

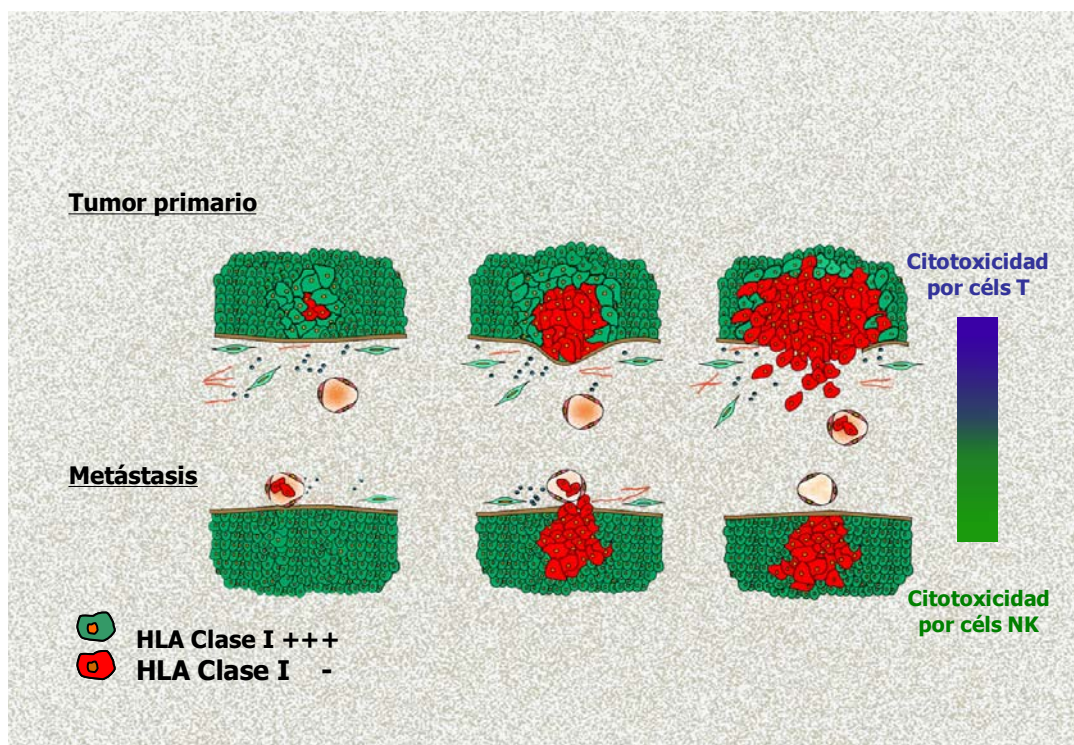
UNIVERSIDAD DE GRANADA

HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**IMPLICACIONES DE LAS MOLÉCULAS DEL COMPLEJO
MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y DE LAS CÉLULAS T EN
LA GENERACIÓN DE VARIANTES METASTÁSICAS EN UN
MODELO TUMORAL MURINO**



M^a Soledad Martínez Llamas
Granada, Mayo 2005

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: María Soledad Martínez Llamas
D.L.: Gr. 1250 - 2005
ISBN: 84-338-3535-1

OBJETIVOS

El papel que desempeña el sistema inmune en su lucha contra los tumores, inmunovigilancia tumoral, es un tema de controversia en la actualidad. Es evidente que los tumores crecen y se desarrollan a pesar de la existencia de una respuesta activa por parte del sistema inmune sano. Esto implica que la aparición del tumor no se debe a un sistema inmune deteriorado, al menos en los estadios tempranos del desarrollo del tumor, por tanto si el sistema inmune juega un papel activo, las células tumorales deben desarrollar mecanismos de escape frente al sistema inmune. La evolución somática de las células tumorales genéticamente inestables permite el desarrollo de variantes tumorales que presentan fenotipos alterados. Dentro de estas variantes tumorales, algunas desarrollan mecanismos de escape frente al sistema inmune. La combinación de la evolución somática con la inmunoselección en el desarrollo del tumor es un concepto actual de la expansión clonal de las células tumorales, y explica que se produzcan células tumorales que escapen del sistema inmune permitiendo la progresión tumoral. Uno de los mecanismos de escape más importantes que desarrollan las células tumorales es la pérdida de expresión de moléculas del MHC de clase I, con lo que no presentan péptidos a los linfocitos T, y por tanto se hacen invisibles para estos.

En este estudio partimos del sistema tumoral murino B9, compuesto por un clon de un tumor primario que carece de expresión de moléculas H-2 de clase I en superficie en estado basal, y de metástasis espontáneas generadas en ratones inmunocompetentes donde aparece un nuevo fenotipo MHC, con no expresión de la molécula L^d después del tratamiento con interferón.

Con estas premisas, y con la intención de aportar nuevos conocimientos en los mecanismos de escape de las células tumorales, y en el papel desempeñado por el sistema inmune durante la progresión tumoral, los objetivos que nos planteamos son:

1. Generar metástasis espontáneas con el clon tumoral B9 en ratones Balb/c nude nu/nu , deficientes en células T: para determinar si las células T desempeñan un papel activo de inmunoselección durante el proceso metastásico.
2. Estudiar y comparar el comportamiento in vivo de las diferentes metástasis obtenidas en ratones inmunocompetentes y en ratones nude: ensayos de inmunogenicidad, crecimiento local y protección.
3. Determinar los mecanismos moleculares implicados en la falta de expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I en el clon B9 y en las metástasis derivadas de ratones inmunocompetentes

UNIVERSIDAD DE GRANADA
HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**IMPLICACIONES DE LAS MOLÉCULAS DEL COMPLEJO MAYOR DE
HISTOCOMPATIBILIDAD Y DE LAS CÉLULAS T EN LA GENERACIÓN DE
VARIANTES METASTÁSICAS EN UN MODELO TUMORAL MURINO**

Memoria presentada por D. M^a Soledad Martínez Llamas
para optar al grado de Doctor en Farmacia por
la Universidad de Granada

Granada, Mayo de 2005

El presente trabajo, **"Implicaciones de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad y de las células T en la generación de variantes metastásicas en un modelo tumoral murino"**, presentado por D^a M^a Soledad Martínez Llamas para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo la dirección de los Drs. D. Angel Miguel García Lora y D. Federico Garrido Torres-Puchol, en el Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

Revisado el texto, damos nuestra conformidad para su presentación y valoración.

Granada, 24 de Mayo de 2005

Dr. D. Angel Miguel García-Lora
Doctor en Ciencias Químicas
Investigador del H.U.Virgen de las Nieves

Dr. D. Federico Garrido Torres-Puchol
Doctor en Medicina y Cirugía
Catedrático de Inmunología del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular en la Universidad de Granada
Jefe de Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología del H.U.Virgen de las Nieves.
Granada

A mis padres

A Fede

A nuestro hijo

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Federico Garrido, director de esta Tesis, por darme la oportunidad de realizar este trabajo bajo su dirección

Al Dr. Angel García-Lora, director de esta Tesis, por haberme iniciado la investigación, por sus consejos ante tantas dudas que me han surgido durante el desarrollo de este trabajo, y por su paciencia y optimismo ante los problemas y dificultades

Al Dr. Ignacio Algarra, por su ayuda y colaboración en este trabajo

A Antonia, Paco y Encarnita, por su ayuda desde el Animalario del H.U. Virgen de las Nieves

A Eva Jiménez y Laura Paco, por su apoyo, por ser grandes compañeras y por tener siempre un momento para reír

A todas aquellas personas que de una forma u otra han ayudado a la realización de esta tesis

A Fede, por su cariño y buen humor y por haber soportado todo el tiempo que he dejado de dedicarle a él para dedicárselo a este trabajo

A mis padres, por la ilusión que han mostrado con mi trabajo, y por intentar hacerme siempre la vida más fácil

INDICE

INTRODUCCIÓN.....	Pag.1
1.- ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD.....	Pag.3
1.1.- GENÉTICA DEL MHC.....	Pag.3
1.2.- ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE LAS MOLÉCULAS H-2.....	Pag.7
2.- PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA.....	Pag.12
3.- INMUNOVIGILANCIA Y MECANISMOS DE ESCAPE TUMORAL.....	Pag.22
3.1.- DE LA INMUNOVIGILANCIA AL INMUNOEDITING.....	Pag.22
3.2.- MECANISMOS DE ESCAPE TUMORAL.....	Pag.32
3.2.1.- Pérdida o baja expresión de las moléculas MHC de clase I.....	Pag.36
3.2.2.- Otros mecanismos de escape tumoral.....	Pag.45
3.2.2.1.- Pérdida de antígenos tumorales e inmunodominancia.....	Pag.45
3.2.2.2.- Señalización defectiva a través de receptores de muerte.....	Pag.45
3.2.2.3.- Ausencia de coestimulación.....	Pag.46
3.2.2.4.- Citoquinas inmunosupresoras.....	Pag.47
3.2.2.5.- Apoptosis de las células T activadas.....	Pag.48
3.2.2.6.- Degradación enzimática del triptófano.....	Pag.49
4.- MODELOS EXPERIMENTALES ANIMALES.....	Pag.51
4.1.- SISTEMA TUMORAL MURINO GR9.....	Pag.51
OBJETIVOS.....	Pag.63

MATERIAL Y MÉTODOS.....	Pag.67
1.- MATERIAL Y SOLUCIONES DE USO GENERAL.....	Pag.69
1.1.- Material	Pag.69
1.2.- Tampones, medios y soluciones	Pag.71
2.- RATONES.....	Pag.71
3.- CULTIVOS CELULARES.....	Pag.71
3.1.-Líneas celulares.....	Pag.71
3.2.-Métodos de cultivo celular.....	Pag.72
3.3.- Congelación de las células.....	Pag.73
3.4.- Lavado de las células.....	Pag.74
3.5.- Tratamiento de las células con IFN- γ	Pag.74
3.6.- Tratamiento de las células con 5'-aza-2'deoxicitidina	Pag.74
4.- ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO.....	Pag.75
4.1.- Análisis de la expresión de moléculas de clase I en superficie	Pag.75
4.2.- Análisis de la expresión de moléculas clase Ib u clase II en superficie...Pag.76	
5.- ENSAYOS DE ESTABILIZACIÓN DEL MHC DE CLASE I	Pag.77
6.- EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	Pag.78
6.1- Extracción de RNA	Pag.78
6.2.- Cuantificación de RNA	Pag.81
7.- SÍNTESIS DE c-DNA.....	Pag.81
8.- RT-PCR.....	Pag.82
9.- ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	Pag.86
10.- BIBLIOTECA DE SUSTRACCIÓN DE c-DNA	Pag.87
10.1.- Fundamento.....	Pag.87
10.2.- Material.....	Pag.88
10.3.- Método.....	Pag.88

11.- EXTRACCIÓN DE LOS DISTINTOS FRAGMENTOS DE c-DNA EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN LA BIBLIOTECA DE SUSTRACCIÓN.....	Pag.93
12.- CLONACIÓN DE LAS DISTINTOS FRAGMENTOS DE c-DNA.....	Pag.93
13.- EXTRACCIÓN DEL PLASMIDO.....	Pag.94
14.- SECUENCIACION.....	Pag.94
15.- BASES DE DATOS	Pag.96
16.- ENSAYOS CELULARES EN VIVO CON RATONES.....	Pag.96
16.1.- Ratones	Pag.96
16.2.- Producción de metástasis espontáneas en ratones BALB/c inmunocompetentes y en ratones nude (nu/nu).....	Pag.96
16.3.- Crecimiento e inmunogenicidad en ratones inmunocompetentes y en ratones atímicos.....	Pag.97
16.4.- Inmunización /protección en ratones inmunocompetentes.....	Pag.98
16.4.1.- Ensayos de inmunización.....	Pag.98
16.4.2.- Ensayos de protección.....	Pag.98
RESULTADOS.....	Pag.99
1.- PRODUCCIÓN DE METÁSTASIS EXPONTÁNEAS EN RATONES BALB/c INMUNOCOMPETENTES Y EN RATONES ATÍMICOS (nu/nu).....	Pag.102
1.1.- Expresión de las moléculas H-2 de clase I en superficie en las metástasis obtenidas en ratones balb/c inmunocompetentes y en ratones nude (nu/nu).....	Pag.104
1.2.- Expresión en superficie de moléculas no clásicas y de clase II en metástasis obtenidas en ratones BALB/c inmunocompetentes y en ratones nude (nu/nu).	Pag.108

2.- ENSAYOS DE ESTABILIZACION DE LA EXPRESIÓN EN SUPERFICIE DE LAS MOLÉCULAS H-2 DE CLASE I A BAJA TEMPERATURA.....	Pag.110
3.- ENSAYO DE DESMETILACIÓN CON 5-AZA-2`DEOXCITIDINA	Pag.112
4.- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN A NIVEL TRANSCRIPCIONAL DE LAS MOLÉCULAS H-2 DE CLASE I Y DE β_2 -MICROGLOBULINA...	Pag.114
5.- ESTUDIO DE LA MAQUINARIA DE PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO (APM).....	Pag.117
6.- TRATAMIENTO DE LAS DISTINTAS LÍNEAS CON IFN- γ	Pag.122
7.- ENSAYOS DE CRECIMIENTO E INMUNOGENICIDAD EN RATONES BALB/c INMUNOCOMPETENTES Y NUDE (nu/nu).....	Pag.124
8.- ENSAYOS DE PROTECCIÓN E INMUNIZACIÓN EN RATONES BALB/c INMUNOCOMPETENTES	Pag.129
9.- BIBLIOTECA DE SUSTRACCIÓN DE c-DNA	Pag.134
10.- EXTRACCIÓN DE LOS DISTINTOS FRAGMENTOS DE c-DNA OBTENIDOS EN LA BIBLIOTECA DE SUSTRACCIÓN	Pag.140
11.- CLONACIÓN DE LOS DIFERENTES AMPLIFICADOS DE c-DNA....	Pag.142
12.- SECUENCIACIÓN	Pag.143
DISCUSIÓN	Pag.149
CONCLUSIONES	Pag.167
BIBLIOGRAFÍA	Pag.171

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- MATERIAL Y SOLUCIONES DE USO GENERAL

1.1.- MATERIAL

Agitador magnético (SBS)

Autoclave (Selecta, Autotester)

Balanza (Denver)

Balanza de precisión (Gibertini)

Baño (Bunsen)

Bomba de vacío

Cámara fotográfica Polaroid (Kodak)

Cámara de flujo laminar (Flow Lab)

Centrífuga (Sigma)

Centrífuga. Microcentrífuga (Biofugue Heraeus)

Congelador de -80°C (Giralt)

Congelador de -20°C

Contenedores de Nitrógeno líquido

Cubeta de electroforesis horizontal

Destilador de Agua (Millipore)

Estufa (Selecta)

Estufa de cultivo (Forma Sientific)

Espectrofotómetro (Beckman)

FACSort (Becton-Dickinson)

Filtro (Millipore)

Fuente de Alimentación (Biorad)

Frascos de Cultivo

Guantes desechables

Jeringuillas estériles

Liofilizador

Micropipetas (Gilson)

Papel de filtro

Película polaroid (Kodak)

PHmetro (Crison)

Placas de cultivo de 24 y 6 pocillos

Pipetas desechables de 5 y 10 ml

Pipetas Pasteur

Secuenciador Abi 377 (Applera)

Termobloque (Selecta)

Termociclador

Transiluminador UV (Giralt)

Tubos eppendorf de 1.5 ml

Tubos universales de 25 ml

1.2.- TAMPONES, MEDIOS Y SOLUCIONES

Medio LB: 1% Bacto triptone (Difco), 0.5% Bacto yeast triptone (Difco), 1% NaCl

Medio LB-Agar

Medio RPMI (Gibco)

Tampón PBS: 10mM Na₂HPO₄, 170mM NaCl, 3mM KCl, pH:7.2

PBS-EDTA: 0.2 g/l de EDTA en PBS

TAE 50X : 2M Tris-acetato, 0.05M EDTA pH 8

TAE 50X con bromuro de etidio (25 µg/ml)

2.- RATONES

Se han utilizado ratones BALB/c inmunocompetentes de 6 a 8 semanas de edad y con un peso medio aproximado de 20 g por ratón, procedentes del animalario del H.U.Virgen de las Nieves. También se han usado ratones BALB/c atímicos nu/nu procedentes de IFFA-Credo (CRIFFA, Barcelona). Los ratones fueron manipulados en condiciones libres de patógenos y conforme a las normas aprobadas por nuestra institución.

3.- CULTIVOS CELULARES

3.1.-LÍNEAS CELULARES

En este estudio partimos de un modelo tumoral murino GR9, compuesto por líneas celulares derivadas de un fibrosarcoma murino inducido por metilcolantreno, clones de este tumor primario y metástasis derivadas de algunos de estos clones en ratones BALB/c

inmunocompetentes. Este modelo GR9 fue establecido a principios de los años 80 y ha sido ampliamente caracterizado en nuestro laboratorio. Nos hemos centrado en el estudio del clon B9 por sus características: 1) carece de expresión de las moléculas H-2 de clase I en superficie e induce la expresión de las tres moléculas K, D, L tras el tratamiento con IFN- γ ; 2) su bajo poder metastásico.

Para los ensayos de producción de metástasis espontáneas se inyectaron 5×10^5 células del clon B9 a nivel subcutáneo en la pata de ratones BALB/c inmunocompetentes y de ratones atímicos. Cuando el tumor local alcanza 6-8 mm el tumor es extirpado, y de 30 a 60 días después el animal es sacrificado. Las metástasis pulmonares visibles macroscópicamente fueron adaptadas a cultivo. Todas estas líneas celulares crecen presentando adherencia al plástico. Su población se dobla en un tiempo de 24-48 horas.

3.2.-MÉTODOS DE CULTIVO CELULAR

El manejo de las líneas celulares se realizó en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, usando material y soluciones estériles. Todas las líneas fueron cultivadas en medio DMEM (GIBCO, Paisley, UK), suplementado con un 10% de suero fetal bovino inactivado (Life Technologies, Milan, Italy), con glutamina 2mM, ampicilina 500 μ g/ml y con gentamicina (Genta-Gobens) 40 μ g/ml. Para el cultivo se utilizan falcons estériles y la incubación se lleva a cabo en una estufa a 37°C, en atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad.

