Biblioteca Digital
F C E N - U B A

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

Tesis Doctoral

Regulación de la actividad biológica de las células NK por receptores de tipo toll y por células dendríticas. Implicancias en la inmunidad contra tumores.

Girart, María Victoria

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. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

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

Cita tipo APA:
Girart, María Victoria. (2009). Regulación de la actividad biológica de las células NK por receptores de tipo toll y por células dendríticas. Implicancias en la inmunidad contra tumores.. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Girart, María Victoria. "Regulación de la actividad biológica de las células NK por receptores de tipo toll y por células dendríticas. Implicancias en la inmunidad contra tumores.". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2009.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

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

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS CÉLULAS NK POR RECEPTORES DE TIPO TOLL Y POR CÉLULAS DENDRÍTICAS. IMPLICANCIAS EN LA INMUNIDAD CONTRA TUMORES.

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

María Victoria Girart

Director de tesis: Dr Norberto Walter Zwirner

Consejero de Estudios: Dr Omar Adrián Coso

Lugares 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

Indice

Agradecimientos 3

Publicaciones 4

Abreviaturas 5

Resumen 6

Abstract 8

Introducción 10

Células *Natural Killer* (NK) 11
Subpoblaciones de células NK 11
Ontogenia 13
Receptores NK 15
Receptores KIR 17
Familia de receptores NKC 18
Receptores activadores no específicos de moléculas de HLA de clase I 20
NCR 20
NKG2D 21
Ligandos de NKG2D 22
Receptores de tipo Toll 29
Estructura y localización de los TLRs 30
PAMPs reconocidos por TLRs 30
Señalización de los TLRs 32
Células dendríticas 34
Interacción células dendrítica-célula NK 38

Objetivos 40

Materiales y métodos 41

Reactivos 42
Líneas celulares 42
Aislamiento de Células NK 42
Estimulación de las células NK 43
Obtención de CDs humanas 43
Obtención de CDs tolerogénicas 45
Aislamiento de linfocitos T $CD4^+$ 45
Depleción de monocitos 45
Pasaje por columnas de nylon 45
Adherencia a placa 46

ELISA de captura para la detección de: 46
IFN-γ 46
IL-12 47
IL-10 48
Citometría de flujo 48
Inmunomarcación de superficie 48
Inmunomarcación intracitoplasmática 49
Anticuerpos para inmunomarcación 49
Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y Western Blot 50
Lisados celulares totales 50
Cuantificación de proteínas 51
Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) 51
Electrotransferencia y Western Blot 51
Anticuerpos para Western Blot 52
Cultivos alogénicos 52
Ensayos de citotoxicidad 53
Cocultivos 53
Células NK humanas con clon 1 o clon C 53
Células NKs con células dendríticas 54

Resultados 55

Discusión 77

Conclusiones 88

Bibliografía 90

Agradecimientos

A Norberto Zwirner, por ser ejemplo de persona y profesional. Gracias por tu invalorable ayuda, por tu optimismo permanente y por no dejarme bajar los brazos ante las adversidades.

A Gabriel Rabinovich, por ser tan generoso y por preocuparte por mí tanto en lo personal como en lo laboral.

A CONICET y Fundación Sales por el apoyo económico.

A Caro, Lucas, Damián y Mer, por ser mucho mas que compañeros de trabajo. Por las interminables charlas en el cuarto de cultivo y por los helados!!!! A Yoni, el Panza, Marian, Ger y Marta por su compañía permanente y por hacer de nuestro lugar de trabajo común un lugar divertido. Al Laboratorio Satz por brindarme su ayuda y amistad. Fueron muchos años juntos, gracias a todos por las buenas anécdotas y por hacerlos inolvidables.

A mis amigos por los momentos compartidos y por hacer lo imposible para que nuestra amistad siga siendo igual que el primer día.

A July, mi inseparable compañera de estudio. Porque todas las horas que pasamos juntas nos permitieron forjar una amistad que espero que dure toda la vida. Gracias por acompañarme hasta el final.

A mi familia, porque me dieron todo su amor y apoyo, y siempre respetaron y me acompañaron en mis decisiones. Gracias por la ayuda incondicional, todo lo que soy hoy se los debo a ustedes.

A Gusty, mi compañero de ruta. Por estar a mi lado desde el primer día del CBC hasta el último de mi doctorado. Por tu amistad, paciencia, y amor incondicional. A Joaqui, quien llegó al mundo para cambiarme la vida y acompañarme en este último tramo del doctorado con toda su alegría. Este logro también les pertenece, los amo!!!!!

Publicaciones

PUBLICACIONES QUE SURGIERON COMO RESULTADO DE ESTE TRABAJO DE TESIS

- Engagement of TL3, TLR7 and NKG2D regulates IFN-γ secretion but not NKG2D-mediated cytotoxicity by human NK cells stimulated with suboptimal doses of IL-12. Girart, Victoria; Fuertes, Mercedes, Domaica, Carolina; Rossi, Lucas; Zwirner, Norberto. *Journal of Immunology. Vol 179(6): 3472-3479 (2007).*

- Intracellular retention of the NKG2D ligand MICA in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity. Mercedes B. Fuertes, María V. Girart, Luciana L. Molinero, Carolina I. Domaica, Lucas E. Rossi, María M. Barrio, José Mordoh, Gabriel A. Rabinovich, and Norberto W. Zwirner. *Journal of Immunology. Vol 180(7):4606-4614. (2008).*

- Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system. Norberto W. Zwirner, Mercedes B. Fuertes, María V. Girart, Carolina I. Domaica, Lucas E. Rossi. *Cytokine Growth Factor Reviews. Vol 18(1-2): 159-70 (2007).*

Abreviaturas

Ac: anticuerpo

AcMo: anticuerpo monoclonal.

CCDA: citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos.

CDs: células dendríticas.

CDi: CDs inmaduras.

CDm: CDs maduras.

CDt: CDs tolerogénicas.

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad.

CI: control de isotipo.

CMSP: células mononucleares de sangre periférica.

GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos.

HLA: complejo mayor de histocompatibilidad humano.

HRP: peroxidasa.

IFN: interferón.

Ig: inmunoglobulina.

IL: interleuquina.

ITAM: motivos de activación basados en tirosina.

ITIM: motivos de inhibición basados en tirosina.

MIC: cadena relacionada con el CMH de clase I.

NK: célula citotóxica natural.

PBS: solución fisiológica tamponada con fosfatos.

PE: ficoeritrina.

SDS: dodecilsulfato de sodio.

SFB: suero fetal bovino.

TNF: factor de necrosis tumoral.

TLRs: receptores de tipo toll

Resumen

REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LAS CÉLULAS NK POR RECEPTORES DE TIPO TOLL Y POR CÉLULAS DENDRÍTICAS. IMPLICANCIAS EN LA INMUNIDAD CONTRA TUMORES.

Las células NK son células linfoides importantes en la defensa del huésped contra patógenos intracelulares y en la inmunovigilancia contra tumores. Ejercen su actividad biológica a través de la elaboración de citoquinas y el desarrollo de actividad citotóxica, funciones reguladas por familias de receptores activadores e inhibidores. Las células NK humanas expresan receptores de tipo Toll (TLRs) tales como TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, entre otros. Sin embargo poco se conoce acerca del impacto de los agonistas de los TLRs en la funcionalidad de las células NK, en particular sobre sus funciones anti-tumorales. En años recientes, se ha demostrado que durante las etapas tempranas de activación de la respuesta inmune, existe una importante interacción entre las células NK y las células dendríticas (CDs), lo que perfila el desarrollo de una respuesta inmune efectiva. CDs maduras (CDm) a diferencia de CDs inmaduras (CDi) promueven, ente otras cosas, la activación y secreción de IFN-γ por células NK. Sin embargo, desconocemos el efecto de las CDs tolerogénicas (como las que se generan en el ambiente tumoral) sobre las células NK. En este trabajo, utilizamos agonistas de TLR3, TL7 y TLR9 (poliI:C, loxorribina y ODNs, respectivamente) con el objeto de estimular células NK en ausencia o en presencia de dosis subóptimas de IL-12, IL-15 o IFN-α, e investigamos la secreción de IFN-γ, citotoxicidad y expresión del receptor activador NKG2D. PoliI:C y loxorribina, en combinación con IL-12 pero no con IL-15, promovieron una intensa secreción de IFN-γ, la cual requirió de la internalización de los agonistas de los TLRs y fue dependiente de las vías de señalización de MEK1/ERK, p38 MAPK, $p70^{S6}$ quinasa y NF-κB pero no de calcineurina. El IFN-α indujo un efecto similar siendo menor los niveles de IFN-γ secretado por las células NK. Sin embargo, la citotoxicidad (ensayos estándares de liberación de ^{51}Cr) contra células blanco tumorales $MICA^-$ y $MICA^+$ no fue regulada por los agonistas así como tampoco se observaron variaciones en los

niveles de expresión de NKG2D. Interesantemente, la secreción de IFN-γ aumento significativamente luego de la estimulación con poliI:C o loxorribina e IL-12, cuando se realizaron co-cultivos con células tumorales MICA$^+$ pero no cuando los co-cultivos se realizaron con células tumorales MICA$^-$, efecto que fue dependiente de PI3K. Por otra parte, CDt no promovieron la secreción de IFN-γ por células NK tal como lo hicieron las CDs maduras. Este hecho reviste especial importancia ya que podría ocurrir que las CDt ejercieran efectos inhibitorios sobre las capacidades anti-tumorales desarrolladas por las células NK en el microambiente durante el curso de la respuesta inmune anti-tumoral natural o en respuesta a diferentes estrategias de inmunoterapia tales como la administración de agonistas de TLRs.

Palabras claves: células NK - receptores de tipo toll - NKG2D – tumores - células dendríticas tolerogenicas.

Abstract

REGULATION OF NK CELL ACTIVITY BY TOLL LIKE RECEPTORS AND BY DENDRITIC CELLS. SIGNIFICANCY IN THE IMMUNITY AGAINST TUMORS.

NK cells are lymphoid cells that play a key role during the immune response against intracellular pathogens and in the immunesurveillance against tumors. These cells exert their biologic activity through the secretion of cytokines and the display of cytotoxic activity against susceptible target cells. These functions are regulated by families of activating and inhibitory receptors. Human NK cells also express different Toll-like receptors (TLRs) such as TLR3, TLR7, TLR8 and TLR9, among others. However, little is known about the impact of agonists of these TLRs on NK cell functionality, in particular on their anti-tumor activity. In recent years, it has been shown that there exist an important interaction between the NK cells and dendritic cells (DCs) during the early activation of the immune response, which gives rise to the development of an effective immune response. Mature DCs (mDCs), in opposition to immature DCs (iDCs) promote, among others, the activation and IFN-γ secretion by NK cells. However, the effect of tolerogenic DCs (tDCs) (such as the generated in a tumor environment) on NK cells remains unknown. In this work, we used specific agonists of TLR3, TLR7 and TLR9 (polyI:C, loxoribine and ODNs, respectively) to stimulate human NK cells in the absence or in the presence of suboptimal doses of IL-12, IL-15 or IFN-α, and investigated the secretion of IFN-γ, cytotoxicity and expression of the activating receptor NKG2D. PolyI:C and loxoribine, in conjunction with IL-12 but not IL-15, promoted a robust secretion of IFN-γ, which required internalization of the TLR agonists and was dependent on MEK1/ERK, p38 MAPK, $p70^{S6}$ kinase and NF-κB but not on calcineurin. IFN-α induced a similar effect but promoted lesser IFN-γ secretion. However, cytotoxicity (^{51}Cr release assays) against $MICA^-$ and $MICA^+$ tumor targets remained unchanged as well as the expression of the NKG2D receptor. Excitingly, IFN-γ secretion was significantly increased when NK cells were stimulated with polyI:C or loxoribine and IL-12, and NKG2D engagement was

induced by coculture with MICA$^+$ tumor cells but not with MICA$^-$ tumor cells, an effect that was dependent on PI3K. We also observed that tDCs were unable to promote IFN-γ secretion by NK cells. Conversely, mDCs were strong stimulators of IFN-γ secretion by NK cells. This fact is of critical relevance as it is likely that tDCs may exert their inhibitory effect on the anti-tumoral capabilities developed by the NK cells in the tumor microenvironment during the course of the natural anti-tumor immune response or in response to different immunotherapy strategies such as the administration of agonists of different TLRs.

Key words: NK cells - toll like receptors - NKG2D - tolerogenic dendritic cells-tumor.

I NTRODUCCI ÓN

Células *natural killer* (NK)

Las células NK son células linfoides importantes en la defensa del huésped contra patógenos intracelulares y en la vigilancia contra células que han sufrido transformaciones malignas. Ejercen su actividad biológica a través de la elaboración de citoquinas y el desarrollo de actividad citotóxica [1-3]. Las células NK humanas representan aproximadamente el 10% de los linfocitos de sangre periférica, y se caracterizan por la expresión en superficie de CD56 y CD16 y la ausencia de CD3 [1, 2]. Su ubicación está restringida principalmente a sangre periférica, médula ósea, hígado, bazo y ganglios linfáticos [2, 4]. Las células NK no expresan receptores para antígenos típicos de células B y células T, y se diferencian morfológicamente de éstos por ser de mayor tamaño y poseer gránulos citoplasmáticos característicos donde se encuentran los depósitos de granzimas y perforinas, mediadores efectores de la citotoxicidad. Funcionalmente, las células NK son una importante fuente de citoquinas inmunorregulatorias tales como interferón (IFN)-γ, factor de necrosis tumoral (TNF)-β y factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), que coordinan la respuesta inmune temprana y contribuyen a perfilar la respuesta de células T, induciendo respuestas Th1 en respuesta a determinados agentes infecciosos [1]. Asimismo, las células NK poseen actividad citotóxica natural contra células infectadas con virus, leucemias y otras células tumorales, y también median la citoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) de células blanco a través de la expresión del el receptor FcγRIII (CD16) que une las porciones Fc de las inmunoglobulinas [2]. A diferencia de los linfocitos T citotóxicos, las células NK ejercen su función citotóxica tanto *in vitro* como *in vivo* sin necesidad de una exposición previa o sensibilización al patógeno, aunque deben recibir una señal de activación a través del reconocimiento de las células diana por medio de receptores específicos.

Subpoblaciones de células NK

En humanos se distinguen dos subpoblaciones de células NK que se identifican según los niveles de expresión de CD56: las células NK CD56^{dim} y las

células NK CD56^{bright} [2]. Cerca del 90% de las células NK de sangre periférica expresan altos niveles de CD16 y bajos niveles de CD56, y se las denomina CD56^{dim}. En cambio, el 10% restante de las células NK de sangre periférica se caracteriza por expresar altos niveles de CD56 y niveles bajos o nulos de CD16 (CD16^{dim} o CD16^{-}), por lo que se las denomina CD56^{bright} [2] (**Figura 1**).

Las subpoblaciones de células NK mencionadas son diferentes funcionalmente. Las células CD56^{bright} poseen escasa capacidad citotóxica debido a que expresan bajos niveles de mediadores de citotoxicidad tales como granzimas y perforinas, pero son fuente primaria de citoquinas inmunorregulatorias que incluyen al IFN-γ, TNF-β, interleuquina (IL)-10, IL-13 y GM-CSF [5, 6]. Esta subpoblación expresa altos niveles del receptor de quimiocina CCR7 y de la molécula de adhesión L-selectina (CD62L), lo que promueve su migración y anidamiento en los órganos linfáticos secundarios, donde se cree que liberan las citoquinas que regulan la respuesta adaptativa de linfocitos T y B [5]. En cambio, las células CD56^{dim} son citotóxicas, funcionando como eficientes efectoras de la citotoxicidad natural y la CCDA [2]. Estas células no expresan CCR7 ni CD62L, pero sí expresan altos niveles de CCR4, CCR5 y otras moléculas de adhesión, por lo que se supone que son capaces de migrar a tejidos periféricos inflamados y mucosas donde ejercerían su función [5]. Las células NK CD56^{bright} expresan de manera constitutiva el receptor de alta afinidad de IL-2 (CD25) y se expanden *in vivo* e *in vitro* en respuesta a bajas dosis de IL-2 [7, 8]. En cambio, las células NK CD56^{dim} expresan en reposo únicamente el receptor de IL-2 de afinidad intermedia, y proliferan débilmente en respuesta a altas dosis de IL-2 *in vitro*, inclusive después de inducir el receptor de alta afinidad de IL-2 ([8], [9]). La activación de las células NK está directamente mediada por el contacto célula-célula e indirectamente promovida por citoquinas como IFNs de tipo I, IL-12, IL-15 e IL-18. Se ha demostrado que los interferones de tipo I secretados principalmente por las células dendríticas plasmocitoides (pCDs) pero también por las mieloides, están involucrados en el aumento de la citotoxicidad por parte de las células NK; mientras que la IL-12 y la IL-18 influencian la secreción de IFN-γ por parte de estas células [10, 11]. También se ha observado que la IL-12 induce la proliferación celular y se la

había postulado como el factor crucial en el aumento de las funciones efectoras de las células NKs humanas y murinas [12]. Recientemente se ha demostrado que en realidad la citoquina más relevante en la proliferación y sobrevida de las células NK en respuesta a estímulos infecciosos, células tumorales u otros tipos de señales de alarma es la IL-15 [13]. Esta citoquina actúa promoviendo un aumento en la expresión de genes anti-apoptóticos tales como bcl-2, entre otros, lo que prolonga la supervivencia celular

También se ha demostrado que las células NK de la población $CD56^{bright}$ podrían ser los precursores que dan lugar a las células $CD56^{dim}$ luego ser activadas por citoquinas en sangre periférica [14].

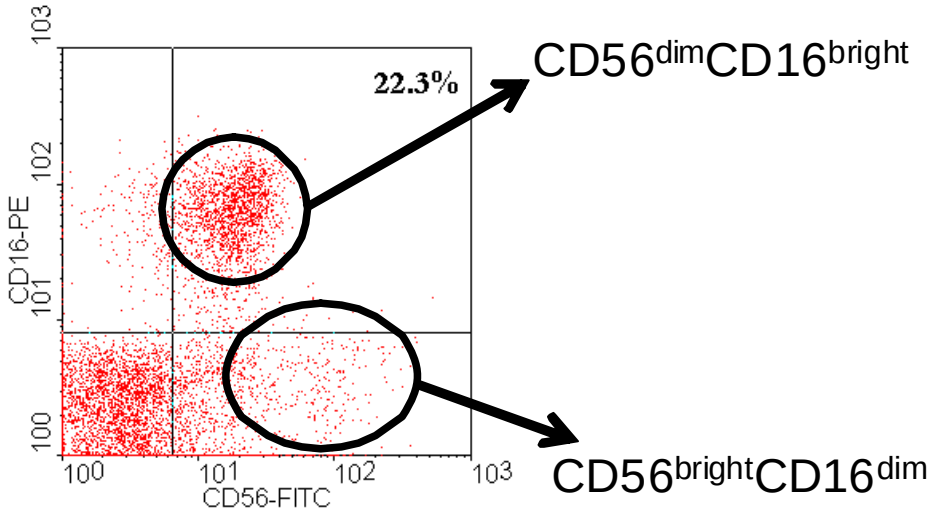


FIGURA 1: Caracterización fenotípica de células NK de sangre periférica.

Ontogenia

Las células NK se originan en la medula ósea a partir de células hematopoyéticas progenitoras $CD34^{+}$ que no expresan ningún marcador de linaje (Lin^{-}), que expresan los receptores tirosincinasas Flt3 y c-kit y requieren del microambiente de la médula ósea para completar su desarrollo. A medida que estos precursores progresan en su maduración, adquieren la expresión de CD161 (uno de los marcadores más tempranos característicos del linaje NK) y la capacidad de responder a IL-7 porque comienzan a expresar el receptor correspondiente (IL-7R). La IL-7 es una citoquina clave para la sobrevida de

estas células y, en conjunto con los ligandos de Flt3 (Flt3L) y de c-kit (c-kit-L), inducen la expresión de las cadenas β (CD122) y γ (γ_c o cadena γ común) del receptor de IL-2 e IL-15. La cadena β es compartida por receptores de IL-2 e IL-15, mientras que la cadena γ_c es compartida también por los receptores de IL-4 e IL-7. Estas células, bajo el efecto de la IL-15 secretada y transpresentada a través de la cadena (del receptor de IL-15 por las células estromales de la médula ósea, generan los precursores inmaduros que abandonan la médula ósea. El estímulo a través de la IL-15 constituye un paso crítico en la adquisición del repertorio de receptores de las células NK durante su ontogenia, mientras que la expresión de CD122 es un evento crucial que determina que la célula que lo expresa se comprometa al linaje de las células NK. Se cree el progenitor resultante de la estimulación por IL-15 transpresentada es el que se diferencia a células $CD56^{bright}$ por efecto de la propia IL-15. La salida a sangre periférica y la expresión del receptor CCR7 y CD62L permite a estas células anidar en ganglios linfáticos, aunque también se las encuentra en bazo. Aunque las etapas finales de la maduración de las células NK aún no han sido elucidadas completamente, se cree que tanto en médula ósea como en diferentes sitios periféricos (sangre, bazo, ganglios linfáticos) podrían completar su maduración (**Figura 2**).

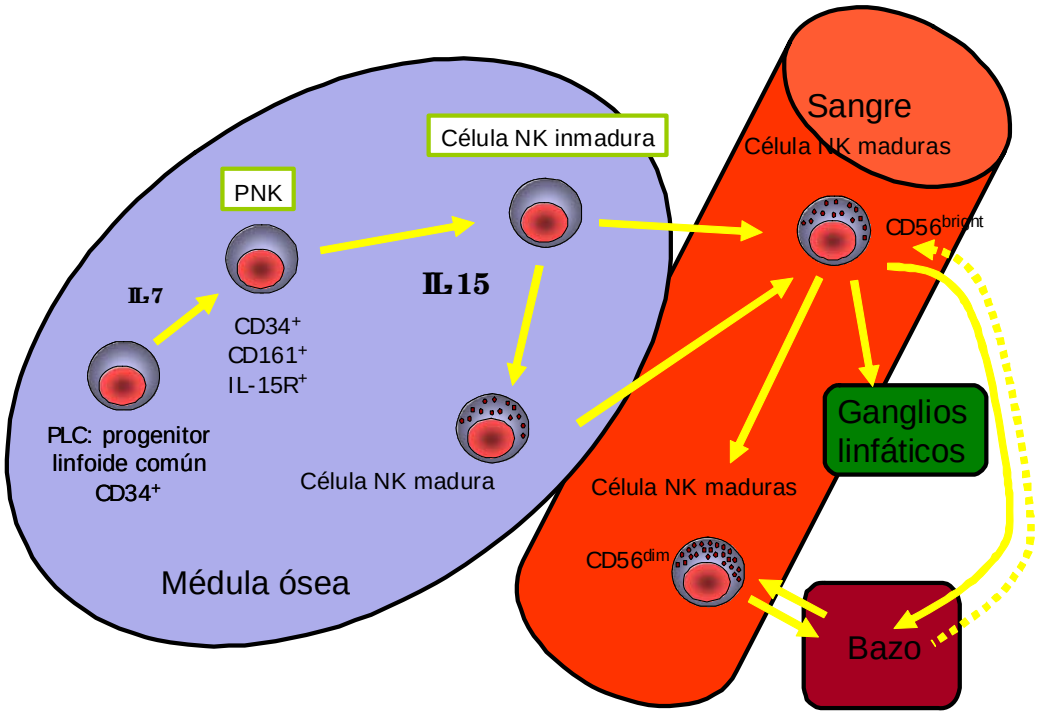


FIGURA 2: Representación esquemática de la ontogenia de las células NK.

Receptores de células NK

A diferencia de los linfocitos B y T, las células NK no rearreglan genes que codifiquen para receptores antigénicos pero desarrollaron la habilidad de reconocer moléculas propias del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I, a través de un grupo de receptores denominados receptores de células NK, que pueden inhibir o promover el desarrollo de funciones efectoras. Los receptores inhibidores poseen en su cola citoplasmática un dominio ITIM (*immunereceptor tyrosine based inhibitory motif,* V/IxYxxL/V), que permite su asociación con fosfatasas de la familia SHP-1 y el gatillado de señales inhibitorias. Por el contrario, los receptores activadores de citotoxicidad poseen una cola citoplasmática más corta que carece del dominio ITIM y se asocian con proteínas adaptadoras transductoras de señales con un dominio ITAM (*immunereceptor tyrosine based activating motif,* $YxxLx_{6-8}YxxL/I$). La activación de la citotoxicidad y la secreción de citoquinas mediada por células NK es el resultado de un balance de señales activadoras e inhibitorias transducidas por esta gran variedad de receptores. Estos receptores activadores e inhibidores frecuentemente son coexpresados por células NK y, en situaciones normales, las señales inhibitorias predominan sobre las activadoras [15]. Inicialmente, se propuso la hipótesis del *missing self* [16] en la cual se postuló que la función de las células NK era reconocer y destruir células autólogas que habiendo perdido o alterado la expresión de niveles normales de moléculas de clase I del CMH como consecuencia de infecciones con virus o neotransformación celular. Esto se debe a que la ausencia de moléculas del CMH de clase I permite a las células afectadas escapar de una respuesta mediada por células T $CD8^+$ citotóxicas específicas contra un antígeno viral o tumoral restringido a diferentes moléculas de clase I. En estas situaciones las células NK son quienes serían capaces de discriminar entre células normales y células que no expresan niveles adecuados de moléculas del CMH de clase I, protegiendo a las primeras y destruyendo a las últimas. En este sentido se ha observado que células NK humanas son capaces de lisar líneas celulares de linfoblastos B transformados con el virus Epstein-Barr que son deficientes en moléculas de clase I del CMH, mientras que la transfección de estas células blanco con diferentes alelos de clase I del CMH

inhibe la lisis por parte de las NK [17, 18]. Sin embargo, la unión de las moléculas del CMH de clase I por receptores inhibitorios no es siempre suficiente para prevenir la citotoxicidad 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 β_2-microglobulina que no expresan moléculas de clase I del CMH [19]. En cambio, 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 [20]. Además, las 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 [6, 8]. Estas observaciones apuntan a la importancia adicional de los receptores activadores en la regulación de la función efectora de las células NK. Esta unión de receptores activadores a moléculas de membrana de células blanco desencadena la producción de citoquinas, citotoxicidad y migración de las células NK [1-4]. Cada célula NK parece expresar su propio repertorio de receptores activadores e inhibidores, y la citotoxicidad es finalmente regulada por un balance de señales provenientes de estos receptores que interactúan con las moléculas del CMH clase I y moléculas relacionadas con el CMH de clase I de las células blanco.

Desde el punto de vista de la organización de los genes, existen 2 grandes grupos de receptores de células NK [21]:

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

El grupo de los LRCs comprende dos familias de genes que se encuentran codificados en el cromosoma 19 humano: los receptores de tipo KIR (*killer immunoglobulin-like receptors*) y los receptores de tipo ILT (*immunoglobulin-like transcripts*) o LIR (*leukocyte inhibitory receptors*). Actualmente se conoce la existencia de polimorfismo poblacional y haplotipos en los receptores KIRs. En el caso de los receptores ILT/LIR, si bien existen unos diez genes, la función de las proteínas codificadas permanece aún sin dilucidar. Por otra parte, los genes del

NKC mapean en el cromosoma 12 humano y están compuestos mayoritariamente por la familia de genes NKG2.

Receptores KIR

Los receptores de tipo KIR (*killer immunoglobulin-like receptor*) pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Son glucoproteínas de membrana de tipo I, y están estructuralmente caracterizados por poseer dos o tres dominios globulares extracelulares del tipo de las inmunoglobulinas (KIR2D y KIR3D, respectivamente, [22]). Los KIRs reconocen diferentes alelos de la molécula de clase I del CMH, incluyendo alelos HLA-A, HLA-B y HLA-C. En general, los KIR3D reconocen alelos de HLA-A y HLA-B, mientras que los KIR2D reconocen a HLA-C [23-25]. Existen dos grupos funcionales de KIRs: inhibitorios y activadores. Cada grupo posee un dominio extracelular idéntico y, por ello, cada grupo une ligandos idénticos. Sin embargo, debido a diferencias en los dominios transmembrana e intracelular o citoplasmático, un grupo señaliza respuestas inhibitorias y el otro señaliza respuestas activadoras como consecuencia de la unión con los mismos alelos de moléculas de clase I del CMH [26, 27]. Los KIRs inhibitorios se expresan además en linfocitos T activados [28].

