Boer, O Williams, B Seddon, M Coles, D Kioussis, HJ Brady: **The basic leucine zipper transcription factor E4BP4 is essential for natural killer cell development.** *Nat Immunol* 2009, **10**:1118-24.
129. JP Di Santo: **A defining factor for natural killer cell development.** *Nat Immunol* 2009, **10**:1051-2.
130. M Zijlstra, H Auchincloss, Jr., JM Loring, CM Chase, PS Russell, R Jaenisch: **Skin graft rejection by beta 2-microglobulin-deficient mice.** *J Exp Med* 1992, **175**:885-93.

131. JM Routes: **IFN increases class I MHC antigen expression on adenovirus-infected human cells without inducing resistance to natural killer cell killing.** *J Immunol* 1992, **149**:2372-7.
132. MA Caligiuri, A Zmuidzinis, TJ Manley, H Levine, KA Smith, J Ritz: **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* 1990, **171**:1509-26.
133. YT Bryceson, ME March, H-G Ljunggren, EO Long: **Activation, coactivation, and costimulation of resting human natural killer cells.** *Immunological Reviews* 2006, **214**:73-91.
134. NC Fernandez, E Treiner, RE Vance, AM Jamieson, S Lemieux, DH Raulat: **A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules.** *Blood* 2005, **105**:4416-23.
135. S Welte, S Kuttruff, I Waldhauer, A Steinle: **Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction.** *Nat Immunol* 2006, **7**:1334-42.
136. F Gerosa, B Baldani-Guerra, C Nisii, V Marchesini, G Carra, G Trinchieri: **Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells.** *J Exp Med* 2002, **195**:327-333.
137. D Piccoli, S Sbrana, E Melandri, NM Valiante: **Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells.** *J Exp Med* 2002, **195**:335-41.
138. G Ferlazzo, ML Tsang, L Moretta, G Melioli, RM Steinman, C Munz: **Human Dendritic Cells Activate Resting Natural Killer (NK) Cells and Are Recognized via the NKp30 Receptor by Activated NK Cells.** *J Exp Med* 2002, **195**:343-351.
139. DM Andrews, CE Andoniou, AA Scalzo, SL van Dommelen, ME Wallace, MJ Smyth, MA Degli-Esposti: **Cross-talk between dendritic cells and natural killer cells in viral infection.** *Mol Immunol* 2005, **42**:547-55.
140. F Ghiringhelli, L Apetoh, F Housseau, G Kroemer, L Zitvogel: **Links between innate and cognate tumor immunity.** *Curr Opin Immunol* 2007, **19**:224-31.
141. M Lucas, W Schachterle, K Oberle, P Aichele, A Diefenbach: **Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15.** *Immunity* 2007, **26**:503-517.
142. AC Mullen, FA High, AS Hutchins, HW Lee, AV Villarino, DM Livingston, AL Kung, N Cereb, TP Yao, SY Yang, et al: **Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12-dependent selection.** *Science* 2001, **292**:1907-10.
143. LL Lanier: **NK cell recognition.** *Annu Rev Immunol* 2005, **23**:225-74.
144. MJ Robertson: **Role of chemokines in the biology of natural killer cells.** *J Leukoc Biol* 2002, **71**:173-183.
145. G Ferlazzo, M Pack, D Thomas, C Paludan, D Schmid, T Strowig, G Bougras, WA Muller, L Moretta, C Munz: **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 USA* 2004, **101**:16606-16611.
146. C Romagnani, K Juelke, M Falco, B Morandi, A D'Agostino, R Costa, G Ratto, G Forte, P Carrega, G Lui, et al: **CD56<sup>bright</sup>CD16<sup>-</sup> killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56<sup>dim</sup> NK cells upon activation.** *J Immunol* 2007, **178**:4947-55.
147. JC Sun, LL Lanier: **Natural killer cells remember: an evolutionary bridge between innate and adaptive immunity?** *Eur J Immunol* 2009, **39**:2059-64.
148. JG O'Leary, M Goodarzi, DL Drayton, UH von Andrian: **T cell- and B cell-independent adaptive immunity mediated by natural killer cells.** *Nat Immunol* 2006, **7**:507-16.
149. JC Sun, JN Beilke, LL Lanier: **Adaptive immune features of natural killer cells.** *Nature* 2009, **457**:557-561.
150. MA Cooper, JM Elliott, PA Keyel, L Yang, JA Carrero, WM Yokoyama: **Cytokine-induced memory-like natural killer cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**:1915-9.