El medio de cultivo fue cambiado de acuerdo con su acidificación (color amarillo), para lo que se deben de despegar las células adheridas al plástico del frasco de cultivo añadiendo una solución de PBS-EDTA. Se incuban las células 10 minutos a 37°C, se golpea el frasco y las células se despegan debido a que el EDTA secuestra el Ca^{++} que es necesario para que las células permanezcan adheridas. A continuación se pasa la suspensión celular a frascos universales estériles y se centrifugan a 200xg durante 5 minutos. Se deshecha el sobrenadante y el botón de células se resuspende en medio de cultivo nuevo, pasándolo posteriormente a un frasco de cultivo nuevo. Cuando el frasco se satura las células se duplican en dos frascos de cultivo nuevos siguiendo el procedimiento anterior.

3.3.- CONGELACIÓN DE LAS CELULAS

Para conservar las líneas celulares durante un largo periodo, se congelan las células en nitrógeno líquido. El proceso consiste en centrifugar las células a 200xg en frascos universales durante 5 minutos y resuspenderlas en suero fetal bovino inactivado + 10% de DMSO. Se distribuyen en criotubos y se introducen rápidamente en el congelador de -80°C, pasándose a las 24h a nitrógeno líquido.

Para descongelarlas se introducen en un baño a 37°C y posteriormente se lavan dos veces con PBS estéril, para eliminar los restos de DMSO. Por último, son resuspendidas en medio de cultivo y depositadas en falcons de cultivo.

3.4.- LAVADO DE LAS CÉLULAS

Esta operación se realiza para retirar los restos de medio de cultivo cuando las células van a ser sometidas a algún experimento posterior, cuando se van a extraer ácidos nucleicos o proteínas o cuando las células van a ser congeladas. Se centrifugan las células a 200xg durante 5 minutos y al botón celular se le añaden 20ml de PBS estéril, volviéndose a centrifugar.

3.5.- TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS CON IFN- γ

Las células derivadas del clon B9 y de las distintas líneas metastásicas derivadas tanto de ratones BALB/c inmunocompetentes como de ratones atímicos nu/nu, fueron tratadas durante 48 horas con 100 U/ml de IFN- γ (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

3.6.- TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS CON 5-AZA-2'-DEOXYCYTIDINA

Se incubaron células del clon B9 y de distintas líneas metastásicas MP5, MP12 que carecen de expresión de moléculas H-2 de clase I en superficie con una concentración 1 μ M de 5-aza-2'-deoxicitidina (SIGMA) en el medio de cultivo, manteniendo las distintas líneas en cultivo durante 3 días y cambiando el medio cada 24 horas. Posteriormente, se midió la expresión de las moléculas de clase I en superficie por FACS. También se incubó con este agente desmetilante las células de la metástasis MN1.5 (H-2 de clase I positiva), utilizada como control.

4.- ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

Mediante esta técnica fueron estudiadas la expresión en superficie de las moléculas del MHC de clase I (K^d, D^d, L^d), tanto en clon B9, en los tumores locales a nivel de la pata generados en ratones inmunocompetentes (B9LT) y en ratones atímicos (N9LT), así como en las distintas metástasis obtenidas en ratones inmunocompetentes y en ratones atímicos.

4.1.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS H-2 DE CLASE I EN SUPERFICIE

4.1.1.- Material

- PBS
- FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA)
- Anticuerpos monoclonales específicos: anti H-2 K^d (K9.18), anti H-2 D^d (34.5.8) y anti H-2 L^d (28.14.8 y 30.5.7) procedentes de ATCC (Rockville, MD)
- 2º anticuerpo marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Dako A/S, Glostrup, Denmark)

4.1.2.- Método

Las células a estudiar son despegadas del frasco de cultivo con PBS-EDTA, y posteriormente son lavadas dos veces con PBS frío, con el fin de eliminar los restos de medio de cultivo. Posteriormente, las células son incubadas con el primer anticuerpo anti

H-2 K^d, D^d, y L^d, a concentración de saturación durante 30 minutos a 4°C. Tras un lavado con PBS se incuban con el segundo anticuerpo FITC a dilución 1/20 durante 30 minutos a 4°C. Por último, se lavan de nuevo y se analizan por citometría de flujo mediante FACScan. Se utilizó como control negativo células incubadas sólo con el segundo anticuerpo FITC. Los parámetros del instrumento fueron chequeados y la calibración se llevó a cabo por el FACScmp software. Los histogramas se obtuvieron por amplificación logarítmica de la fluorescencia emitida por las células. Cada muestra analizada constó de un mínimo de 10⁴ células.

4.2.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN EN SUPERFICIE DE LAS MOLÉCULAS H-2 DE CLASE Ib Y DE CLASE II

4.2.1.- Material

- Líneas celulares: B9, MP5, MP12, MN1.1 y MN1.5
- PBS
- FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA)
- Anticuerpos monoclonales específicos: Biotin-anti-mouse Qa-2 y Qa1^b (moléculas no clásicas) y biotin-antimouse I-A y I-E (clase II), todos de Pharmingen
- Estreptavidina-Phycoeritrina, Pharmingen

4.2.2.- Método

Las células de las distintas líneas celulares se despegan con 1ml de PBS-edta, y son lavadas durante 5 minutos con PBS. A continuación se incuban 5µl del primer anticuerpo 0.5 mg/ml durante 30 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente las células son lavadas con PBS e incubadas con el 2º anticuerpo (Streptavidina-Phycoeritrina 0.5 mg/ml) durante 30 minutos. Finalmente se analizó la expresión de estas moléculas por FACS.

5.- ENSAYOS DE ESTABILIZACIÓN DE MHC DE CLASE I

Estos ensayos se realizaron con el fin de determinar si la falta de expresión de moléculas MHC de clase I en el clon B9 y en las distintas metástasis derivadas de ratones inmunocompetentes se debe a un déficit de β_2 -microglobulina o a una alteración de las moléculas necesarias en el procesamiento y presentación antigénicas.

5.1- Material

- Líneas celulares: B9LT, MP12, N9LT
- PBS
- β_2 -microglobulina humana (Sigma, Deisenhofen, Germany)

5.2.- Método

Se incubaron 0.5×10^6 células de B9LT (tumor local a nivel de la pata en ratones inmunocompetentes), y de las distintas líneas metastásicas derivadas de ratones

inmunocompetentes (MP12) durante 18h a 26° C en presencia o no de 2.5 µg/ml de β₂-microglobulina exógena. Igualmente fueron incubadas 0.5 x 10⁶ células de N9LT (tumor local a nivel de la pata en ratones atímicos nu/nu), que al igual que las anteriores carecen de la expresión de moléculas H-2 de clase I en superficie.

Posteriormente se determinó la expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I: K^d, D^d, L^d por citometría de flujo, según el método descrito anteriormente.

6.- EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

6.1- EXTRACCIÓN DE RNA

Como se conoce, en la célula eucariota existen varios tipos de RNA: RNA mensajero (mRNA), RNA de transferencia (tRNA) y RNA ribosómico (rRNA). Generalmente se extrae RNA total de las células, pero en este caso se procedió a la extracción de mRNA ya que es una copia directa de la secuencia de DNA codificadora de proteínas.

6.1.1- Fundamento

El método utilizado para la extracción de RNA se fundamenta en la subpoblación de mRNA contiene una “cola” constituida por una secuencia poliadenílica (poliA) formada por unos 200 nucleótidos que posteriormente se acortan a unos 40-65 residuos de adenina.

La existencia de estas colas de poliA permite la extracción de mRNA (desechando el tRNA y rRNA) ya que estas colas hibridan con el oligodT y se unen a streptavidina sobre un

soporte sólido (bolitas magnéticas). El tRNA y rRNA que no contienen estas “colas” y se pierden con el lavado. Posteriormente el mRNA se eluye del soporte sólido y es almacenado para su uso posterior (**Fig. 19**).

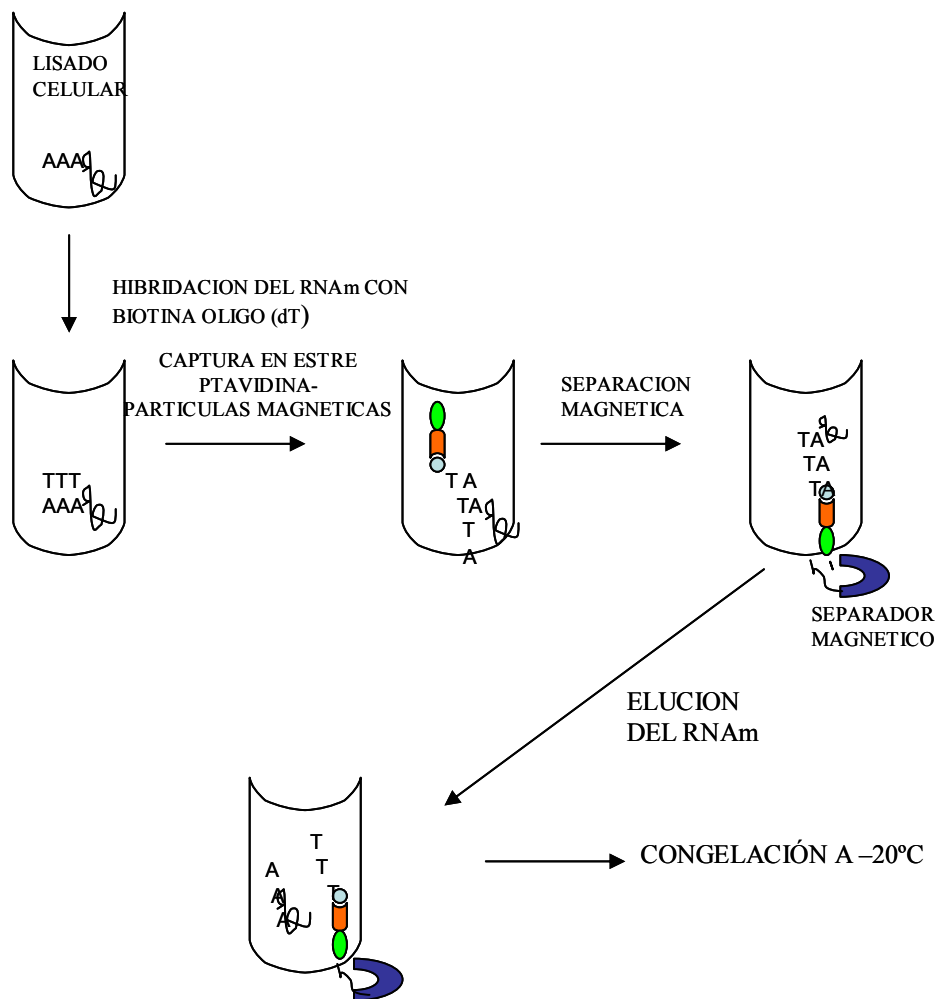


Figura 19.- Esquema de extracción de RNAm desde cultivo celular. La extracción consta de varios pasos: hibridación del mRNA con oligo dT, captura con partículas magnéticas, posterior separación, elución y congelación a -20°C.

6.1.2.- Material

- Líneas celulares: B9, MP3, MP5, MP6, MP11, MP12, N9LT, MN1.1, MN1.5 en condiciones basales y tras tratamiento con IFN- γ
- PBS-EDTA
- mRNA isolation kit (Roche) que incluye las siguientes soluciones:
 - Tampón de lisis
 - Partículas magnéticas unidas a Streptavidina
 - Biotina-oligodT
 - Tampón de Lavado
 - Agua libre de RNAasa
 - Tampón de almacenamiento

6.1.3.- Método

Se utilizaron 2×10^6 células que se lavaron con tampón PBS y se pusieron en un tubo eppendorf. Seguidamente se añade 500 μ l de tampón de lisis y se hace pasar 6 veces por una jeringa. A continuación, se hibrida el lisado con 50 pmol de oligo(dT) y se procede a la inmovilización del RNA + oligo(dT) con las partículas magnéticas unidas a streptavidina incubando a 37° durante 5 minutos. Posteriormente se procede a la separación del mRNA de las partículas magnéticas lavando con 200 μ l de tampón de lavado y utilizando un separador magnético (imán), durante 3 minutos, desechando el sobrenadante en cada

lavado. Por último, se eluye el mRNA con 15 μ l de tampón de elución durante 2 minutos a 65°C y se transfiere el sobrenadante a un eppendorf limpio para su posterior cuantificación.

6.2.- CUANTIFICACIÓN DE RNA

Para cuantificar el RNA se utiliza un espectrofotómetro ultravioleta a una densidad óptica de 260 nm. Se realiza una dilución 1/50: 2 μ l de RNAm + 98 μ l de agua destilada y medimos la absorbancia de la muestra. La absorbancia a 260 nm corresponde a RNA, mientras que la absorbancia a 280 nm corresponde a la concentración de proteínas. La relación de la D.O. a 260 nm/ D.O. a 280 nm es el índice de pureza de la muestra, aconsejándose que sea superior a 1.5, mientras que la lectura inversa, 280/260 debe ser de 0.5. El espectrofotómetro da la concentración de RNA directamente en μ g/ μ l, y lo hace multiplicando la lectura obtenida a 260 nm por 40 (ya que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a una solución de RNA de 40 μ g/ml) y por la dilución.

7.- SÍNTESIS DE cDNA

7.1.- Material

- Kit Reverse Transcription System (Promega)
- RNAm (100ng) de las distintas líneas celulares en condiciones basales y tras tratamiento con IFN- γ 100U/ml

7.2.- Método

En un tubo eppendorf se añadió:

- 4 µl MgCl₂ 25 mM
- 2 µl Reverse transcription buffer 10X (100 mM Tris-ClH pH 8.8, 500 mM KCl, 1% Triton X-100)
- 2 µl dNTPs 10 mM
- 0.5 µl de inhibidor de RNAasa (RNasin)
- 30 unidades de AMV reverse transcriptasa
- 1 µl de oligo(dT)₁₅ primer
- 1 µg de mRNA
- Agua libre de RNAasa hasta un volumen de 20 µl.

Al agua libre de RNAasa se le añade el mRNA y se calienta a 65°C durante 10 minutos. La reacción con todos los componentes se incuba a 42°C durante 1 hora. Posteriormente se mantiene a 95°C durante 5 minutos y se incuba en hielo durante otros 5 minutos para parar la reacción. Finalmente a los 20 µl de reacción se le añaden 80 µl de agua destilada y los 100 µl resultantes se alicotan y se congelan a -20°C.

8.- RT-PCR

8.1.- Material

- cDNA

- Primers específicos
- 250 μ M de dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Boehringer Mannheim)
- Tampón PCR 10X (10mM TrisHCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂) (Boehringer Mannheim)
- Taq DNA polimerasa: 5 U/ μ l (Boehringer Mannheim)

8.2.- Método

Para una reacción de 50 μ l se mezclan en un tubo de PCR:

cDNA	2.5 μ l
Tampón PCR10X	5 μ l
Primer F	100 ng
Primer R	100 ng
Mezcla dNTP	5 μ l
Taq DNA polimerasa	0.5 μ l
Agua bidestilada	hasta 50 μ l

En el termociclador se somete a los ciclos deseados, en los que la temperatura de hibridación dependerá de los primers utilizados, y la duración de las etapas del tamaño del fragmento a amplificar. Todas las reacciones de PCR se sometieron a un primer ciclo de 94°C durante 5 minutos, a continuación se somete a un número de ciclos con temperaturas

y ciclos específicos para cada amplificación, y al final se sometieron a un ciclo de 72°C durante 10 minutos.

8.3.- Primers utilizados en las amplificaciones de cDNA

Se amplificaron por PCR los c-DNAs correspondientes a las distintas líneas celulares estudiadas. Para ello se utilizaron primers específicos para los siguientes genes: β -actina, GADPH, antígenos MHC de clase I, β_2 -microglobulina, TAP1, TAP2, LMP2, LMP7, LMP10, PA28 α , PA28 β , ERP59, ERP60, Calnexina, Calreticulina y tapasina.

Se realizaron amplificaciones semicuantitativas utilizando diferentes cantidades de c-DNA y un número limitado de ciclos. El ciclador utilizado fue Robocycler 40 (Stratagene, La Jolla, Ca). El protocolo usado es el siguiente:

Temperatura (°C)	Tiempo (minutos)	Nº ciclos	
94°	1		Desnaturalización
63-68°	1	25-35	Hibridación
72°	1		Elongación

Se terminó con una extensión final a 72° durante 10 minutos. Los primers específicos y las temperaturas de hibridación los podemos ver en la tabla 1.