La familia KIR incluye doce miembros, cada uno con un cierto número de variantes alélicas, y dentro de esta familia de receptores seis son inhibidores y seis son activadores. Estos receptores KIR2D o KIR3D son monoméricos y poseen una cola citoplasmática larga (L) o una cola citoplasmática corta (S). Los KIRs con cola citoplasmática larga (KIR2DL o KIR3DL) generan señales inhibitorias, mientras que los de cola citoplasmática corta (KIR2DS o KIR3DS) generan señales activadoras. La señal inhibitoria se genera por la presencia de motivos ITIM en el dominio citoplasmático de los receptores de cola larga. Los receptores de cola citoplasmática corta deben su función activadora a la asociación con una proteína adaptadora que contiene motivos ITAM que sirven como unidades de transducción de señales [22]. Como se mencionó anteriormente, ciertos KIRs reconocen determinantes que son compartidos

entre miembros de un grupo de alelos de HLA-C. De acuerdo a residuos aminoacídicos presentes en las posiciones 77 y 80 de la molécula HLA-C, se han identificado dos grupos de alelos de HLA-C. El grupo I posee una Ser en la posición 77 y una Asn en la posición 80, e incluye a HLA-Cw1, HLA-Cw3, HLA-Cw7 y HLA-Cw8. Por ejemplo, el KIR2DL2 y el KIR2DL3 inhibitorios reconocen alelos del grupo I. Naturalmente, el KIR2DS2 y el KIR2DS3 contienen los mismos dominios extracelulares que sus contrapartes inhibitorias y, por esa razón, también reconocen alelos del grupo I. El grupo 2 posee una Asn en la posición 77 y una Lis en la posición 80 e incluye a HLA-Cw2, HLA-Cw4, HLA-Cw5 y HLA-Cw6. Por ejemplo, el KIR2DL1 inhibitorio y el KIR2DS1 activador reconocen alelos del grupo 2.

Estudios recientes en ratón y en humano sugieren que los receptores inhibitorios participarían en un nuevo proceso llamado licenciamiento [29, 30]. Según este modelo, durante la ontogenia de las células NK, los receptores inhibitorios desencadenan señales específicas al reconocer sus ligandos en células del estroma de la médula ósea, promoviendo la maduración funcional de las células NK. Si los precursores de las células NK comienzan a expresar receptores inhibitorios que no reconocen sus ligandos específicos en ese individuo no se completa la maduración funcional de esta célula a pesar de que se produce la maduración fenotípica. De esta manera, existirían dos poblaciones de células NK: una población funcionalmente competente que expresa receptores con especificidad hacia las moléculas de clase I del CMH de ese individuo y otra funcionalmente incompetente que expresan receptores incapaces de reconocer las moléculas de clase I del CMH de ese individuo [31, 32]. En este modelo, el estado de baja capacidad de respuesta es el estado “por defecto” en las células NK y la capacidad de respuesta se adquiere en forma activa durante la ontogenia.

Familia de receptores NKC

La familia de receptores NKC se caracteriza por poseer un dominio extracelular de lectina tipo C, y se expresan como proteínas de membrana de tipo II en células NK y subpoblaciones de células T. Estos receptores son heterodímeros formados por una subunidad común invariante (CD94) covalentemente unida a una cadena polipeptídica codificada por un gen de la familia NKG2 con excepción de NKG2D [33, 34]. La subunidad CD94 es producto de un gen no polimórfico que carece de dominio citoplasmático para transducir señales [35]. Los dominios citoplasmático y extracelular de las moléculas NKG2 son estructuralmente diversos, de acuerdo con las diferencias de reconocimiento de ligando y transducción de señales. Se han identificado cuatro genes y sus respectivos transcriptos de la familia NKG2: NKG2A (y la variante NKG2B generada por *splicing* alternativo); NKG2C; NKG2E (y la variante NKG2H generada por *splicing* alternativo); y NKG2F [36, 37]. En cambio, NKG2D es un quinto miembro poco relacionado que muestra baja homología de secuencia con otros miembros de NKG2, no se asocia con CD94, y forma homodímeros cuando se expresa en la superficie de las células NK. Los genes de CD94 y NKG2 se ubican en el cromosoma 12 dentro del complejo de NKCs [38].

Los heterodímeros CD94/NKG2 se expresan selectivamente en células NK y linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos [33]. De los receptores de lectina tipo C, sólo CD94/NKG2A y CD94/NKG2B son inhibitorios y poseen un dominio citoplasmático largo, mientras que los otros heterodímeros son receptores activadores y poseen un dominio citoplasmático corto [28]. Diferentes subpoblaciones de células NK pueden poseer receptores CD94/NKG2 activadores o inhibidores. Se han detectado NKG2A y NKG2C por RT-PCR en algunos clones de células NK y algunas evidencias experimentales sugieren que algunas células NK podrían expresar ambos receptores [38]. Los complejos CD94/NKG2A, CD94/NKG2B y CD94/NKG2C reconocen como ligando a la molécula no clásica de clase I HLA-E [39]. HLA-E une y presenta un subgrupo de péptidos derivados de la secuencia líder de las cadenas α de las moléculas HLA-A, HLA-B, HLA-C y HLA-G. Consecuentemente, una disminución en la síntesis de moléculas de HLA, disminuye la expresión de HLA-E por falta de péptidos necesarios para el

ensamblaje y transporte de HLA-E hacia la superficie celular [40]. Por ello, se considera que los receptores CD94/NKG2 sensan la integridad de la vía de biosíntesis de las moléculas de clase I del CMH [41].

Receptores activadores no específicos de moléculas de HLA de clase I

Dentro de este grupo se encuentran receptores activadores que reconocen ligandos que son inducidos en células transformadas, infectadas con virus o sometidas a estímulos de estrés. Esto permite a las células NK destruir a las células afectadas, independientemente de la expresión de moléculas de clase I.

En humanos, se conocen dos grupos mayoritarios de receptores dentro de esta categoría llamados Receptores de Citotoxicidad Natural (*Natural Cytotoxicity Receptors,* NCR) y NKG2D. Ambos son receptores activadores de las funciones efectoras de las células NK importantes tanto en el reconocimiento y lisis de células tumorales humanas así como también en la secreción de citoquinas como el IFN-γ.

Los receptores de la familia NCR (NKp30, NKp44 y NKp46 pero no NKp80) se asocian a diferentes moléculas adaptadoras tales como CD3ζ, FcεRIγ y DAP12, que poseen motivos ITAM. En cambio NKG2D se asocia a DAP10, que posee un motivo YxxM [42, 43]. La unión del ligando desencadena una cascada de fosforilación, mediada por tirosín-quinasas, que finaliza en la movilización de gránulos que contienen perforinas y granzimas, causando la lisis de las células blanco [44].

NCR

Se han identificado cuatro NCRs, pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, que se denominaron NKp46 [45, 46], NKp44 [47], NKp30 [48] y NKp80 [49]. NKp46 y NKp30 se expresan de manera constitutiva en todas las células NK (en reposo y activadas) de sangre periférica [46, 48]; en cambio, NKp44 no se expresa en células NK en reposo de sangre periférica,

pero su expresión aumenta luego de la estimulación con IL-2 [48]. NKp44 también se encuentra en células T $\gamma\delta$. NKp44 y NKp46, pero no NKp30, son receptores sialilados, lo que les permite unirse y reconocer como ligando a la hemaglutinina (HA) del virus de la influenza y a la neuraminidasa del virus Sendai [50, 51]. Ese reconocimiento activa la función citotóxica de las células NK [51]. Estos NCRs también están involucrados en el reconocimiento de diversas células tumorales. Sin embargo, los ligandos de los NCR sobre células tumorales o infectadas con otros patógenos no han sido identificados.

NKG2D

NKG2D es el receptor activador mejor caracterizado de células NK. Fue identificado por primera vez en 1991 por Houchins y col, en una búsqueda de genes expresados preferentemente en células NK humanas [37]. El rol de la molécula de NKG2D permaneció desconocido hasta 1999, cuando se identificó como receptor activador que reconoce como ligando a una molécula relacionada con el CMH de clase I denominada MICA (*MHC class I Chain related A,* [52]). Desde entonces, NKG2D y sus ligandos fueron objeto de intensa investigación. NKG2D es un receptor de superficie perteneciente a la familia de las lectinas de tipo C que no se asocia con CD94. En cambio, forma homodímeros que se unen a la proteína adaptadora DAP10 en humanos y a DAP12 o DAP10 en ratones [53, 54]. La proteína DAP10 no contiene motivos ITAM, pero tiene un motivo YxxM, que está implicado en la unión a la subunidad p85 de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K, [53]) y a Grb [55], mientras que DAP12 contiene un motivo ITAM citoplasmático que recluta y activa a las tirosín-quinasas Syc y ZAP-70, que disparan una cascada de eventos que desembocan en el desarrollo de la citotoxicidad y la secreción de IFN-γ. La estimulación de células NK a través de NKG2D dispara una señal tan intensa que sobrepasa la señal inhibitoria gatillada por el reconocimiento de moléculas de clase I del CMH por parte de los receptores inhibitorios KIRs.

El receptor NKG2D está expresado de manera constitutiva en células NK, pero a diferencia de lo observado para los NCR, también se expresa en la

mayoría de los linfocitos T $\gamma\delta$ y en linfocitos T $\alpha\beta$ $CD8^+$ de sangre periférica no activados, inclusive en aquellos que carecen de la expresión de la molécula co-estimulatoria CD28 [52]. Aunque las células T $CD4^+$ humanas normalmente no expresan NKG2D en superficie [52], se observó un aumento de su expresión en células de pacientes con artritis reumatoidea [56] y lupus [57]. La expresión de NKG2D es modulada por las citoquinas IL-15, IL-12 e IFN-α [58]. A diferencia de lo observado en humanos, las células T $CD8^+$ de ratón carecen de NKG2D en superficie cuando están en reposo, pero su expresión se induce tras la activación de los mismos [59]. Por otra parte, NKG2D no se expresa en células T $CD4^+$ de sangre periférica de ratón, ni en cultivo de células T $CD4^+$ activadas pero se expresa también en subgrupos de células T$\gamma\delta$ y NKT [60].

Estudios en células NK y linfocitos T $CD8^+$ han demostrado que NKG2D posee una función dual como receptor primario de citotoxicidad o como molécula co-estimulatoria. Esta diferencia funcional en los distintos tipos celulares podría deberse en parte a la existencia de 2 especies proteicas de NKG2D codificadas por dos variantes producidas por *splicing* alternativo del ARNm, y a diferencias de expresión de las proteínas adaptadoras [54]. El transcripto largo de NKG2D (NKG2D*l*) codifica para una proteína que se asocia a DAP10 y no a DAP12. En cambio, el producto del transcripto corto de NKG2D (NKG2D*s*) posee 13 aminoácidos menos en el dominio citoplasmático y se asocia con ambas proteínas adaptadoras. Los dos transcriptos están en células NK, células T $CD8^+$ y macrófagos activados, pero las células T, a diferencia de las células NK y los macrófagos, no expresan DAP12 [54, 61]. La asociación diferencial de NKG2D con las moléculas adaptadoras le confiere al receptor funciones que son características del tipo celular. En las células NK y en los macrófagos, la señalización vía NKG2D lleva a la activación de las células, actuando como receptor primario de citotoxicidad. En cambio, en las células T, NKG2D amplifica la respuesta antígeno-específica producida por reconocimiento del TCR o receptor de antígenos de células T. La asociación de NKG2D con DAP12 observada en las células NK y macrófagos de ratón, no se ha observado en células NK humanas, así como tampoco se ha detectado una isoforma corta de NKG2D en células humanas [62].

Ligandos de NKG2D

Los ligandos de NKG2D conocidos hasta el momento en ratón son las proteínas Rae1 [59], H60 [59] y MULT1 [63]. 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 ULBP-1, -2 y -3 (*UL16-binding protein-1, -2 y –3;* [64, 65]). 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 [64, 65]). Del mismo modo, se ha detectado la expresión de las proteínas integrales de membrana ULBP-4 (RAET1E) y RAET1G en diferentes líneas tumorales humanas [66, 67]. En humanos, así como en varias especies de mamíferos pero no en ratón, existe otro grupo de NKG2DLs. Estas moléculas son proteínas integrales de membrana denominadas MICA y MICB (***M****HC class* ***I*** *-* ***C****hain Related proteins* ***A*** *y* ***B,*** [52]). En la **Figura 3** se muestra una representación esquemática de los NKG2DL de ambas especies. Algunos de ellos son inducidos por estrés o transformaciones neoplásicas, sugiriendo que este receptor media la eliminación de células que han sido alteradas por estos procesos. La inducción de la expresión de estos ligandos podría constituir una señal de peligro para promover respuestas de las células T y NK.

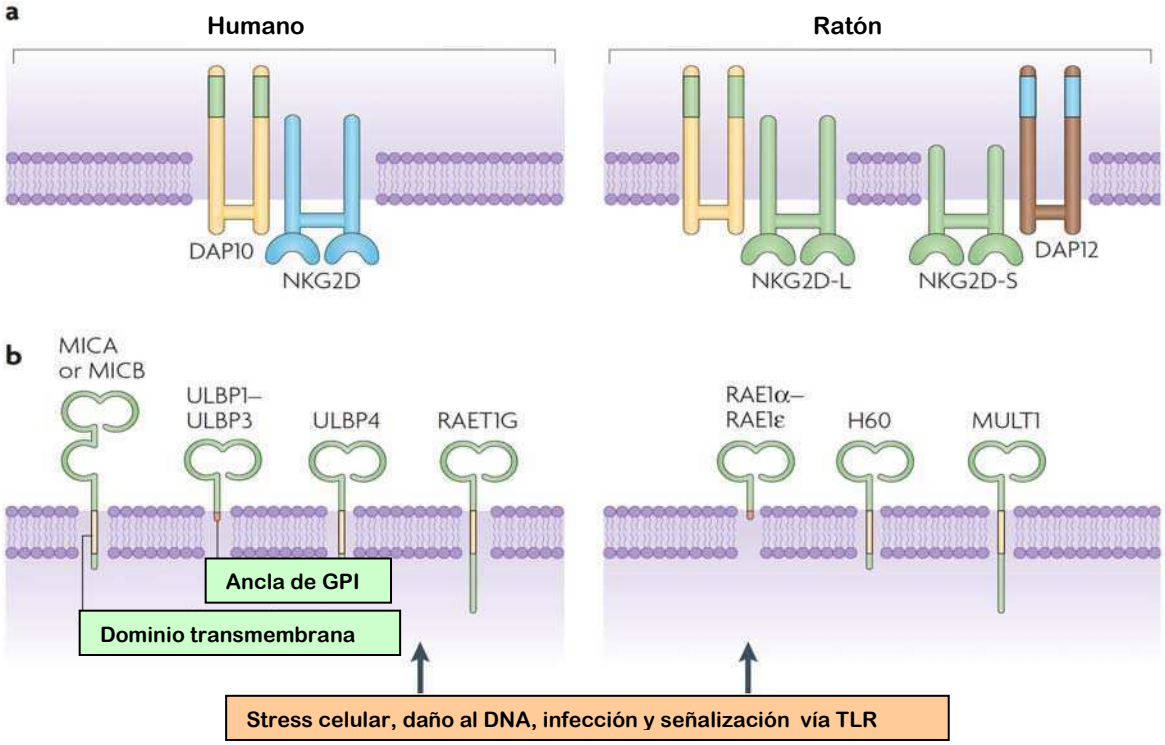


FIGURA 3: Representación esquemática de los ligandos de NKG2D. Tanto en humanos (izquierda) como en ratón (derecha) algunas de estas moléculas están ancladas a GPI y otras poseen dominios transmembrana. Adaptado de [68].

La familia de genes MIC fue descubierta en 1994 por el grupo de Spies cuando buscaba nuevos genes en la región del HLA-B. Se encuentra dentro del sistema HLA pero sus miembros poseen baja homología con otros genes que codifican para moléculas de clase I [69]. Está compuesta por dos genes polimórficos, MICA y MICB, y cinco pseudogenes, MICC, MICD, MICE, MICF y MICG [69, 70], cuya ubicación se muestra esquemáticamente en la **Figura 4**.

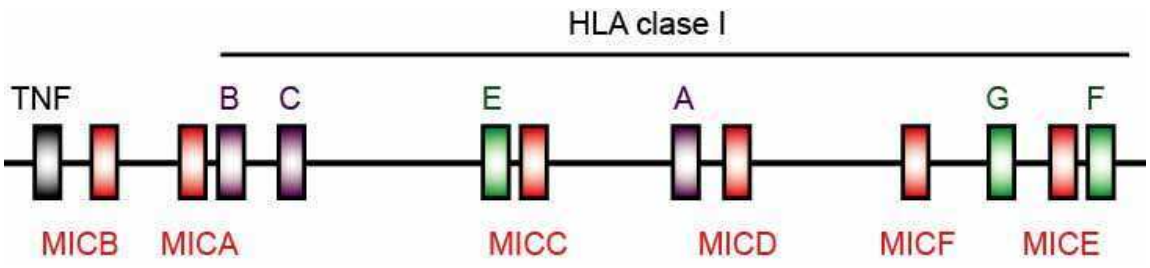


FIGURA 4: Ubicación de los genes de la familia MIC en la región de clase I del HLA. Se muestran los genes para las moléculas de clase I HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F y HLA-G, así como los 2 genes (MICA y MICB) y 4 pseudogenes (MICC, MICD, MICE y MICF) de la familia MIC.

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 [69, 71]. Sin embargo, no se ha encontrado dicho gen en el genoma murino [69, 71]. No obstante, se ha descripto una familia de genes en ratón denominada Mill (*MHC class I-like located near the LRC*), compuesta por los genes Mill1 Y Mill2 que están relacionados con MICA y MICB [72, 73].

El gen de MICA se organiza en seis exones que codifican para un péptido líder (exón 1), los dominios extracelulares α1, α2 y α3 (exones 2, 3 y 4, respectivamente), un dominio transmembrana (exón 5) y una cola citoplasmática (exón 6). MICA se expresa en forma codominante [74] y su expresión está regulada por estímulos de estrés [75, 76] o infecciones [77, 78]. El gen de MICA codifica para un polipéptido de membrana de 383 aminoácidos,

que en su forma madura posee una masa molecular de aproximadamente 62 a 65 kDa [75, 79]. Además, MICA no se asocia a β_2-microglobulina [75, 79] y no presenta péptidos [80]. La proteína MICA nativa está altamente glucosilada, lo que incrementa su peso molecular de 43 (péptido desnudo) a 65 kDa (proteína madura, [75]). Por su parte, el producto del gen MICB posee una masa molecular de 54 kDa [81], con cinco sitios de N-glucosilación potencial [82].

Hasta hace muy poco tiempo atrás se creía que MICA exhibía un patrón de expresión celular restringido a células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, monocitos y epitelio gastrointestinal, y que no se expresaba en linfocitos T o B en reposo [75, 79, 83, 84]. 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 [85]. Además, se ha observado que carcinomas de mama, pulmón, ovario, próstata, colon, riñón y melanomas expresan altos niveles de MICA por lo que también se ha asociado su expresión a la neotransformación [86-89]. Recientemente se ha demostrado que las células responden ante daños genotóxicos induciendo la expresión de MICA y otros NKG2DLs. El anti-encogen p53 que está vinculado con la protección ante una transformación maligna [90], no parecería estar involucrado en la regulación de la expresión de MICA [91]. 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 [91]. De esta manera, estímulos genotóxicos que inducen la expresión de NKG2DLs hacen a los tumores susceptibles al ataque citotóxico por células $NKG2D^+$ [92].

El reconocimiento de MICA por parte de NKG2D dispara una respuesta citotóxica por parte de la célula que expresa NKG2D hacia la célula que expresa MICA y la producción de IFN-γ [52, 87]. Este mecanismo contribuye con la eliminación de células tumorales.

El ortólogo murino de NKG2D [93], al igual que su contraparte humana, gatilla la citotoxicidad y la liberación de IFN-γ por parte de células NK [59]. La

sobre-expresión de Rae1 o H60 en células tumorales induce un rechazo tumoral en ratones singeneicos desafiados, fenómeno mediado por células NK y linfocitos T $CD8^+$ a través de la interacción entre NKG2D y sus ligandos [94]. La inmunización de ratones vírgenes con células tumorales transducidas con Rae1 o H60, induce una respuesta protectora y memoria inmunológica a desafíos posteriores tanto con células tumorales transducidas como con células tumorales salvajes [94]. NKG2D, además de ser importante en el control del crecimiento y establecimiento de tumores y metástasis que expresan sus ligandos, protege al huésped de la iniciación de tumores, ya que la neutralización de NKG2D en ratones induce un aumento en la incidencia de tumores generados con carcinógenos químicos [95]. Además, ratones que presentan una disminución sistémica de la expresión de NKG2D en células NK y linfocitos T $CD8^+$ no son capaces de rechazar tumores que expresan MICA [96]. Resultados equivalentes han sido obtenidos por otros investigadores [97, 98], lo que confirma que la sobre-expresión de ligandos del receptor NKG2D en células tumorales desarrolla una inmunidad anti-tumoral eficiente en ratón.

Se ha demostrado que los infiltrados linfocitarios que se detectan en los tumores (*tumor infiltrating lymphocytes,* TILs) de pacientes con melanomas expresan NKG2D y que este receptor es importante para el reconocimiento del tumor por parte de estos linfocitos [99], 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 [100, 101]. El clivaje involucra la acción de metaloproteasas [101] 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 [102]. 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 en linfocitos T $CD8^+$ y, consecuentemente una disminución de su expresión en superficie. De esta manera las células citotóxicas se ven impedidas de reconocer a las células tumorales. Otro mecanismo de escape que involucra al sistema NKG2DL-NKG2D es mediado por TGF-β. Esta citoquina inmunosupresora [103] 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 [104] y por otro lado induce una disminución en la expresión de NKG2D en linfocitos T $CD8^+$ y células NK, lo que evita el reconocimiento y destrucción de distintos tipos celulares [104-107] sin afectar la expresión de perforina y FasL [108]. El TGF-β además de ser secretado por los tumores, es expresado en la superficie de las células Treg, que en el microambiente tumoral inducen una disminución de NKG2D en las células NK [105]. 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 [109]. Los mecanismos de escape que involucran al sistema NKG2D-NKG2DL se encuentran resumidos en la **Figura 5**.

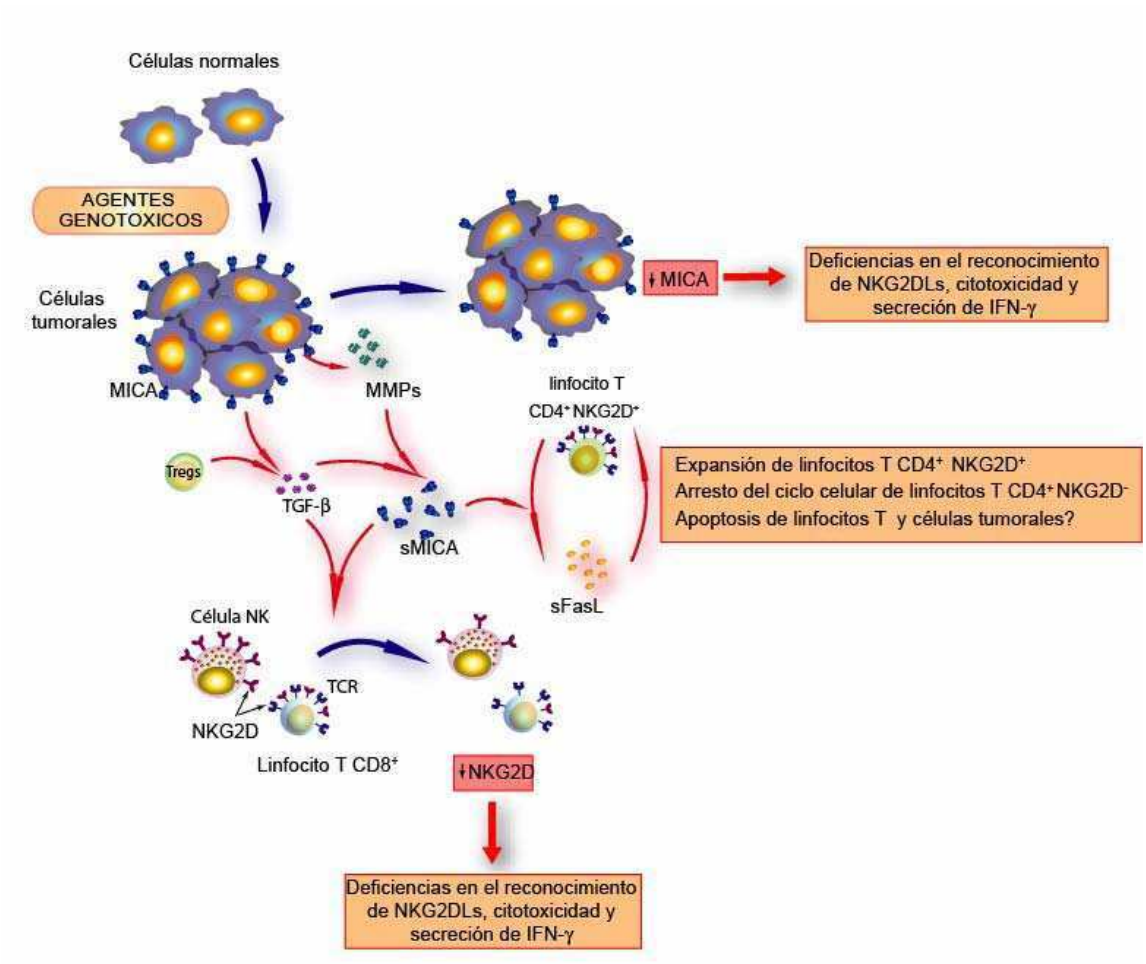


FIGURA 5: Mecanismos de escape tumoral que involucran a NKG2D y sus ligandos. Se muestran los tres mecanismos de escape que involucran a NKG2D descriptos hasta el momento. Adaptada de [110].

La segunda familia de ligandos de NKG2D son moléculas identificadas en un principio por su habilidad de unirse a la proteína UL16 del citomegalovirus humano (CMV), por lo que se las denominó ULBP-1, ULBP-2 y ULBP-3. Los tres ULBPs poseen dominios α1 y (2 pero, a diferencia de MIC y de las moléculas del CMH de clase I, carecen del dominio (3 y están ancladas a la membrana a través de GPI. La expresión de las ULBP es más ubicua que la de las proteínas MIC. Mediante RT-PCR, se detectaron transcriptos en corazón, pulmón, testículos, cerebro, nódulos linfáticos, timo, hígado y medula ósea [64]. Sin embargo, en algunos tejidos en donde se detectó alta expresión de RNA mensajero, no había expresión de proteína en superficie, sugiriendo que la expresión de superficie sería regulada a nivel post-transcripcional. Se ha demostrado que los ULBPs se expresan en una amplia variedad de células tumorales, pudiéndose coexpresarse con MICA en tumores de diferente origen [88]. Además, se

demostró que los ULBPs son responsables de la inducción de la citotoxicidad dependiente de NKG2D en tumores MICA$^-$, como ciertos linfomas EBV$^+$ y la mayoría de las leucemias T, siendo esta la razón por la cual tumores que carecen de expresión de MICA en superficie son igualmente susceptibles a la lisis NKG2D-dependiente por células NK [88]. Los ULBPs también se expresan y son funcionalmente activos en líneas celulares de carcinomas y en melanomas, siendo un ligando de NKG2D adicional en estos tumores. Si bien el nivel de expresión en melanomas es bajo, se encuentran altamente expresados en líneas celulares de carcinomas de pulmón, colon, ovario y carcinomas cervicales [88]. Recientemente se ha demostrado que el aumento en la expresión de los ULBPs en leucemias promueve una mayor citotoxicidad por parte de las células NK, convirtiéndose así en blanco de futuras terapias leucémicas [111, 112].