151. A Cerwenka, LL Lanier: **Natural killer cells, viruses and cancer.** *Nat Rev Immunol* 2001, **1**:41-49.
152. JM Moser, AM Byers, AE Lukacher: **NK cell receptors in antiviral immunity.** *Curr Opin Immunol* 2002, **14**:509-16.
153. EO Long: **Regulation of immune responses through inhibitory receptors.** *Annu Rev Immunol* 1999, **17**:875-904.

154. A Moretta, C Bottino, M Vitale, D Pende, C Cantoni, MC Mingari, R Biassoni, L Moretta: **Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity.** *Annu Rev Immunol* 2001, **19**:197-223.
155. JV Ravetch, LL Lanier: **Immune inhibitory receptors.** *Science* 2000, **290**:84-9.
156. NW Zwirner, MB Fuertes, MV Girart, CI Domaica, LE Rossi: **Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2007, **18**:159-170.
157. J Trowsdale: **Genetic and Functional Relationships between MHC and NK Receptor Genes.** *Immunity* 2001, **15**:363-374.
158. K Natarajan, N Dimasi, J Wang, RA Mariuzza, DH Margulies: **Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination.** *Annu Rev Immunol* 2002, **20**:853-85.
159. M Faure, EO Long: **KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential.** *J Immunol* 2002, **168**:6208-14.
160. CC Winter, JE Gumperz, P Parham, EO Long, N Wagtmann: **Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition.** *J Immunol* 1998, **161**:571-7.
161. EO Long: **Tumor cell recognition by natural killer cells.** *Semin Cancer Biol* 2002, **12**:57-61.
162. AB Bakker, J Wu, JH Phillips, LL Lanier: **NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals.** *Hum Immunol* 2000, **61**:18-27.
163. C Vilches, P Parham: **KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity.** *Annu Rev Immunol* 2002, **20**:217-51.
164. J Glienke, Y Sobanov, C Brostjan, C Steffens, C Nguyen, H Lehrach, E Hofer, F Francis: **The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex.** *Immunogenetics* 1998, **48**:163-73.
165. JP Houchins, T Yabe, C McSherry, FH Bach: **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* 1991, **173**:1017-20.
166. F Borrego, M Masilamani, AI Marusina, X Tang, JE Coligan: **The CD94/NKG2 family of receptors: from molecules and cells to clinical relevance.** *Immunol Res* 2006, **35**:263-78.
167. LL Lanier, B Corliss, J Wu, JH Phillips: **Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors.** *Immunity* 1998, **8**:693-701.
168. LL Lanier, BC Corliss, J Wu, C Leong, JH Phillips: **Immunoreceptor DAP12 bearing a tyrosine-based activation motif is involved in activating NK cells.** *Nature* 1998, **391**:703-7.
169. VM Braud, DS Allan, CA O'Callaghan, K Soderstrom, A D'Andrea, GS Ogg, S Lazetic, NT Young, JI Bell, JH Phillips, et al: **HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C.** *Nature* 1998, **391**:795-9.
170. VM Braud, DS Allan, D Wilson, AJ McMichael: **TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide.** *Curr Biol* 1998, **8**:1-10.
171. LL Spruyt, MJ Glennie, AD Beyers, AF Williams: **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 RIIA (CD16).** *J Exp Med* 1991, **174**:1407-15.
172. S Sivori, S Parolini, M Falco, E Marcenaro, R Biassoni, C Bottino, L Moretta, A Moretta: **2B4 functions as a co-receptor in human NK cell activation.** *Eur J Immunol* 2000, **30**:787-93.
173. A Bouchon, M Cella, HL Grierson, JI Cohen, M Colonna: **Activation of NK cell-mediated cytotoxicity by a SAP-independent receptor of the CD2 family.** *J Immunol* 2001, **167**:5517-21.
174. C Bottino, M Falco, S Parolini, E Marcenaro, R Augugliaro, S Sivori, E Landi, R Biassoni, LD Notarangelo, L Moretta, et al: **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* 2001, **194**:235-46.

175. A Shibuya, D Campbell, C Hannum, H Yssel, K Franz-Bacon, T McClanahan, T Kitamura, J Nicholl, GR Sutherland, LL Lanier, et al: **DNAM-1, a novel adhesion molecule involved in the cytolytic function of T lymphocytes.** *Immunity* 1996, **4**:573-81.