Tabla 1: Primers usados para el análisis por RT-PCR

Oligonucleotido	Secuencia (5'-3')	T ^a hibridación (°C)	Ciclos	pb
β-actina.F β-actina.R	ggcattgtgatggactccg ctggaaggtggacagtga	60	25	202
GADPH.F GADPH.R	atggtgaaggtcgggtgaacggattggc catcgaaggtggaagagtgggagttgctgt	67	30	882
TAP1.F TAP1.R	tggagacatgctgtgtcggatgctgggct tgctgacagtccctctgatcaccagct	68	30	814
TAP2.F TAP2.R	atggcgctgtcctacctgaggccctgg ggctcatcagagaggtgtcagagctca	67	28	784
LMP2.F LMP2.R	atgctgcgggcaggagcacctaccgc tcactcatcgtagaattttggcagctc	67	35	660
LMP7.F LMP7.R	atggcgctactggatctgtcgggtgc tcacagagcggcctctccgtacttga	67	35	831
LMP10.F LMP10.R	aggaatgcgtccttgaacacg tcaatgctctctgcagcttggc	63	30	630
Tapas.F Tapas.R	gctatactcaaggtggatgacc tgcaagacagagcagttctggg	63	30	764
Calnexina. F Calnexina.R	catgatggacatgatgatgacgc ggtcttcagatctgcatctggc	64	35	627
Calret.F Calret.R	ccctgccatctattcaaagagc tcactcggccttgtattcagg	63	30	772
ER60.F ER60.R	ctgagtatgaagctgcagcaacc tccgtcatatgaggacagagacc	64	35	552
ERP59.F ERP59.R	gttgaagaagagcaacttcgagg atacactctgggcaggaacagc	64	35	712
PA28α.F PA28α.R	caagccaaggtggatgtgtcc gatcattccctttgttctccacg	64	35	711
PA28β.F PA28β.B	agtggagaagcccgaacacagg gatggcttttctcaccctcgg	64	30	682
β ₂ microglobulina.F β ₂ microglobulina.B	gtgaccctagtctttctggtg tgaatcttcagagcatcatg	56	30	375
H-2.F H-2.B	gcacagattcccaaagg atctcaggtgaggggctca	56	33	278

9.- ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

En geles de agarosa se separan fragmentos de DNA de acuerdo con su tamaño y conformación. Dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar debemos escoger el % del gel:

>1Kb	0.8-1%
0,5-1Kb	1-2%
<0,5Kb.....	2-3%

9.1.- Material

- Agarosa (Sigma)
- Solución TAE 50X (0.4 M Tris-acetato, 0.01M EDTA pH 8.0)
- Solución de Bromuro de Etidio (10 mg/ml)
- Tampón de carga 6X (0.25% azul de bromofenol, 0.25% Xileno Cyanol, 15% Ficoll 400)
- Marcador de peso molecular (Boehringer Mannheim)

9.2.- Preparación del gel

Para el caso de un gel del 1% y un molde de 250 ml se pesan 2.5 g de agarosa y se enrasa hasta 250 ml con agua bidestilada, se calienta hasta ebullición, posteriormente se deja enfriar hasta 65°C y se le añade 5 ml de TAE 50X y 7.5µl de solución de bromuro de etidio. A continuación se vierte sobre el soporte del gel con el peine. Debido a la toxicidad de los

vapores de bromuro este procedimiento se lleva a cabo en campana de extracción de gases hasta que esté solidificado.

9.3.- Electroforesis

Se lleva a cabo en cubeta de electroforesis horizontal, en la cual se introduce el gel. De los productos de PCR se chequean 10 a 20 µl a los que se les añade tampón de carga. Las muestras en los pocillos del gel se someten a una diferencia de potencial de 50-100 V en solución 1X TAE. La electroforesis es chequeada en un transiluminador UV, donde se visualiza el DNA por el bromuro de etidio intercalado entre las bases. Comparando la movilidad de nuestros fragmentos con los del marcador del peso molecular podremos conocer el tamaño de nuestros fragmentos.

10.- BIBLIOTECA DE SUSTRACCIÓN DE c-DNA

10.1.- FUNDAMENTO

La hibridación sustractiva es una técnica que permite comparar dos poblaciones de mRNA y obtener clones de genes que se expresan en una población, pero no en la otra. El fundamento de la técnica es simple: en primer lugar ambas poblaciones de mRNA se convierten en c-DNA. Nos referimos al c-DNA que contiene transcritos específicos (expresados diferencialmente) como “tester” y al c-DNA que carece de éstos o c-DNA de referencia nos referiremos como “driver”. El c-DNA “tester” y “driver” se someten a

hibridación, y las secuencias que hibridan se desechan, de tal forma que el c-DNA que queda sin hibridar representa a los genes que están presentes en el “tester”, pero que están ausentes en el “driver”

10.2.- Material

- Clontech PCR-Select cDNA subtraction Kit.
- mRNA de las distintas líneas metastásicas que se van a comparar:
 - MN1.1 y MN1.5: MHC de clase I (+)
 - MP12 y MP5: MHC de clase I (-)

10.3.- Método

Un esquema del proceso es representado en la **figura 20**. Partimos de 0.5-2 µg de mRNA de las distintas líneas metastásicas que se van a comparar, unas MHC de clase I (+): MN1.1 y MN1.5 y otras MHC de clase I (-): MP12 Y MP5. Este mRNA se retrotranscribe a c-DNA.

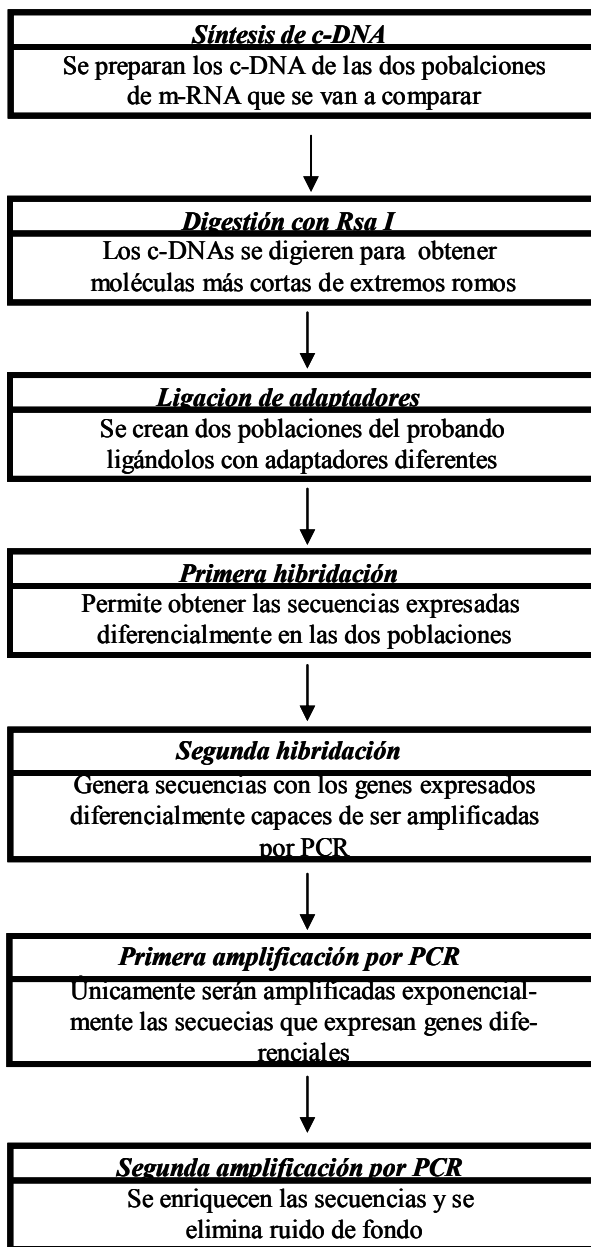


Figura 20.- Esquema del procedimiento de elaboración de la biblioteca de sustracción de c-DNA. Consta de diversos pasos sucesivos: síntesis de cDNA, digestión con RsaI, dos hibridaciones consecutivas seguidas de dos amplificaciones por PCR.

Posteriormente, los c-DNAs que se van a comparar se digieren con la enzima de restricción RsaI, que corta 4 pares de bases en extremo romo: GT/AC. A continuación, el c-DNA “tester” (c-DNA derivado de líneas metastásicas MN1.1 ó MN1.5) se divide en dos partes y cada una de ellas se liga con un adaptador diferente. Los extremos de los adaptadores carecen de grupo fosfato, por tanto los adaptadores se pegan en el extremo 5’ del c-DNA. Hay que tener en cuenta que al c-DNA “driver” (derivado de líneas metastásicas MP12 ó MP5), no se le van a ligar los adaptadores (**Fig. 21**).

Seguidamente, se llevan a cabo dos hibridaciones: la 1ª hibridación se lleva a cabo en exceso de c-DNA “driver” (**Fig. 21**). Las muestras son desnaturalizadas e hibridan el c-DNA “tester” con el “driver”. Aparecen moléculas de distinto tipo: a, b, c y d, tal y como se muestra en la **Fig. 21**. Las moléculas que hibridan no presentan diferencia de expresión de genes, por tanto, las moléculas de cadena simple son las que presentan las secuencias expresadas diferencialmente.

En la 2ª hibridación se mezclan las dos partes de c-DNA “tester” (con diferentes adaptadores), obteniéndose así un nuevo tipo de híbridos e), (que son moléculas de “tester” con distintos extremos”). A continuación se vuelve a poner c-DNA “driver” en exceso, para enriquecer aún más las secuencias expresadas diferencialmente. Los extremos de estas moléculas se rellenan con DNA polimerasa, y así presentarán distintos sitios de hibridación para los oligonucleotidos Nested en los extremos 5’ y 3’.

Estas moléculas se amplifican por PCR de tal forma que según vemos en la **Fig. 21**:

- moléculas a) y d) → no amplifican ya que le faltan sitios de hibridación con los primers
- moléculas b) → No amplifican
- moléculas c) → amplifican linealmente porque sólo tiene un sitio de hibridación con el primer
- moléculas e) → amplifican exponencialmente ya que tiene dos tipos de adaptadores

Finalmente se lleva a cabo una 2ª amplificación por PCR, con el fin de eliminar ruido de fondo y enriquecer las secuencias de los genes expresadas diferencialmente.

Las PCR se realizaron en el ciclador Perkin-Elmer GeneAmp en las siguientes condiciones:

1ª PCR:

Primer: PCR P1 5'ctaatacgactcactatagggc 3'

Condiciones: 94°C 10 seg
66°C 30 seg 32 ciclos
72°C 1.5 min

2ª PCR:

Primers: Nested PCR P1: 5'tcgagcggccgcccgggcaggt 3'

Nested PCR P2: 5'agcgtggtcgcccggaggt 3'

Condiciones: 94°C 10 seg
68°C 30 seg 17 ciclos
72°C 1.5 min

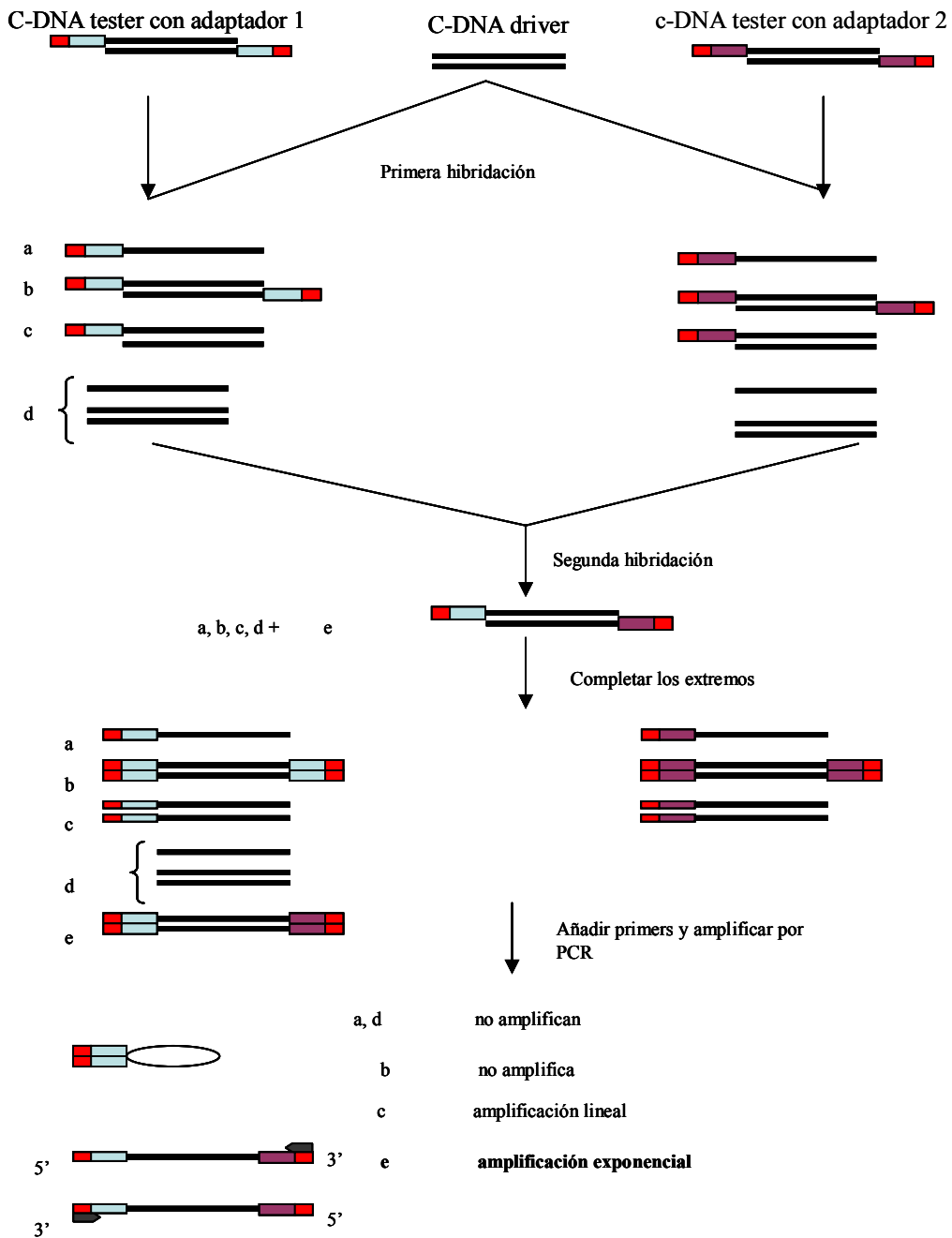


Figura 21.- Ligación de adaptadores, hibridaciones y amplificación por PCR en el diseño de la biblioteca de sustracción de c-DNA

11.- EXTRACCIÓN DE LOS DISTINTOS FRAGMENTOS DE c-DNA EXPRESADOS DIFERENCIALMENTE EN LA BIBLIOTECA DE SUSTRACCIÓN

Para aislar los distintos fragmentos de c-DNA expresados diferencialmente en las distintas líneas metastásicas, los hacemos correr en un gel al 1.5 % (con agarosa LM-2) y usamos para visualizar las bandas cristal violeta (2mg/ml) en vez de bromuro de etidio. El gel se corre a 25Vol a 4°C durante 18-19 horas. Posteriormente, el gel se coloca bajo un transiluminador y se procede a cortar las distintas bandas obtenidas con un bisturí esteril, pasándolas a un tubo ependorff. A continuación se añadió 2.5 veces su volumen de INa y se incubó a 42° en termobloque hasta que funde la agarosa. Seguidamente se añade 1.5vol de “Buffer de unión” (7M Guanidina HCl) a T^a ambiente. Por último, se purificó usando el kit S.N.A.P purification column y se resuspende en 40µl de agua bid., almacenándose a -20°C.

12.- CLONACIÓN DE LAS DISTINTOS FRAGMENTOS DE c-DNA OBTENIDOS

Los distintos fragmentos de c-DNA extraídos y purificados se someten a clonación utilizando el Kit “TOPO TA Cloning® for sequencing” de Invitrogen, el cual está diseñado específicamente para insertar productos de PCR en un vector plasmídico (pCR®4-TOPO®, de 3957 pb) para su posterior secuenciación.

El método seguido fue: se incubó el producto de PCR con el vector junto con solución salina (para aumentar el número de transformantes) a T^a ambiente durante 30 minutos

A continuación, se incubó la reacción de clonación con las bacterias E.coli TOP10 en hielo durante 20 minutos y posteriormente se someten a un choque térmico a 42° durante 35 seg.

Big dye® terminator v.3.1	8µl
Primer	3.2 pmol
Agua destilada c.s.p	20µl

Los primers utilizados fueron

T3 5' attaacctcactaaagga 3'

T7 5' taatacgactcactataggg 3'

Las condiciones de PCR utilizadas en el ciclador fueron:

96° 10 seg

50° 5 seg 25 ciclos

60° 4 min

Posteriormente, las muestras fueron purificadas en columnas (Centri-Sep Columns, Applera) según el protocolo y se desecaron en el liofilizador DNA Speed Vac DNA120 (Savant).

Seguidamente se añade el tampon de carga con formamida y se calienta a 95°, 2min, transcurridos los cuales pasamos las muestras inmediatamente a hielo y procedemos a cargarlas en el gel, previamente atemperado en el secuenciador ABI PRISM 377 DNA Sequencer (Applied Biosystems). En este se realiza la electroforesis usando un programa preestablecido en el secuenciador. Finalmente, el secuenciador realiza el análisis del gel y nos proporciona el electroferograma y las secuencias.

15.- BASES DE DATOS

Las distintas secuencias obtenidas fueron comparadas con distintas bases de datos con el fin de determinar los genes a los que correspondían.

Las bases de datos usadas fueron NCBI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y SANGER (http://www.ensembl.org/Multi/blastview?species=Mus_musculus).

16.- ENSAYOS CELULARES IN VIVO CON RATONES

16.1.- RATONES

Se han utilizado ratones BALB/c inmunocompetentes de 6 a 8 semanas de edad y con un peso medio aproximado de 20 g por ratón, procedentes del animalario del H.U.Virgen de las Nieves. También se han usado ratones atímicos nu/nu procedentes de IFFA-Credo (CRIFFA, Barcelona). Los ratones fueron manipulados en condiciones libres de patógenos y conforme a las normas aprobadas por nuestra institución.

16.2.- PRODUCCIÓN DE METÁSTASIS ESPONTÁNEAS EN RATONES BALB/c INMUNOCOMPETENTES Y EN RATONES NUDE (nu/nu)

Para la producción de metástasis espontáneas se utilizó el clon B9, derivado del tumor GR9, fibrosarcoma inducido químicamente con metilcolantreno en nuestro laboratorio [Garrido A, Pérez M y cols.1986]. El clon B9 se caracteriza por ser H-2 de clase I (-). Este

clon fue reclonado 3 veces mediante el método de pesca en pocillos individuales usando microscopio de contraste de fases. Se mantuvo en cultivo varios pases, mostrando no expresión en superficie de las moléculas K^d, D^d, L^d en condiciones basales y con expresión de estas tres moléculas en superficie tras tratamiento con IFN- γ .

Se inyectaron 5×10^5 células de este clon B9 a nivel subcutáneo en la pata de ratones BALB/c inmunocompetentes y en ratones nude (nu/nu). Se emplearon 3 grupos de ratones con cinco ratones por grupo. Cuando el tumor a nivel de la pata alcanzó 6-8 mm fue extirpado, y se esperó a que produjese metástasis pulmonares, según el procedimiento descrito por [Pérez M, y cols 1990]. Aquellas metástasis visibles macroscópicamente fueron adaptadas a cultivo in vitro según el método descrito anteriormente.