Receptores de tipo Toll

La participación de los receptores de tipo Toll en la respuesta inmune innata se describió por primera vez en Drosophila [113]. El receptor de tipo Toll de Drosophila fue originalmente identificado como un receptor transmembrana necesario para establecer la polaridad dorsoventral durante el desarrollo embrionario [114]. Las vías de señalización del receptor Toll de Drosophila era muy similar a la vía de IL-1 de mamíferos, la cual induce la activación de NK-κB, factor de transcripción que participa en la respuesta inmune inflamatoria. Más aun, el dominio citoplasmático del receptor de tipo Toll de Drosophila y del receptor de IL-1 de mamíferos están altamente conservados y se los denomina dominio TIR. Basados en esta similitud, se propuso que la vía de los receptores de tipo Toll estaría involucrada en la regulación de las respuestas inmunes [115]. En 1996, se demostró que era un componente esencial en la inmunidad antifúngica de la mosca [113], y un año mas tarde se identificó su homólogo en mamíferos [116]. A partir de este momento, se identificó una familia de proteínas estructuralmente relacionadas al receptor Toll de Drosophila involucrada en la defensa anti-infecciosa en plantas, insectos y vertebrados y se la denominó receptores de tipo toll (TLRs).

Estructura y localización de los TLRs

En mamíferos la familia de los TLRs consta de doce miembros (TLR1-TLR12) conociéndose ligandos específicos para la mayoría de ellos [117-119]. Los receptores de tipo Toll (TLRs) son glicoproteínas integrales de membrana de tipo I que reconocen estructuras conservadas en patógenos llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). El dominio extracelular N-terminal esta formado aproximadamente por 16-28 repeticiones ricas en leucinas (LLRs), y cada LRR contiene 20-30 aminoácidos con el motivo conservado "LxxLxLxxN". El dominio intracelular C-terminal se denomina TIR y muestra homología con el mismo dominio del receptor de IL-1 [117-120]. Este dominio se requiere para la interacción y reclutamiento de varias moléculas adaptadoras que activan la vía de señalización. Los TLRs forman heterodímeros como TLR1–TLR2, TLR4–MD2 u homodímeros como TLR3–TLR3 y luego de la asociación con su respectivo ligando forman una estructura tipo herradura que es esencial para la iniciación de la cascada de señalización [121]. Los TLRs reconocen varios PAMPs provenientes de virus, bacterias, hongos y protozoos y están expresados en diferentes compartimentos celulares. TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR11 (solo se expresa en ratón) están expresados en la superficie celular mientras que TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se encuentran expresados en vesículas intracelulares como los endosomas y el retículo endoplásmico (RE). Los TLRs intracelulares son transportados a las vesículas a través de UNC93B1, una proteína transmembrana que se localiza en el RE de las células [122].

PAMPs reconocidos por TLRs

Los TLRs pueden reconocer varios componentes de la pared celular bacteriana como lipopolisacáridos (LPS) de bacterias Gram-negativas (reconocido por TLR4), peptidoglicano de bacterias Gram-positivas (reconocido por TLR2), lipoarabinomanano de micobacterias (reconocido por TLR2), diacil- o triacil-lipopéptidos de bacterias, micobacterias o micoplasmas (reconocidos por TLR2/1 o TLR2/6), flagelina proveniente de bacterias flageladas (reconocida por

TLR5) y DNA genómico bacteriano rico en secuencias CpG no metiladas (reconocido por TLR9). El reconocimiento de los diferentes componentes bacterianos por parte de los TLRs induce citoquinas inflamatorias y, en condiciones especificas, de IFNs de tipo I [122, 123]. Recientemente se ha descripto que estreptococos del grupo B, que residen en fagosomas, inducen la producción de IFN de tipo I dependiente de TLR7, sugiriendo que el RNA producido en el compartimento lisosomal puede ser reconocido por TLR7 [124].

Las proteínas de la cápside de los virus y sus ácidos nucleicos (de ARN de simple o doble cadena o ADN de simple o doble cadena), que son reconocidos por diferentes receptores en distintos compartimentos celulares tales como la superficie celular, los endosomas y el citoplasma. Las proteínas de la cápside provenientes de virus como el virus sincicial respiratorio (RSV) son reconocidos por TLR4. Sin embargo recientemente se ha demostrado que también inducen la producción de citoquinas y quimioquinas inflamatorias a través de TLR2 y TLR6 [125]. Los ácidos nucleicos virales también son importantes PAMPs. El ADN viral como el del herpes simplex (HSV) también contiene secuencias CpG no metiladas con motivos reconocidos por TLR9. Estos motivos son potentes inductores de la secreción de IFNs de tipo I por pDCs, y prometen ser buenos adyuvantes en vacunas contra infecciones virales [126]. El ARN de simple cadena es reconocido por TLR7 y TLR8 (en humanos solamente), y el ARN de doble cadena es reconocido por TLR3 [118, 122, 123].

Se ha observado que ratones que carecen de MyD88, molécula intracelular adaptadora de varios TLRs, son altamente susceptibles a infecciones fúngicas lo que sugiere que TLRs que señalizan en forma dependiente de MyD88 son componentes importantes en la inmunidad contra hongos. Otros estudios revelaron que varios componentes de los hongos son reconocidos por los TLRs. Por ejemplo, fosfolipomananos y β-glucanos son reconocidos por TLR2 y glucuronoxilomananos son reconocidos por CD14 y TLR4.

Diversas enfermedades infecciosas protozoarias humanas tales como las causadas por *Trypanosoma brucei, T. cruzi, Toxoplasma gondii, Plasmodium falciparum* y *Leishmania sp.* involucran la interacción entre glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) y GPI provenientes de estos patógenos y TLR2 y

TLR4. Por otra parte el alcalicilglicerol insaturado y lipofosfoglicano (LPG) de *Trypanosoma sp.* y *Leishmania sp.*, respectivamente, son reconocidos por TLR2, mientras que el ADN de *Trypanosoma sp.* es reconocido por TLR9 [122, 123]. Esto indica que los TLRs también son un componente importante de la inmunidad contra parásitos.

Señalización de los TLRs

La unión de los TLRs a su ligandos específico lleva al reclutamiento de varias proteínas adaptadoras que contienen un dominio TIR como MyD88, TIRAP, TRIF y TRAM. El entrecruzamiento de TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9 y TLR11 con sus respectivos ligandos recluta MyD88. Además de MyD88, TLR1, TLR2, TLR4 y TLR6 reclutan TIRAP, que sirve como adaptador entre los dominios TIR de los TLRs y MyD88. La unión de TLR3 y TLR4 con su ligando reclutan TRIF. Asimismo, TLR4 recluta a TRIF a través de TRAM, que hace de adaptador entre el dominio TIR de TLR4 y TRIF. El reclutamiento de proteínas adaptadoras dispara una cascada de señalización que finaliza con la activación de factores de transcripción tales como NF-κB e IRFs (*Interferon regulatory factors*) (**Figura 6**). Este reclutamiento también activa a diversas MAP quinasas (*mitogen activated protein kinases*) tales como p38, JNKs (*c-Jun N-terminal kinases*) y ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases)*, que a su vez activan al factor de transcripción AP-1. Este factor de transcripción induce la transcripción de citoquinas inflamatorias, IFNs de tipo I y quimioquinas. Debido a la complejidad de la vía de señalización a través de diferentes TLRs; se las divide en MyD88-dependiente y TRIF-dependiente [118, 120, 122, 123]. La vía de señalización dependiente de MyD88 es utilizada por todos los TLRs excepto TLR3. La estimulación recluta a MyD88 y a la familia de protein quinasas IRAK (*interleukin-1 receptor-associated kinase*), que llevan a la activación de TRAF6. TRAF6 activa a TAK1, que resulta en la activación de NF-κB y AP-1 a través del complejo IKK (*IκB kinase*) y las MAP quinasas, respectivamente. TLR3 y TLR4 inician la vía dependiente de TRIF para la inducción de citoquinas inflamatorias e IFNs de tipo I. La vía dependiente de TRIF activa a NF-κB a través de dos

caminos independientes. El dominio N-terminal de TRIF interactúa con TRAF6 y active a NF-κB. Por otro lado, el dominio C-terminal de TRIF interacciona con RIP1 y activa a TAK1. La vía dependiente de TRIF también induce la producción de IFNs de tipo I a través de IRF3. La estimulación de pDCs con agonistas de TLR7 y TLR9 rápidamente induce la secreción de IFNs de tipo I (principalmente IFN-α) a través de la activación de IRF7, y también induce la producción de citoquinas inflamatorias a través de la activación de NF-κB y AP-1 por la vía dependiente de MyD88. Además de las citoquinas inflamatorias y de los interferones, la vía dependiente de MyD88 induce la expresión de moléculas involucradas en la regulación de la inflamación y de la inmunidad adaptativa.

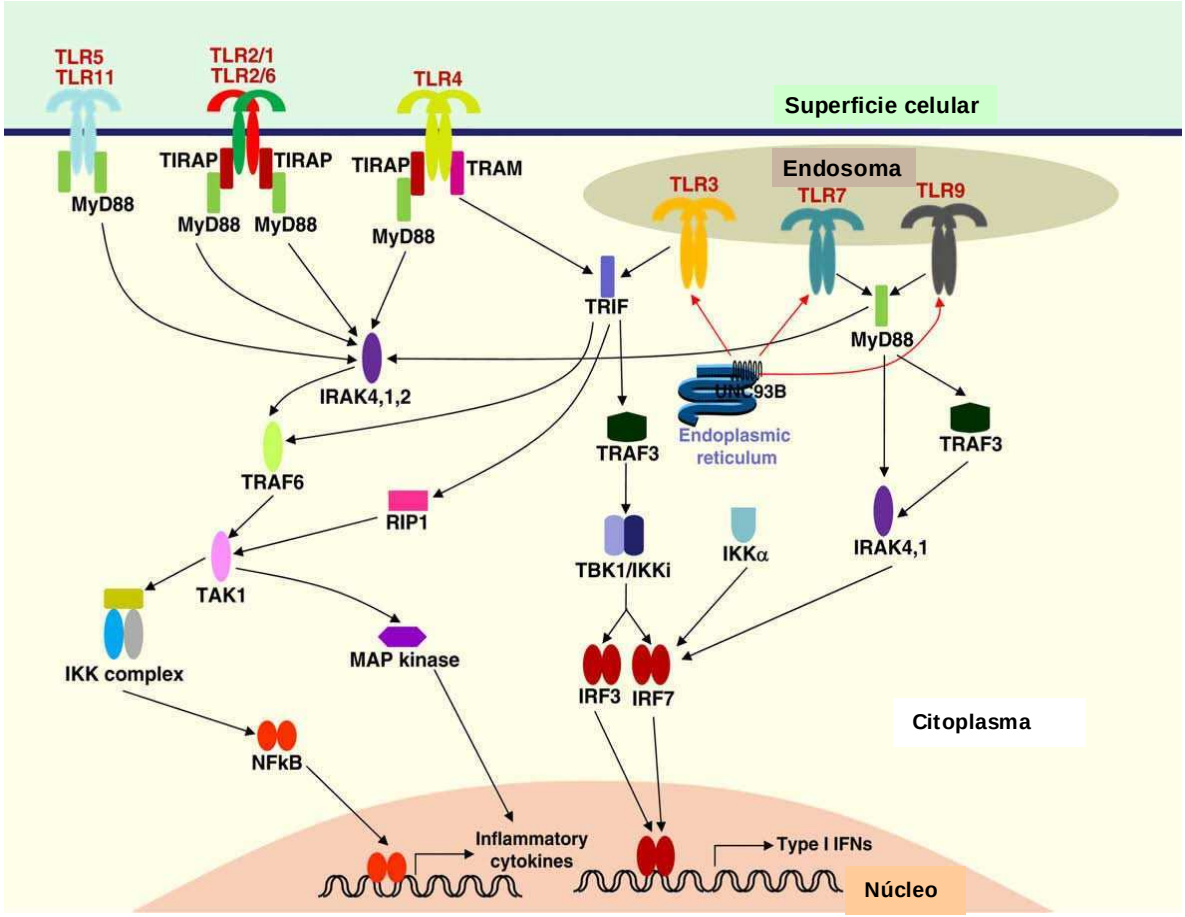


FIGURA 6: Localización y señalización de los TLRs. Adaptada de [122].

Las células NK humanas expresan TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, cuyos ligandos son, como se mencionara mas arriba, RNA doble cadena, RNA simple cadena que se generan durante la replicación viral (21), y secuencias de ADN específicas con motivos CpG no metilados (22), respectivamente. En los últimos

años varios trabajos han demostrado que los TLRs participan en la activación de las células NK. Sivori y col. demostró que en presencia de IL-12 las células NK responden al ácido poliinosínico:policitidílico, poliI:C, o a oligonucleótidos sintéticos que contienen secuencias CpG no metiladas -ODNs- de tipo A activando sus funciones efectoras (liberación al medio citoquinas como IFN-γ y TNF-(y aumento de la actividad citotóxica contra células tumorales y células dendríticas inmaduras, [127]). En cambio Hart y col. demostraron que en ausencia de citoquinas, tanto los agonistas de TLR3 como los de TLR7/8 son capaces de activar la citotoxicidad de las células NK pero solo el agonista de TLR7/8 aumentó la producción de citoquinas [128]. En otro trabajo, Chalifour y col. observaron que la estimulación a través de TLR2 y TLR5, en ausencia de citoquinas, aumentó la secreción de IFN-γ y de defensinas por células NK, efecto que aumentó sinérgicamente en presencia de citoquinas como IL-12 [129]. Sin embargo, muchos aspectos de la respuesta de las células NK a agonistas de TLRs permanecen desconocidos.

Células dendríticas

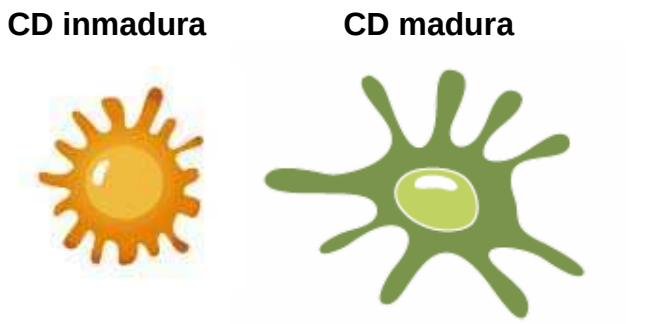
Las células dendríticas (CDs), constituyen una población heterogénea de células cuya característica común es su capacidad de captar, procesar y presentar antígenos a los linfocitos T [130]. Son células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales que cumplen una función crítica en la inducción y regulación de la respuesta inmune adaptativa [131]. Residen en la mayoría de los tejidos periféricos, especialmente en sitios de interfase con el medio ambiente (piel y mucosas) donde representan el 1-2% del total de células [132]. En ausencia de inflamación y de respuesta inmune, las CDs se encuentran en un estado inmaduro patrullando el sistema circulatorio, los tejidos periféricos y los órganos linfáticos secundarios. En los tejidos periféricos, las CDs internalizan antígenos propios por macropinocitosis (mecanismo de endocitosis que no involucra receptores y permite la internalización eficiente de antígenos solubles, a través de la proyección de pseudópodos y la formación de vesículas endocíticas de gran tamaño) o por endocitosis mediada por receptores

(proceso dependiente de clatrina, a través del cual se internalizan antígenos particulados [132]). Las diferentes subpoblaciones de CDs expresan selectivamente un gran número de receptores endocíticos. Estas células expresan receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas, receptores para componentes del complemento [133], receptores que reconocen proteínas de choque térmico (*heat shock proteins,* Hsp)[134], receptores "scavenger" (RSs) que reconocen cuerpos apoptóticos y lipoproteínas propias [132], así como diversos componentes presentes en bacterias y parásitos. Además, expresan receptores lectina de tipo C (RLCs) que reconocen antígenos glicosilados presentes en células eucariotas y procariotas [135], y TLRs [117].

Sin embargo, estas CDs inmaduras (CDi) presentan antígenos de manera ineficiente. Señales provenientes de patógenos tales como productos bacterianos y virales, citoquinas inflamatorias y algunas moléculas propias, son necesarias para inducir la maduración de las CDs a través de la interacción directa con receptores específicos, en la cual las CDs maduran y se transforman en CPA eficientes capaces de activar células T (CDm). Los linfocitos T, a través de vías independientes y dependientes de CD40, y las células endoteliales contribuyen a la maduración final de las CDs a través del contacto directo célula-célula y la secreción de citoquinas.

Durante el proceso de maduración, las CDs reducen su capacidad endocítica a través de una disminución en la expresión de receptores antigénicos y menor capacidad fagocítica y macropinocítica, y aumentan su capacidad presentadora tras un aumento marcado en la expresión de complejos péptido antigénico/molécula del complejo mayor de histocompatibilidad. Además, se incrementa la expresión en superficie de moléculas coestimulatorias como CD40, CD80 y CD86. Estas CDs maduras, necesitan migrar desde los tejidos hasta los órganos linfáticos secundarios, en donde interactúan con las células T. En el proceso de maduración se incrementan los niveles de expresión de moléculas de adhesión y del receptor CCR7, cuyos ligandos CCL19 y CCL21 son expresados por células endoteliales de las vénulas del endotelio alto (HEV) y en las zonas T de los órganos linfáticos secundarios lo que contribuye al reclutamiento de las CDm a los órganos linfáticos secundarios. Como

consecuencia de la maduración de las CDs, también ocurren cambios en la organización del citoesqueleto, eventos que contribuyen a la migración de las CDs. Es importante destacar que además de la presentación antigénica, las CDs también influencian el tipo de respuesta que se va a desencadenar. Diferentes subpoblaciones de CDs, y CDs en diferentes estadios de maduración, expresan distintos receptores de superficie y secretan distintas citoquinas, determinando selectivamente el tipo de respuesta inmune inducida lo cual es reflejo de la plasticidad de ésta célula (**Figura 7**).



Ubicación	Tejidos periféricos	Órganos linfáticos secundarios
Capacidad endocítica	++	+/-
Capacidad de procesamiento	++	+/-
Expresión de moléculas coestimulatorias y de presentación	+	++
Capacidad estimulatoria de linfocitos T vírgenes	+/-	++

FIGURA 7: Características de las CDs.

Tradicionalmente se ha identificado a las CDs como células capaces de promover la iniciación y amplificación de la respuesta inmune adaptativa [132]. Sin embargo, evidencias recientes indican que las CDs poseen a su vez la facultad de promover tolerancia y silenciar la respuesta inmune favoreciendo la expansión de células T regulatorias con fenotipo $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ (T regulatorias naturales o Tregs) ó $Foxp3^-$ productoras de IL-10 (T regulatorias inducibles o Tr1, [136]). Estas células dendríticas tolerogénicas (CDt) son células que pueden encontrarse en diferentes estadios de maduración y activación, y pueden inhibir la polarización de la respuesta inmune hacia perfiles inflamatorios. Las CDt se caracterizan generalmente, por la baja expresión de

moléculas coestimulatorias, en particular CD40, CD80 y CD86 [137], y muestran además, una producción de IL-12 disminuida y una de IL-10 aumentada [133]. Aunque la información acerca de los mecanismos que controlan la generación de CDs tolerogénicas es limitada, se ha observado que el microambiente local juega un importante rol en la inducción de las CDs tolerogénicas [138], junto con algunos otros mecanismos como indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO, [139]), y galectina-1 (Gal-1, [140]). Las citoquinas son factores claves para modelar la tolerogenicidad de las CDs, como lo muestran las propiedades fenotípicas y funcionales expresadas por las CDs diferenciadas en presencia de IL-10 [141], TGF-β [142], TNF-α [143] o G-CSF [144]. Recientemente se ha demostrado que existen otras citoquinas adicionales producidas por el estroma tumoral y mediadores anti-inflamatorios tales como 1,25-dihidroxivitamina D3 (vitD3, [145]), el péptido vasoactivo intestinal (VIP, [146]), el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF, [147]), entre otros [136], que favorecen la diferenciación de estas CDt. Las mismas células Treg pueden inducir y mantener a las CDs en un estado tolerogénico, pudiendo inhibir su maduración, su función como célula presentadora de antígenos y su capacidad de secreción de IL-12.

Por otra parte, en un microambiente tumoral se generan señales de peligro y neoantigenos capaces de disparar la respuesta inmune innata y adaptativa. Las CDs captan, procesan y presentan antígenos tumorales activando células T específicas [148]. Sin embargo, generalmente hay tolerancia a la mayoría de los antígenos presentados por las CDs [149]. Se ha observado que pacientes con cáncer tienen disminuido el numero de CDs en los ganglios linfáticos, bazo y piel [150] acumulándose CDi que tienen baja capacidad fagocítica y que son incapaces de disparar la proliferación y secreción de IFN-γ, pero que pueden inducir tolerancia o anergia en las células T [131, 132]. Estos efectos son provocados por el microambiente tumoral que impide la maduración adecuada de las CDs por falta de estimulación a través de receptores de reconocimiento de patrones (RRPs), y además por la presencia de citoquinas inmunosupresoras tales como IL-10 , TGF-β y VEGF, creando un microambiente supresor. La células estromales y citoquinas del microambiente tumoral

promueven el reclutamiento de CDs regulatorias, cuyas propiedades inmunosupresivas dependen de la presencia de factores inhibitorios [151].

Interacción CD-NK

Se ha demostrado que durante las etapas tempranas de activación de la respuesta inmune existe una interacción crítica entre las células NK y las CDs, lo que perfila el desarrollo de una respuesta inmune efectiva. Las células NK generalmente no se encuentran infiltrando los tejidos normales, pero acceden a los tejidos inflamados en respuesta a un gradiente de quimioatractantes, tales como la IL-8. Una vez en los tejidos inflamados, estas células NK pueden activarse a través de receptores activadores, como los descriptos en secciones anteriores, o pueden activarse por contacto con CDs que reconocieron PAMPs, disparando un circuito de estimulación recíproca entre ambas células. En este diálogo recíproco que establecen las células NK con las CDs y que promueve el desarrollo de la actividad citotóxica y la secreción de IFN-γ y otras citoquinas por parte de las células NK, intervienen citoquinas secretadas localmente por las CDs pero también es necesario el contacto célula-célula. Las células NK reciben señales de activación mediadas por citoquinas secretadas por las CDs, tales como IL-12, IL-15, IL-18 e IFNs de tipo I, y a través de los receptores de superficie tales como NKp30 y DNAM-1 de las células NK que reconocen ligandos específicos expresados por las CDs. El IFN-γ localmente secretado por las células NK en el microambiente inflamatorio contribuye con la maduración de las CDs, aumentando su capacidad de secreción de citoquinas pro-inflamatorias y estimuladoras para las propias células NK. Simultáneamente, aquellas CDs que no maduran adecuadamente, son destruidas por los mecanismos citotóxicos de las células NK [152]. Se ha especulado que este mecanismo contribuye con la eliminación de CDi que podrían desencadenar señales tolerogénicas contra los agentes infecciosos, mientras que se favorece la maduración adecuada de las CDs. La susceptibilidad diferencial de las CDi y las CDm al ataque citotóxico mediado por las células NK se debe a que durante la maduración, las CDs incrementan la expresión de la molécula HLA-E, la que desencadena señales

inhibitorias en las células NK a través de CD94/NKG2A, protegiéndose de esta manera a las CDm de la lisis por células NK [153, 154].

Por otra parte, las CDm que migran desde los sitios de inflamación pueden interaccionar con las células NK que se encuentran en los ganglios linfáticos. Esto provoca la activación de las células NK y el desarrollo de una alta capacidad citotóxica y, principalmente, de secreción de IFN-γ, ya que la mayoría de las células NK residentes son $CD56^{bright}$ productoras de citoquinas. El IFN-γ secretado participa en el desarrollo de un perfil de CDs con alta capacidad de secreción de IL-12 y demás citoquinas proinflamatorias, contribuyendo a polarizar la respuesta inmune adaptativa hacia un perfil Th1 y citotóxico [155, 156].

Estos hallazgos demuestran que las interacciones entre células NK y CDs juegan un papel fundamental en la polarización de la respuesta inmune hacia un perfil Th1y citotóxico, y que este desarrollo resulta critico para generar una respuesta inmune anti-tumoral eficiente. Sin embargo, desconocemos hasta el presente el efecto de las CDs tolerogénicas, tales como las que se generan en el ambiente tumoral, sobre las células NK.

Objetivos

Los antecedentes descriptos ponen en evidencia la importancia crucial del sistema NKG2DL/NKG2D en la vigilancia inmunológica contra tumores. Por ello y con el objetivo de desarrollar nuevas estrategias tendientes a potenciar las funciones anti-tumorales de las células NK a través de su activación con estímulos externos, como por ejemplo con agonistas de los TLRs, resulta fundamental elucidar el impacto de los mismos en la funcionalidad de las células NK. Asimismo, desconocemos hasta el presente el efecto de las CDs tolerogénicas sobre las células NK. Este hecho reviste importancia especialmente considerando que podría ocurrir que las CDs tolerogénicas ejercieran efectos inhibitorios sobre las capacidades anti-tumorales desarrolladas por las células NK mediante la estimulación con los agonistas de TLRs. Por lo tanto, el objetivo central de esta Tesis fue desarrollar nuevas estrategias tendientes a potenciar las funciones anti-tumorales de las células NK a través de su activación con estímulos externos de posible aplicación en humanos e investigar el efecto que ejercen las CDs tolerogénicas sobre tales funciones

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

1.- Investigar el papel de los agonistas de TLRs expresados por las células NK como estimuladores de la citotoxicidad, la secreción de IFN-γ y la expresión de NKG2D, elucidando además los mediadores intracelulares involucrados.

2.- Estudiar los efectos que ejercen las CDs tolerogénicas sobre las células NK con el objeto de elucidar estrategias de inmunosupresión que comprometen la actividad de las células NK.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

1. Reactivos

El agonista de TLR3, poliI:C, se adquirió a Amersham Biosciences (Piscataway, NJ), y los agonistas de TLR7 (loxorribina) y TLR9 (ODNs de tipo A o B y sus respectivos controles) se adquirieron a Invivogen (San Diego, CA). Las interleuquinas IL-12, IL-15, IL-18, e IL-4 humanas recombinantes fueron adquiridas a Peprotech (Rock Hill, NJ). El IFN-α humano recombinante fue gentilmente cedido por Biosidus (Argentina).

La vitD3 y la dexametasona fueron adquiridas a Sigma.

Las drogas U0126, SB202190 y rapamicina fueron adquiridas a Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU). La ciclosporina (CsA) fue gentilmente provista por la empresa Novartis (Buenos Aires, Argentina). La sulfasalazina (Sz), la cloroquina y la droga Ly294002 fueron adquiridas a Sigma (St. Louis, MO, EEUU) y diluidas en DMSO. Las concentraciones empleadas se especifican en cada ensayo en particular.

2. Líneas celulares utilizadas

Se utilizaron dos clones del melanoma IIB-Mel-LES [157] transfectados establemente con el plásmido pCIneo-MICA (*clon 1*) o con el mismo plásmido vacío (*clon C)*. Los clones de este melanoma se cultivaron a 37°C en medio RPMI-1640 (Invitrogen, Gaithersburg, MD, EEUU), suplementado con 10% de suero fetal bovino Gibco (SFB, Invitrogen 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 estreptomicina (todos de Invitrogen) en estufa de atmósfera controlada a 37ºC con 5% de CO2.