176. M Vitale, M Falco, R Castriconi, S Parolini, R Zambello, G Semenzato, R Biassoni, C Bottino, L Moretta, A Moretta: **Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells.** *Eur J Immunol* 2001, **31**:233-42.
177. JL Upshaw, PJ Leibson: **NKG2D-mediated activation of cytotoxic lymphocytes: unique signaling pathways and distinct functional outcomes.** *Semin Immunol* 2006, **18**:167-75.
178. YT Bryceson, ME March, H-G Ljunggren, EO Long: **Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion.** *Blood* 2006, **107**:159-166.
179. L Fischer, O Penack, C Gentilini, A Nogai, A Muessig, E Thiel, L Uharek: **The anti-lymphoma effect of antibody-mediated immunotherapy is based on an increased degranulation of peripheral blood natural killer (NK) cells.** *Experimental Hematology* 2006, **34**:753-759.
180. KJ Maddocks, TS Lin: **Update in the management of chronic lymphocytic leukemia.** *J Hematol Oncol* 2009, **2**:29.
181. A Pessino, S Sivori, C Bottino, A Malaspina, L Morelli, L Moretta, R Biassoni, A Moretta: **Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity.** *J Exp Med* 1998, **188**:953-60.
182. C Cantoni, C Bottino, M Vitale, A Pessino, R Augugliaro, A Malaspina, S Parolini, L Moretta, A Moretta, R Biassoni: **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* 1999, **189**:787-796.
183. D Pende, S Parolini, A Pessino, S Sivori, R Augugliaro, L Morelli, E Marcenaro, L Accame, A Malaspina, R Biassoni, et al: **Identification and Molecular Characterization of NKp30, a Novel Triggering Receptor Involved in Natural Cytotoxicity Mediated by Human Natural Killer Cells.** *J. Exp. Med.* 1999, **190**:1505-1516.
184. TI Arnon, M Lev, G Katz, Y Chernobrov, A Porgador, O Mandelboim: **Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30.** *Eur J Immunol* 2001, **31**:2680-9.
185. O Mandelboim, N Lieberman, M Lev, L Paul, TI Arnon, Y Bushkin, DM Davis, JL Strominger, JW Yewdell, A Porgador: **Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells.** *Nature* 2001, **409**:1055-60.
186. A Byrd, SC Hoffmann, M Jarahian, F Momburg, C Watzl: **Expression analysis of the ligands for the Natural Killer cell receptors NKp30 and NKp44.** *PLoS One* 2007, **2**:e1339.
187. O Hershkovitz, S Jivov, N Bloushtain, A Zilka, G Landau, A Bar-Ilan, RG Lichtenstein, KS Campbell, TH van Kuppevelt, A Porgador: **Characterization of the recognition of tumor cells by the natural cytotoxicity receptor, NKp44.** *Biochemistry* 2007, **46**:7426-36.
188. N Bloushtain, U Qimron, A Bar-Ilan, O Hershkovitz, R Gazit, E Fima, M Korc, I Vlodavsky, NV Bovin, A Porgador: **Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46.** *J Immunol* 2004, **173**:2392-401.
189. J Wu, Y Song, AB Bakker, S Bauer, T Spies, LL Lanier, JH Phillips: **An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10.** *Science* 1999, **285**:730-732.
190. A Diefenbach, E Tomasello, M Lucas, AM Jamieson, JK Hsia, E Vivier, DH Raulet: **Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D.** *Nat Immunol* 2002, **3**:1142-1149.
191. C Chang, J Dietrich, AG Harpur, JA Lindquist, A Haude, YW Loke, A King, M Colonna, J Trowsdale, MJ Wilson: **Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties.** *J Immunol* 1999, **163**:4651-4.
192. AI Roberts, L Lee, E Schwarz, V Groh, T Spies, EC Ebert, B Jabri: **NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment.** *J Immunol* 2001, **167**:5527-5530.

193. EL Ho, JW Heusel, MG Brown, K Matsumoto, AA Scalzo, WM Yokoyama: **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* 1998, **95**:6320-5.
194. EO Long: **Versatile signaling through NKG2D.** *Nat Immunol* 2002, **3**:1119-20.
195. S Gilfillan, EL Ho, M Cella, WM Yokoyama, M Colonna: **NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation.** *Nat Immunol* 2002, **3**:1150-1155.
196. A Diefenbach, AM Jamieson, SD Liu, N Shastri, DH Raulet: **Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages.** *Nat Immunol* 2000, **1**:119-126.
197. LN Carayannopoulos, OV Naidenko, DH Fremont, WM Yokoyama: **Murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D.** *J Immunol* 2002, **169**:4079-4083.