16.3.- CRECIMIENTO E INMUNOGENICIDAD EN RATONES INMUNOCOMPETENTES Y EN RATONES ATÍMICOS

Se establecieron varios grupos de ratones Balb/c inmunocompetentes (5 ratones por grupo), y se inyectaron subcutáneamente en la pata 5×10^5 células de líneas metastásicas derivadas de ratones Balb/c inmunocompetentes (MP5, MP12) y de ratones atímicos (nu/nu) (MN1.1 y MN1.5). También se inyectaron 5×10^5 células del clon B9 como control. El crecimiento tumoral fue vigilado 3 veces a la semana. El mismo procedimiento fue empleado en ratones atímicos (nu/nu).

16.4.- INMUNIZACIÓN/PROTECCIÓN EN RATONES INMUNOCOMPETENTES

16.4.1.- ENSAYOS DE INMUNIZACIÓN

Se establecieron varios grupos de 5 ratones Balb/c inmunocompetentes. En primer lugar, se inyectaron 1×10^6 células derivadas de las líneas metastásicas MN1.1 o MN1.5 en la pata izquierda de cada grupo de ratones. Cuando los tumores regresaron se volvió a reinmunizar con 1×10^6 de células de las líneas MN1.1 y MN1.5. Posteriormente se inyectó 1×10^6 células de líneas derivadas de las metástasis MP5 y MP12 en la pata derecha de los ratones. El crecimiento tumoral fue vigilado 3 veces a la semana.

El mismo ensayo se realizó con distintos clones, así se inyectaron 1×10^6 células derivadas del clon G2 en la pata izquierda del ratón. Cuando el tumor regresó se inyectaron 1×10^6 células derivadas del clon B9 en la pata derecha y se observó el crecimiento tumoral.

16.4.2.- ENSAYOS DE PROTECCIÓN *in situ*

En estos ensayos se establecieron varios grupos de ratones Balb/c inmunocompetentes (5 ratones por grupo). Se inyectaron a nivel subcutáneo en la pata izquierda de cada ratón mezcla de células derivadas de distintas líneas metastásicas MHC de clase I (+) y MHC de clase I (-). Así se inyectaron mezclas de 1×10^6 células de MN1.1+ 5×10^5 células de MP5 y mezcla de 1×10^6 células de MN1.5+ 5×10^5 células de MP12.

Igualmente se realizó este ensayo de protección con distintos clones celulares, inyectando 1×10^6 células de G2 + 5×10^5 células de B9. El crecimiento tumoral fue vigilado 3 veces a la semana.

RESULTADOS

Dentro del sistema tumoral GR9, fibrosarcoma inducido por metilcolantreno, el clon B9 es una línea celular establecida de un tumor primario que presenta las siguientes características: H-2 de clase I negativo en condiciones basales, sin expresión en la superficie celular de las moléculas K^d, D^d, y L^d, mientras que recupera la expresión de estas moléculas tras el tratamiento con IFN- γ ; es muy tumorigénico a nivel local, es decir, presenta una baja inmunogenicidad; posee un bajo poder metastático y las metástasis originadas desde este clon presentan principalmente un fenotipo H-2 distinto del clon B9. Todas estas características hacen que el sistema tumoral B9 sea un modelo ideal para estudiar tanto los mecanismos moleculares que originan la pérdida de expresión de moléculas del MHC, como para determinar la implicación del sistema inmune en el origen de estos fenotipos H-2 alterados.

1.- PRODUCCIÓN DE METÁSTASIS ESPONTÁNEAS EN RATONES BALB/c INMUNOCOMPETENTES Y EN RATONES ATÍMICOS (nu/nu)

Para analizar el papel de las células T en la generación y selección de metástasis con fenotipos H-2 de clase I alterados, realizamos ensayos de producción de metástasis espontáneas con el clon B9 en ratones BALB/c inmunocompetentes y en ratones nude nu/nu, según el método utilizado por Pérez y colaboradores en 1990. Antes de los ensayos, el clon B9 fue reclonado mediante el método de pesca en pocillos individuales utilizando un microscopio de contraste de fases. Los clones obtenidos se mantuvieron en cultivo varios pases mostrando todos un fenotipo H-2 de clase I idéntico, sin expresión en superficie de las moléculas K^d, D^d y L^d en condiciones basales. Se inyectó el mismo subclon B9 a nivel subcutáneo en la pata, tanto en ratones BALB/c inmunocompetentes como en ratones nude. El crecimiento local a nivel de la pata fue similar en ambos grupos de ratones, alrededor de 20 días, hasta que el tumor alcanzó 8 mm y fue extirpado. Sin embargo, las metástasis se generaron de forma más lenta en ratones atímicos que en ratones inmunocompetentes. En ratones BALB/c inmunocompetentes se generaron metástasis pulmonares a los 50 días post-inyección, generándose una sola metástasis por ratón (12 metástasis de 12 ratones) nombradas MP1, MP2.....MP12. Las metástasis pulmonares en los ratones nude aparecieron alrededor del día 65 post-inyección, generándose de 5 a 7 metástasis por ratón, en total 29 metástasis de 5 ratones que fueron adaptadas a cultivo celular y nombradas MN1.1....MN1.5, MN2.1...MN2.5, MN3.1....MN3.7, MN4.1...MN4.5, MN5.1...MN5.7 (**Fig. 22**). Por consiguiente, en ratones BALB/c inmunocompetentes

se generan un menor número de metástasis por ratón y lo hacen en menor tiempo que en ratones nude .

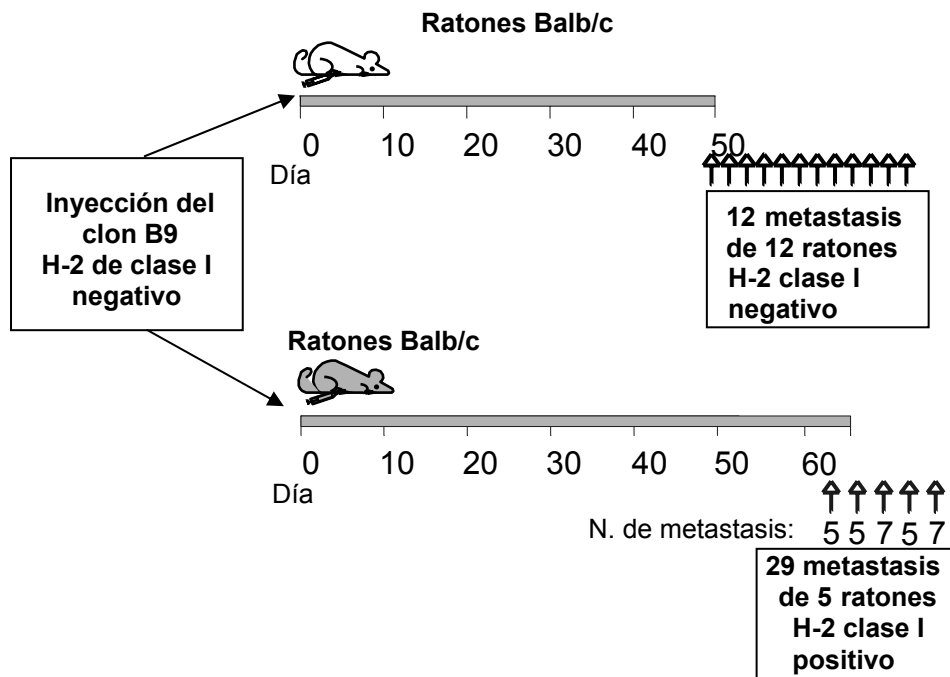


Figura 22- Ensayos de metástasis espontáneas en ratones BALB/c inmunocompetentes y en ratones nude (nu/nu). Se inyectaron 5×10^5 células del clon B9 (H2 de clase I negativo) a nivel subcutáneo en la pata en día 0. Alrededor del día 20 el tumor fue extirpado. En el día 50 se realizó la autopsia a los ratones inmunocompetentes, apareciendo 12 metástasis pulmonares, una por ratón. En ratones atímicos se obtuvieron metástasis pulmonares en el día 65, de 5 a 7 por ratón (29 metástasis de 5 ratones).

1.1.- EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS H-2 DE CLASE I EN SUPERFICIE EN LAS METÁSTASIS OBTENIDAS EN RATONES BALB/c INMUNOCOMPETENTES Y EN RATONES NUDE (nu/nu)

Las metástasis espontáneas generadas tanto en ratones BALB/c inmunocompetentes como en ratones atímicos fueron tipadas para la expresión en superficie de las moléculas K^d, D^d y L^d por citometría de flujo, utilizando anticuerpos monoclonales específicos. En estos ensayos podemos observar que todas las metástasis generadas en ratones BALB/c inmunocompetentes se mantienen negativas para la expresión de moléculas H-2 de clase I en condiciones basales, al igual que el clon B9 del que proceden (**Fig. 23, Tabla 1**).

Sin embargo, cuando el mismo subclon B9 fue inyectado en ratones BALB/c nude (nu/nu), todas las metástasis generadas fueron H-2 de clase I positivas para las tres moléculas K^d, D^d y L^d en condiciones basales (**Fig. 24, Tabla 1**). La **Figura 24** muestra la expresión de los nódulos metastásicos más representativos obtenidos en cada ratón nude. Todos ellos presentan una expresión similar en superficie de las tres moléculas de clase I, en particular, aquellas metástasis derivadas de los ratones nude 1 y 2 presentan una mayor expresión de las moléculas K^d, D^d, y L^d. Es importante observar que el tumor crecido localmente a nivel de la pata tanto en ratones nude como en ratones inmunocompetentes es siempre negativo para la expresión en superficie de las moléculas K^d, D^d, y L^d en condiciones basales (**Fig. 23, Fig. 24 y Tabla 1**).

Cuando los distintos nódulos metastásicos fueron tratados con IFN- γ y posteriormente tipados por FACS, se observó dos fenotipos distintos en ratones

inmunocompetentes: unos recuperaban la expresión de las tres moléculas K^d, D^d y L^d al igual que el clon B9, mientras que otros recuperaban la expresión de las moléculas K^d y D^d pero no recuperaban L^d. En ratones nude se observó un incremento en la expresión de las tres moléculas K^d, D^d y L^d.

Tabla 1.- Metástasis espontáneas derivadas del clon B9

Ratones	BALB/c Inmunocompetentes	BALB/c atímicos (nu/nu)
Células inyectadas ¹	clon B9	clon B9
Nº de metástasis	12	29
Nº de metástasis por ratón	1	5-7
Expresión H2 tumor local ²	Negativa	Negativa
Expresión H2 metástasis basal ³	Negativa	Positiva
Expresión H2 metástasis IFN- γ ⁴	K ^d positiva	Positiva
	D ^d positiva	Positiva
	L ^d negativa ⁵	Positiva

¹Células tumorales inyectadas subcutáneamente a nivel de la pata para generar metástasis espontáneas.²Expresión de las moléculas H-2 de clase I en el tumor local a nivel de la pata tras la inyección de células del clon B9.³Expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I de las metástasis pulmonares en condiciones basales.⁴Expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I en las metástasis pulmonares tras tratamiento con IFN- γ .⁵El 83% de las metástasis no presentaban la molécula L^d en superficie, esta molécula fue positiva para el 17% de las metástasis.

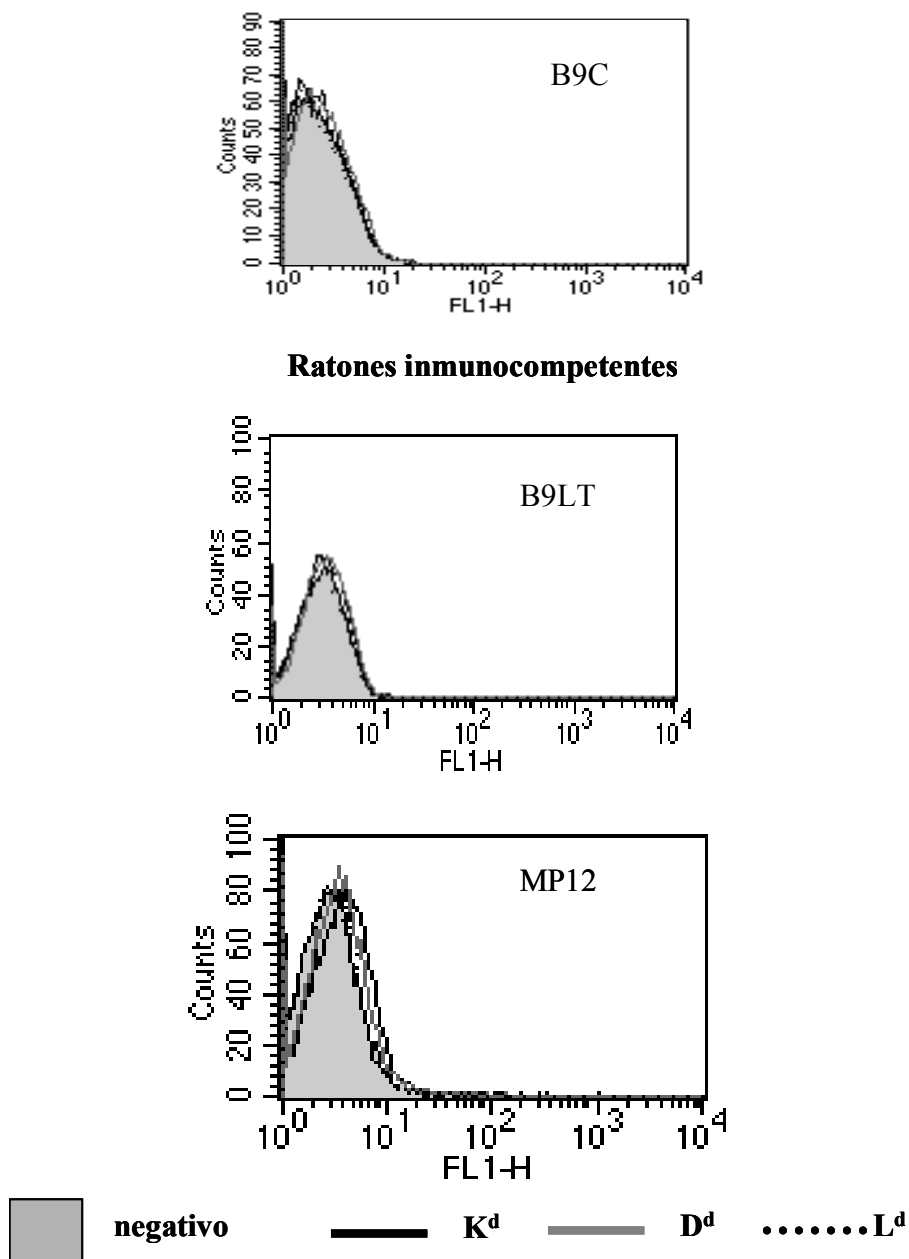


Figura 23.- Expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I (K, D y L) en condiciones basales en ratones inmunocompetentes.

Expresión del subclon B9 (B9C); expresión en el tumor local a nivel de la pata, en ratones inmunocompetentes (B9LT), ambos H-2 de clase I (-); expresión de la metástasis de ratones inmunocompetentes (MP12), H-2 de clase I (-).

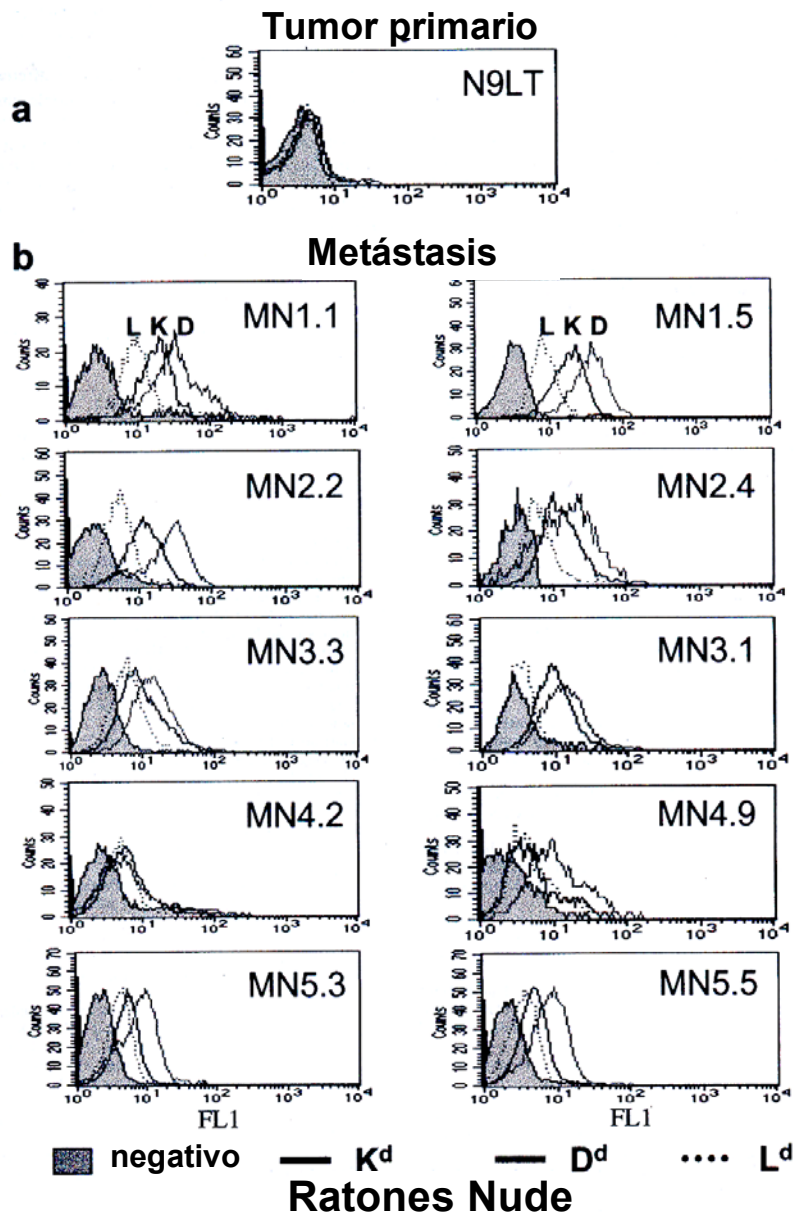
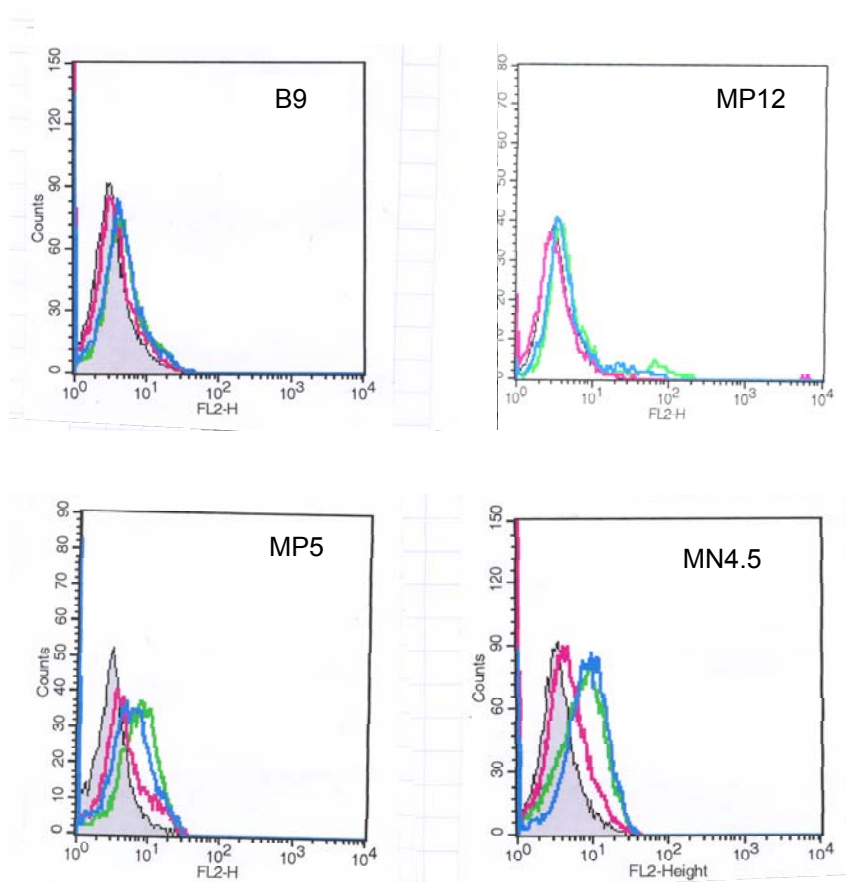