3. Aislamiento de células NK:

Se extrajo sangre de donantes voluntarios sanos y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente con el reactivo de enriquecimiento de células NK *Rosette Sep* (StemCell Technologies, Vancouver, BC, Canadá). Se diluyó la muestra al décimo con solución fisiológica (0,9 g de NaCl en un volumen final de 100 ml de agua destilada) suplementada al 2% con SFB (Natocor) a

temperatura ambiente y se sembró sobre un colchón de Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia). Se centrifugó a 2.000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente y se colectó la nube de células NK. Las células se lavaron dos veces con solución fisiológica suplementada con SFB, y se resuspendieron a razón de $1x10^6$ células/ml en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB (Natocor), glutamina, piruvato, penicilina y estreptomicina (Invitrogen). Se realizó una inmunomarcación de superficie con AcMo específicos anti-CD56, anti-CD16, y anti-CD3 con el objeto de analizar el porcentaje y la pureza de las células NK obtenidas. Posteriormente, se realizó el recuento de células con el colorante vital azul de Tripán en cámara de Neubauer.

3.2. Estimulación de las células NK:

Las células NK humanas aisladas fueron resuspendidas a razón de $1x10^6$ células por cada mililitro de medio de cultivo y estimuladas durante 24 hs con 1 ng/ml de IL-12, IL-15 o IL-18, o 1000 U/ml de IFN-α en ausencia o en presencia de 50 µg/ml de polyI:C (agonista de TLR3) o de 1 mM de loxorribina (agonista de TLR7) o de 10 µg/ml de ODN-A o de ODN-B (agonistas de TLR9) o de sus respectivos controles negativos ODN-Ac u ODN-Bc.

En algunos ensayos las células NK se estimularon con IL-12 y loxorribina o poliI:C en ausencia o en presencia de 20 μg/ml de cloroquina, de 20 μM de U0126, 10 μM de SB202190, 1 mM de Sz, 1 μM de CsA o de 1 μM de rapamicina (inhibidores farmacológicos de las vías de señalización MEK1/ERK, p38 MAPK, NF-κB, calcineurina y $p70^{S6}$ kinasa respectivamente).

Seguidamente, se estudió la secreción de IFN-γ por ELISA, la expresión de NKG2D, TLRs, IL-12Rβ1, IL-12Rβ2, IFN-αR por citometría de flujo, y la citotoxicidad contra células del clon C o del clon 1 del melanoma IIB-Mel-LES.

4. Obtención de CDs humanas

Las CDs se diferenciaron a partir de monocitos de sangre periférica aislados a partir de células mononucleares de sangre periférica (CMSPs). Para

ello, se extrajo sangre de donantes voluntarios sanos, se diluyó la muestra al medio con solución fisiológica a temperatura ambiente y se sembró sobre un colchón de Ficoll-Paque™ PLUS. Se centrifugó a 2.000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente y se colectó la nube de CMSPs. Las células se lavaron 2 veces con solución fisiológica, se resuspendieron en 2 ml de buffer de deshidratación y se incubaron a 37°C durante 40 min con concentraciones crecientes de NaCl. A continuación se realizó una separación por centrifugación en un gradiente de Percoll (GE Healthcare). Se colectó la nube de monocitos y se realizaron dos lavados con solución fisiológica. Los monocitos obtenidos se resuspendieron a razón de $2x10^6$ células/ml en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB, 50 µM de 2-mercaptoetanol (Sigma), glutamina, piruvato, penicilina y estreptomicina. La pureza de la población resultante se comprobó por citometría de flujo siendo la fracción enriquecida en células $CD14^+$ siempre superior al 75%. En experimentos realizados subsecuentemente, los monocitos se aislaron de CMSPs por selección positiva de células $CD14^+$ por métodos inmunomagnéticos empleando el kit específico de Miltenyi Biotech (Bergisch Gladbach, Alemania). En estos casos, la pureza de las células $CD14^+$ fue siempre superior al 90%. Para su diferenciación a CDs los monocitos se cultivaron durante 6 días en presencia de 5 ng/ml de IL-4 recombinante humana (Sigma) y 35 ng/ml de GM-CSF (Sigma), renovándose el medio cada tres días de cultivo. Al sexto día de cultivo, se cosecharon las CDi, se lavaron, se resuspendieron en medio completo y se cultivaron durante 24 h en ausencia o en presencia de 1 µg/ml de LPS (cepa 0111:B4; Sigma) para inducir su maduración y obtener CDm.

Al sexto día de cultivo y tras 24 h de maduración se realizó una inmunomarcación de superficie con AcMo específicos anti-CD1a, anti-CD83, anti-CD86, anti-CD14 y anti-HLA-DR con el objeto de analizar el fenotipo de las células obtenidas. También se estudió el perfil de citoquinas (IL-12 e IL-10) liberadas por las CDs durante su maduración y se analizó la capacidad de inducir proliferación linfocitaria mediante cultivos alogénicos.

4.1 Obtención de CDs tolerogénicas

Las CDi obtenidas se maduraron como se describió anteriormente en presencia de $1x10^{-8}$M de vitD3, $1x10^{-8}$M de dexametasona. Tras 24 h de maduración se realizó una inmunomarcación de superficie con AcMo específicos anti-CD1a, anti-CD83, anti-CD86, anti-CD14 y anti-HLA-DR con el objeto de analizar el fenotipo de las células obtenidas. También se estudió el perfil de citoquinas (IL-12 e IL-10) liberadas por las CDs durante su maduración y se analizó la capacidad de inducir proliferación linfocitaria mediante cultivos alogénicos.

5. Aislamiento de linfocitos T $CD4^+$

Se aislaron linfocitos T $CD4^+$ por selección positiva a partir de CMSPs empleando AcMo anti-CD4 acoplado a perlas magnéticas (Dynabeads, Dynal, Oslo, Noruega), de acuerdo a las instrucciones provistas por el fabricante. Brevemente, 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 temperatura ambiente en un agitador orbital. Utilizando un dispositivo magnético, se separaron las células $CD4^+$ y se realizaron tres lavados con 2% de SFB en PBS. Finalmente, las células se resuspendieron en medio RPMI completo. La eficiencia de purificación fue siempre mayor al 95 % y fue determinada por citometría de flujo.

6. Depleción de monocitos

6.1. Pasaje por columnas de nylon

Se rellenó una jeringa de 5 ml con 0,04 g de lana de nylon, se lavó con 10 ml de PBS, se envolvió en papel aluminio y se autoclavó durante 1 h a 1,5 atm. Seguidamente, se realizaron sucesivos lavados de la columna de nylon. Primero se lavó con 10 ml de PBS estéril, luego se lavó con 3 ml de RPMI-1640 y finalmente con 5 ml de RPMI-1640 completo. Se agregó una suspensión de

células NK aisladas como se detalló anteriormente, se envolvió en papel aluminio y se incubó en estufa de atmósfera controlada a 37ºC con 5% de CO_2 durante 45 min. Las células se eluyeron con el pasaje de 30 ml de medio RPMI-1640 completo, se centrifugaron a 2.000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente y se resuspendieron a razón de $1x10^6$ células/ml en medio RPMI-1640 completo.

6.2. Adherencia a placa

Se aislaron células NK a partir de sangre de donantes voluntarios sanos como se describió anteriormente. Las células se resuspendieron a razón de $2x10^6$ células/ml en medio RPMI-1640 completo y se incubaron en placas de Petri en estufa de atmósfera controlada a 37ºC con 5% de CO_2 durante 2 h. Se levantaron las células no adherentes, se centrifugaron a 2.000 rpm durante 20 min a temperatura ambiente y se resuspendieron a razón de $1x10^6$ células/ml en medio RPMI-1640 completo.

7. ELISA de captura para la detección de:

7.1. IFN-γ:

Se utilizó un kit de ELISA de captura comercial (Pierce, Rockford, Illinois, EEUU). Se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 fosas de fondo plano Maxisorp (NUNC, Rochester, Nueva Cork, EEUU), con 100 µl de una dilución 1/1000 del Ac de captura anti-IFN-γ diluido en PBS (150mM de NaCl, 1,7mM de KH_2PO_4, 5,2mM de Na_2HPO_4 pH 7,4), y se incubaron en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. Las fosas se lavaron con buffer de lavado (50mM de Tris-HCl, 0,2% Tween-20 pH 8) y se bloquearon con 100 µl/fosa de PBS con seroalbúmina bovina al 0,5% (BSA, Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU) durante 1 h a 37°C. Se realizaron dos lavados con buffer de lavado y a continuación, se incubó durante 1 h a 37(C con 25 (l/fosa de los sobrenadantes de cultivo obtenido tras 24 h de estimulación de las células NK humanas con los diferentes estímulos. Se agregaron 100 µl por fosa del Ac de detección anti-IFN-γ diluido 1/600 conjugado con biotina y se incubó durante 1 h a 37°C. Seguidamente, se

realizaron tres lavados con el buffer de lavado y se incubaron las placas durante 30 min a 37°C con estreptavidina conjugada con peroxidasa (HRP, Bio-Rad), diluida 1/5000 en PBS con Tween 20 al 0,01% pH 7,4 (PBS-T) con leche descremada al 1% a razón de 100 μl/fosa. Posteriormente, se realizaron tres lavados con buffer de lavado y se incubó en oscuridad durante 15 min con una solución de *o*-fenilendiamina (OPD 1 mg/ml, Sigma) y H_2O_2 (1 μl/ml, Sigma) como cromógeno/sustrato, diluidos en buffer citrato/fosfato (0,1 M de ácido cítrico; 0,1M de $Na_2H\ PO_4$ pH=5), a razón de 100 μl/fosa. Se detuvo la reacción por adición de 12,5 μl de H_2SO_4 4 N en cada pocillo y se leyó la densidad óptica a 492 nm (DO_{490}) en un lector de ELISA Titertek Multiscan Plus MK II (Labsystems, Helsinki, Finlandia). La concentración de IFN-γ en los sobrenadantes de cultivo se calculó extrapolando los valores de absorbancia medidos en una curva patrón. La curva estándar se obtuvo empleando IFN-γ recombinante humano (eBioscience, San Diego, California, EEUU).

7.2. IL-12

La secreción de IL-12 en sobrenadantes de cultivo por CDs humanas se analizó empleando el kit de ELISA de captura comercial y se siguieron las instrucciones provistas por el fabricante. Brevemente, se sensibilizaron placas de poliestireno de 96 fosas de fondo plano Maxisorp con el Ac de captura disuelto en buffer de sensibilización (buffer carbonato pH 9,6) y se incubaron en cámara húmeda durante toda la noche a 4°C. A continuación, se lavaron tres veces las placas con buffer de lavado (PBS pH 7,4; 0,01% Tween-20) y se incubaron con buffer de bloqueo (PBS/10% SFB) durante 1 h a temperatura ambiente. Seguidamente, se incubaron las muestras durante 2 h a temperatura ambiente, se realizaron tres lavados con el buffer de lavado, se agregó la solución de detección conteniendo el Ac secundario biotinilado y la estreptavidina-HRP y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron seis lavados y se procedió al revelado con una solución de 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) y 0,03% de H_2O_2 en buffer fosfato-citrato. La reacción se detuvo con H_2SO_4 2N y se determinó la absorbancia a una longitud de onda de 450nm en un espectrofotómetro de placa (Labsystems). Se obtuvo

la correspondiente curva patrón utilizando IL-12 humana recombinante y la concentración de IL-12 en los sobrenadantes de cultivo se calculó extrapolando los valores de absorbancia producidos por cada muestra.

7.3. IL-10

La secreción de IL-10 en sobrenadantes de cultivo por CDs humanas se analizó empleando el kit de ELISA de captura comercial y se siguieron las instrucciones provistas por el fabricante, como se describió anteriormente para IL-12.

8. Citometría de flujo

8.1 Inmunomarcación de superficie

Para las inmunomarcaciones indirectas se utilizaron 500.000 células por tubo. Las células fueron lavadas dos veces con 500 µl de PBS con 1% de SFB y 0,1% de NaN_3 (PBS/SFB/NaN_3) centrifugando durante 5 min a 2000 rpm. A continuación, se incubaron las células durante 15 min a 37ºC con 25 µl de solución de bloqueo (PBS/suero normal de ratón 10%) y se realizó una centrifugación durante 5 min a 2000 rpm. Seguidamente, se descartaron los sobrenadantes, se resuspendieron las células en 10 µl del correspondiente Ac primario y se incubaron durante 30 min en hielo. A continuación, las células se lavaron dos veces con 500µl de PBS/SFB/NaN_3 y se resuspendieron en 20 µl de una dilución 1/40 del Ac secundario conjugado a ficoeritrina (PE) diluido en PBS/SFB/NaN_3 y se incubaron durante 30 min en hielo y oscuridad. Finalmente las células se lavaron 2 veces con 500µl de PBS/SFB/NaN3, y se resuspendieron en 400µl de PBS y 0,1% de NaN_3. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACScalibur o FACSAria (Becton Dickinson, San José, CA), y los datos fueron analizados con el programa WinMDI 2.8 (http://facs.scripps.edu).

Para las inmunomarcaciones directas se utilizaron 500.000 células por tubo. Las células fueron lavadas dos veces con 500 µl de PBS/SFB/NaN_3 centrifugando durante 5 min a 2000 rpm. A continuación, se incubaron las células durante 15 min a 37ºC con 25 µl de solución de bloqueo (PBS/suero

normal de ratón 10%) y se realizó una centrifugación durante 5 min a 2000 rpm. Seguidamente, se descartaron los sobrenadantes, se resuspendieron las células en el correspondiente Ac conjugado a un fluorocromo, según se indica en cada experimento, y se incubaron durante 30 min en hielo. A continuación, las células se lavaron dos veces con 500µl de PBS/SFB/NaN_3 y se resuspendieron 400µl de PBS y 0,1% de NaN_3. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACScalibur o FACSAria (Becton Dickinson), y los datos fueron analizados con el programa WinMDI 2.8.

8.2. Inmunomarcación intracitoplasmática

Se utilizaron 10^6 células por tubo. Las células se lavaron con 1 ml de PBS/SFB/NaN_3. Posteriormente se incubaron 15 min a 37ºC con 10% de suero normal de ratón en PBS, se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 min y se fijaron con 100 µl de para-formaldehído al 4% en PBS a pH 7,4 (PFA) durante 20 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 min y se lavaron con 1 ml de PBS. Las células se resuspendieron en 100 µl de *buffer* de permeabilización (PBS/SFB/NaN_3 con 10% de saponina) y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 2.000 rpm durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se lavó con 1 ml de *buffer* de permeabilización. Las células se resuspendieron en 50 µl de *buffer* de permeabilización y se agregaron 10 µl del AcMo correspondiente o de su respectivo control de isotipo. Se incubó durante 30 min a temperatura ambiente, se lavaron con 1 ml de *buffer* de permeabilización, se resuspendieron en 100 µl de *buffer* de permeabilización y se agregaron 100 µl de 2% de PFA. Las muestras fueron adquiridas en un citómetro de flujo FACScalibur (Becton Dickinson). Los resultados fueron analizados con el programa WinMDI 2.8.

8.3. Anticuerpos para inmunomarcación

Para determinar el porcentaje de pureza de células NK se utilizaron AcMo anti-CD3, anti-CD56 y anti-CD16, y sus respectivos controles de isotipo de eBioscience.

Para la detección de NKG2D se utilizó 10 μl del AcMo 1D11 (eBioscience) a razón de 10 μg/ml como Ac secundario se utilizó una dilución 1/40 de IgG de cabra contra IgG de ratón, conjugadas con FITC o PE (DAKO, Glostrup, Dinamarca). El respectivo control de isotipo (CI) fue adquirido a Southern Biotech (Birmingham, AL).

Para la marcación intracitoplasmática de TLR3, TLR7 y TLR9 se emplearon AcMo anti-TLR3 y anti-TLR9 (eBioscience) y anti-TLR7 (Imgenex, San Diego, CA). Los AcMo anti-IL-12Rβ1 y anti-IL-12Rβ2 se adquirieron a BD Biosciences (San José, CA) y el AcMo anti-IFN-αR (64G12) fue gentilmente provisto por P. Eid, Institut Gustave Roussy (IGR), Villejuif, Francia.

Para analizar el fenotipo de las CDs al sexto día de cultivo y tras 24 h de maduración se utilizaron AcMo específicos anti-CD1a, anti-CD80, anti-CD86 y anti-HLA-DR, y sus respectivos controles de isotipo de BD Biosciences.

9. Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y Western Blot

9.1. Lisados celulares totales

Se cosecharon dos millones de CDs, se lavaron tres veces con PBS, se centrifugaron a 2.000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente y se resuspendieron en 200 μl de *buffer* de lisis (TBS -0,15 M de NaCl, 50 mM de Tris-HCl pH 7,4-, una dilución 1/100 de un cóctel de inhibidores de proteasas (SIGMA) y 3-[(3-cloroaminopropil) dimetilamino]-1-propano-sulfonato –CHAPS SIGMA al 1%-). Se incubó durante 1 h en hielo, y se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se trasvasó a un tubo nuevo y el lisado obtenido se guardó a -20ºC. Se tomaron 47 μl de los extractos y se mezclaron con 3 μl de 0,2 M de ditiotreitol (DTT) y 10 μl de buffer de siembra para SDS-PAGE (7 ml de buffer de apilamiento 4X, 3 ml de glicerol, 1 g de SDS, 2 mg de azul de bromofenol).

9.2. 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.

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

Se utilizó el método discontinuo en placa descripto por Hames [158]. Para ello, se preparó un gel de separación con 12% de poliacrilamida y un gel de apilamiento con 3% de poliacrilamida. En el gel se sembraron marcadores de peso molecular Mark12™ MW Standard (Invitrogen, Carlsbad, CA, EEUU), y 20 (g de proteínas del lisado de las CDs por calle. Se realizó la corrida electroforética en una cuba de electroforesis Mini Protean II (Bio-Rad) con buffer de corrida (3,02 g de Tris base, 14,4 g de glicina y 1 g de SDS, en un volumen final de 1000 ml) a 150 V durante 15 min, y luego a 200 V hasta que el frente de corrida alcanzó el límite del gel.

9.4. Electrotransferencia y Western Blot

Se transfirieron las proteínas separadas a una membrana de PVDF (Hybond-P, Amersham Biosciences), utilizando buffer de transferencia (3,02 g de Tris base, 14,4 g de glicina y 200 ml de metanol en un volumen final de 1000 ml), 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 con un AcMo anti-β-actina (Santa Cruz Biotech). Las membranas se bloquearon con TBS con 5% de leche descremada (Bio-Rad) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron tres veces con TBS con Tween 20 al 0,1% (TBS-T) con agitación. Se incubaron las membranas con los correspondientes anticuerpos desde 1 h hasta 16 h a temperatura ambiente, dependiendo del Ac. Luego, las membranas se lavaron cinco veces con TBS-T

(el primer lavado se realizó durante 15 min y los cuatro restantes se realizaron durante 5 min). A continuación, las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con Ig de cabra anti-IgG de ratón conjugadas a HRP (Bio-Rad) diluidas 1/3000 en TBS-T con 1% de leche descremada, se lavaron 5 veces con TBS-T como se describió anteriormente 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).

9.5. Anticuerpos para Western Blot

Anti-Gal-1: Se incubó durante 16 h a 4°C a una dilución 1/5000 de un Ac policlonal anti-Gal-1 gentilmente cedido por el Dr. Gabriel Rabinovich (Laboratorio de Inmunopatología, IByME) [159]. Como Ac secundario se utilizaron Igs de cabra anti-IgGs de conejo conjugadas a HRP.

10. Cultivos alogénicos

Con el fin de analizar la actividad regulatoria de las CDs, células T $CD4^+$ alogénicas ($2x10^5$) se cocultivaron a diferentes relaciones E:T en 200 μl de medio RPMI completo durante 5 días con CDs maduradas con LPS ($1x10^4$) en ausencia o presencia de vitD3 o dexametasona por triplicado en placas de 96 pocillos. Se agregó 1 μCi de [^{3}H]-timidina (New Englands 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 Pakcard Filtermate (Packard Instruments, La Grange, IL, EEUU). Los papeles se secaron y se les 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.

11. Ensayos de citotoxicidad

Las relaciones efector:blanco (E:B) utilizadas fueron 20:1, 10:1, 5:1 y 1:1. Se realizó la incubación de las células blanco (células del clon 1 o del clon C del melanoma IIB-Mel-LES o células de la línea de eritroleucemia K562) con $^{51}CrO_4Na_2$ en solución acuosa (^{51}Cr, Amershan Biosciences) a razón de 0,1 mCi/10^6 células, durante 1 h en baño de agua a 37ºC. Se lavaron las células tres veces con RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB, y se incubaron con las células efectoras en placas de 96 fosas de fondo en "U", durante 5 h a 37ºC. Como células efectoras se utilizaron células NK no estimuladas o estimuladas durante períodos cortos (24h) con dosis subóptimas de diferentes citoquinas como IL-12, IL-15, IL-18 o IFN-α en presencia o ausencia de diferentes agonistas de los TLRs. Se cosecharon 100 μl de los sobrenadantes de cultivo y se cuantificó la radiación en un contador γ (Clinigamma, LKB, Wallac, Turku, Finlandia). Los resultados obtenidos se transformaron en porcentaje de lisis, usando la siguiente fórmula:

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

donde X es la muestra, LE es la liberación espontánea de las células blanco en ausencia de células efectoras y MAX es la liberación máxima de las células blanco tratadas con 100 μl de una solución de Tritón X-100 al 2%. Los resultados obtenidos se analizaron empleando el programa Instat y se aplicó el análisis de varianzas (ANOVA) con test de Bonferroni.

12. Cocultivos

12.1. Células NK humanas con clon 1 o clon C

Se realizaron cocultivos de células NK estimuladas como se describió anteriormente y células del un clon 1 o del clon C de IIB-MEL-LES, a una relación E:T de 20:1.

En algunos ensayos los cocultivos se realizaron en ausencia o en presencia de 50 µM de Ly294002 (inhibidor de PI3K).

Luego de 24 h de cocultivo en estufa de atmósfera controlada, se cosecharon los sobrenadantes de cultivo y se utilizaron para evaluar por ELISA de captura la presencia de IFN-γ.

12.2. Células NKs con células dendríticas

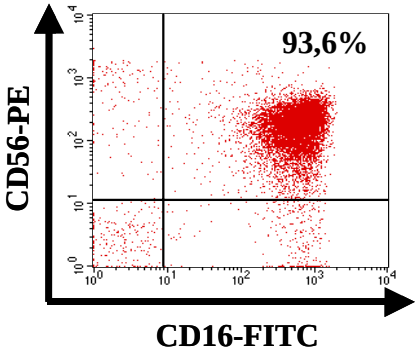
Se realizaron cocultivos de células NK humanas no estimuladas o estimuladas como se describió anteriormente con células dendríticas humanas inmaduras, maduras o tolerogénicas a una relación E:T de 5:1 en estufa de atmósfera controlada a 37ºC. Luego de 16 h se cosecharon los sobrenadantes de cultivo y se utilizaron para evaluar la presencia de IFN-γ.

En otra serie de experimentos, células NK se cultivaron con medios condicionados (sobrenadantes de cultivo) de CDi, CDm y CDt durante 24 h en estufa de atmósfera controlada a 37ºC. Como en el caso anterior, luego de 16 h se cosecharon los sobrenadantes de cultivo y se utilizaron para evaluar la presencia de IFN-γ.

RESULTADOS

1. Aislamiento de células NK humanas:

Las células NK de sangre periférica humana se aislaron utilizando el kit comercial RosetteSep (StemCell Technologies Inc.). La pureza obtenida fue siempre superior al 93% como se pudo observar por citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD56 marcado con PE, y anti-CD16 marcado con FITC. En la **Figura 8** se muestra un gráfico de marcación para CD56 y CD3 representativo.



	Media ± Desvío
Células $CD3^+$	0.19 ± 1.70 %
Células $CD14^+$	1.47 ± 1.00
Células $CD3^-CD56^+$	96.52 ± 2.26 %

Figura 8: Análisis de la pureza de las células NK utilizadas en los experimentos. Analizado por citometría de flujo.

2. Secreción de IFN-γ por células NK estimuladas con agonistas de TLRs:

Con el objetivo de estudiar la función biológica de algunos TLRs que se expresan en las células NK, en primer lugar evaluamos la capacidad de estos receptores de modular la secreción de IFN-γ empleando células NK sin estimular o estimuladas durante períodos cortos (24 h) con dosis subóptimas de IL-12, IL-15, o IFN-α (**Figura 9**). Observamos que en ausencia de citoquinas, poliI:C, loxorribina, u ODN-A, agonistas de TLR3, TLR7 y TLR9 respectivamente, promovieron una baja secreción de IFN-γ (menor que 20 pg/ml, **Figura 9A**). Por el contrario, la estimulación de células NK con dosis subóptimas de IL-12 promovió una buena secreción IFN-γ (300-400 pg/ml considerando los valores obtenidos con diferentes donantes); siendo mayor el efecto cuando las células NK se estimularon simultáneamente con IL-12 y poliI:C o loxorribina (valores por encima de 500 pg/ml para la mayoría de los donantes) (**Figura 9B**). Además, a pesar de que se observó una baja secreción de IFN-γ con los oligonucleótidos controles de los ODNs tipo A y B, sólo ODN-A provocó una secreción de IFN-γ por encima de los efectos provocados por su ODN control. En

cambio, la estimulación de las células NK con dosis subóptimas de IL-15 y los agonistas de TLR3, TLR7 y TLR9 no promovió la secreción de IFN-γ en niveles comparables a lo producido por IL-12 (**Figura 9C**). Debido a que el IFN-α posee un importante rol en la activación de la respuesta antiviral de las células NK, investigamos el efecto de esta citoquina en presencia de polIl:C y loxorribina, los dos agonistas de TLRs que mostraron mayor capacidad de estimular la secreción de IFN-γ tanto en presencia como en ausencia de IL-12 (**Figura 9D**). En estos experimentos observamos que la estimulación de células NK con IFN-α durante periodos cortos promovió la secreción de IFN-γ (valores entre 100 y 200 pg/ml). Sin embargo, los niveles de IFN-γ detectados en estos sobrenadantes de cultivo permanecieron siempre por debajo de los niveles detectados en los sobrenadantes de células NK estimuladas con el mismo agonista e IL-12. En cambio, ODN-A y ODN-B no aumentaron la secreción de IFN-γ por parte de células NK estimuladas con IFN-α (no mostrado).

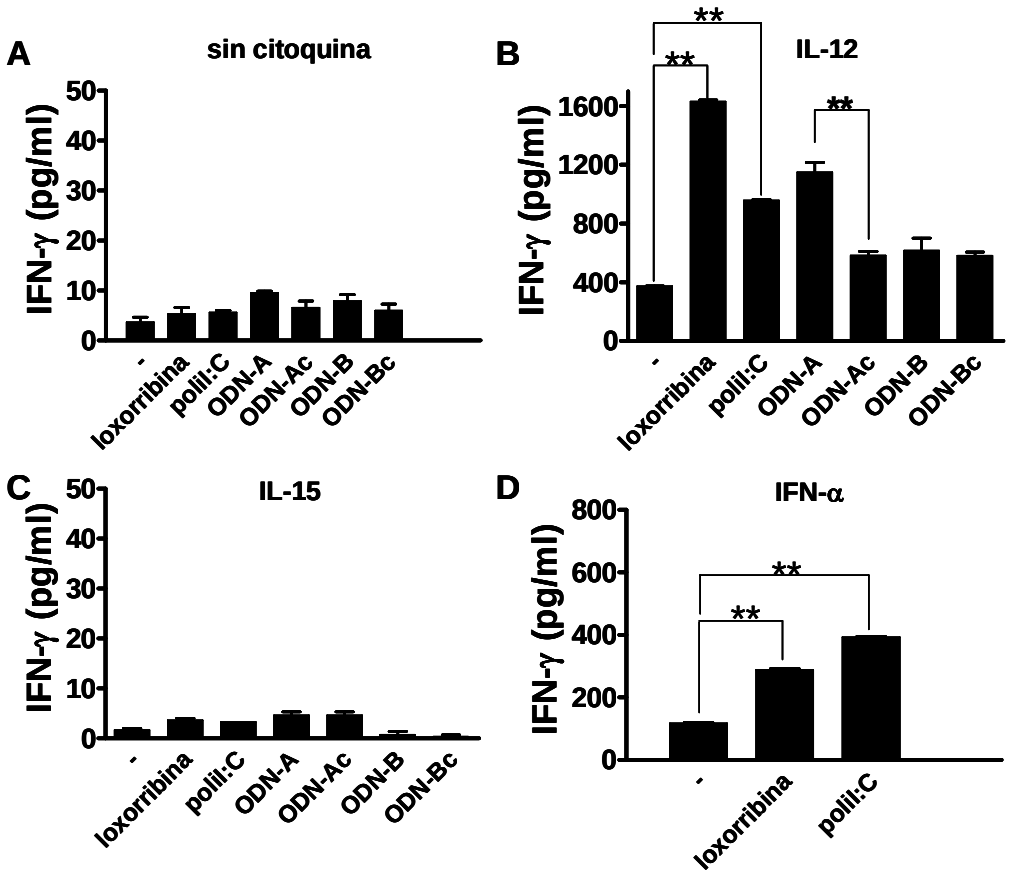


FIGURA 9. IL-12 e IFN-α, en combinación con agonistas de TLR3 o TLR7, promueven una alta secreción de IFN-γ por células NK humanas. La producción de IFN-γ fue medida por ELISA en sobrenadantes de cultivo de células NK cultivadas en ausencia (A) o en presencia de IL-12 (B), IL-15 (C), o IFN-α (D) y agonistas de TLR3 (polIl:C), TLR7

(loxorribina), TLR9 (ODN-A u ODN-B), o sus respectivos controles (ODN-Ac y ODN-Bc) durante 24 h. Los resultados son representativos de 14 experimentos independientes.