198. D Cosman, J Mullberg, CL Sutherland, W Chin, R Armitage, W Fanslow, M Kubin, NJ Chalupny: **ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor.** *Immunity* 2001, **14**:123-133.
199. CL Sutherland, NJ Chalupny, K Schooley, T VandenBos, M Kubin, D Cosman: **UL16-Binding Proteins, Novel MHC Class I-Related Proteins, Bind to NKG2D and Activate Multiple Signaling Pathways in Primary NK Cells.** *J Immunol* 2002, **168**:671-679.
200. W Cao, X Xi, Z Hao, W Li, Y Kong, L Cui, C Ma, D Ba, W He: **RAET1E2, a Soluble Isoform of the UL16-binding Protein RAET1E Produced by Tumor Cells, Inhibits NKG2D-mediated NK Cytotoxicity.** In: *J Biol Chem*, vol. 282. City; 2007: 18922-18928.
201. L Bacon, RA Eagle, M Meyer, N Easom, NT Young, J Trowsdale: **Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D.** *J Immunol* 2004, **173**:1078-1084.
202. RA Eagle, J Trowsdale: **Promiscuity and the single receptor: NKG2D.** *Nat Rev Immunol* 2007, **7**:737-744.
203. C Bona, R Robineaux, A Anteunis, C Heuclin, A Astesano: **Transfer of antigen from macrophages to lymphocytes. II. Immunological significance of the transfer of lipopolysaccharide.** *Immunology* 1973, **24**:831-40.
204. ST Lee, F Paraskevas: **Macrophage--T cell interactions. I. The uptake by T cells of Fc receptors released from macrophages.** *Cell Immunol* 1978, **40**:141-53.
205. D Hudrisier, P Bongrand: **Intercellular transfer of antigen-presenting cell determinants onto T cells: molecular mechanisms and biological significance.** *FASEB J.* 2002, **16**:477-486.
206. FD Batista, D Iber, MS Neuberger: **B cells acquire antigen from target cells after synapse formation.** *Nature* 2001, **411**:489-494.
207. DM Davis: **Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response.** *Nat Rev Immunol* 2007, **7**:238-243.
208. E Joly, D Hudrisier: **What is trogocytosis and what is its purpose?** *Nat Immunol* 2003, **4**:815.
209. J Zhou, Y Tagaya, R Tolouei-Semnani, J Schlom, H Sabzevari: **Physiological relevance of antigen presentasome (APS), an acquired MHC/costimulatory complex, in the sustained activation of CD4+ T cells in the absence of APCs.** *Blood* 2005, **105**:3238-3246.
210. Z Tatari-Calderone, RT Semnani, TB Nutman, J Schlom, H Sabzevari: **Acquisition of CD80 by human T cells at early stages of activation: functional involvement of CD80 acquisition in T cell to T cell interaction.** *J Immunol* 2002, **169**:6162-6169.
211. I Hwang, JF Huang, H Kishimoto, A Brunmark, PA Peterson, MR Jackson, CD Surh, Z Cai, J Sprent: **T cells can use either T cell receptor or CD28 receptors to absorb and internalize cell surface molecules derived from antigen-presenting cells.** *J Exp Med* 2000, **191**:1137-148.
212. D Hudrisier, J Riond, H Mazarguil, JE Gairin, E Joly: **CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner.** *J Immunol* 2001, **166**:3645-3649.
213. SA Wetzel, TW McKeithan, DC Parker: **Peptide-Specific Intercellular Transfer of MHC Class II to CD4+ T Cells Directly from the Immunological Synapse upon Cellular Dissociation.** *J Immunol* 2005, **174**:80-89.

214. J LeMaout, J Caumartin, M Daouya, B Favier, S Le Rond, A Gonzalez, ED Carosella: **Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells.** *Blood* 2007, **109**:2040-2048.
215. P Roda-Navarro, M Vales-Gomez, SE Chisholm, HT Reburn: **Transfer of NKG2D and MICB at the cytotoxic NK cell immune synapse correlates with a reduction in NK cell cytotoxic function.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, **103**:11258-11263.
216. FE McCann, P Eissmann, B Onfelt, R Leung, DM Davis: **The activating NKG2D ligand MHC class I-related chain A transfers from target cells to NK cells in a manner that allows functional consequences.** *J Immunol* 2007, **178**:3418-3426.