Figura 24.- Expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I en metástasis derivadas de ratones nude. (a) Expresión en el tumor local a nivel de la pata en ratones nude (N9LT), H-2 de clase I (-). (b) Expresión de las metástasis pulmonares en ratones nude. Todas las metástasis presentan una expresión similar para las tres moléculas K, D y L

1.2.- EXPRESIÓN EN SUPERFICIE DE MOLÉCULAS NO CLÁSICAS Y DE CLASE II EN METÁSTASIS OBTENIDAS EN RATONES BALB/c INMUNOCOMPETENTES Y EN RATONES NUDE (nu/nu)

En este ensayo quisimos analizar la expresión en superficie de las moléculas no clásicas Qa1^b y Qa2 o moléculas clase Ib, así como la expresión de las moléculas I-A y I-E o moléculas de clase II, con el fin de tener un tipaje completo de la expresión de moléculas en superficie en las distintas metástasis. Para ello realizamos una inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales específicos y posteriormente análisis por citometría de flujo (FACS). En la **Figura 25** podemos observar que el clon B9 es negativo para la expresión tanto de moléculas de clase Ib como de moléculas de clase II. En las metástasis obtenidas en ratones inmunocompetentes nos encontramos algunas idénticas al B9, negativas para clase Ib y clase II (MP12), y otras como la MP5 débilmente positivas para Qa-1^b y clase II y negativas para Qa-2. Las metástasis derivadas de ratones nude presentan todas una mayor expresión de clase II y de las moléculas Qa-1^b y una débil expresión de las moléculas Qa-2^b.



Neg
 Qa-1b
 Qa-2
 Clase II

Figura 25.- Expresión de moléculas no clásicas y de clase II en las distintas líneas metastásicas.

2.- ENSAYOS DE ESTABILIZACION DE LA EXPRESIÓN EN SUPERFICIE DE LAS MOLÉCULAS H-2 DE CLASE I

Los resultados anteriores muestran la ausencia de expresión en superficie de las moléculas de clase I clásicas en algunas de las líneas estudiadas. Para determinar si existe expresión de estas moléculas a nivel intracitoplasmático realizamos ensayos de estabilización en superficie para estas moléculas. Las moléculas de clase I son inestables en superficie por ausencia de β_2 -microglobulina y/o péptidos, y pueden ser estabilizadas vacías en la superficie celular manteniendo las células a baja temperatura. Células del clon B9 y de la metástasis MP12 se mantuvieron en cultivo en condiciones fisiológicas (37°C) y a baja temperatura (26°C) durante toda la noche (18h) en presencia y ausencia de β_2 -microglobulina exógena. La **Figura 26** muestra que las líneas celulares incubadas a baja temperatura, 26°C, y en presencia de β_2 -microglobulina exógena recuperan parcialmente la expresión de las moléculas H-2 de clase I, K^d, D^d y L^d. Estos resultados muestran la existencia de moléculas del MHC de clase I a nivel intracitoplasmático y sugieren que la falta de expresión en superficie de las moléculas del MHC de clase I en el clon B9 y en las metástasis derivadas de ratones inmunocompetentes tales como MP12, no es debida a un defecto transcripcional o traduccional en los genes MHC de clase I, sino a un déficit de β_2 -microglobulina o alteraciones en los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM) que les impidan cargar los péptidos.

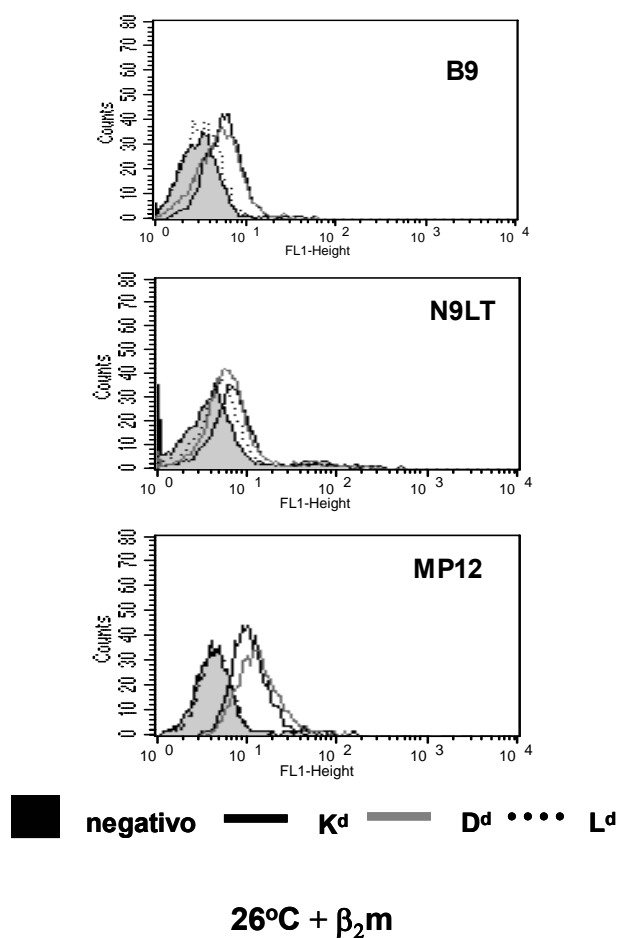


Figura 26.- Expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I en líneas celulares cultivadas a 26°C y en presencia de beta2-microglobulina durante 18 horas. Posteriormente se midió la expresión de las moléculas de clase I por citometría de flujo. Se muestran los resultados del clon B9 (B9), del tumor local a nivel de la pata en ratones nude (N9LT), y de la metástasis derivada de ratones inmunocompetentes (MP12). En todos ellos hay una recuperación parcial de la expresión de moléculas de clase I.

3.- ENSAYO DE DESMETILACIÓN CON 5-AZA-2'DEOXICITIDINA

Las alteraciones del DNA por metilación es un mecanismo que contribuye en el proceso del desarrollo del tumor, de tal forma que algunos genes supresores de tumores se encuentran silenciados a nivel transcripcional por la hipermetilación de los promotores. Para asegurarnos de que en nuestro sistema tumoral no está implicado este mecanismo hemos llevado a cabo un ensayo de desmetilación utilizando el agente 5-aza-2'deoxicitidina, el cual inhibe la enzima DNA metil transferasa 1 (DNMT1). Si este compuesto es capaz de reactivar la expresión del gen silenciado sería evidente que existe un mecanismo de metilación implicado en la distinta expresión de moléculas de clase I en superficie en las metástasis derivadas de ratones inmunocompetentes y de ratones nude.

Para llevar a cabo este ensayo se incubaron las células a una concentración 1µM de 5-aza-2'deoxicitidina en el medio de cultivo, manteniendo las distintas líneas en cultivo durante 3 días y cambiando el medio cada 24 horas. Los resultados muestran que no existen diferencias de expresión de las moléculas H-2 de clase I en superficie en las distintas líneas con o sin el agente desmetilante. Así, las células del clon B9, y de la metástasis MP5, que carecen de expresión de las moléculas de clase I en superficie en condiciones basales, siguen siendo negativas tras la incubación con 5-aza-2'deoxicitidina (**Fig. 27**). Igualmente, la metástasis MN1.5 tampoco modifica la expresión en superficie de las moléculas K, D y L tras el tratamiento con este agente (**Fig. 27**).

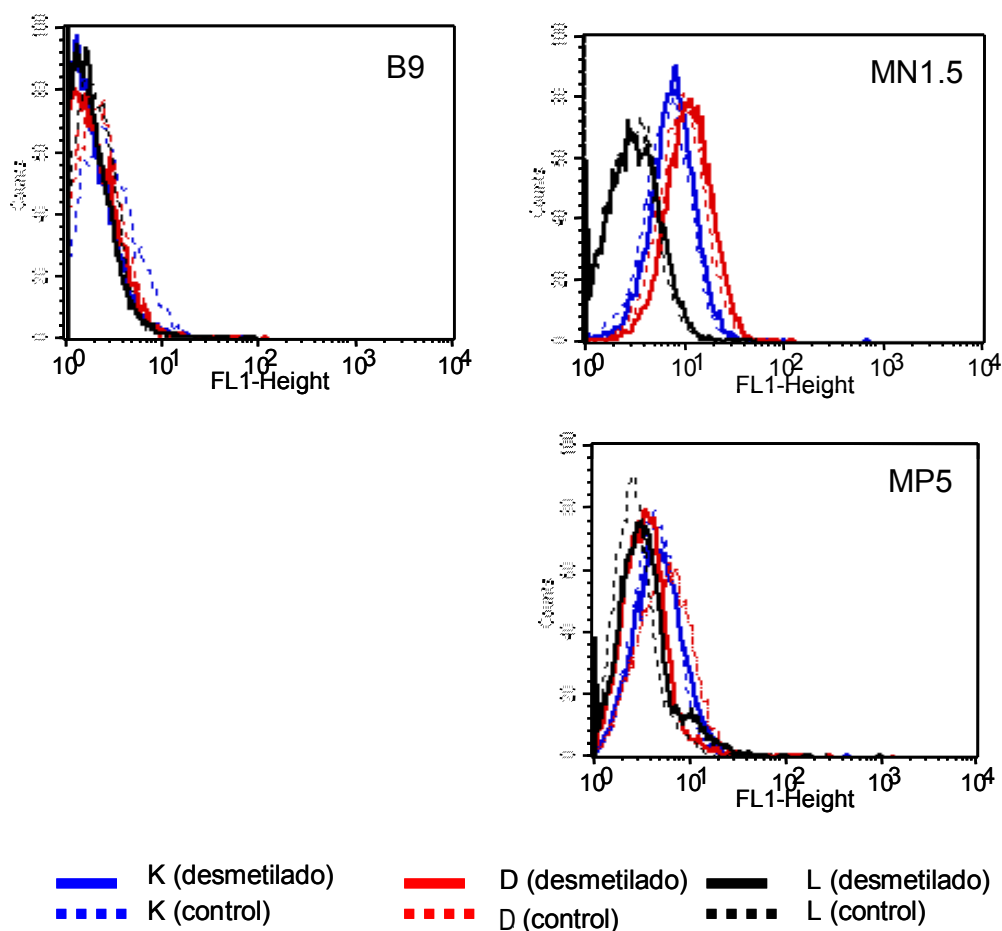


Figura 27.- Ensayo de desmetilación con 5’deoxi-2-azacitidina. Las células de las distintas líneas metastásicas fueron cultivadas durante 3 días, cambiando el medio cada 24h con y sin agente desmetilante 5-aza2’deoxicitidina. Posteriormente fueron tipadas por FACS para la expresión en superficie de las tres moléculas de clase I (K, D, L). La figura muestra que no existe diferencia de expresión entre las líneas tratadas con o sin agente desmetilante.

4.- ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN A NIVEL TRANSCRIPCIONAL DE LAS MOLÉCULAS H-2 DE CLASE I Y DE LA β_2 -MICROGLOBULINA

Con el fin de conocer el mecanismo implicado en la falta de expresión en superficie de las moléculas MHC de clase I, y según los datos obtenidos en experimentos anteriores, decidimos en primer lugar analizar y comparar la expresión a nivel de transcripción mediante RT-PCR semicuantitativa de β_2 -microglobulina en el clon B9 y en las diferentes metástasis. En primer lugar, quisimos comprobar los niveles de m-RNA de las moléculas H-2 de clase I, que según los datos obtenidos de los ensayos de estabilización en superficie, debería ser semejante en todas ellas. Se extrajo m-RNA de las diferentes líneas y se obtuvo el c-DNA. La calidad y cantidad del c-DNA se midió mediante dos genes control GAPDH y β -actina. En la **figura 28** podemos ver que los c-DNAs obtenidos presentan similares características.

A continuación, amplificamos mediante PCR las tres moléculas H-2 de clase I conjuntamente, y pudimos observar que la transcripción es similar en todas las líneas estudiadas (**Fig. 29**). La expresión es positiva tanto en el clon B9, en el tumor local a nivel de la pata en ratones nude (N9.1), así como en todas las metástasis derivadas de ratones inmunocompetentes que según recordamos todas ellas carecían de expresión de estas moléculas H-2 de clase I en superficie. Esta expresión a nivel de m-RNA es similar a la encontrada en las metástasis derivadas de ratones nude, las cuales sí expresan estas moléculas en superficie (**Fig. 29**). Igualmente, cuando estudiamos la transcripción para el gen de la β_2 -microglobulina pudimos comprobar que existen niveles de m-RNA para la β_2 -microglobulina en todas estas líneas (**Fig. 29**).

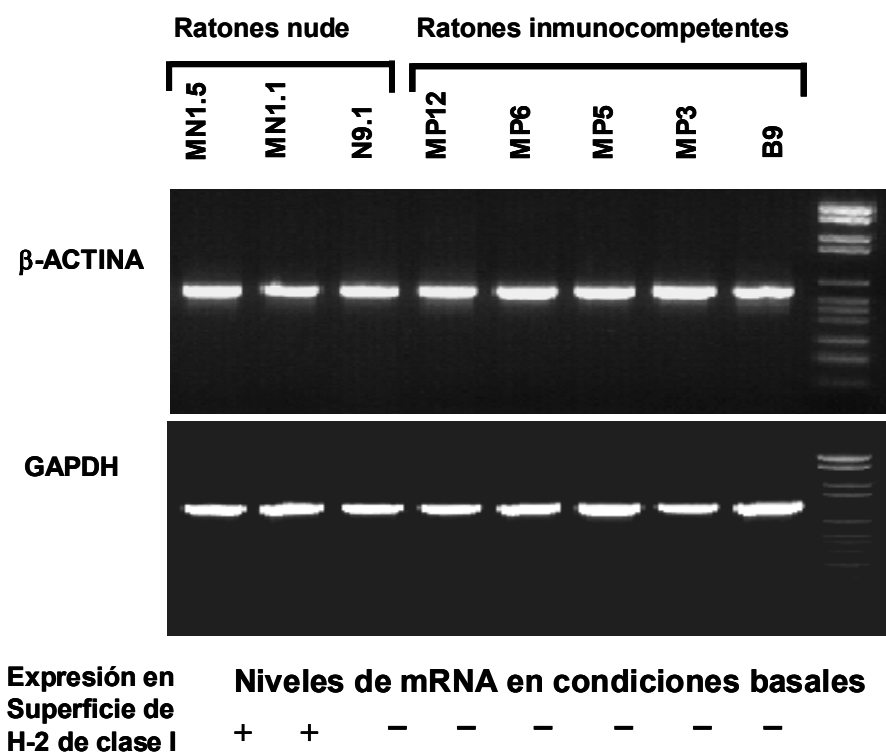


Figura 28.- Transcripción de los genes control: b-ACTINA y GADPH.
 La calidad y la cantidad de los c-DNAs obtenidos de las distintas líneas metastásicas estudiadas se midió utilizando estos dos genes control. La figura muestra que los c-DNAs muestran similares características

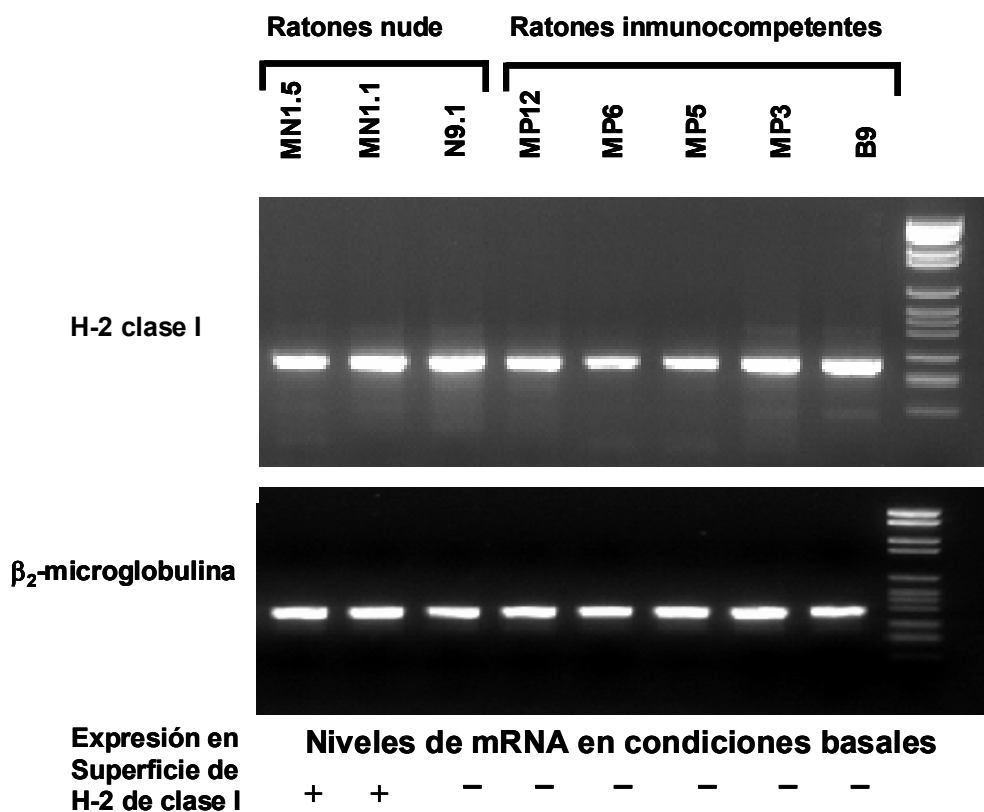


Figura 29.- Transcripción de las moléculas H-2 de clase I y b2-microglobulina
 Se amplificó las moléculas H-2 de clase I y b2-microglobulina mediante primers específicos. Se observó una transcripción similar en todas las líneas estudiadas, incluso en las líneas que carecen de expresión de las moléculas H-2 de clase I en superficie.