Con el fin de descartar la posibilidad de que los agonistas de TLRs estuvieran estimulando a los monocitos contaminantes y éstos activaran a las células NK a través de la secreción de citoquinas como IL-12, realizamos experimentos adicionales depletando los monocitos remanentes por pasaje a través de columnas rellenas con lana de vidrio. En esta nueva serie de experimentos partimos de preparaciones de células NK ($CD3^-$ $CD56^+$) con un 1,93 ± 1,64% de células $CD14^+$. Luego del pasaje por las columnas de nylon, las células $CD14^+$ representaron 1,40 ± 0,38% del total de las células. Además, observamos que cuando la preparación original de células contenía menos del 1,5% de monocitos, el pasaje a través de la columna no enriquecía a la misma en células NK. Cuando estas células NK aisladas se utilizaron para la estimulación con IL-12 o IFN-α y loxorribina o poliI:C, observamos que producían cantidades similares de IFN-γ a las obtenidas en experimentos en donde las células NK del mismo donante no habían sido depletadas de monocitos (**Figura 10A**). Por otra parte, cuando las células adherentes fueron depletadas por adherencia a placas de Petri durante 2 h antes de realizar las estimulaciones, los resultados de producción de IFN-γ fueron idénticos a los obtenidos en experimentos donde las células adherentes no habían sido depletadas (**Figura 10B**).

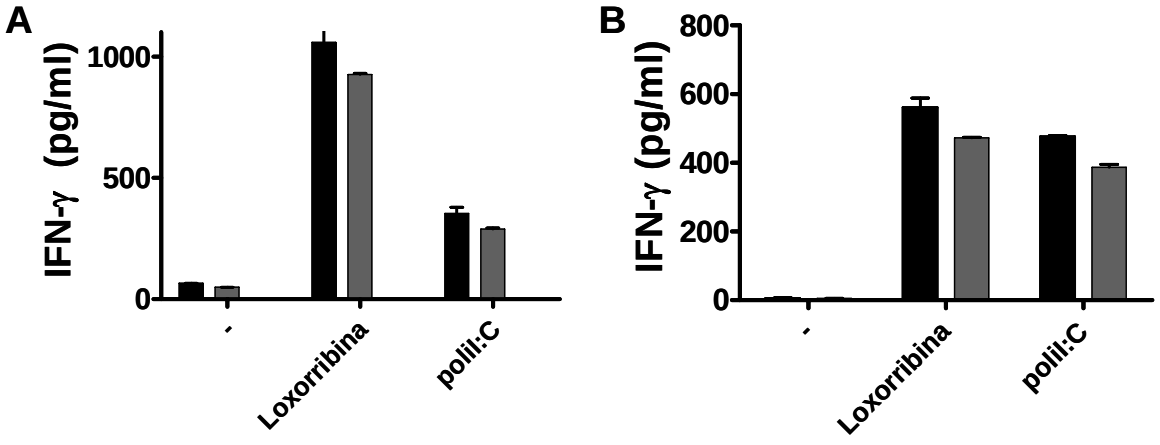


FIGURA 10. Depleción de monocitos y secreción de IFN-γ por células NK estimuladas con IL-12 y agonistas de TLR3 y TLR7. Las células NK aisladas mediante el reactivo Rosette Sep se pasaron por columnas de nylon (A) o se incubaron durante 2 h en placas de Petri (B) con el objeto de repletar los monocitos contaminantes. Posteriormente, las células se estimularon con IL-12 en ausencia o en presencia de loxorribina o poliI:C y la producción de IFN-γ fue medida por ELISA en los sobrenadantes de cultivo. Los resultados son representativos de 4 experimentos independientes.

La elevada secreción de IFN-γ promovida por IL-12 y los agonistas de TLR3 o TLR7, y la heterogeneidad de respuesta de las células NK humanas a diferentes estímulos reportadas por diferentes autores [127, 128], nos llevó a investigar el efecto de estos estímulos en células NK de un número mayor de donantes. En estos experimentos observamos que células NK de 14 dadores diferentes, secretaron sistemática y significativamente IFN-γ tras la estimulación con IL-12 y loxorribina o poliI:C (**Figura 11A**). El análisis individual de las células NK de 12 de estos dadores permitió confirmar esta observación para IL-12 y loxorribina (**Figura 11B**) y para IL-12 y poliI:C (**Figura 11C**). La secreción de INF-γ por células NK fue reproducible a lo largo del tiempo (**Figura 11D**), aunque observamos que un dador respondió a IL-12 y loxorribina e IL-12 y poliI:C; un dador respondió solo a IL-12 y loxorribina y un dador no respondió a ninguno de los estímulos.

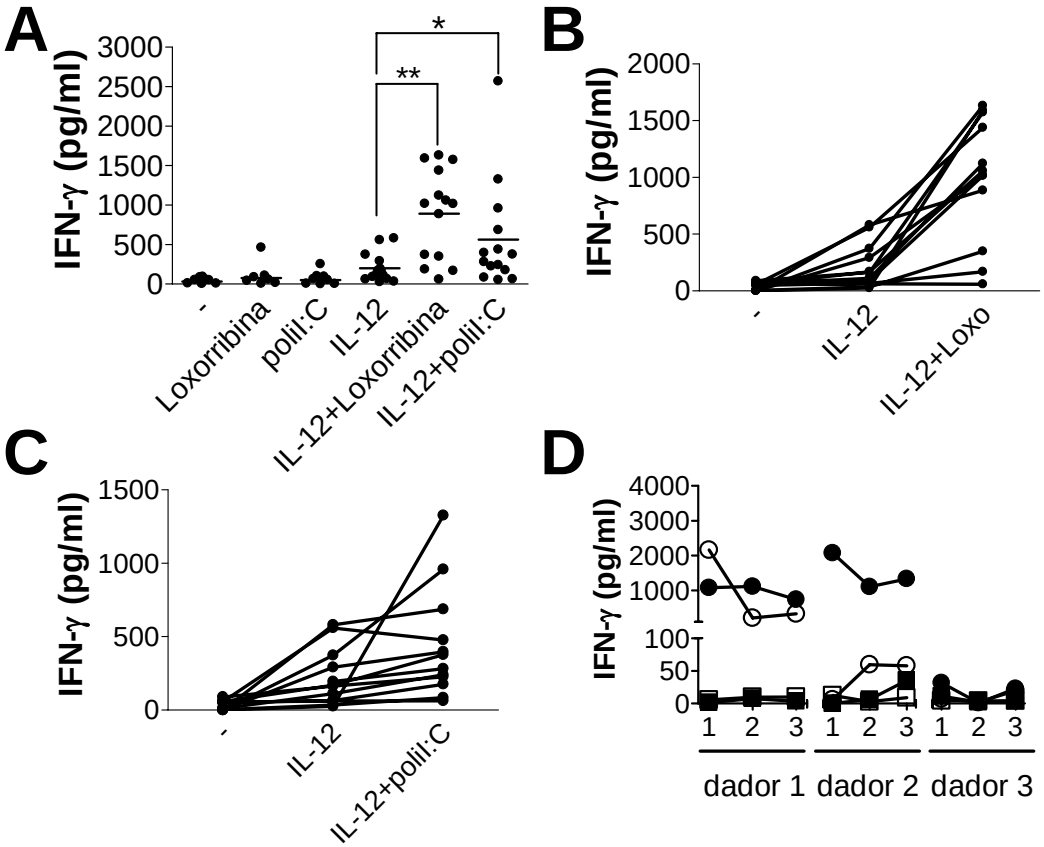


FIGURA 11: Secreción de IFN-γ por de células NK de 14 dadores diferentes estimuladas con loxorribina, polIl:C, IL-12, IL-12 y loxorribina o IL-12 y polIl:C como se describió anteriormente (A). -, células NK sin estimular. *A–D*, *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$. Comportamiento individual de células NK de 12 dadores diferentes en respuesta a IL-12, IL-12 y loxorribina (B), o IL-12 y polIl:C (C), y reproducibilidad de la respuesta individual a lo largo del tiempo a la estimulación con IL-12 y loxorribina (●), a la estimulación con IL-12 y polIl:C (◦) o a la estimulación con IL-12 sola (□) en células NK de 3 dadores diferentes (D). ▪, células NK sin estimulo.

Previamente se han descripto efectos cooperativos similares para IL-12, IFN-α, e IL-18 [155, 160]. Por lo tanto investigamos el efecto de IL-18 en nuestro modelo experimental. En primer lugar, observamos que IL-18 sola o en combinación con agonistas de TLR3, TLR7 o TLR9 no promovió la secreción de IFN-γ por células NK (no mostrado). Sin embargo, IL-18 aumentó la secreción de IFN-γ por células NK estimuladas con IL-12 o IFN-α, siendo el efecto de IFN-α mas débil que el efecto de IL-12 (**Figura 12A**). Además, IL-18 aumentó la secreción de IFN-γ por células NK estimuladas con IL-12 y polIl:C, o con IFN-α y loxorribina o con IFN-α y polIl:C, pero no cuando las células NK fueron estimuladas con IL-12 y loxorribina (**Figura 12B** y **C**). Asimismo,

concentraciones crecientes de IL-12, IL-15 o IFN-α promovieron una menor secreción de IFN-γ comparado con lo que se obtiene al estimular las células NK con dosis subóptimas de las citoquinas y los agonistas de los TLRs (**Figura 12D**). Estos resultados apoyan la idea de que las células NK humanas de sangre periférica se convierten en células secretoras de IFN-γ tras la coactivación con citoquinas tales como IL-12 o IFN-α y agonistas de determinados TLRs.

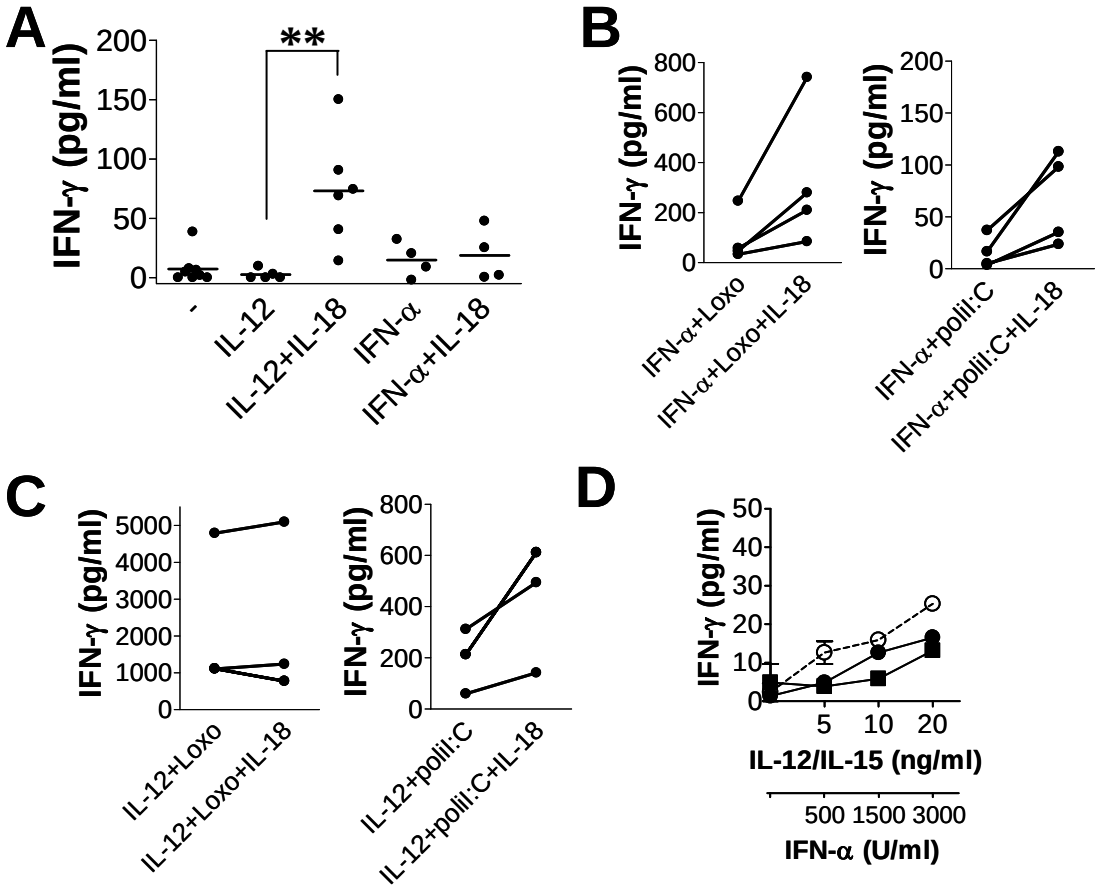


FIGURA 12: Cooperación de IL-18 con IL-12 o IFN-α (A), con IL-12 y loxorribina (B, panel izquierdo) o polii:C (B, panel derecho), o con IFN-α y loxorribina (C, panel izquierdo) o polii:C (C, panel derecho) en la secreción de IFN-γ por células NK. Se muestra también el efecto de concentraciones crecientes de IL-12 (●), IL-15 (▪), o IFN-α (◦) en la secreción de IFN-γ por células NK (D). En A-D, cada punto o línea representa el resultado obtenido utilizando células NK aisladas de un donante diferente.

Una explicación posible al efecto aditivo/cooperativo en la secreción de IFN-γ inducida por IL-12 e IFN-α y agonistas de TLR3, TLR7 y TLR9 podría ser un incremento mutuo en la expresión de los receptores que conferirían una mejor capacidad de respuesta a cada estimulo individual. Con el objeto de analizar esta posibilidad, investigamos si la estimulación de células NK con IL-12

o IFN-α afectaba la expresión de TLR3, TLR7 y TLR9, y viceversa, si la estimulación con agonistas de TLR3, TLR7 y TLR9 modulaba la expresión de IL-12Rβ1, IL-12Rβ2 o IFN-αR. En estos experimentos observamos que la expresión de los TLRs fue detectada solo utilizando células NK permeabilizadas (**Figura 13A** y **13B**). Asimismo, observamos que las células NK sin estimular expresaban niveles similares de los tres TLRs a los expresados por células NK estimuladas con IL-12 o IFN-α. Por otra parte, células NK sin estimular expresaron niveles similares de IL-12Rβ1 a los expresados por las células NK estimuladas con agonistas de TLR3, TLR7 o TLR9 (**Figura 13C**, panel izquierdo). Sin embargo, no fuimos capaces de detectar la expresión de IL-12Rβ2 en células NK estimuladas o en reposo (**Figura 13C**, panel medio). Como control estudiamos la expresión de IL-12Rβ2 en células T activadas (**Figura 13D**) observando que este receptor se expresaba en bajos niveles, como ha sido reportado por otros autores [161]. En cuanto a la expresión de IFN-αR, tanto en células NK estimuladas como en células NK sin estimular detectamos muy bajos niveles de este receptor (**Figura 13C**, panel derecho).

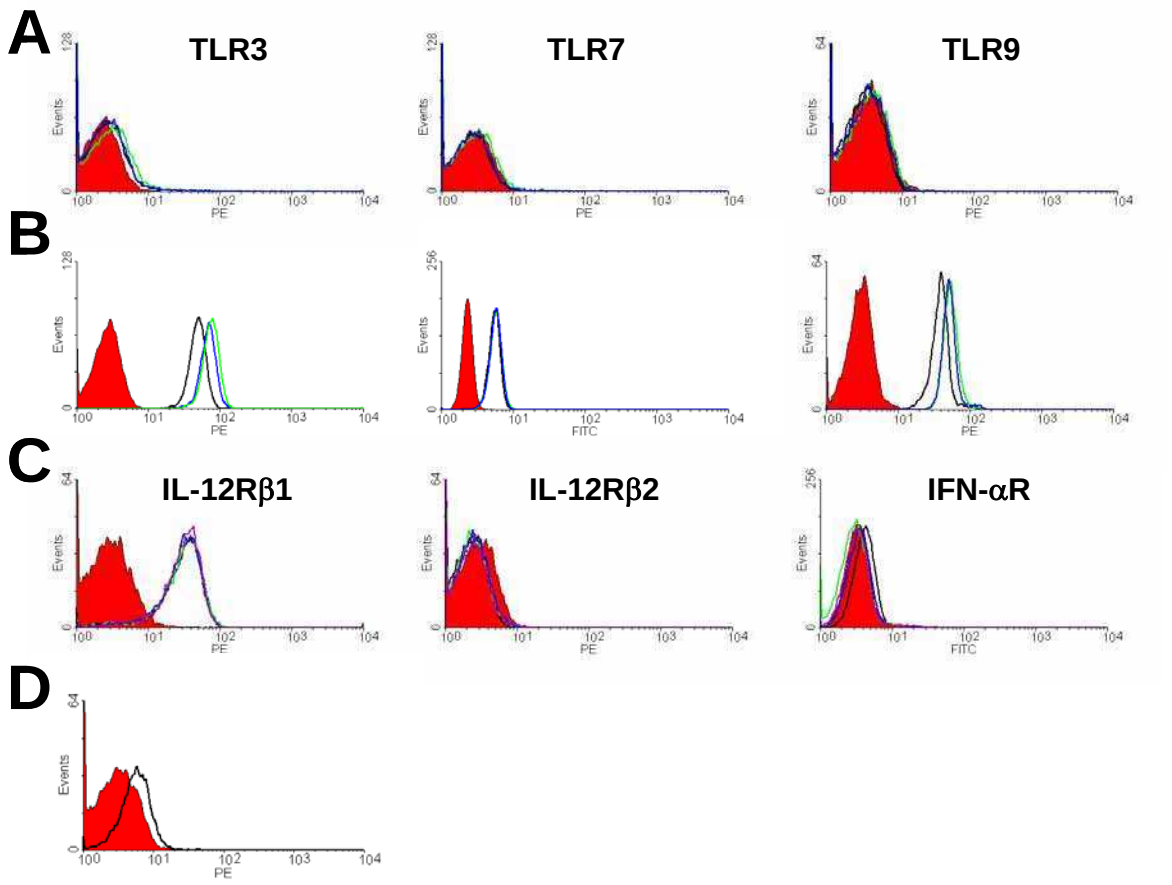


FIGURA 13. La expresión de TLRs, IL-12Rβ1, IL-12Rβ2, e IFN-αR en células NK no se encuentra recíprocamente regulada por la estimulación con IL-12, IFN-α, o agonistas de TLR3 o TLR7. Expresión de TLR3, TLR7, y TLR9 en células NK humanas (A, sin permeabilizar; B, permeabilizadas) analizadas por citometría de flujo luego de un cultivo de 24 h en ausencia (línea negra) o en presencia de IL-12 (línea azul) o IFN-α (línea verde). C, Expresión de IL-12Rβ1, IL-12Rβ2, e IFN-αR en células NK humanas analizadas por citometría de flujo luego de un cultivo de 24 h en ausencia (línea negra) o en presencia de loxorribina (línea azul), poliI:C (línea verde), u ODN-A (línea violeta). D, Expresión de IL-12Rβ2 en linfocitos $CD3^+$ activados (línea negra). Histograma lleno: AcMo CI.

Por lo tanto, nuestros resultados indican que el entrecruzamiento de TLR3, TLR7 y en menor medida de TLR9 promovieron la secreción de IFN-γ por parte de las células NK en presencia de dosis subóptimas de IL-12 o IFN-α, pero no en presencia de dosis subóptimas de IL-15 o IL-18. Este proceso no involucró el aumento recíproco de la expresión de los receptores IL-12Rβ1, IL-12Rβ2 o IFN-αR por agonistas de TLRs, ni la de los receptores TLRs por IL-12 o IFN-α. Además, se observó una cooperación de IL-18 con IL-12 o IFN-α y agonistas de TLR3 o TLR7 (salvo cuando las células se estimularon con IL-12 y loxorribina) para la secreción de IFN-γ en nuestro modelo experimental.

3. Vías de señalización:

La señalización a través de TLR3 y TLR7 en CDs depende del reconocimiento del agonista por el receptor en compartimientos endosomales. Con el objetivo de estudiar si lo mismo ocurre en células NK humanas, se estimularon células NK con IL-12 y loxorribina o poliI:C en ausencia o en presencia de cloroquina (inhibidor de la acidificación endosomal) y se evaluó la secreción de IFN-γ (**Figura 14**). En estos experimentos observamos que la secreción de IFN-γ por células NK estimuladas con IL-12 y agonistas de los TLRs fue inhibida por esta droga (**Figura 14, A y B**). Por el contrario, la baja cantidad de IFN-γ secretado por parte de las células NK estimuladas con IL-12 sola no fue inhibida por la cloroquina (**Figura 14C**). Estos resultados sugieren que la señalización a través de TLR3 y TLR7 en células NK depende del reconocimiento de sus respectivos ligandos en un compartimento intracelular sensible a cloroquina.

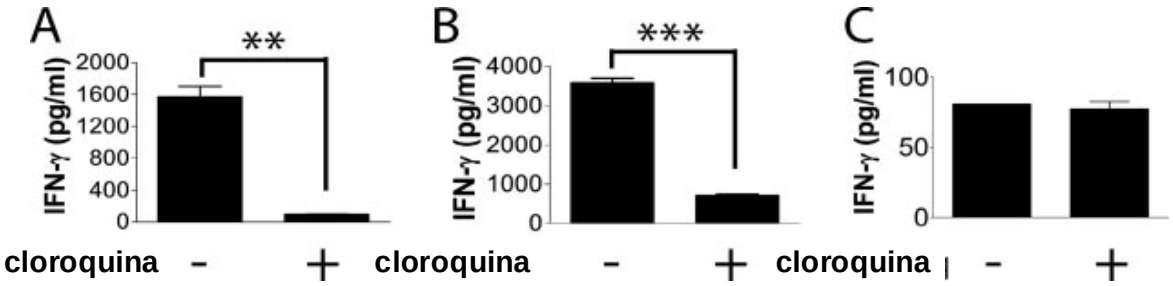


FIGURA 14. La secreción de IFN-γ por células NK humanas estimuladas con IL-12 y agonistas de TLR3 o TLR7 depende de la internalización y reconocimiento de sus ligandos en un compartimento intracelular sensible a cloroquina. Producción de IFN-γ por parte de células NK estimuladas con IL-12 y loxorribina (A), IL-12 y poliI:C (B), o con IL-12 sola (C) evaluada por ELISA en ausencia (-) o en presencia (+) de 20 μg/ml de cloroquina. * $p < 0.01$; **, $p < 0.001$.

Seguidamente, estudiamos las rutas de señalización involucradas en la secreción de IFN-γ. Para ello, estimulamos células NK durante 24 h con IL-12 y loxorribina o poliI:C en ausencia o en presencia de inhibidores farmacológicos de diferentes vías de señalización (**Figura 15**). En estos experimentos observamos que la inhibición de MEK1/ERK con U0126, de p38 MAPK con SB202190, de $p70^{S6}$ quinasa con rapamicina, y de NF-κB con sulfasalazina inhibió fuertemente la secreción de IFN-γ por células NK estimuladas con IL-12 y agonistas de TLR3 o TLR7 (**Figura 15A**). Este efecto no fue observado cuando se inhibió la calcineurina con ciclosporina A. Los efectos de U0126, SB202190, rapamicina, y Sz fueron dosis-dependiente tanto en células NK estimuladas con IL-12 y loxorribina (**Figura 15B**) como el células NK estimuladas con IL-12 y poliI:C (**Figura 15C**).