217. F Fallarino, U Grohmann, KW Hwang, C Orabona, C Vacca, R Bianchi, ML Belladonna, MC Fioretti, ML Alegre, P Puccetti: **Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells.** *Nat Immunol* 2003, **4**:1206-1212.
218. M Poupot, F Pont, JJ Fournie: **Profiling blood lymphocyte interactions with cancer cells uncovers the innate reactivity of human gamma delta T cells to anaplastic large cell lymphoma.** *J Immunol* 2005, **174**:1717-1722.
219. D Hudrisier, A Aucher, AL Puaux, C Bordier, E Joly: **Capture of target cell membrane components via trogocytosis is triggered by a selected set of surface molecules on T or B cells.** *J Immunol* 2007, **178**:3637-3647.
220. DM Patel, PY Arnold, GA White, JP Nardella, MD Mannie: **Class II MHC/peptide complexes are released from APC and are acquired by T cell responders during specific antigen recognition.** *J Immunol* 1999, **163**:5201-5210.
221. JF Huang, Y Yang, H Sepulveda, W Shi, I Hwang, PA Peterson, MR Jackson, J Sprent, Z Cai: **TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells.** *Science* 1999, **286**:952-4.
222. DM Davis, S Sowinski: **Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**:431-6.
223. JC Stinchcombe, G Bossi, S Booth, GM Griffiths: **The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges.** *Immunity* 2001, **15**:751-61.
224. P Paul, N Rouas-Freiss, I Khalil-Daher, P Moreau, B Riteau, FA Le Gal, MF Avril, J Dausset, JG Guillet, ED Carosella: **HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:4510-4515.
225. JA Reed, E Bales, W Xu, NA Okan, D Bandyopadhyay, EE Medrano: **Cytoplasmic localization of the oncogenic protein Ski in human cutaneous melanomas in vivo: functional implications for transforming growth factor beta signaling.** *Cancer Res* 2001, **61**:8074-8078.
226. C Kairiyama, I Slavutsky, I Larripa, V Morvillo, AI Bravo, L Bover, OL Podhajcer, J Mordoh: **Biologic, immunocytochemical, and cytogenetic characterization of two new human melanoma cell lines: IIB-MEL-LES and IIB-MEL-IAN.** *Pigment Cell Res* 1995, **8**:121-131.
227. NW Zwirner, CY Marcos, F Mirbaha, Y Zou, P Stastny: **Identification of MICA as a new polymorphic alloantigen recognized by antibodies in sera of organ transplant recipients.** *Hum Immunol* 2000, **61**:917-924.
228. FA Goldbaum, J Leoni, JC Wallach, CA Fossati: **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* 1993, **31**:2141-5.
229. B Hames: **An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis.** *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach.* 1981:1-86.
230. MB Fuertes: **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. 2003.
231. R Biassoni, C Bottino, C Cantoni, A Moretta: **Human natural killer receptors and their ligands.** *Curr Protoc Immunol* 2002, **Chapter 14**:Unit 14 10.
232. LL Molinero, CI Domaica, MB Fuertes, MV Girart, LE Rossi, NW Zwirner: **Intracellular Expression of MICA in Activated CD4 T Lymphocytes and Protection from NK Cell-Mediated MICA-Dependent Cytotoxicity.** *Human Immunology* 2006, **67**:170-182.



233. H Spits, H Yssel, Y Takebe, N Arai, T Yokota, F Lee, K Arai, J Banchereau, JE de Vries: **Recombinant interleukin 4 promotes the growth of human T cells.** *J Immunol* 1987, **139**:1142-1147.
234. M Kubo, M Yamashita, R Abe, T Tada, K Okumura, JT Ransom, T Nakayama: **CD28 costimulation accelerates IL-4 receptor sensitivity and IL-4-mediated Th2 differentiation.** *J Immunol* 1999, **163**:2432-2442.
235. A Truneh, F Albert, P Golstein, AM Schmitt-Verhulst: **Calcium ionophore plus phorbol ester can substitute for antigen in the induction of cytolytic T lymphocytes from specifically primed precursors.** *J Immunol* 1985, **135**:2262-2267.
236. MW Makgoba, ME Sanders, S Shaw: **The CD2-LFA-3 and LFA-1-ICAM pathways: relevance to T-cell recognition.** *Immunol Today* 1989, **10**:417-22.
237. MS Diamond, DE Staunton, AR de Fougères, SA Stacker, J Garcia-Aguilar, ML Hibbs, TA Springer: **ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18).** *J Cell Biol* 1990, **111**:3129-39.