5.- ESTUDIO DE LA MAQUINARIA DE PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO (APM)

Según los resultados obtenidos en el ensayo anterior pensamos que la falta de expresión en superficie de las moléculas MHC de clase I en ciertas líneas metastásicas podría deberse a un fallo en la maquinaria de procesamiento antigénico, y por tanto procedimos al estudio de los distintos componentes de esta maquinaria de procesamiento antigénico (APM).

Se analizaron distintos componentes del complejo de carga peptídico tales como TAP-1, TAP-2, Tapasina, ERP-59, ER-60, las chaperonas calnexina y calreticulina, los componentes del proteosoma LMP-2, LMP-7, LMP-10 y los activadores de éste PA28 α y PA28 β . Estos componentes del APM se analizaron utilizando primers específicos mediante RT-PCR semicuantitativa. Para ello se ajustaron el número de ciclos (25-35 ciclos), las condiciones de PCR y la cantidad de c-DNA a utilizar (de 1 a 5 μ l de c-DNA en un volumen de 50 μ l). Cuando se analizaron las moléculas TAP-1 y TAP-2 en condiciones basales, se observó una falta o baja expresión de estas moléculas en aquellas líneas que no expresaban moléculas MHC de clase I en superficie, es decir, en el clon B9, N9.1 (tumor local a nivel de la pata en ratones nude) y en las distintas metástasis derivadas de ratones inmunocompetentes: MP3, MP5, MP6, MP12 (**Fig. 30**). Sin embargo estas moléculas presentan una transcripción normal en las metástasis derivadas de ratones nude: MN1.1 y MN1.5 (MHC de clase I + en superficie) (**Fig. 30**). A continuación se analizó la transcripción de los genes de las subunidades del proteosoma LMP-2, LMP-7 y LMP-10 (**Fig. 31**) y según muestran los resultados, existe

una falta de expresión en las líneas que carecen de la expresión de las moléculas H-2 de clase I en superficie. Cuando se analizó la transcripción de las moléculas Tapasina y calnexina (**Fig. 32**) ocurrió igualmente, existe una falta de expresión en aquellas líneas que no expresan las moléculas de clase I en superficie (B9, N9.1, MP3, MP5, MP6, MP12), expresándose normalmente en las líneas H-2 de clase I (+) en superficie (MN1.1 y MN1.5).

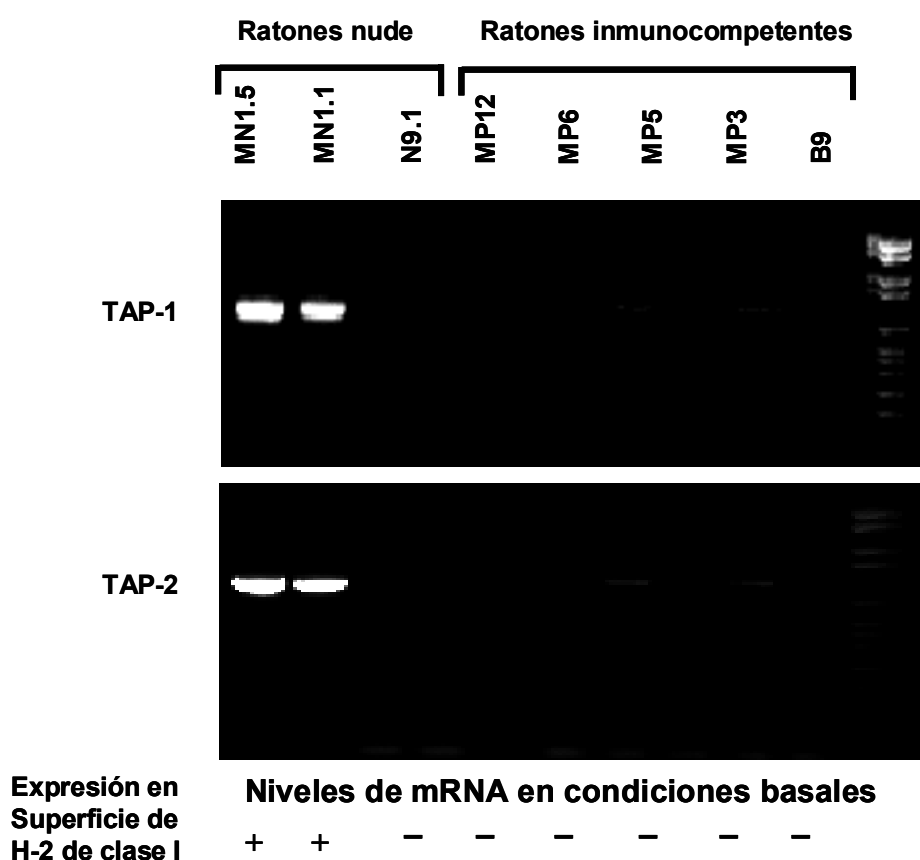


Figura 30- Transcripción de TAP-1 y TAP-2 en condiciones basales. Se analizó la transcripción de estos transportadores por RT-PCR utilizando primers específicos. La figura muestra una falta de expresión de estas moléculas en las líneas celulares que carecen de expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I.

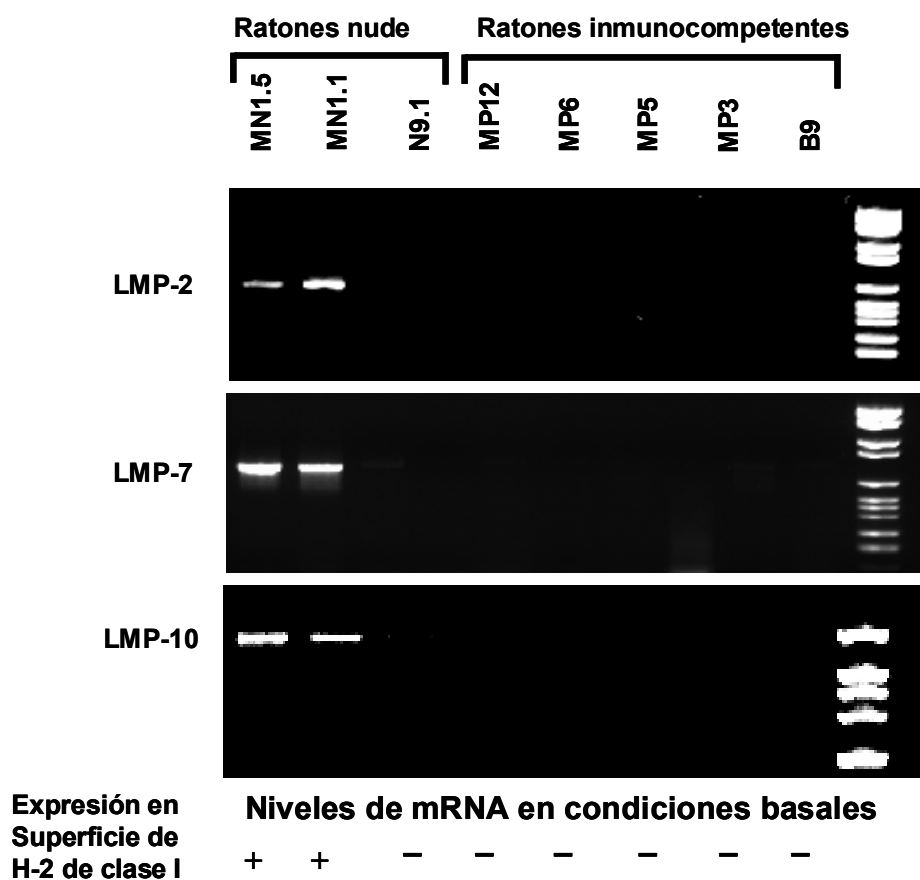


Figura 31.- Transcripción de las moléculas LMP-2, LMP7 y LMP10 en condiciones basales. La figura muestra la RT-PCR realizada con primers específicos para las tres subunidades del proteosoma. Se observa una falta de expresión de las tres moléculas en las líneas que carecen de expresión en superficie de las moléculas de clase I.

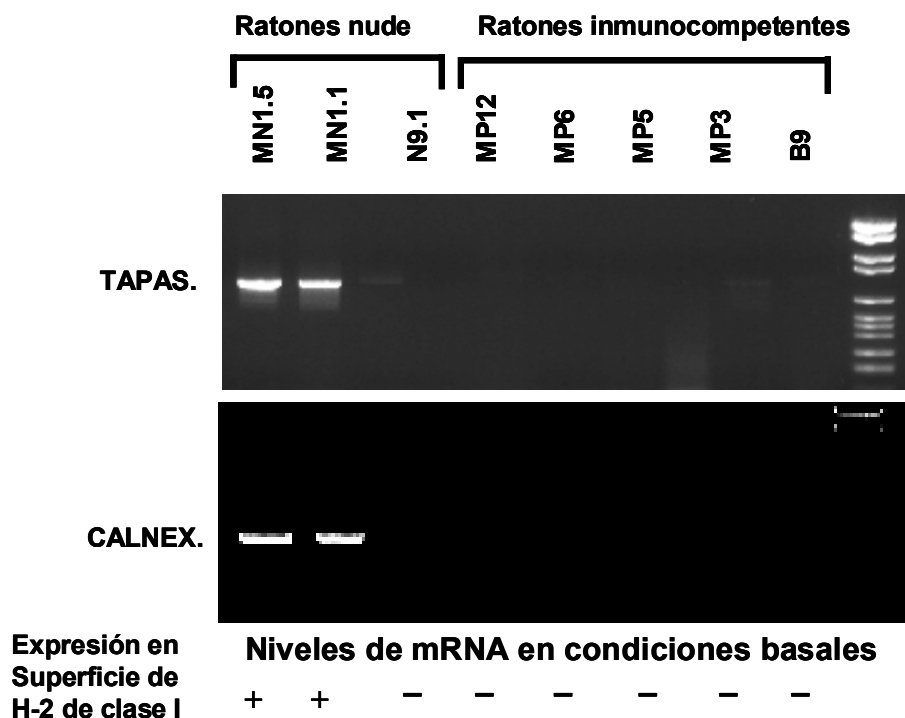


Figura 32.- Transcripción de Tapasina y calnexina en condiciones basales. Se analizó la expresión de m-RNA de estas moléculas mediante RT-PCR, observándose una falta de expresión en las líneas que no expresan moléculas de clase I en superficie, expresándose normalmente en las líneas H-2 de clase I + en superficie.

Sin embargo, cuando se analizaron otros componentes del APM tales como la calreticulina, ER60 y ERP59 se observó que existía una transcripción muy similar en todas las líneas estudiadas (**Fig. 33**). Del mismo modo, los activadores del proteosoma PA28 α y PA28 β (**Fig. 34**) presentaron una expresión similar en todas estas líneas, independientemente de que expresen o no moléculas H-2 de clase I en superficie. Por tanto este ensayo, el cual se repitió al menos tres veces con distintos lotes de m-RNA, muestra una falta de expresión coordinada a nivel de transcripción en ciertos componentes del APM en condiciones basales, tales como TAP-1, TAP-2, LMP-2,

LMP-7, LMP-10, Tapasina y Calnexina, que es la causa de la falta de expresión en superficie de las moléculas H-2 de clase I. Otros componentes del APM tales como la calreticulina, ERP-59, ER-60, PA28 α y PA28 β presentan una transcripción normal.

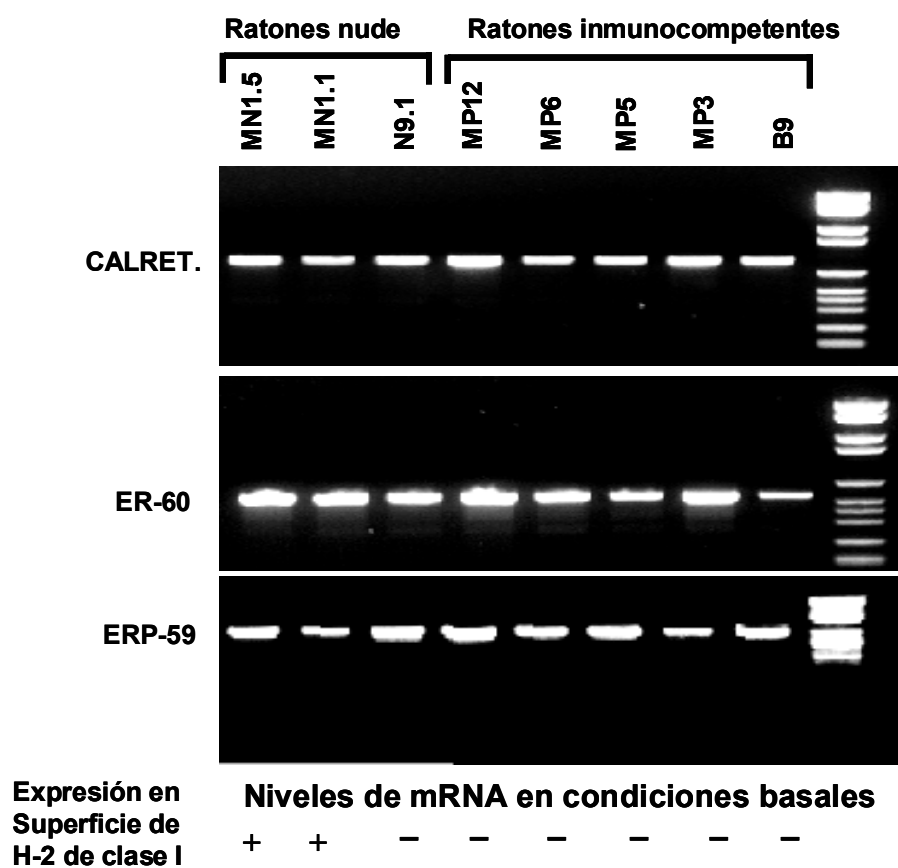


Figura 33.- Transcripción de las moléculas Calreticulina, ER-60 y ERP-59. Se analizó la transcripción de estas tres moléculas mediante RT-PCR semicuantitativa utilizando primers específicos. La figura muestra una transcripción similar en todas las líneas estudiadas.

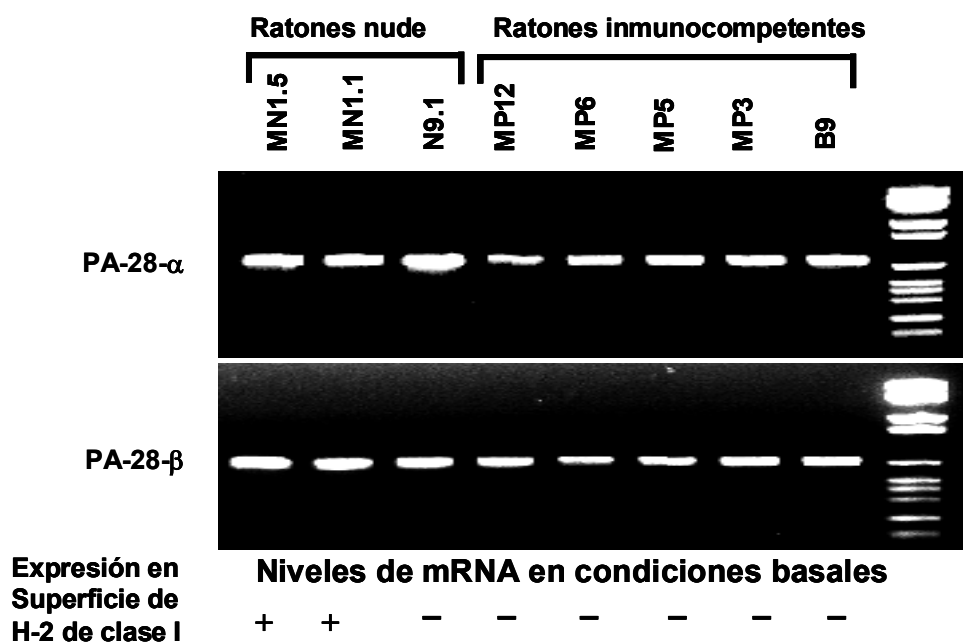


Figura 34.- Transcripción de las moléculas PA-28- α y PA-28- β en condiciones basales. El análisis de la expresión de mRNA mediante RT-PCR muestra una expresión similar en todas las líneas estudiadas.