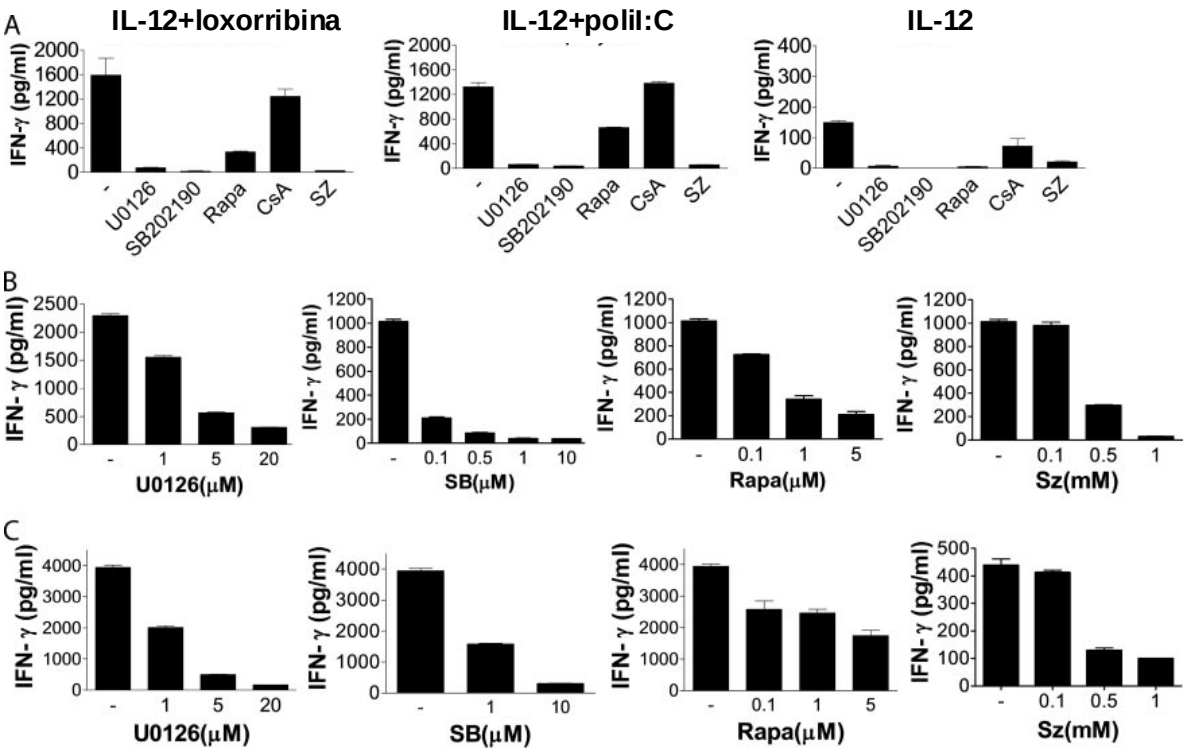


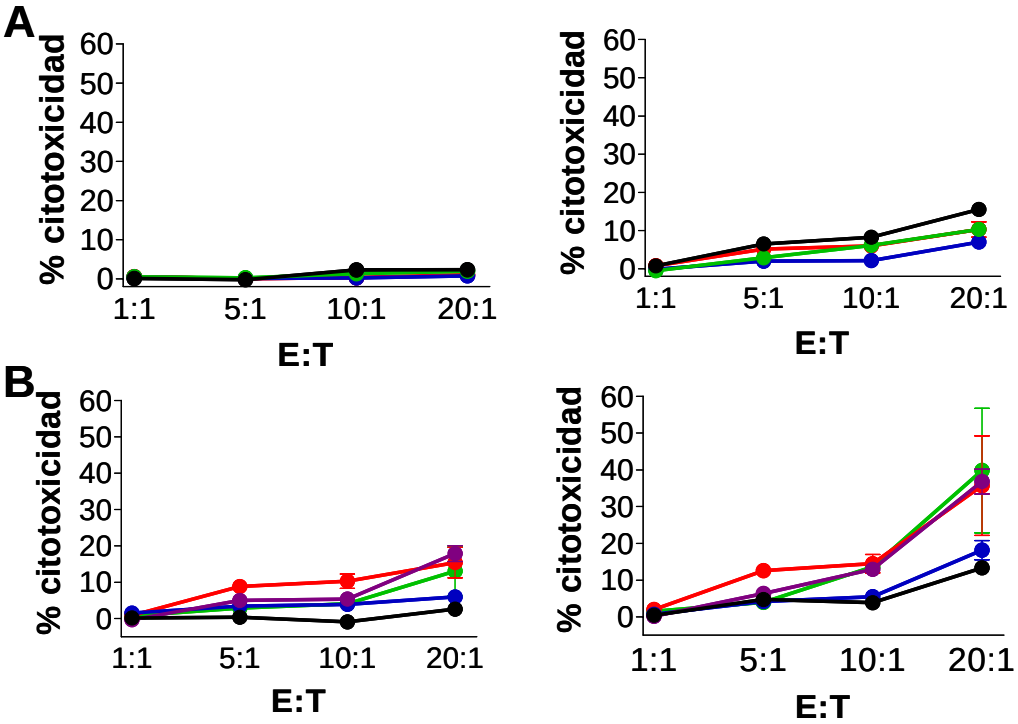
FIGURA 15. Vías de señalización involucradas en la producción de IFN-γ por células NK humanas estimuladas con IL-12 y loxorribina o polil:C. *A*, Células NK fueron estimuladas con IL-12 y loxorribina (panel izquierdo), IL-12 y polil:C (panel medio), o IL-12 sola (panel derecho) en ausencia (-) o en presencia de U0126 20 μM, SB202190 10 μM, rapamicina 5 μM, CsA 1 μM, o Sz 1 μM. U0126, SB202190, rapamicina, y Sz vs "-", $p < 0,01$; CsA vs "-", NS. *B*, Inhibición dosis dependiente de la secreción de IFN-γ por células NK estimuladas con IL-12 y loxorribina en presencia de diferentes dosis de U0126, SB202190 (SB), rapamicina (Rapa), o Sz. *C*, Inhibición dosis-dependiente de la secreción de IFN-γ por células NK estimuladas con IL-12 y polil:C en presencia de diferentes dosis de U0126, SB202190 (SB), rapamicina (Rapa), o Sz. Resultados representativos de tres experimentos independentes

Por lo tanto, el efecto de los agonistas de TLR3 y TLR7 depende de la internalización y de la activación de las vías de MEK1/ERK, p38 MAPK, $p70^{S6}$ quinasa y de NF-κB.

4. Citotoxicidad de células NK estimuladas con agonistas de los TLRs:

A continuación investigamos si los agonistas también poseían la capacidad de modular la citotoxicidad mediada por células NK dependiente de NKG2D. Para ello, realizamos ensayos estándar de liberación de ^{51}Cr utilizando como blanco un clon del melanoma humano IIB-MEL-LES (que expresa muy bajos niveles de NKG2DLs endógenos, [109]) transfectado establemente con MICA (clon 1) o un clon de la misma línea transfectado establemente con el mismo plásmido vacío (clon C). En estos experimentos observamos que las

células NK sin estimular no fueron capaces de lisar a las células del clon C (**Figura 16A**, panel izquierdo), pero fueron capaces de lisar a las células del clon 1 (**Figura 16A**, panel derecho). Sin embargo estas células NK no aumentaron su capacidad citotóxica contra las células blanco por estimulación con agonistas de TLR3, TLR7 y TLR9, en ausencia de citoquinas. En presencia de citoquinas, se detectó un leve aumento en la citotoxicidad contra el clon C cuando las células NK fueron estimuladas con IL-12 (**Figura 16B**, panel izquierdo), pero no cuando las células NK se estimularon con IL-15 (**Figura 16C**, panel izquierdo). Sin embargo, ambas citoquinas promovieron una mayor citotoxicidad contra el clon 1 (**Figura 16, B** y **C**, paneles derechos), sugiriendo que IL-12 e IL-15 promueven el aumento de la citotoxicidad dependiente de NKG2D de las células NK. Cuando las células NK fueron estimuladas con IFN-α, ambas células blanco fueron lisadas eficientemente (**Figura 16D**). Sin embargo, al igual que en ausencia de citoquinas, no observamos un aumento en la citotoxicidad de las células NK cuando fueron estimuladas con IL-12, IL-15 o IFN-α y loxorribina, polI:C u ODN-A, respecto de las células NK que fueron estimuladas con citoquinas solamente (**Figura 16, B–D**). Por este motivo, concluimos que los agonistas de TLR3, TLR7, o TLR9 no regulan la respuesta citotóxica dependiente de NKG2D de células NK contra células blanco que expresan bajos o altos niveles de MICA.



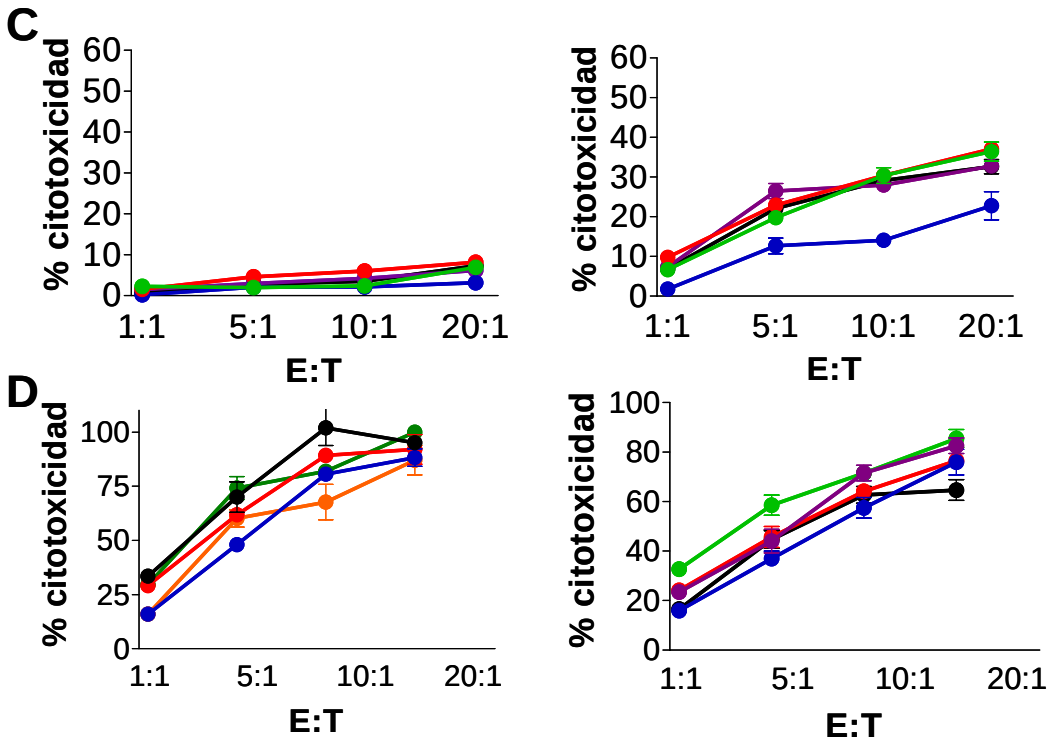


FIGURA 16. La estimulación con citoquinas solas, pero no con agonistas de TLRs, regula la citotoxicidad por parte de células NK dependiente de NKG2D. Citotoxicidad mediada por células NK contra el clon C MICA$^-$ (panel izquierdo) y contra el clon 1 MICA$^+$ (panel derecho) a diferentes relaciones E:T (eje x). Las células NK fueron utilizadas sin estimular (A) o estimuladas con IL-12 (B), IL-15 (C), o IFN-α (D) en ausencia de agonistas de TLRs y citoquinas (línea negra) o en presencia de loxorribina (línea azul), polI:C (línea roja), u ODN-A (línea verde). La línea violeta representa la citotoxicidad obtenida con células NK estimuladas solo con citoquinas (IL-12 en B; IL-15 en C; e IFN-α en D). El ODN-Ac (no mostrado) produjo valores de citotoxicidad idénticos a los producidos por células NK sin estimular (A) o por células NK estimuladas solo con citoquinas (B–D). Resultados representativos de cinco experimentos independientes.

Con el objeto de investigar si la falta de aumento en la citotoxicidad luego de la estimulación de células NK con agonistas de los TLRs e IL-12, IL-15 o IFN-α era un efecto generalizado, repetimos el ensayo utilizando como blanco a la línea celular K562, blanco universal susceptible a la lisis por parte de células NK humanas. En éstos experimentos tampoco observamos una mayor actividad citotóxica inducida por los agonistas de los TLRs respecto de la actividad citotóxica inducida por las citoquinas solamente. (**Fig. 17**)

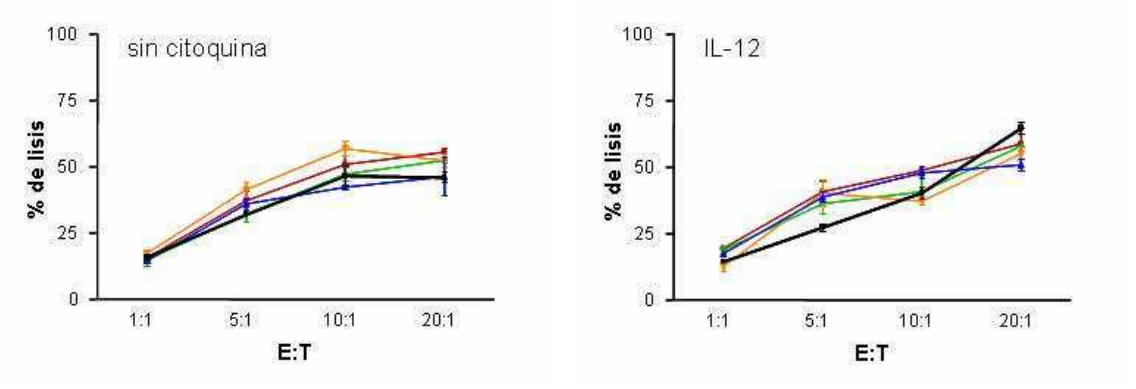


FIGURA 17: Los agonistas de TLRs no regulan la citotoxicidad de células NK contra la línea K562. Citotoxicidad mediada por células NK contra la línea celular K562. Las células NK fueron utilizadas sin estimular (panel izquierdo) o estimuladas durante 24h con IL-12 (panel derecho) en ausencia de agonistas de TLRs (línea negra) o en presencia de loxorribina (línea azul), polI:C (línea naranja), ODN-Ac (línea verde), u ODN-A (línea roja). Resultados representativos de tres experimentos independientes.

De estos resultados concluimos que agonistas de TLR3, TLR7, y TLR9 en combinación con IL-12, IL-15, o IFN-α no aumenta la función citotóxica de las células NK mediada por NKG2D.

5. Modulación de la expresión de NKG2D en células NK estimuladas con agonistas de los TLRs:

La disociación entre la secreción de IFN-γ y la citotoxicidad observada con células NK estimuladas con IL-12 y los agonistas de TLRs nos llevó a estudiar si estos estímulos eran capaces de regular la expresión de NKG2D en su superficie. Para ello, se cultivaron células NK durante 24 h con o sin IL-12, IL-15 o IFN-α en ausencia o en presencia de polI:C, loxorribina, ODN-A, ODN-B o de sus respectivos ODNs controles (ODN-Ac y ODN-Bc). Por citometría de flujo observamos que loxorribina, polI:C y ODN-A provocaron una leve disminución en los niveles de expresión de NKG2D. En cambio, la incubacion de células NK con IL-15 o IL-12 en combinación con los agonistas de TLRs no moduló la expresión de este receptor (**Figura 18**).

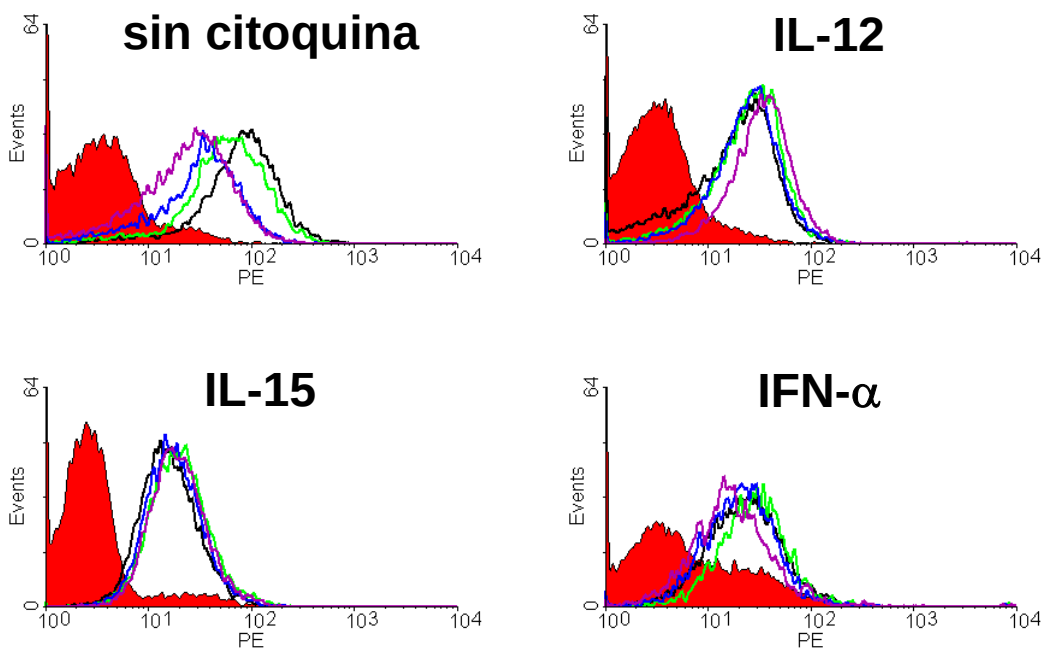


FIGURA 18. La expresión de NKG2D no esta regulada por citoquinas o agonistas de TLRs. Expresión de NKG2D en células NK por citometría de flujo tras un cultivo de 24 h con o sin IL-12, IL-15, o IFN-α en ausencia o en presencia de loxorribina (línea azul) o polI:C (línea verde). La línea negra representa la fluorescencia basal para NKG2D (células NK cultivadas en ausencia de agonistas en cada caso). ODN-A y ODN-Ac produjeron histogramas similares al de las células NK cultivadas en ausencia de estímulos en cada caso (no mostrado). Histograma lleno: AcMo CI. Resultados representativos de 6 experimentos independientes

6. Cocultivo de células NK estimuladas con agonistas de los TLRs, con melanomas que expresan diferentes niveles de MICA:

Aunque la citotoxicidad dependiente de NKG2D y la expresión de este receptor en células NK no se vieron afectadas tras la estimulación con IL-12 y agonistas de TLR3 y TLR7, la secreción de IFN-γ fue potenciada por estos estímulos. Por ello, y con el objeto de investigar si la microagregación de NKG2D podía contribuir al aumento aún mayor en la secreción de IFN-γ inducido por los agonistas de TLR7 o TLR3 en presencia de IL-12, realizamos cultivos de células NK con loxorribina o polI:C y dosis subóptimas de IL-12 en ausencia o en presencia del clon C o del clon 1 del melanoma IIB-MEL-LES (**Figura 19**). En estos experimentos observamos que la secreción de IFN-γ aumentó significativamente luego de la estimulación con IL-12 y polI:C o loxorribina cuando se realizaron co-cultivos con células tumorales MICA$^+$ (clon 1), respecto de lo observado en los co-cultivos con células tumorales MICA$^-$ (clon C) (**Figura**

19A). Esta respuesta fue dependiente de la vía de señalización de PI3K debido a que el efecto fue inhibido por el inhibidor específico Ly294002, tanto en células estimuladas con IL-12 y loxorribina (**Figura 19B**) como en células estimuladas con IL-12 y polIl:C (**Figura 19C**). Estos resultados confirman la participación de la vía de señalización a través de NKG2D en la secreción de IFN-γ detectada en estos ensayos.

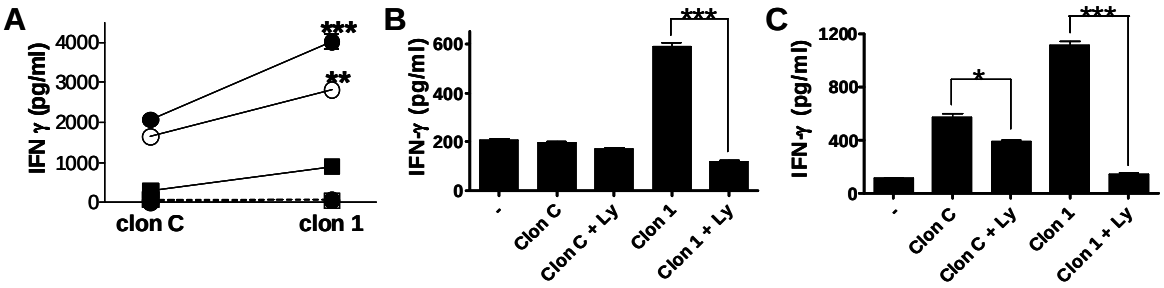


FIGURA 19. Aumento en la secreción de IFN-γ por de células NK estimuladas con IL-12 y loxorribina o polIl:C tras la microagregación de NKG2D, y participación de PI3K. A, Las células NK fueron cultivadas por 24h con IL-12 (línea continua) o cultivadas sin citoquinas (línea punteada) en ausencia (▪) o en presencia de loxorribina (●) o polIl:C (◦) y en presencia del clon C (MICA$^-$) o en presencia del clon 1(MICA$^+$). ***, $p < 0{,}001$ (clon 1 vs clon C para IL-12 y loxorribina); **, $p < 0{,}01$ (clon 1 vs clon C para IL-12 y polIl:C. B y C, secreción de IFN-γ por células NK estimuladas con IL-12 y loxorribina (B) o polyI:C (C) y co-cultivadas con el clon C o con el clon 1 en ausencia o en presencia del inhibidor de PI3K Ly294002 (Ly). -, IFN-γ secretado por células NK estimuladas con IL-12 y loxorribina (B) o polIl:C (C) en ausencia de células de melanoma. Resultados representativos de tres experimentos independientes. ***, $p < 0.001$.

Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que determinados agonistas de TLRs expresados en células NK (en particular, TLR7 y TLR3), en presencia de IL-12 o IFN-α puede promover de manera directa la secreción de IFN-γ en un proceso que involucra la internalización de los agonistas y la activación de ERK, p38 MAPK, $p70^{S6}$ quinasa, y NF-κB. Además, aunque la citotoxicidad dependiente de NKG2D y la expresión de este receptor en células NK no se vieron afectadas, la secreción de IFN-γ fue potenciada aun más luego de la microagregación de NKG2D por MICA presente en la superficie de células tumorales, de manera dependiente de PI3K.

7. Obtención de CDs humanas:

Hasta el momento, estudiamos el impacto de los agonistas de los TLRs en la funcionalidad de las células NK, en particular sobre sus funciones efectoras anti-tumorales. La importancia de estos estudios radica en los esfuerzos que se realizan para implementar la administración de agonistas de TLRs como inmunoterapia con el objeto de promover el desarrollo de una respuesta efectiva para la erradicación de tumores. Sin embargo los tumores generan un microambiente tolerogénico e inmunosupresor que involucra entre otros el reclutamiento de CDt. Estas CDt podrían ejercer efectos inhibitorios sobre las capacidades anti-tumorales desarrolladas por las células NK mediante la estimulación con tales agonistas de TLRs. Por ello, emprendimos el estudio de la interacción con células NK y CDt, y el efecto de los agonistas sobre esta interacción. Para ello, comenzamos con la optimización de un protocolo para la obtención de CDt.

7.1 Aislamiento de monocitos

Se aislaron monocitos humanos a partir de sangre periférica de dadores voluntarios sanos, realizando una centrifugación estándar en Ficoll y un gradiente de Percoll. Las células obtenidas se analizaron por citometría de flujo para evaluar el porcentaje de monocitos en la población aislada. La pureza obtenida (células $CD14^+$) fue siempre superior al 70%. En la **Figura 20** se observa un gráfico de tamaño vs. granularidad representativo (79% de monocitos) y la expresión de marcadores de monocitos y de CDs (CD14 y CD1a respectivamente).

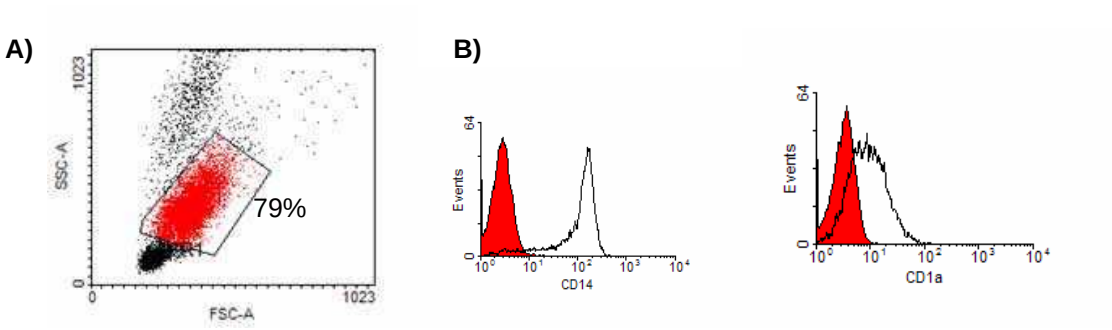


FIGURA 20: Aislamiento de monocitos. A) *Dot plot* de tamaño *vs* granularidad de las poblaciones celulares obtenidas luego del gradiente Percoll. B) Expresión de CD14 y CD1a (histograma vacío) y sus respectivos controles de isotipo (histograma rojo)

7.2 Diferenciación a células dendríticas:

En aquellos aislamientos en donde el porcentaje de células $CD14^+$ fue mayor al 75% se indujo la diferenciación a CDs por cultivo durante 6 días con GM-CSF e IL-4. Seguidamente se realizó una caracterización fenotípica de las CDs inmaduras obtenidas por citometría de flujo con AcMo específicos anti-CD14, anti-CD1a, anti-CD86, anti-CMH clase II y con anti-CD83. La **Fig. 21** muestra la expresión de los distintos marcadores de superficie analizados. Puede observarse una disminución en la expresión del marcador de monocitos CD14, y un aumento en la expresión de CD1a, HLA-DR, y CD83, característicos de células dendríticas.

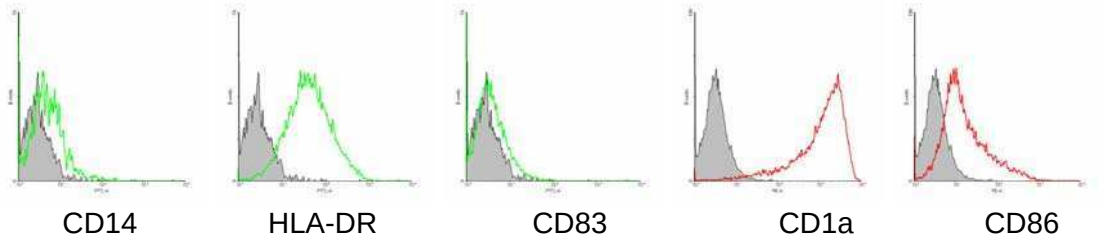
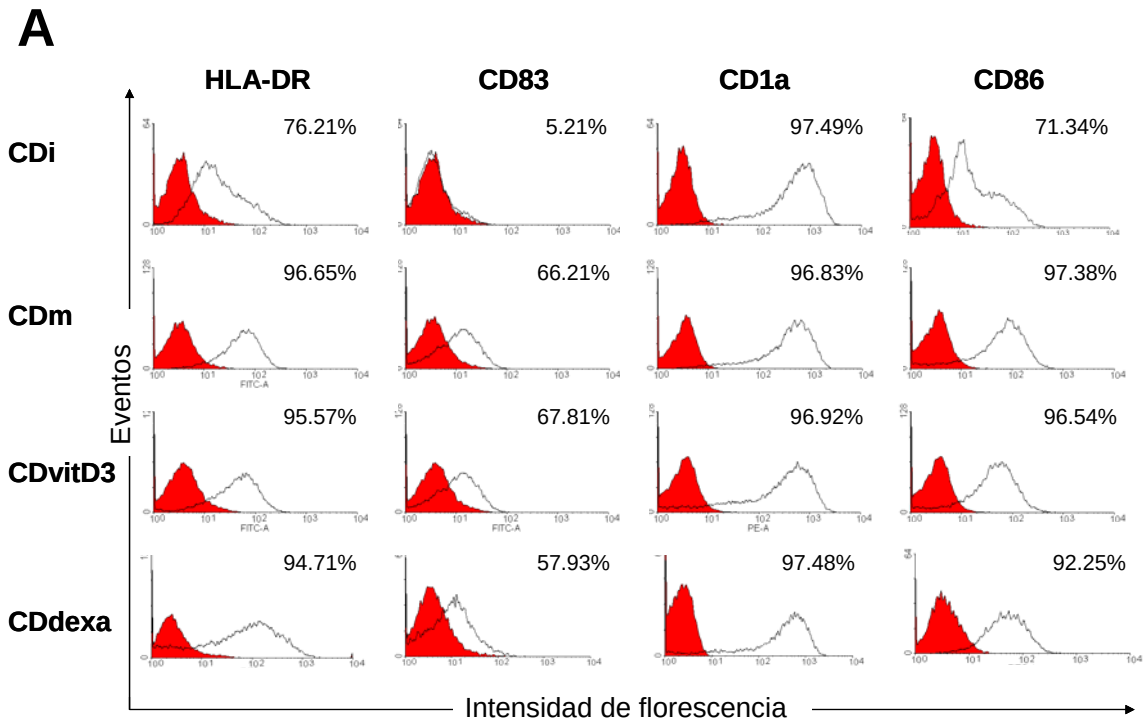


FIGURA 21: Caracterización fenotípica por citometría de flujo de las CDs diferenciadas *in vitro* (CDi). Los histogramas muestran la expresión en superficie de CD14, HLA-DR, CD83, CD83, CD1a y CD86 (histogramas vacíos verdes y rojos) y sus respectivos controles de isotipo (histogramas grises rellenos).

8. Obtención células dendríticas tolerogénicas:

Las CDs humanas obtenidas se maduraron con LPS durante 24 hs en presencia o en ausencia de vitD3 o dexametasona. Seguidamente se analizó su fenotipo evaluándose la expresión de los marcadores de superficie anteriormente descriptos por citometría de flujo, la producción de IL-12 e IL-10

en los sobrenadantes de cultivo por ELISA, y la capacidad de inducir proliferación linfocitaria por estimulaciones alogeneicas. En la **Figura 22A** se observa que las CDs estimuladas con LPS durante 24 hs tanto en ausencia como en presencia de los estímulos tolerogénicos no mostraron diferencias entre sí en cuanto al fenotipo de superficie, mostrando niveles intermedios de expresión de los marcadores de maduración CD83 y altos niveles de HLA-DR y de la molécula coestimulatoria CD86. Por su parte, comparadas con las CDi, las CDm y las CDt mostraron una mayor expresión de HLA-DR, CD83 y CD86 (**Figura 22A**, panel inferior). Sin embargo, como se observa en la **Figura 22B**, las CDs maduradas en presencia de LPS y estímulos tolerogénicos produjeron niveles significativamente mayores de IL-10 (citoquina asociada a funciones tolerogénicas) y niveles menores de IL-12 (citoquina asociada al inicio de una respuesta Th1) comparadas a CDs maduradas con LPS únicamente. En forma concordante con estos resultados, las CDt generadas no fueron capaces de estimular la respuesta alogeneica (proliferación) de linfocitos T (**Figura 22C**). Asimismo, comprobamos que las CDs obtenidas también expresaron mayores niveles de la galectina-1 tal como fuera reportado recientemente (**Figura 22D**) [140].