238. PE Kovanen, WJ Leonard: **Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways.** *Immunol Rev* 2004, **202**:67-83.
239. C Menier, B Riteau, ED Carosella, N Rouas-Freiss: **MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal.** *Int J Cancer* 2002, **100**:63-70.
240. BA Rabinovich, J Li, J Shannon, R Hurren, J Chalupny, D Cosman, RG Miller: **Activated, But Not Resting, T Cells Can Be Recognized and Killed by Syngeneic NK Cells** *J Immunol* 2003, **170**:3572-3576.
241. A Zingoni, T Sornasse, BG Cocks, Y Tanaka, A Santoni, LL Lanier: **Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions.** *J Immunol* 2004, **173**:3716-3724.
242. B Seliger, H Abken, S Ferrone: **HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity.** *Trends Immunol* 2003, **24**:82-87.
243. A Moretta: **Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues.** *Nat Rev Immunol* 2002, **2**:957-964.
244. S Kakuta, Y Tagawa, S Shibata, M Nanno, Y Iwakura: **Inhibition of B16 melanoma experimental metastasis by interferon-gamma through direct inhibition of cell proliferation and activation of antitumor host mechanisms.** *Immunology* 2002, **105**:92-100.
245. F Ghiringhelli, C Menard, F Martin, L Zitvogel: **The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression.** *Immunol Rev* 2006, **214**:229-238.
246. A Clayton, JP Mitchell, J Court, S Linnane, MD Mason, Z Tabi: **Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression.** *J Immunol* 2008, **180**:7249-7458.
247. K Eleme, SB Taner, B Onfelt, LM Collinson, FE McCann, NJ Chalupny, D Cosman, C Hopkins, AI Magee, DM Davis: **Cell Surface Organization of Stress-inducible Proteins ULBP and MICA That Stimulate Human NK Cells and T Cells via NKG2D.** *J. Exp. Med.* 2004, **199**:1005-1010.
248. CE Hirst, MS Buzza, CH Bird, HS Warren, PU Cameron, M Zhang, PG Ashton-Rickardt, PI Bird: **The intracellular granzyme B inhibitor, proteinase inhibitor 9, is up-regulated during accessory cell maturation and effector cell degranulation, and its overexpression enhances CTL potency.** *J Immunol* 2003, **170**:805-15.
249. E Cagnano, O Hershkovitz, A Zilka, A Bar-Ilan, A Golder, N Sion-Vardy, A Bogdanov-Berezovsky, O Mandelboim, D Benharroch, A Porgador: **Expression of ligands to Nkp46 in benign and malignant melanocytes.** *J Invest Dermatol* 2008, **128**:972-979.
250. DA Weigent, MP Langford, WR Fleischmann, Jr., GJ Stanton: **Potential of lymphocyte natural killing by mixtures of alpha or beta interferon with recombinant gamma interferon.** *Infect Immun* 1983, **40**:35-8.
251. CM Coughlin, KE Salhany, MS Gee, DC LaTemple, S Kotenko, X Ma, G Gri, M Wsocka, JE Kim, L Liu, et al: **Tumor cell responses to IFN-gamma affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis.** *Immunity* 1998, **9**:25-34.

- 
252. K Abe, M Harada, K Tamada, O Ito, T Li, K Nomoto: **Early-appearing tumor-infiltrating natural killer cells play an important role in the nitric oxide production of tumor-associated macrophages through their interferon production.** *Cancer Immunol Immunother* 1998, **45**:225-33.
253. Z Li, F Pradera, T Kammertoens, B Li, S Liu, Z Qin: **Cross-talk between T cells and innate immune cells is crucial for IFN-gamma-dependent tumor rejection.** *J Immunol* 2007, **179**:1568-1576.
254. BM Segal, DD Glass, EM Shevach: **IL-10-producing CD4+ T cells mediate tumor rejection.** *J Immunol* 2002, **168**:1-4.
255. JA Westwood, JM Kelly, JE Tanner, MH Kershaw, MJ Smyth, Y Hayakawa: **Novel priming of tumor-specific immunity by NKG2D-triggered NK cell-mediated tumor rejection and Th1-independent CD4+ T cell pathway.** *J Immunol* 2004, **172**:757-761.
256. D Mumberg, PA Monach, S Wanderling, M Philip, AY Toledano, RD Schreiber, H Schreiber: **CD4(+) T cells eliminate MHC class II-negative cancer cells in vivo by indirect effects of IFN-gamma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999, **96**:8633-8.