6.- TRATAMIENTO DE LAS DISTINTAS LÍNEAS CON IFN- γ

Posteriormente, las distintas líneas estudiadas fueron tratadas con 100 U/mL de IFN- γ durante 48h, y se midió la expresión mediante RT-PCR de los distintos genes que no se expresan en condiciones basales en las líneas que carecen de expresión de moléculas H-2 de clase I en superficie. Los resultados mostraron una expresión positiva en todos los genes estudiados: TAP-1, TAP-2, LMP-2, LMP-7, LMP-10, Tapasina y Calnexina en las distintas líneas celulares derivadas tanto de ratones inmunocompetentes como de ratones nude (**Fig. 35**). Por tanto, podemos decir, que la recuperación de la transcripción

de estos genes tras tratamiento con IFN- γ , implica la expresión en superficie de las moléculas de clase I.

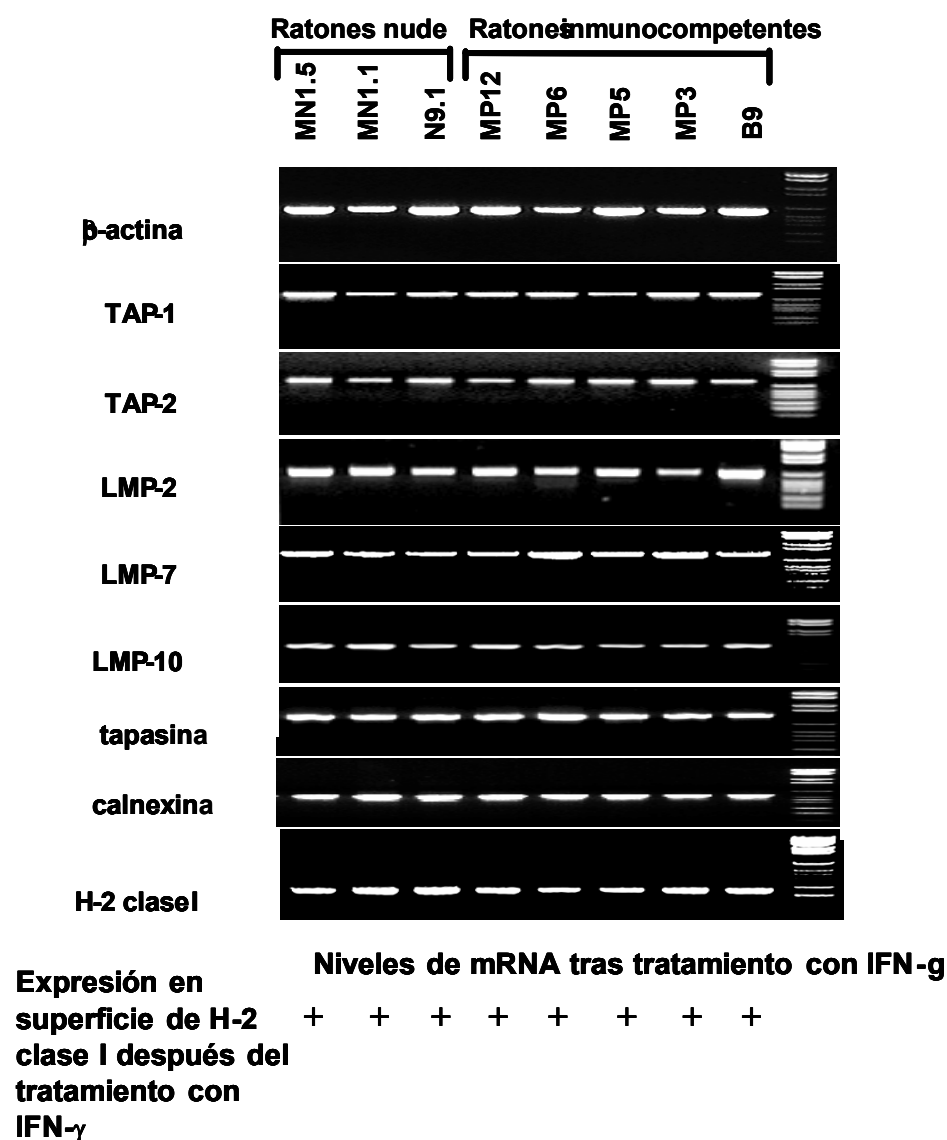


Figura 35.- Transcripción de los diferentes componentes del APM tras tratamiento con IFN- γ . Las distintas líneas estudiadas fueron tratadas con 100 U/ml de IFN-g durante 48h y posteriormente se realizó RT-PCR utilizando primers específicos para los genes del APM. La figura muestra que no solo se recupera la expresión de los distintos genes, sino que también se recupera la expresión de las moléculas H-2 de clase I en superficie.

7.- ENSAYOS DE CRECIMIENTO E INMUNOGENICIDAD EN RATONES BALB/c INMUNOCOMPETENTES Y NUDE (nu/nu).

En los ensayos anteriores pudimos observar la existencia de una falta de expresión coordinada en ciertos componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM), presente en aquellas líneas celulares que carecían de expresión de las moléculas H-2 de clase I en superficie. Los ensayos in vivo que mostramos a continuación fueron realizados con el fin de observar cómo afecta la expresión o no de los genes del APM y de las moléculas H-2 de clase I en superficie al crecimiento local del tumor y a la capacidad tumorigénica e inmunogenicidad del mismo.

En primer lugar, se llevaron a cabo ensayos de crecimiento local e inmunogenicidad en ratones BALB/c inmunocompetentes. Los ratones fueron distribuidos por grupos (5 ratones por grupo), y se inyectaron 5×10^5 células derivadas de distintas líneas metastásicas a nivel subcutáneo en la pata. Las líneas metastásicas utilizadas fueron MP5 y MP12, derivadas de ratones inmunocompetentes y MN1.1 y MN1.5 derivadas de ratones nude. También se inyectó células del clon B9 como control. El crecimiento tumoral fue vigilado cada 3 veces a la semana. Según podemos observar en la **Figura 36**, el crecimiento local fue distinto en cada línea metastásica. Así, las líneas celulares derivadas de las metástasis MP5 y MP12, crecieron hasta 14mm y 11mm respectivamente en 25 días. Sin embargo, las líneas celulares derivadas de las metástasis MN1.1 y MN1.5 crecieron de forma más lenta, alcanzando un máximo de 5mm y 4mm respectivamente, en 15 días, para posteriormente comenzar a regresar, siendo totalmente rechazadas a los 25 días (**Fig. 36**). Estos experimentos fueron repetidos al menos tres veces. También inyectamos un mayor número de células (1.5×10^6 por ratón), e

igualmente las metástasis MN1.1 y MN1.5 fueron rechazadas. Estos resultados muestran que las variantes metastásicas MN1.1 y MN1.5 derivadas de ratones nude (nu/nu) son muy inmunógenas y que presentan una mayor inmunogenicidad que las variantes metastásicas MP5 y MP12, derivadas de ratones inmunocompetentes.

La línea metastásica MP12 presenta un fenotipo H-2 de clase I negativo en condiciones basales, y tras tratamiento con IFN- γ recupera la expresión en superficie de las tres moléculas K^d, D^d y L^d, tal y como ocurre con el clon B9. El crecimiento local e inmunogenicidad es idéntico en ambas líneas (**Fig. 36**). La metástasis MP5 presenta un fenotipo H-2 de clase I negativo en condiciones basales, similar al clon B9, pero sin embargo no recupera la expresión de la molécula L^d tras ser tratada con IFN- γ . Como podemos observar, su crecimiento local es más rápido que el clon B9 y la metástasis MP12 (**Fig. 36**). Por el contrario, las metástasis MN1.1 y MN1.5 son H-2 de clase I positivas para las tres moléculas K^d, D^d y L^d y su crecimiento local es más lento que el del clon B9 y las metástasis MP5 y MP12 (**Fig. 36**). Estos resultados muestran una correlación directa entre la expresión en superficie de las moléculas MHC de clase I e inmunogenicidad y una correlación inversa entre estos con el crecimiento local del tumor.

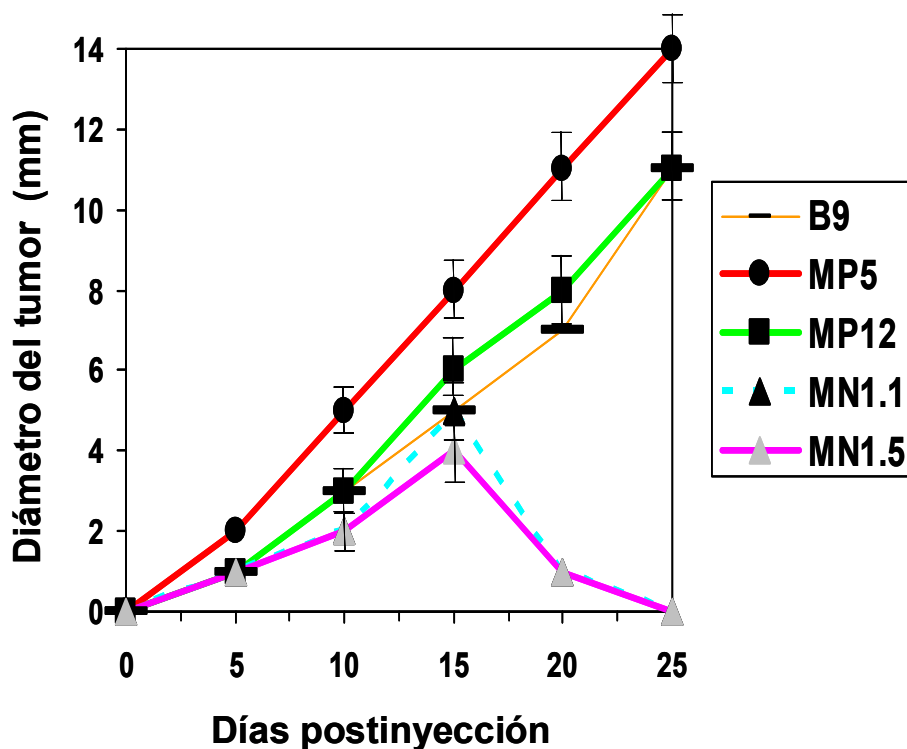


Figura 36.- Crecimiento local e inmunogenicidad en ratones inmunocompetentes. Se inyectaron de 0.5×10^6 a 1.5×10^6 células de diferentes líneas metastásicas a nivel subcutáneo en la pata de ratones inmunocompetentes. Se observó el crecimiento tumoral y se midió el diámetro de los tumores. Los tumores originados por las líneas MN1.1 y MN1.5, obtenidas de ratones nude, crecieron más despacio y fueron finalmente rechazados. La figura muestra la media del diámetro del tumor +sd de varios grupos de ratones.

Posteriormente, se llevaron a cabo estos ensayos de crecimiento local e inmunogenicidad en ratones nude (nu/nu). Para ello, del mismo modo que en los ensayos anteriores, se inyectaron 5×10^5 células derivadas de distintas líneas metastásicas (MP5, MP12, MN1.1 Y MN1.5) a nivel subcutáneo en la pata de ratones nude, vigilando el crecimiento tumoral 3 veces a la semana. El clon B9 se inyectó como control. Todas las líneas metastásicas crecieron más rápidamente en ratones nude que en ratones inmunocompetentes. Así, las líneas celulares derivadas de las metástasis MP5 y MP12 crecieron hasta 20mm y 18mm respectivamente en 25 días (Fig. 37). Igualmente,

las líneas celulares derivadas de las metástasis MN1.1 y MN1.5, crecieron de forma más lenta que las anteriores, alcanzando 10mm y 8mm respectivamente, pero a diferencia de lo que ocurría en ratones inmunocompetentes, estas no regresaban y por tanto no eran finalmente rechazadas en ratones nude (Fig. 37). Estos estudios muestran que tanto las metástasis MP5 y MP12 (H-2 de clase I negativas en superficie) como las metástasis MN1.1 como MN1.5 (H-2 de clase I positivas en superficie) crecen más rápidamente presentando un mayor crecimiento local y una menor inmunogenicidad en ratones nude que en ratones inmunocompetentes.

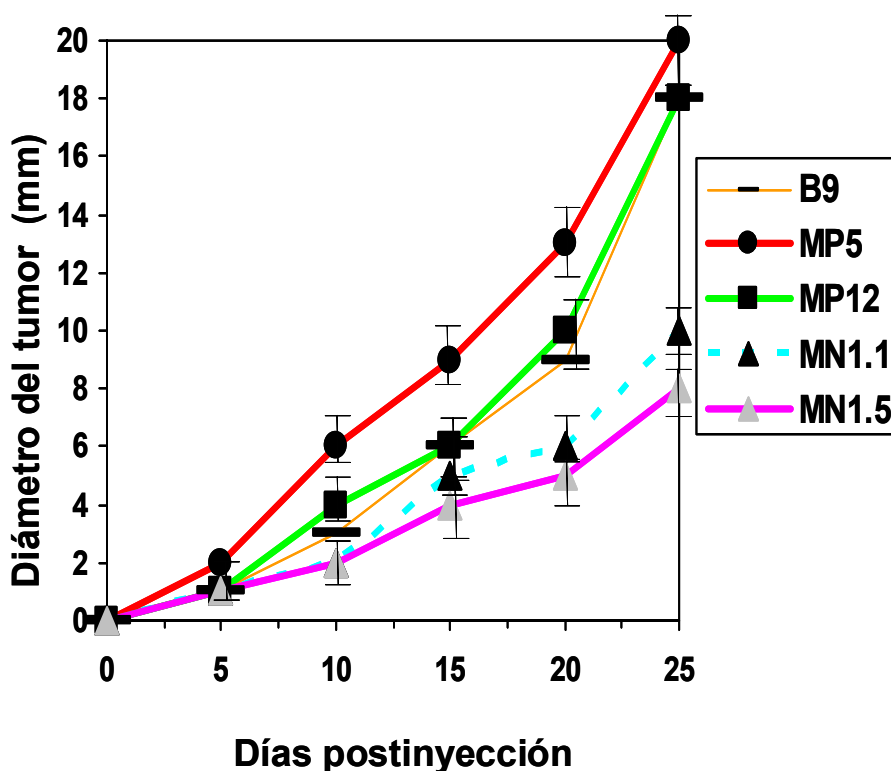


Figura 37.- Crecimiento e inmunogenicidad en ratones nude. Se inyectaron de 0.5×10^6 a 1.5×10^6 células de diferentes líneas metastásicas a nivel subcutáneo en la pata de ratones nude. Se observó el crecimiento tumoral y se midió el diámetro de los tumores. Todas las líneas metastásicas crecieron más rápidamente en ratones nude que en ratones inmunocompetentes. Los tumores originados por las líneas derivadas de ratones nude MN1.1 y MN1.5 crecieron de forma más lenta que el resto, pero no son finalmente rechazadas

Hay que destacar que a diferencia de lo que ocurre en ratones inmunocompetentes, MN1.1 y MN1.5 no regresan en ratones nude ni son finalmente rechazadas, incluso dan lugar a la producción un alto número de macrometástasis pulmonares a los 20-25 días (**Fig. 38**). Estos resultados sugieren una gran implicación de las células T en el crecimiento local y rechazo de estos tumores en ratones inmunocompetentes.

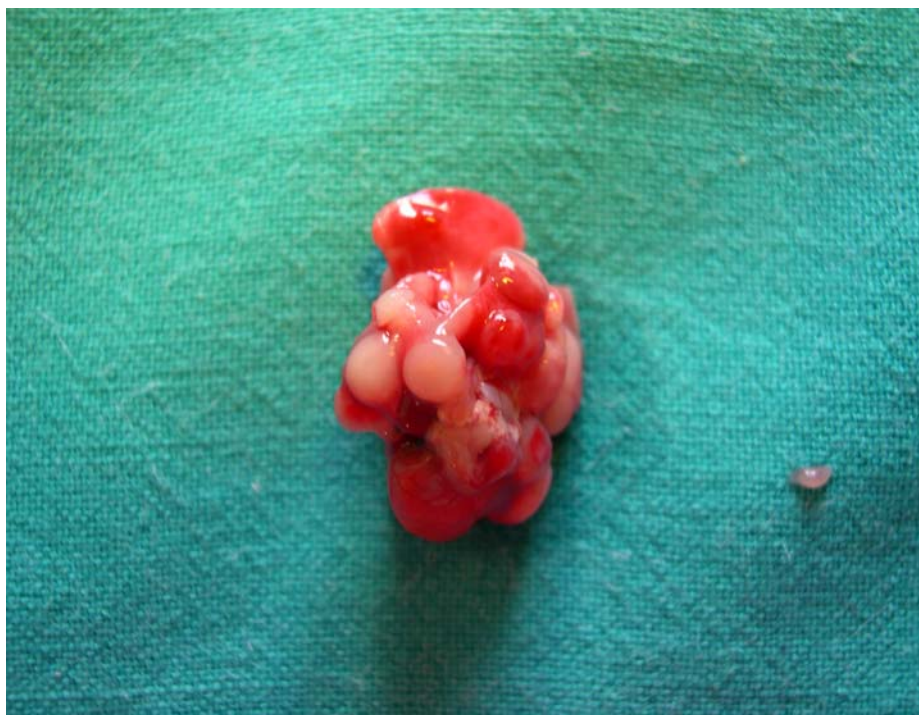


Figura 38.- Metástasis pulmonar. Estas metástasis se produjeron tras la inyección de la línea MN1.5 en ratones nude. A diferencia de lo que ocurre en ratones inmunocompetentes, estas células no solo no regresan, ni son finalmente rechazadas en ratones nude, sino que además metastatizan. En la figura se observan de 6-8 nódulos metastásicos.

8.- ENSAYOS DE PROTECCIÓN E INMUNIZACIÓN EN RATONES BALB/c INMUNOCOMPETENTES

En los ensayos de crecimiento local e inmunogenicidad llevados a cabo en ratones inmunocompetentes observamos que en las distintas metástasis existía una correlación directa entre la expresión de moléculas H-2 de clase I en superficie e inmunogenicidad, y una correlación inversa con el crecimiento local del tumor. A continuación, quisimos ver si las metástasis muy inmunógenas, H-2 de clase I (+) (MN1.1 y MN1.5), protegían a los ratones inmunocompetentes frente al crecimiento de las metástasis H-2 de clase I (-) (MP5 y MP12).