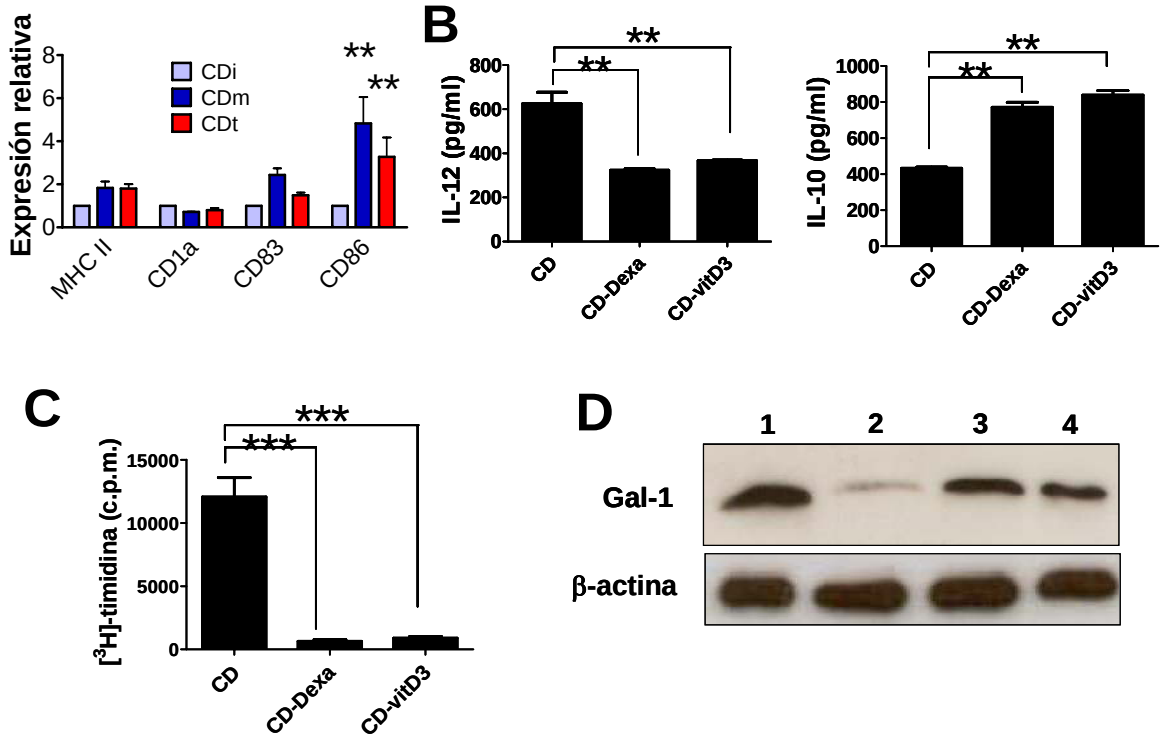


FIGURA 22: Obtención de células dendríticas tolerogénicas. A) Marcación y análisis por citometría de flujo. Los histogramas muestran la expresión en superficie en CDs maduradas en ausencia (panel superior) o en presencia de dexametasona (panel inferior) de CD83, MHC clase II, CD86, CD14 y CD1a y sus respectivos controles de isotipo. El gráfico inferior muestra la media de los valores obtenidos con CDs de 5 donantes diferentes y los valores graficados corresponden a la expresión relativa, entendiéndose por tal, el SFI de cada marcador en la CDm o CDt dividido el SFI del mismo marcador en la CDi. B) Niveles de IL-12 e IL-10 en sobrenadantes determinados por ELISA. C) Incorporación de [^{3}H]-Timidina por células T CD4$^+$ alogénicas cultivadas por 4 d con CDs maduradas en ausencia o en presencia de dexametasona o vitD3 (DC:T, 1:10). Se muestra la media ± SEM. D) Análisis por Western Blot de los niveles de expresión de DCGal1 en CDi (1), CDm (2), CD-dexa (3) o CD-vitD3 (4).** $p<0,01$; *** $p<0.001$.

9. Efecto de CDs tolerogénicas en la activación de las células NK:

Con el objeto de evaluar la modulación de la funcionalidad de las células NK por CDs tolerogénicas, se realizaron cocultivos de CDi, CDm o CDt con células NK singeneicas. Debido a que en los ensayos previos siempre observamos un comportamiento similar de las CDt obtenidas con dexametasona y las CDt obtenidas con vitD3, continuamos nuestros experimentos sólo con CDs tolerizadas con dexametasona. Realizamos cocultivos en relación 1:1 y a las 24 hs cosechamos el sobrenadante con el fin de cuantificar la secreción de IFN-γ por ELISA. Como puede observarse en la **Figura 23A** y **B**, las CDi no fueron capaces de promover la producción de IFN-γ por parte de las células NK. En cambio, las CDm promovieron una fuerte secreción de esta citoquina por células

NK. En cambio, las CDt sólo promovieron la secreción de niveles muy bajos de IFN-γ (menos de un 20% respecto de lo que hicieron las CDm).

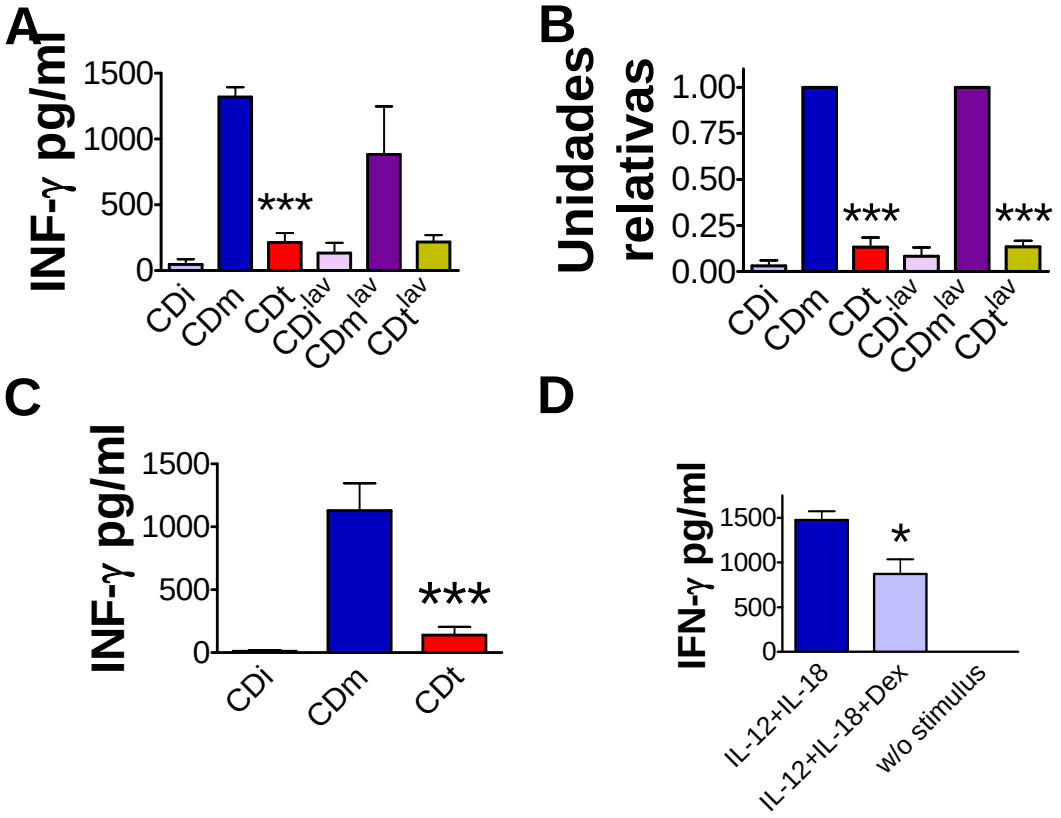


FIGURA 23: Producción de IFN-γ por células NK luego del cultivo durante 24 h con CDs o sus sobrenadantes de cultivo (medios condicionados). A) Secreción de IFN-γ por células NK tras 24hs de cocultivo con CDi, CDm o CDt (CDs maduradas con LPS en presencia de dexametasona). Además de analizar el efecto directo de las distintas CDs, analizamos el efecto de las distintas CDs previamente lavadas (CDi^{lav}, CDm^{lav} y CDt^{lav}) con el objeto de eliminar todo rastro de dexametasona y otros factores solubles secretados durante la maduración o la inducción de las CDt. **B)** Normalización de los valores de IFN-γ detectados en A, tomando como referencia los valores máximos de IFN-γ detectados en los cultivos de células NK con CDm o con CDm^{lav}. **C)** Secreción de IFN-γ por células NK tras 24hs de cultivo con medios condicionados de CDi, CDm o CDt. **D)** Efecto de la dexametasona (Dex) sobre la secreción de IFN-γ por células NK estimuladas con IL-12+IL-18.Se muestra la media ± SEM de 3 a 6 experimentos independientes realizados con células de diferentes donantes * $p<0.05$, *** $p<0.001$ *vs.* DCm (Test estadístico: ANOVA con corrección de Bonferroni).

Debido a que el medio de cultivo en el cual generamos las CDt contiene el agente tolerogénico dexametasona, investigamos si el efecto supresor sobre la secreción de IFN-γ por las células NK era debido a este compuesto. Para ello, primeramente repetimos los experimentos de cocultivo con células NK pero empleando CDi, CDm y CDt lavadas exhaustivamente antes de ser enfrentadas con las células NK. En estos experimentos, volvimos a observar que las CDt ejercían una potente inhibición de la secreción de IFN-γ (CDt^{lav} en **Figura 23A** y **B**). En cambio, nuevamente las CDm fueron poderosas inductoras de la secreción de IFN-γ por células NK. Por otra parte, el empleo de CDs lavadas

exhaustivamente y los resultados obtenidos indican que los efectos inhibitorios ejercidos por las CDt o los efectos estimuladores ejercidos por las CDm dependen de receptores específicos expresados en la superficie de las CDs y las células NK. Con el objeto de investigar si además hay una participación de mediadores solubles en la respuesta observada, realizamos cultivos de células NK con medios condicionados de CDi, CDm y CDt (**Figura 23C**). Nuevamente, observamos que medios condicionados de CDt eran incapaces de promover la secreción de IFN-γ por células NK tal como lo hicieron los medios condicionados de CDm. Finalmente, analizamos el efecto directo de la dexametasona sobre la capacidad de secreción de IFN-γ de las células NK. Para ello, activamos células NK con citoquinas de reconocida actividad estimuladora (IL-12 + IL-18) en ausencia o en presencia de dexametasona y observamos que este agente tolerogénico sólo ejerció un efecto inhibitorio parcial sobre la secreción de IFN-γ (**Figura 23D**). Células NK estimuladas en presencia de dexametasona aún secretaron niveles de IFN-γ que superan el 50% respecto de los niveles secretados por células NK estimuladas en ausencia de dexametasona. Estos resultados indican que si bien la dexametasona inhibe la secreción de IFN-γ, sus efectos fueron parciales y de ninguna manera explican el poderoso efecto supresor detectado con CDt (**Figura 23A-C**).

Discusión

Si bien la expresión de los TLRs en células NK humanas se conoce hace un tiempo, su relevancia funcional no ha sido elucidada por completo [127, 128, 162-164]. Elucidar el rol que tienen estos receptores en las células NK es de importancia mayor ya que desde hace varios años se han desarrollado protocolos clínicos empleando agonistas de diferentes TLRs con el objeto de promover una mejor respuesta inmune anti-tumoral [165]. Además, hasta el presente no se ha investigado la existencia de un posible efecto cooperativo entre TLRs y receptores activadores de las células NK tales como NKG2D, molécula que juega un papel fundamental en las funciones tumoricidas de estas células. Por lo tanto y con el objetivo de elucidar algunos de estos aspectos, en este trabajo demostramos que las células NK rápidamente secretan altos niveles de IFN-γ cuando son estimuladas simultáneamente con dosis subóptimas de IL-12 y agonistas de TLR3, TLR7 o TLR9. Asimismo, IFN-α y loxorribina o poliI:C también promovieron, aunque en menor medida, la secreción de IFN-γ, respuesta que no fue desencadenada cuando se utilizaron los agonistas de TLRs en ausencia de estas citoquinas o en presencia de IL-15 o IL-18. Las preparaciones de células NK empleadas para estos estudios contenían menos de un 2% de células $CD3^+$ y menos de un 2% de monocitos contaminantes lo que indica claramente que los efectos detectados son mediados por la acción directa de los agonistas y las citoquinas sobre las células NK, y no por efectos indirectos ejercidos sobre células accesorias.

En nuestro esquema experimental, IL-12 y loxorribina o poliI:C indujeron con mayor potencia la secreción de IFN-γ que IL-12 e IL-18. No obstante, IL-18 ha sido considerada una citoquina importante en la activación y desarrollo de las funciones efectoras de las células NK [166]. Estos resultados remarcan la importancia de nuestros hallazgos debido a que al menos en lo que a las células NK concierne, aparece como lógico el empleo de agonistas de TLR3 o TLR7 como sustitutos de IL-18 para la promoción de respuestas anti-tumorales debido a que son mucho más económicos, no presentan efectos tóxicos (son en general bien tolerados) y además, promovieron una mayor secreción de IFN-γ que IL-18, cuando fueron combinados con IL-12 o IFN-α. Por otra parte, la mayor

secreción de IFN-γ promovida por los agonistas y las citoquinas IL-12 o IFN-α respecto de lo observado con IL-18 y las mismas citoquinas (IL-12 o IFN-α) indican que la respuesta mediada por células NK se ha especializado a lo largo de la evolución con el objeto de responder rápida- y eficientemente a la detección de productos de origen microbiano (tales como los agonistas de los TLRs) en los tejidos, en momentos en que aún se secretan niveles subóptimos de IL-12 o IFN-α. De esta manera, se asegura una mejor respuesta mediada por las células NK, comparado con lo que ocurriría si estas células sólo respondieran a la combinación de IL-12 e IL-18, dos citoquinas secretadas por CDs y que deben alcanzar una concentración mínima en tejidos y fluidos biológicos como para superar el umbral de activación de las células NK.

De acuerdo a los datos publicados en la literatura reciente, es posible que las células NK estimuladas con IL-12 y agonistas de TLR3 o TLR7 adquirieran un potencial inmunoregulatorio tendiente a desviar la respuesta inmune hacia un perfil Th1, tal como ha sido descripto para IL-12 e IL-18 [151, 154]. Este hecho contribuye definitivamente a las propiedades anti-tumorales de los agonistas mencionados y sustentan su empleo en protocolos de inmunoterapia.

Los efectos cooperativos observados con IL-12 o IFN-α y agonistas de TLR3, TLR7 o TLR9 no involucraron un aumento recíproco en la expresión de TLRs, IL-12Rβ1, IL-12Rβ2 o IFN-αR. A pesar de que observamos la expresión de IL-12Rβ1 (componente compartido por otros receptores de citoquinas pertenecientes a la familia de IL-12 tales como IL-23) [158] y que otros autores han observado que células NK estimuladas con IL- 2 expresan bajos niveles de IL-12Rβ2 [155], sorpresivamente no fuimos capaces de detectar la expresión de IL-12Rβ2 en células NK en reposo o estimuladas con agonistas de TLR3, TLR7 o TLR9. Aunque no tenemos una explicación a este hecho, podemos especular que tal vez el anticuerpo empleado no esté detectando correctamente a IL-12Rβ2. Alternativamente, aunque menos probable, también debemos considerar la posibilidad de que la secreción de IFN-γ en respuesta a dosis subóptimas de IL-12 sola pueda ocurrir a través de IL-12Rβ1, ya que se ha reportado que la

estimulación a través de IL-12Rβ1 en ausencia de IL-12Rβ2 conduce a una activación parcial en células T [159, 160]. De acuerdo con nuestros resultados, descartamos que los efectos cooperativos disparados por IL-12 o IFN-α, y los agonistas de TLR3, TLR7 o TLR9 se deban a un aumento mutuo en la expresión de los receptores respectivos (fenómeno que podría aumentar la capacidad de respuesta de las células NK a estos estímulos). Por lo tanto, consideramos que los efectos cooperativos entre ambos estímulos podrían deberse a un mejor acoplamiento o integración de las rutas de señalización intracelular disparadas por cada uno. No resulta claro por qué ODN-A, pero no ODN-B, promovió la secreción de IFN-γ a pesar de que ambos señalizan a través de TLR9. No obstante, otros autores han obtenido resultados similares [127].

En general, células NK provenientes de diferentes dadores respondieron mejor a la loxorribina que al poliI:C. Sin embargo, una constante en nuestros resultados experimentales fue la heterogeneidad en los niveles de IFN-γ secretados por células NK de diferentes dadores. Esta heterogeneidad en los niveles de citoquinas secretadas por parte de células NK también fue observada por otros autores [127]. Aunque hasta el presente no tenemos una justificación a este hallazgo, podemos especular que dicha heterogeneidad podría deberse al fenómeno de “licenciamiento” en el compartimiento de células NK recientemente descripto en células NK de ratones [29] y acerca del cual existen evidencias en células NK humanas [167]. En tal sentido, es posible que el umbral de activación de las células NK en diferentes donantes sea ajustado durante su ontogenia en diferentes órganos (médula ósea, timo, hígado, bazo), de acuerdo al haplotipo de alelos HLA-C que cada individuo expresa. Dicho umbral sería quien condiciona luego la capacidad de respuesta de las células NK a diferentes estímulos.

Sorpresivamente, la secreción de IFN-γ inducida por los ODNs control fue bastante más alta a la producida por otros controles negativos en nuestros ensayos. Dicho hallazgo podría deberse a efectos inducidos por estos ODNs controles a través de otros receptores diferentes a TLR9.

Como mencionáramos más arriba, es poco probable que los efectos observados en nuestro trabajo se debieran a la presencia de monocitos contaminantes ya que trabajamos con preparaciones de células NK que contenían 1,2 ± 0,95 % de monocitos, y aún cuando estas preparaciones fueron depletadas de células adherentes, las células NK secretaron niveles de IFN-γ tras la estimulación con IL-12 o IFN-α y loxorribina o poliI:C comparables a los niveles detectados en células NK no depletadas de células adherentes. Si dichos monocitos o CDs mediarían el fenómeno descripto en este trabajo, deberíamos haber detectado IFN-γ inducido solo por los agonistas de TLRs (sin el agregado de citoquinas exógenas) ya que dichas citoquinas habrían sido provistas por los monocitos o CDs contaminantes. En cambio, nosotros observamos un estricto requerimiento de IL-12 (o en menor medida de IFN-α) para la secreción de IFN-γ, apoyando nuestra conclusión de que el efecto estimulatorio se debió a un efecto directo sobre las células NK. Se han descripto dos grandes poblaciones de células NK [4, 161]. Aunque la población mayoritaria (>90 %) $CD56^{dim}$ ha sido asociada con la citotoxicidad natural, en nuestros preparados de células NK detectamos que estas células NK $CD56^{dim}$ constituían mas del 95 % de las células recuperadas luego del procedimiento de aislamiento (no mostrado). Por esta razón, esta población de células NK sería la responsable de la secreción de IFN-γ en nuestro modelo experimental.

Se ha descripto que la señalización de los agonistas de TLR7 y TLR3 requiere de la internalización del agonista en CDs, lo cual guarda relación con el compartimiento subcelular en el cual estos TLRs pueden encontrarse con sus ligandos específicos durante el curso de una infección natural con un virus. En nuestro trabajo demostramos que algo similar ocurre en células NK, ya que la secreción de IFN-γ fue inhibida por la cloroquina, llevando los niveles de IFN-γ a valores iguales a los producidos por IL-12 solamente. Por el contrario, el efecto de IL-12 no fue sensible a esta droga, como se esperaba para un receptor de superficie que reconoce a un ligando extracelular. Esta conclusión está apoyada además por la detección de TLR3, TLR7 y TLR9 sólo en células NK permeabilizadas y no en células NK intactas (expresión en superficie celular).

Por lo tanto, en células NK, tal como en CDs, los agonistas de TLR3, TLR7 y TLR9 ejercen sus efectos tras unirse a su receptor específico en un compartimento intracelular sensible a cloroquina que muy probablemente podría ser el endosoma. Hart y col. [128] utilizando agonistas de TLR7/8 reportaron que la señalización de poliI:C en células NK era independiente de endocitosis. Esta discrepancia con nuestros resultados podría deberse a que ellos utilizaron la línea celular NKL y que estudiaron el efecto de la cloroquina evaluando la degradación de IkBα. También, Pisegna y col. [162] observaron que poliI:C, en combinación con IL-2, estimularon la secreción de IFN-γ por células NK de manera dependiente de p38 MAPK y de IRF3, mientras que Schmidt y col. [157] observaron que células NK estimuladas con poliI:C de manera independiente de CPA requería de la participación de NK-κB (evaluado como degradación de IkBα). Sin embargo, en ningún caso existe información adicional sobre las vías de señalización disparadas por los agonistas de TLRs en células NK y sus consecuencias funcionales. En este estudio, observamos que la secreción de IFN-γ disparada por TLR3 o TLR7 en presencia de dosis subóptimas de IL-12 dependió estrictamente de la activación de MEK1/ERK, p38 MAPK, $p70^{S6}$ quinasa y NF-κB, pero no de calcineurina. De acuerdo a nuestros resultados, estos intermediarios de señalización también participarían en la secreción de IFN-γ promovida por IL-12 sola. Debido a que la cantidad de IFN-γ secretada fue mayor en presencia de loxorribina o poliI:C, y que el efecto de inhibidores farmacológicos llevó a casi una completa eliminación de la secreción de IFN-γ, podemos especular que la activación de los mediadores intracelulares mencionados también podría ser disparada por los agonistas de TLR3 y TLR7, para luego integrarse con las señales disparadas por la IL-12, e inducir los efectos cooperativos observados en este estudio.

Con el objeto de estudiar la contribución de NKG2D, investigamos el efecto de las citoquinas y agonistas sobre la citotoxicidad de las células NK contra células blanco que expresan altos o bajos niveles de MICA. Para ello, empleamos dos clones del melanoma IIB-MEL-LES (que se caracteriza por expresar niveles extremadamente bajos de ligandos de NKG2D), uno de los

cuales se encuentra transfectado en forma estable con MICA (clon 1) y el otro de los cuales se encuentra transfectado en forma estable con un plásmido vacío (clon C) [109]. Aunque las células NK no fueron citotóxicas contra el clon C, fueron capaces de lisar al clon 1, y este efecto fue aumentado por IL-12, IL-15 e IFN-α. Sin embargo, los agonistas de TLR3, TLR7, o TLR9 no modularon la citotoxicidad más allá de lo que observamos con las citoquinas solas. Un análisis más detallado permitió observad que IL-12 e IL-15 promovieron un aumento en la citotoxicidad contra el clon 1 pero no contra el clon C, mientras que el IFN-α promovió un aumento en la citotoxicidad contra ambos clones. No obstante, la expresión de NKG2D permaneció sin cambios en células NK tras la estimulación con IL-12, IL-15 o IFN-α, y polI:C, loxorribina u ODN-A. Estos resultados podrían deberse a un aumento en la expresión y/o actividad de algunos mediadores intracelulares que se encuentran río debajo de NKG2D, inducida por IL-12 e IL-15, lo que generaría células NK mejor capacitadas o con una maquinaria intracelular mejor preparada para responder a los estímulos a través de NKG2D. En cuanto al IFN-α, la mayor citotoxicidad promovida por esta citoquina tanto contra el clon C como contra el clon 1 podría deberse a un efecto similar pero también al aumento en la expresión de algún/os receptor/es activador/es de citotoxicidad diferentes a NKG2D y cuyos ligandos se encontrarían expresados por el clon C y por el clon 1. Otros autores observaron que agonistas de diferentes TLRs promovieron una mayor citotoxicidad por parte de las células NK contra células blanco tales como P815 sensibilizadas con AcMo anti-CD16 [162], contra células K562 [127, 163], contra células Daudi [128, 164] o contra células Yac-1 [163, 164]. Sin embargo, la contribución de NKG2D en esta respuesta no había sido estudiada previamente. En nuestro trabajo, demostramos por primera vez que la citotoxicidad disparada por este receptor fue aumentada por IL-12, IL-15 o IFN-α.

Se han publicado resultados contradictorios acerca de la secreción de IFN-γ por células NK tras el entrecruzamiento de NKG2D [65, 163-167]. Nuestros resultados sugieren que el entrecruzamiento de este receptor inducido por MICA expresado en células tumorales aumenta la secreción de IFN-γ en

presencia de IL-12 y loxorribina o poliI:C de manera PI3K dependiente. A pesar de que la vía de PI3K dependiente de NKG2D ha sido asociada principalmente con la citotoxicidad [168], también podrían existir vías de señalización específicas que acoplan el entrecruzamiento de NKG2D con la secreción de IFN-γ sin la inducción de citotoxicidad [167] y estar involucradas en nuestras observaciones experimentales. La dicotomía entre la secreción de IFN-γ mediada por NKG2D y promovida por el melanoma MICA^{+} (clon 1) en ausencia de citotoxicidad dependiente de NKG2D en células NK humanas estimuladas con agonistas de TLR3 o TLR7 e IL-12 podría deberse a un rápido aumento en algún receptor involucrado principalmente en la secreción de IFN-γ y no en la citotoxicidad tal como lo es el KIR2DL4 [169]. Alternativamente, poliI:C y loxorribina en presencia de IL-12 podrían inducir un mejor acoplamiento de la cascada de señalización disparada tras el entrecruzamiento de NKG2D por el clon 1 y conducir a un aumento en la secreción de IFN-γ. La relocalización o neosíntesis de proteínas andamio o de señalización, inducidas por estos estímulos podrían contribuir a esta respuesta. En cualquiera de los casos, nuestros resultados sugieren que determinados agonistas de TLRs expresados por células NK (en particular, TLR7 y TLR3), en presencia de IL-12 o, en menor medida, de IFN-α disparan directamente la secreción de IFN-γ sin promover la citotoxicidad dependiente de NKG2D, proceso que involucraría la internalización de los agonistas y la activación de MEK1/ERK, p38 MAPK, p70^{S6} quinasa, y NF-κB. Dicha secreción de IFN-γ podría ser adicionalmente aumentada por NKG2D a través de la vía de la PI3K, lo que a su vez podría ser crucial para promover respuestas inmunes del tipo Th1 [12, 151, 154, 170]. A la luz de la creciente evidencia experimental que indica que la respuesta inmune contra tumores que involucra a NKG2D es crítica para alcanzar una inmunovigilancia eficiente [171], la estimulación provista por los agonistas de TLR7 o TLR3 (administrados exógenamente), en conjunto con citoquinas como IL-12 en un microambiente tumoral, podría constituir una estrategia terapéutica útil, y estos agonistas podrían ser empleados como adyuvantes para disparar una mejor respuesta inmune anti-tumoral mediada no sólo por células NK, sino también por linfocitos T. Dicha estrategia sería adecuada en particular contra tumores que expresan

ligandos de NKG2D, como MICA, para promover una fuerte secreción de IFN-γ y aumentar la función tumoricida.

En una segunda etapa, nos orientamos a la optimización de la obtención de CDs tolerogénicas con el fin de investigar la regulación recíproca entre estas CDt y las células NK, y con el objeto de analizar el efecto de los agonistas de los TLRs en este diálogo recíproco. Estos estudios revisten importancia ya que si se emplean agonistas de TLRs como terapia adyuvante para el cáncer pero las células estimuladas migran a un tumor inmerso en un nicho tolerogénico y rodeado de CDt, es posible que cualquier estrategia de administración de agonistas de TLRs se vea condenada al fracaso. Alternativamente, es posible que estos agonistas reviertan el fenotipo tolerogénico/supresor de las CDt, contribuyendo en este caso al éxito de la terapia.

Con la intención de profundizar en estas cuestiones, inicialmente optimizamos la generación de CDt. Los resultados obtenidos indican que vitD3 y dexametasona fueron capaces de promover la generación de CDt, las que se caracterizaron como bajas secretoras de IL-12 (IL-12^{low}), altas secretoras de IL-10(IL-10^{high}), por su baja capacidad de estimular la respuesta proliferativa alogeneica mediada por linfocitos T, y por la expresión de galectina-1. Curiosamente, no detectamos diferencias fenotípicas entre las CDm y las CDt, al menos para la expresión de los marcadores CD1a, CD83, CD86 y HLA-DR.

El análisis del efecto de las diferentes CDs sobre la secreción de IFN-γ por células NK mostró, tal como era conocido de la literatura, que las CDi no fueron capaces de promover la producción de esta citoquina, mientras que las CDm promovieron una fuerte secreción de IFN-γ por células NK. Por otra parte, las CDt sólo promovieron una secreción de niveles muy bajos de IFN-γ.

Empleando CDt exhaustivamente lavadas confirmamos que el efecto supresor está mediado por estas células. Asimismo, el hecho de lavar exhaustivamente el medio en el cual se estimularon a las CDi para generar CDm o CDt indica que el efecto producido por las CDt es dependiente de receptores

específicos expresados en la superficie de tales CDt y por las células NK. En este contexto, resulta posible especular que tal vez las CDt provoquen la estimulación de receptores inhibitorios en las células NK que previenen la secreción de IFN-γ. Asimismo, también es posible que las CDt carezcan de los ligandos necesarios para promover la activación de las células NK a través de receptores activadores tales como NKp30 y DNAM-1 [168, 169].

Por otra parte, también observamos que medios condicionados de CDt eran incapaces de promover la secreción de IFN-γ por células NK, indicando que además de la participación de receptores de superficie, existen factores solubles secretados por las CDt que podrían promover los efectos observados. Es de remarcar que si bien en estos medios condicionados la dexametasona está presente, el efecto inhibitorio directo de este esteroide sobre la secreción de IFN-γ fue sólo parcial y no justifica el poderoso efecto supresor puesto de manifiesto con CDt y con medios condicionados de CDt. Aunque desconocemos la identidad de los factores solubles presentes en los medios condicionados de CDt y que son responsables del efecto supresor detectado sobre las células NK, es posible especular que los bajos niveles de IL-12 secretados por las CDt en comparación con las CDm juegue un cierto rol. No obstante, también es posible que en estos medios condicionados exista una alta concentración de citoquinas inmunosupresoras tales como TGF-β, quien podría ejercer los efectos supresores observados [170].

En consecuencia, nuestros resultados indican que las CDt, a través de mecanismos redundantes, ejercen efectos supresores también sobre las células NK, lo que podría además comprometer a las estrategias de inmunoterapia basadas en la estimulación de células NK con diferentes compuestos tales como los agonistas de TLRs. Esto reviste particular importancia en un microentorno tumoral, donde se ha observado un reclutamiento preferencial de CDt, entre otras células con propiedades inmunosupresoras.

Conclusiones

En esta Tesis doctoral hemos demostrado que:

- El entrecruzamiento de TLR3, TLR7 y en menor medida de TLR9 promovió la secreción de IFN-γ por parte de las células NK en presencia de dosis subóptimas de IL-12 o IFN-α, pero no en presencia de dosis subóptimas de IL-15 o IL-18.
- Existe una cooperación de IL-18 con IL-12 o IFN-α y agonistas de TLR3 o TLR7 (salvo cuando las células se estimularon con IL-12 y loxorribina) para la secreción de IFN-γ por células NK.
- Los efectos de los agonistas combinados con las citoquinas no involucró el aumento recíproco de la expresión de los receptores IL-12Rβ1, IL-12Rβ2 o IFN-αR por agonistas de TLRs, ni la de los receptores TLRs por IL-12 o IFN-α sino que el mecanismo involucrado comprendería una mejor integración de las vías de señalización intracelular disparadas por los agonistas y las citoquinas.
- El efecto de los agonistas de TLR3 y TLR7 depende de la internalización y de la activación de las vías de MEK1/ERK, p38 MAPK, $p70^{S6}$ quinasa y de NF-κB.
- Agonistas de TLR3, TLR7, y TLR9 en combinación con IL-12, IL-15, o IFN-α no aumentaron la función citotóxica de las células NK mediada por NKG2D respecto de lo que hacen las citoquinas por sí mismas.
- Agonistas de TLR3, TLR7, y TLR9 en combinación con IL-12, IL-15, o IFN-α no aumentaron la expresión en superficie de NKG2D.
- la secreción de IFN-γ fue potenciada aun más luego de la microagregación de NKG2D por MICA presente en la superficie de células tumorales, y de manera dependiente de PI3K.
- Las células dendríticas tolerogénicas son poderosas supresoras de la secreción de IFN-γ por células NK.

- Este efecto probablemente involucra la interacción entre receptores de células NK con ligandos específicos expresados en la superficie de las células dendríticas tolerogénicas.
- Paralelamente, el efecto supresor de las células dendríticas tolerogénicas involucra la secreción de mediadores supresores para el desarrollo de los mecanismos efectores de las células NK.
- Estos hallazgos tienen implicancias en el desarrollo de protocolos de inmunoterapia contra tumores basadas en la estimulación de la actividad de las células NK mediante el empleo de componenete innocuos tales como los agonistas de diferentes TLRs.

Bibliografía

1. Trinchieri, G., *Biology of natural killer cells.* Adv Immunol, 1989. 47: p. 187-376.
2. Cooper, M.A., T.A. Fehniger, and M.A. Caligiuri, *The biology of human natural killer-cell subsets.* Trends Immunol, 2001. 22(11): p. 633-40.
3. Robertson, M.J. and J. Ritz, *Biology and clinical relevance of human natural killer cells.* Blood, 1990. 76(12): p. 2421-38.
4. Fehniger, T.A., et al., *CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity.* Blood, 2003. 101(8): p. 3052-7.
5. Robertson, M.J., *Role of chemokines in the biology of natural killer cells.* J Leukoc Biol, 2002. 71(2): p. 173-83.
6. Cooper, M.A., et al., *Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset.* Blood, 2001. 97(10): p. 3146-51.
7. Caligiuri, M.A., et al., *Selective modulation of human natural killer cells in vivo after prolonged infusion of low dose recombinant interleukin 2.* J Clin Invest, 1993. 91(1): p. 123-32.
8. Caligiuri, M.A., et al., *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(5): p. 1509-26.
9. Baume, D.M., et al., *Differential responses to interleukin 2 define functionally distinct subsets of human natural killer cells.* Eur J Immunol, 1992. 22(1): p. 1-6.
10. Orange, J.S. and C.A. Biron, *Characterization of early IL-12, IFN-alphabeta, and TNF effects on antiviral state and NK cell responses during murine cytomegalovirus infection.* J Immunol, 1996. 156(12): p. 4746-56.
11. Nguyen, K.B., et al., *Coordinated and distinct roles for IFN-alpha beta, IL-12, and IL-15 regulation of NK cell responses to viral infection.* J Immunol, 2002. 169(8): p. 4279-87.
12. Ferlazzo, G., et al., *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(47): p. 16606-11.
13. Lucas, M., et al., *Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15.* Immunity, 2007. 26(4): p. 503-17.
14. Romagnani, C., et al., *CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation.* J Immunol, 2007. 178(8): p. 4947-55.
15. Ravetch, J.V. and L.L. Lanier, *Immune inhibitory receptors.* Science, 2000. 290(5489): p. 84-9.
16. Ljunggren, H.G. and K. Karre, *In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition.* Immunol Today, 1990. 11(7): p. 237-44.
17. Storkus, W.J., et al., *Reversal of natural killing susceptibility in target cells expressing transfected class I HLA genes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. 86(7): p. 2361-4.
18. Shimizu, Y. and R. DeMars, *Demonstration by class I gene transfer that reduced susceptibility of human cells to natural killer cell-mediated lysis is inversely correlated with HLA class I antigen expression.* Eur J Immunol, 1989. 19(3): p. 447-51.
19. Zijlstra, M., et al., *Skin graft rejection by beta 2-microglobulin-deficient mice.* J Exp Med, 1992. 175(4): p. 885-93.

20. Routes, J.M., *IFN increases class I MHC antigen expression on adenovirus-infected human cells without inducing resistance to natural killer cell killing.* J Immunol, 1992. 149(7): p. 2372-7.
21. Trowsdale, J., *Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes.* Immunity, 2001. 15(3): p. 363-74.
22. Natarajan, K., et al., *Structure and function of natural killer cell receptors: multiple molecular solutions to self, nonself discrimination.* Annu Rev Immunol, 2002. 20: p. 853-85.
23. Winter, C.C., et al., *Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition.* J Immunol, 1998. 161(2): p. 571-7.
24. Long, E.O., *Tumor cell recognition by natural killer cells.* Semin Cancer Biol, 2002. 12(1): p. 57-61.
25. Bakker, A.B., et al., *NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals.* Hum Immunol, 2000. 61(1): p. 18-27.
26. Biassoni, R., et al., *The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions.* J Exp Med, 1996. 183(2): p. 645-50.
27. Colonna, M. and J. Samaridis, *Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells.* Science, 1995. 268(5209): p. 405-8.
28. Vilches, C. and P. Parham, *KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity.* Annu Rev Immunol, 2002. 20: p. 217-51.
29. Kim, S., et al., *Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules.* Nature, 2005. 436(7051): p. 709-13.
30. Anfossi, N., et al., *Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I.* Immunity, 2006. 25(2): p. 331-42.
31. Yokoyama, W.M. and S. Kim, *How do natural killer cells find self to achieve tolerance?* Immunity, 2006. 24(3): p. 249-57.
32. Raulet, D.H. and R.E. Vance, *Self-tolerance of natural killer cells.* Nat Rev Immunol, 2006. 6(7): p. 520-31.
33. Lanier, L.L., *NK cell receptors.* Annu Rev Immunol, 1998. 16: p. 359-93.
34. Lazetic, S., et al., *Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits.* J Immunol, 1996. 157(11): p. 4741-5.
35. Chang, C., et al., *Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily.* Eur J Immunol, 1995. 25(9): p. 2433-7.
36. Glienke, J., et al., *The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex.* Immunogenetics, 1998. 48(3): p. 163-73.
37. Houchins, J.P., et al., *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(4): p. 1017-20.
38. Lopez-Botet, M., et al., *The CD94/NKG2 C-type lectin receptor complex.* Curr Top Microbiol Immunol, 1998. 230: p. 41-52.
39. Braud, V.M., et al., *HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C.* Nature, 1998. 391(6669): p. 795-9.

40. Braud, V.M., et al., *TAP- and tapasin-dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide.* Curr Biol, 1998. 8(1): p. 1-10.
41. Long, E.O., *Regulation of immune responses through inhibitory receptors.* Annu Rev Immunol, 1999. 17: p. 875-904.
42. Cerwenka, A. and L.L. Lanier, *Natural killer cells, viruses and cancer.* Nat Rev Immunol, 2001. 1(1): p. 41-9.
43. Lanier, L.L., *On guard--activating NK cell receptors.* Nat Immunol, 2001. 2(1): p. 23-7.
44. Djeu, J.Y., K. Jiang, and S. Wei, *A view to a kill: signals triggering cytotoxicity.* Clin Cancer Res, 2002. 8(3): p. 636-40.
45. Pessino, A., et al., *Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity.* J Exp Med, 1998. 188(5): p. 953-60.
46. Sivori, S., et al., *p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation.* J Exp Med, 1997. 186(7): p. 1129-36.
47. Vitale, M., et al., *NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis.* J Exp Med, 1998. 187(12): p. 2065-72.
48. Pende, D., 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(10): p. 1505-16.
49. Vitale, M., et al., *Identification of NKp80, a novel triggering molecule expressed by human NK cells.* Eur J Immunol, 2001. 31(1): p. 233-42.
50. Arnon, T.I., et al., *Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30.* European Journal of Immunology, 2001. 31(9): p. 2680-9.
51. Mandelboim, O., et al., *Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells.* Nature, 2001. 409(6823): p. 1055-60.
52. Bauer, S., et al., *Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA.* Science, 1999. 285(5428): p. 727-9.
53. Wu, J., et al., *An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10.* Science, 1999. 285(5428): p. 730-2.
54. Diefenbach, A., et al., *Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D.* Nat Immunol, 2002. 3(12): p. 1142-9.
55. Chang, C., et al., *Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties.* J Immunol, 1999. 163(9): p. 4651-4.
56. Groh, V., et al., *Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(16): p. 9452-7.
57. Dai, Z., et al., *Normally occurring NKG2D+CD4+ T cells are immunosuppressive and inversely correlated with disease activity in juvenile-onset lupus.* J Exp Med, 2009. 206(4): p. 793-805.
58. Vivier, E., E. Tomasello, and P. Paul, *Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition?* Curr Opin Immunol, 2002. 14(3): p. 306-11.

59. Diefenbach, A., et al., *Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages.* Nat Immunol, 2000. 1(2): p. 119-26.
60. Jamieson, A.M., et al., *The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing.* Immunity, 2002. 17(1): p. 19-29.
61. Gilfillan, S., et al., *NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation.* Nat Immunol, 2002. 3(12): p. 1150-5.
62. Tomasello, E. and E. Vivier, *KARAP/DAP12/TYROBP: three names and a multiplicity of biological functions.* Eur J Immunol, 2005. 35(6): p. 1670-7.
63. Carayannopoulos, L.N., et al., *Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D.* J Immunol, 2002. 169(8): p. 4079-83.
64. Cosman, D., et al., *ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor.* Immunity, 2001. 14(2): p. 123-33.
65. Sutherland, C.L., et al., *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(2): p. 671-9.
66. Cao, W., et al., *RAET1E2, a soluble isoform of the UL16-binding protein RAET1E produced by tumor cells, inhibits NKG2D-mediated NK cytotoxicity.* J Biol Chem, 2007. 282(26): p. 18922-8.
67. Bacon, L., et al., *Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D.* J Immunol, 2004. 173(2): p. 1078-84.
68. Eagle, R.A. and J. Trowsdale, *Promiscuity and the single receptor: NKG2D.* Nat Rev Immunol, 2007. 7(9): p. 737-44.
69. Bahram, S., et al., *A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. 91(14): p. 6259-63.
70. *Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium.* Nature, 1999. 401(6756): p. 921-3.
71. Steinle, A., V. Groh, and 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 U S A, 1998. 95(21): p. 12510-5.
72. Kasahara, M., et al., *A family of MHC class I-like genes located in the vicinity of the mouse leukocyte receptor complex.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. 99(21): p. 13687-92.
73. Rabinovich, B.A., et al., *A role for the MHC class I-like Mill molecules in nutrient metabolism and wound healing.* Immunol Cell Biol, 2008. 86(6): p. 489-96.
74. Molinero, L.L., et al., *Codominant expression of the polymorphic MICA alloantigens encoded by genes in the HLA region.* Eur J Immunogenet, 2002. 29(4): p. 315-9.
75. Groh, V., et al., *Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(22): p. 12445-50.
76. Yamamoto, K., et al., *Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2).* Biochim Biophys Acta, 2001. 1526(1): p. 10-2.

77. Groh, V., et al., *Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells.* Nat Immunol, 2001. 2(3): p. 255-60.
78. Das, H., et al., *MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function.* Immunity, 2001. 15(1): p. 83-93.
79. Zwirner, N.W., M.A. Fernandez-Vina, and P. Stastny, *MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells, and monocytes.* Immunogenetics, 1998. 47(2): p. 139-48.
80. Li, P., et al., *Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand.* Immunity, 1999. 10(5): p. 577-84.
81. Zwirner, N.W. and P. Stastny, *Production of polyclonal antibodies against MICB, a novel polymorphic HLA-related antigen, and preliminary characterization of its pattern of expression.* Human Immunology, 1997. 55: p. 98.
82. Bahram, S., et al., *Genomic structure of the human MHC class I MICB gene.* Immunogenetics, 1996. 45(2): p. 161-2.
83. Zwirner, N.W., K. Dole, and P. Stastny, *Differential surface expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes, and monocytes.* Hum Immunol, 1999. 60(4): p. 323-30.
84. Molinero, L.L., et al., *Activation-induced expression of MICA on T lymphocytes involves engagement of CD3 and CD28.* J Leukoc Biol, 2002. 71(5): p. 791-7.
85. Schrambach, S., et al., *In vivo expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer.* PLoS One, 2007. 2(6): p. e518.
86. Groh, V., et al., *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(12): p. 6879-84.
87. Groh, V., et al., *Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells.* Science, 1998. 279(5357): p. 1737-40.
88. Pende, D., 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(21): p. 6178-86.
89. Vetter, C.S., et al., *Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma.* J Invest Dermatol, 2002. 118(4): p. 600-5.
90. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53.* Nat Rev Cancer, 2002. 2(8): p. 594-604.
91. Gasser, S., et al., *The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor.* Nature, 2005. 436(7054): p. 1186-90.
92. Raulet, D.H. and N. Guerra, *Oncogenic stress sensed by the immune system: role of natural killer cell receptors.* Nat Rev Immunol, 2009. 9(8): p. 568-80.
93. Ho, E.L., et al., *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(11): p. 6320-5.
94. Diefenbach, A., et al., *Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity.* Nature, 2001. 413(6852): p. 165-71.
95. Smyth, M.J., et al., *NKG2D function protects the host from tumor initiation.* J Exp Med, 2005. 202(5): p. 583-8.
96. Wiemann, K., et al., *Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo.* J Immunol, 2005. 175(2): p. 720-9.

97. Cerwenka, A., J.L. Baron, and L.L. Lanier, *Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. 98(20): p. 11521-6.
98. Girardi, M., et al., *Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells.* Science, 2001. 294(5542): p. 605-9.
99. Maccalli, C., et al., *NKG2D-mediated antitumor activity by tumor-infiltrating lymphocytes and antigen-specific T-cell clones isolated from melanoma patients.* Clin Cancer Res, 2007. 13(24): p. 7459-68.
100. Groh, V., et al., *Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation.* Nature, 2002. 419(6908): p. 734-8.
101. Salih, H.R., H.G. Rammensee, and A. Steinle, *Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding.* J Immunol, 2002. 169(8): p. 4098-102.
102. Kaiser, B.K., et al., *Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands.* Nature, 2007. 447(7143): p. 482-6.
103. Wahl, S.M., J. Wen, and N. Moutsopoulos, *TGF-beta: a mobile purveyor of immune privilege.* Immunol Rev, 2006. 213: p. 213-27.
104. Friese, M.A., et al., *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(20): p. 7596-603.
105. Ghiringhelli, F., 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(8): p. 1075-85.
106. Castriconi, R., et al., *Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(7): p. 4120-5.
107. Smyth, M.J., et al., *CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer.* J Immunol, 2006. 176(3): p. 1582-7.
108. Lee, J.C., et al., *Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients.* J Immunol, 2004. 172(12): p. 7335-40.
109. Fuertes, M.B., et al., *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(7): p. 4606-14.
110. Zwirner, N.W., et al., *Cytokine-driven regulation of NK cell functions in tumor immunity: role of the MICA-NKG2D system.* Cytokine Growth Factor Rev, 2007. 18(1-2): p. 159-70.
111. Rohner, A., et al., *Differentiation-promoting drugs up-regulate NKG2D ligand expression and enhance the susceptibility of acute myeloid leukemia cells to natural killer cell-mediated lysis.* Leuk Res, 2007. 31(10): p. 1393-402.
112. Ogbomo, H., et al., *Resistance to cytarabine induces the up-regulation of NKG2D ligands and enhances natural killer cell lysis of leukemic cells.* Neoplasia, 2008. 10(12): p. 1402-10.
113. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults.* Cell, 1996. 86(6): p. 973-83.

114. Hashimoto, C., K.L. Hudson, and K.V. Anderson, *The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein.* Cell, 1988. 52(2): p. 269-79.
115. Belvin, M.P. and K.V. Anderson, *A conserved signaling pathway: the Drosophila toll-dorsal pathway.* Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. 12: p. 393-416.
116. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.* Nature, 1997. 388(6640): p. 394-7.
117. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition.* Annu Rev Immunol, 2002. 20: p. 197-216.
118. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity.* Cell, 2006. 124(4): p. 783-801.
119. Medzhitov, R., *Recognition of microorganisms and activation of the immune response.* Nature, 2007. 449(7164): p. 819-26.
120. Beutler, B.A., *TLRs and innate immunity.* Blood, 2009. 113(7): p. 1399-407.
121. Jin, M.S. and J.O. Lee, *Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes.* Immunity, 2008. 29(2): p. 182-91.
122. Kumar, H., T. Kawai, and S. Akira, *Toll-like receptors and innate immunity.* Biochem Biophys Res Commun, 2009. 388(4): p. 621-5.
123. Kawai, T. and S. Akira, *The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition.* Int Immunol, 2009. 21(4): p. 317-37.
124. Mancuso, G., et al., *Bacterial recognition by TLR7 in the lysosomes of conventional dendritic cells.* Nat Immunol, 2009. 10(6): p. 587-94.
125. Murawski, M.R., et al., *Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2.* J Virol, 2009. 83(3): p. 1492-500.
126. Wagner, H., *The immunogenicity of CpG-antigen conjugates.* Adv Drug Deliv Rev, 2009. 61(3): p. 243-7.
127. Sivori, S., et al., *CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. 101(27): p. 10116-21.
128. Hart, O.M., et al., *TLR7/8-mediated activation of human NK cells results in accessory cell-dependent IFN-gamma production.* J Immunol, 2005. 175(3): p. 1636-42.
129. Chalifour, A., et al., *Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production.* Blood, 2004. 104(6): p. 1778-83.
130. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2000. 18: p. 767-811.
131. Steinman, R.M., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity.* Annu Rev Immunol, 1991. 9: p. 271-96.
132. Guermonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2002. 20: p. 621-67.
133. Steinman, R.M., D. Hawiger, and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2003. 21: p. 685-711.
134. Basu, S., et al., *CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin.* Immunity, 2001. 14(3): p. 303-13.
135. Geijtenbeek, T.B., et al., *Self- and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells.* Annu Rev Immunol, 2004. 22: p. 33-54.
136. Rutella, S., S. Danese, and G. Leone, *Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age.* Blood, 2006. 108(5): p. 1435-40.

137. Adler, H.S. and K. Steinbrink, *Tolerogenic dendritic cells in health and disease: friend and foe!* Eur J Dermatol, 2007. 17(6): p. 476-91.
138. Belkaid, Y. and G. Oldenhove, *Tuning microenvironments: induction of regulatory T cells by dendritic cells.* Immunity, 2008. 29(3): p. 362-71.
139. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells.* Nat Immunol, 2003. 4(12): p. 1206-12.
140. Ilarregui, J.M., et al., *Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10.* Nat Immunol, 2009. 10(9): p. 981-91.
141. Steinbrink, K., et al., *Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells.* J Immunol, 1997. 159(10): p. 4772-80.
142. Faunce, D.E., A. Terajewicz, and J. Stein-Streilein, *Cutting edge: in vitro-generated tolerogenic APC induce CD8+ T regulatory cells that can suppress ongoing experimental autoimmune encephalomyelitis.* J Immunol, 2004. 172(4): p. 1991-5.
143. Verginis, P., H.S. Li, and G. Carayanniotis, *Tolerogenic semimature dendritic cells suppress experimental autoimmune thyroiditis by activation of thyroglobulin-specific CD4+CD25+ T cells.* J Immunol, 2005. 174(11): p. 7433-9.
144. Rutella, S., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor promotes the generation of regulatory DC through induction of IL-10 and IFN-alpha.* Eur J Immunol, 2004. 34(5): p. 1291-302.
145. Penna, G., et al., *1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells.* J Immunol, 2007. 178(1): p. 145-53.
146. Chorny, A., et al., *Vasoactive intestinal peptide induces regulatory dendritic cells with therapeutic effects on autoimmune disorders.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. 102(38): p. 13562-7.
147. Rutella, S., et al., *Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10++IL-12low/neg accessory cells with dendritic-cell features.* Blood, 2006. 108(1): p. 218-27.
148. Smyth, M.J., D.I. Godfrey, and J.A. Trapani, *A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy.* Nat Immunol, 2001. 2(4): p. 293-9.
149. Boon, T., et al., *Human T cell responses against melanoma.* Annu Rev Immunol, 2006. 24: p. 175-208.
150. Hoffmann, T.K., et al., *Alterations in the frequency of dendritic cell subsets in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck.* Clin Cancer Res, 2002. 8(6): p. 1787-93.
151. Zhang, M., et al., *Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells.* Nat Immunol, 2004. 5(11): p. 1124-33.
152. Moretta, A., *Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues.* Nat Rev Immunol, 2002. 2(12): p. 957-64.
153. Carbone, E., et al., *Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells.* Eur J Immunol, 1999. 29(12): p. 4022-9.
154. Della Chiesa, M., et al., *The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors.* Eur J Immunol, 2003. 33(6): p. 1657-66.
155. Mailliard, R.B., et al., *Dendritic cells mediate NK cell help for Th1 and CTL responses: two-signal requirement for the induction of NK cell helper function.* J Immunol, 2003. 171(5): p. 2366-73.

156. Martin-Fontecha, A., et al., *Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming.* Nat Immunol, 2004. 5(12): p. 1260-5.
157. Kairiyama, C., I. Slavutsky, I. Larripa, V. Morvillo, A. I. Bravo, L. Bover, O. L. Podhajcer, and 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: p. 121-131.
158. Hames, E. and D. Rikwood, *An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis.* Gel electrophoresis of proteins: a practical approach, 1981: p. 1-86.
159. Rabinovich, G.A., et al., *Specific inhibition of T-cell adhesion to extracellular matrix and proinflammatory cytokine secretion by human recombinant galectin-1.* Immunology, 1999. 97(1): p. 100-6.
160. Mailliard, R.B., et al., *IL-18-induced CD83+CCR7+ NK helper cells.* J Exp Med, 2005. 202(7): p. 941-53.
161. Rogge, L., et al., *Antibodies to the IL-12 receptor beta 2 chain mark human Th1 but not Th2 cells in vitro and in vivo.* J Immunol, 1999. 162(7): p. 3926-32.
162. Pisegna, S., et al., *p38 MAPK activation controls the TLR3-mediated up-regulation of cytotoxicity and cytokine production in human NK cells.* Blood, 2004. 104(13): p. 4157-64.
163. Gorski, K.S., et al., *Distinct indirect pathways govern human NK-cell activation by TLR-7 and TLR-8 agonists.* Int Immunol, 2006. 18(7): p. 1115-26.
164. Schmidt, K.N., et al., *APC-independent activation of NK cells by the Toll-like receptor 3 agonist double-stranded RNA.* J Immunol, 2004. 172(1): p. 138-43.
165. Kanzler, H., et al., *Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists.* Nat Med, 2007. 13(5): p. 552-9.
166. Son, Y.I., et al., *Interleukin-18 (IL-18) synergizes with IL-2 to enhance cytotoxicity, interferon-gamma production, and expansion of natural killer cells.* Cancer Res, 2001. 61(3): p. 884-8.
167. Kim, S., et al., *HLA alleles determine differences in human natural killer cell responsiveness and potency.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. 105(8): p. 3053-8.
168. Vitale, M., et al., *NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor.* Blood, 2005. 106(2): p. 566-71.
169. Pende, D., et al., *Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction.* Blood, 2006. 107(5): p. 2030-6.
170. Bellone, G., et al., *Regulation of NK cell functions by TGF-beta 1.* J Immunol, 1995. 155(3): p. 1066-73.