Con este fin, realizamos ensayos de protección cruzada e inmunización a largo plazo. Se establecieron dos grupos de 4 ratones y se les inyectó 1×10^6 células de las líneas metastásicas MN1.1 y MN1.5 subcutáneamente a nivel de la pata. Asimismo se inyectó el clon G2 (H-2 de clase I positivo), a nivel subcutáneo en la pata de otros dos grupos de 4 ratones con el fin de observar si protege frente al crecimiento del clon B9 (H-2 de clase I negativo). Cuando los tumores regresaron, para asegurarnos de que la inmunización había sido efectiva, los ratones fueron reinmunizados a los treinta días, inyectando de nuevo 1×10^6 células de las líneas metastásicas MN1.1, MN1.5 y del clon G2. Posteriormente, a los 30 días, se inyectó 1×10^6 células de las líneas metastásicas MP5, MP12 y del clon B9 (H-2 de clase I negativos) en la otra pata, y se observó el crecimiento tumoral en los animales cada 2 días. Los resultados mostraron que los tumores crecieron 4-5mm a los 7-10 días, y posteriormente o bien regresaban siendo finalmente rechazados por el animal a los 25-30 días, o en otros casos el tumor crecía y no era rechazado (**Fig. 39**). Hay que destacar, que el rechazo se produjo en 6 de los 8

ratones estudiados para la metástasis MP5 y MP12 y en 8 ratones de los 8 estudiados para el clon B9. Los ensayos fueron repetidos al menos 3 veces mostrando resultados similares. Por tanto, podemos decir que en estos ensayos las líneas celulares H-2 de clase I positivas protegen frente al crecimiento de las líneas celulares H-2 de clase I negativas en un 75 a nivel metastático y en un 100% a nivel de los distintos clones del tumor primario (**Fig. 39**).

A continuación, realizamos ensayos de inmunización in situ, es decir, inyectamos conjuntamente, una mezcla de células de las metástasis positivas (MN1.1 y MN1.5) y las metástasis negativas (MP5 y MP12). El fin de este ensayo fue comprobar si las metástasis positivas protegían frente a las negativas sin la existencia de previa inmunización. Para la realización de estos estudios se establecieron dos grupos de cuatro ratones y se inyectó a nivel subcutáneo en la pata una mezcla de dos líneas celulares con distinta expresión de moléculas H-2 de clase I en superficie. Se inyectaron conjuntamente 5×10^5 células de las líneas celulares MN1.1 ó MN1.5 ó del clon G2 con 1×10^6 células de las líneas celulares H-2 de clase I (-), MP5, ó MP12 ó del clon B9. En los ratones se produjo el inicio del crecimiento del tumor a los 5-6 días, alcanzando 4-6mm a los 14-15 días, para posteriormente o bien regresar y ser finalmente rechazado a los 30-35 días, o en otros casos continuar creciendo (**Fig. 40**). Los resultados mostraron la existencia del rechazo en 4 de los 8 tumores generados al inyectar conjuntamente MN1.1 y MP5, en 5 de los 8 tumores generados al inyectar conjuntamente MN1.1 y MP12 y en 8 de los 8 tumores producidos tras inyectar G2 y B9 (**Fig. 40**). Los ensayos fueron repetidos al menos tres veces obteniendo resultados similares. Además, se realizaron los ensayos disminuyendo el número de células de las líneas H-2 positivas

hasta 10^5 células, y el grado de protección observado fue similar. Por tanto, en estos ensayos obtuvimos una protección del 50%-60% a nivel metastático y una protección del 100% a nivel de los distintos clones del tumor primario GR9. Estos últimos resultados indican que la respuesta inmune generada por los tumores MHC de clase I positivos no solo es potente, sino que también es rápida en el tiempo.

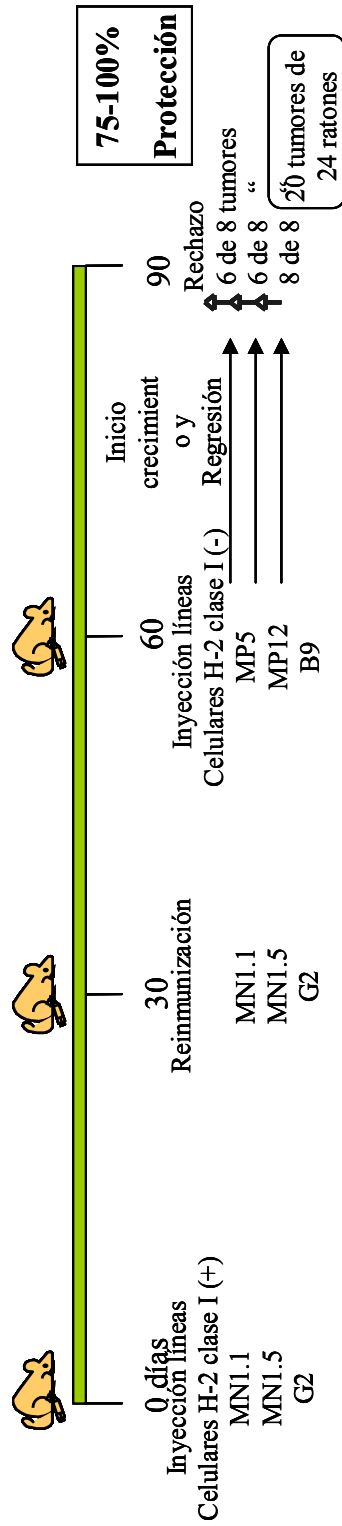


Figura 39.- Ensayos de inmunización a largo plazo. Los ratones fueron inmunizados con 1×10^6 células de líneas H-2 de clase I (+) (altamente inmunógenas) y reinmunizados al mes. Cuando los tumores regresaron fueron inyectados con 1×10^6 células de líneas H-2 de clase I (-) y se observó el crecimiento tumoral. Se observó una protección del 75% a nivel metastático y del 100% a nivel de distintos clones. Los ensayos fueron realizados con 2 grupos de cuatro ratones y repetidos al menos 3 veces.

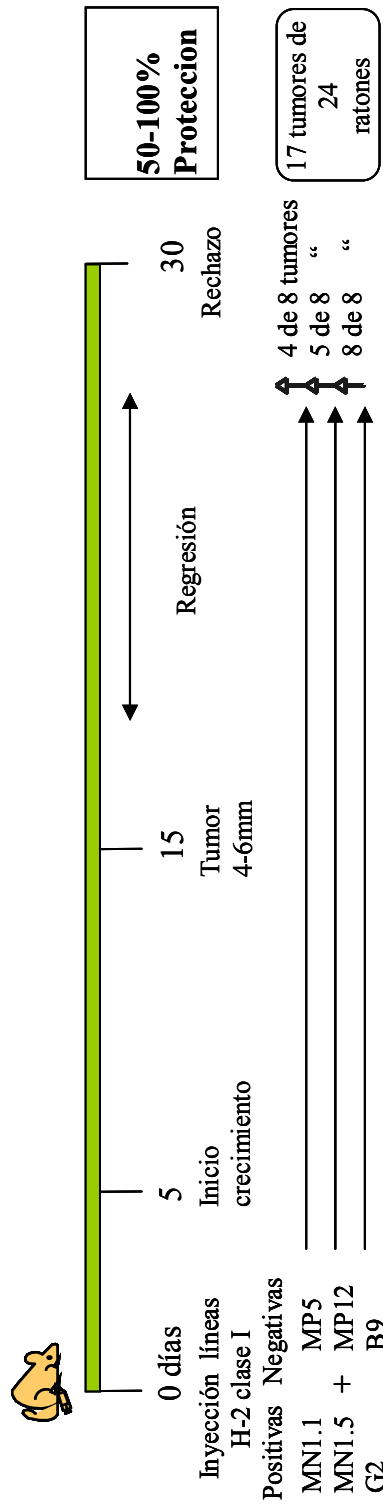


Figura 40.- Ensayos de inmunización in situ. Se inyectaron conjuntamente 1×10^5 - 1×10^6 células de líneas metastásicas H-2 de clase I (+), altamente inmunógenas con 1×10^6 células H-2 de clase I (-) a nivel subcutáneo en la pata de ratones inmunocompetentes. A los 35 días se observó una protección del 50% a nivel metastático y del 100% a nivel de distintos clones. Los ensayos fueron realizados con grupos de cuatro ratones y repetidos al menos 3 veces.

Por último, realizamos ensayos de protección cruzada, pero inyectando ambas células en diferentes patas al mismo tiempo. En estos ensayos encontramos que las metástasis MHC de clase I positivas, MN 1.1 y MN1.5, no protegen contra el crecimiento de las metástasis MHC de clase I negativas. Idénticos resultados encontramos en el caso de los diferentes clones del GR9.

9.- BIBLIOTECA DE SUSTRACCIÓN DE c-DNA

Como ya hemos comentado, en el estudio de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM), observamos que en las líneas celulares que no expresan moléculas H-2 de clase I en superficie existe una falta de expresión coordinada en ciertos componentes del APM en condiciones basales. Sin embargo, cuando estas líneas son tratadas con IFN- γ recuperan la transcripción de los genes de estos componentes del APM, al mismo tiempo que recuperan la expresión de las moléculas H-2 de clase I en superficie. De hecho, la falta de expresión coordinada de los componentes del APM es extensa, afectando a varios genes con una localización dispersa, encontrándose incluso en diferentes cromosomas. Todos estos datos nos hicieron pensar que debería existir un mecanismo común para la regulación de la expresión de estos componentes. El hecho de que la pérdida de expresión coordinada afecte a genes que se encuentran en diferentes cromosomas, nos hizo pensar que mecanismos “cis” tales como metilación o mutación de promotores era poco probable que estuvieran implicados. Por tanto, pensamos que esta baja expresión coordinada se debía a un mecanismo en “trans”, un gen que regulase todo este proceso, un posible factor transcripcional positivo o negativo.

Con el fin de acercarnos al gen que podría estar implicado en la falta de expresión de estos componentes del AMP, decidimos investigar la diferente expresión de genes entre unas metástasis y otras. Para abordar este tema construimos varias bibliotecas de sustracción de c-DNA. Estos ensayos fueron diseñados comparando las líneas metastásicas que expresaban normalmente estas moléculas H-2 de clase I en superficie en condiciones basales (MN1.1 y MN1.5) con aquellas que carecían de expresión de moléculas H-2 de clase I en superficie (MP5 y MP12). Hay que destacar que las metástasis que van a ser comparadas presentan diferente expresión de moléculas H-2 de clase I en superficie, pero que todas ellas han sido generadas a partir del mismo subclon B9. Por tanto, en principio estas metástasis deben ser muy similares entre sí, y deben de expresar diferencialmente un número reducido de genes.

En primer lugar, se extrajo mRNA de las distintas líneas metastásicas que se iban a comparar. Posteriormente, se sintetizó c-DNA a partir de 2µg de este mRNA. Nos referiremos al c-DNA que contiene transcritos específicos (expresados diferencialmente) como “tester”, y al c-DNA que carece de éstos o c-DNA de referencia lo denominaremos como “driver”. A continuación, tanto el “tester” (MN1.1 y MN1.5) como el “driver” (MP5 y MP12) son digeridos con la enzima de restricción RsaI, la cual corta 4 pares de bases en extremo romo (GT↓AC). De esta forma se cortan secuencias muy repetitivas consiguiendo moléculas más cortas. El c-DNA “tester” (MN1.1 y MN1.5) se divide en dos partes y cada una de ellas se liga con un adaptador diferente en 5', mientras que al c-DNA “driver” no se le va a ligar ningún adaptador.

Seguidamente realizamos dos hibridaciones consecutivas. La primera hibridación se lleva a cabo en exceso de “driver”. Las distintas muestras, tanto el “tester” como

“driver”son desnaturalizadas y sometidas a hibridación. Aquellas moléculas que hibridan no presentan diferencia de expresión de genes, y son por tanto eliminadas. La segunda hibridación se realiza con el fin de enriquecer aún más las secuencias expresadas diferencialmente. Los extremos de estas moléculas se rellenan con DNA polimerasa, y así presentarán distintos sitios de unión en los extremos 5' y 3', generando así secuencias expresadas diferencialmente capaces de ser amplificadas por PCR.

A continuación, se realiza una primera amplificación por PCR utilizando el primer PCR1. Mediante esta PCR se amplificaran exponencialmente sólo los genes que se expresen diferencialmente. Posteriormente, se lleva a cabo una segunda PCR utilizando los primers Nested (Nested PCR1 y Nested PCR2), con el fin de enriquecer las secuencias expresadas diferencialmente y eliminar posibles secuencias contaminantes. Por último, esta segunda PCR se sometió a electroforesis en gel de agarosa al 2%. Las distintas bandas muestran los genes expresados diferencialmente en las diferentes líneas metastásicas estudiadas (**Fig. 41**). Así, en esta figura podemos observar dos bibliotecas de sustracción de c-DNA comparando la línea metastásica H-2 de clase I (+) MN1.5, usada como “tester”, con dos líneas metastásicas H-2 de clase I (-), MP5 y MP12, usadas como “driver”. Tal y como muestra la figura, se obtienen un bajo número de bandas que representan los genes expresados diferencialmente en las distintas metástasis. Igualmente mostramos el c-DNA del “tester” (MN1.5) sin ser sometido a sustracción diferencial (**Fig. 41**). Para asegurarnos de que la biblioteca de sustracción fue llevada a cabo correctamente, también procesamos un c-DNA control, el cual

podemos observar en la figura sustraído y no sustraído (**Fig. 41**). Este c-DNA control fue comparado con el control del kit.

Las bibliotecas de sustracción obtenidas se sometieron posteriormente a electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5%. La electroforesis se realizó a 4°C y bajo voltaje con el fin de que las bandas se separasen correctamente pudiendo identificar y numerar las distintas bandas bajo un transiluminador. Como podemos observar en la figura 42, en la Biblioteca 1, en la que se utiliza la metástasis MN1.5 (H-2 de clase I positiva) como “tester” y la metástasis MP5 (H-2 de clase I negativa) como “driver” pudimos aislar un total de siete bandas. En la Biblioteca 2, formada por la metástasis MN1.5 (H-2 de clase I positiva) como “tester” y por la metástasis MP12 (H-2 de clase I negativa) como “driver” se aislaron igualmente un total de siete bandas. En cada una de estas bandas pueden encontrarse fragmentos del mismo tamaño correspondientes a diferentes genes

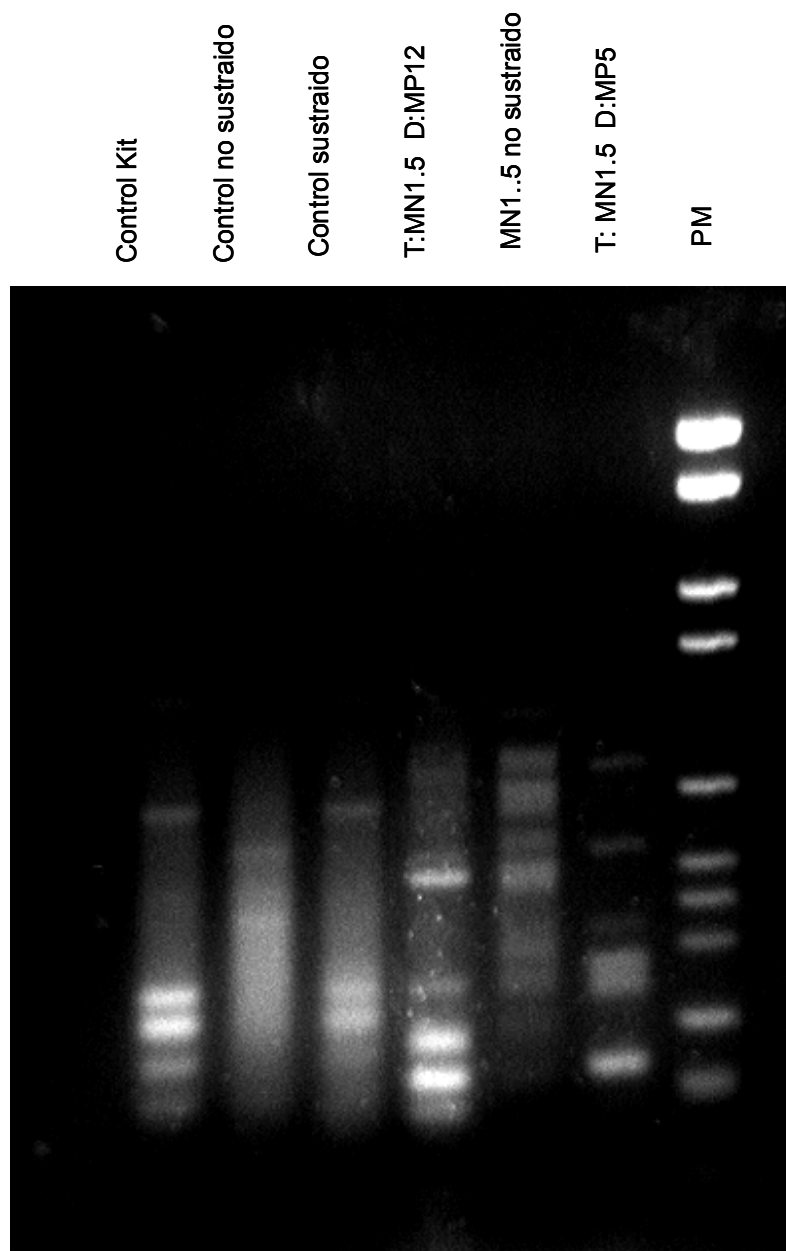


Figura 41.- Librería de sustracción de c-DNA. Han sido construidas dos bibliotecas de sustracción de c-DNA usando como “tester” variantes tumorales H-2 de clase I (+) (MN1.5). Las variantes tumorales H-2 de clase I (-) se usaron como “driver” (MP5 y MP12). Igualmente procesamos un c-DNA control para compararlo con el control del kit.

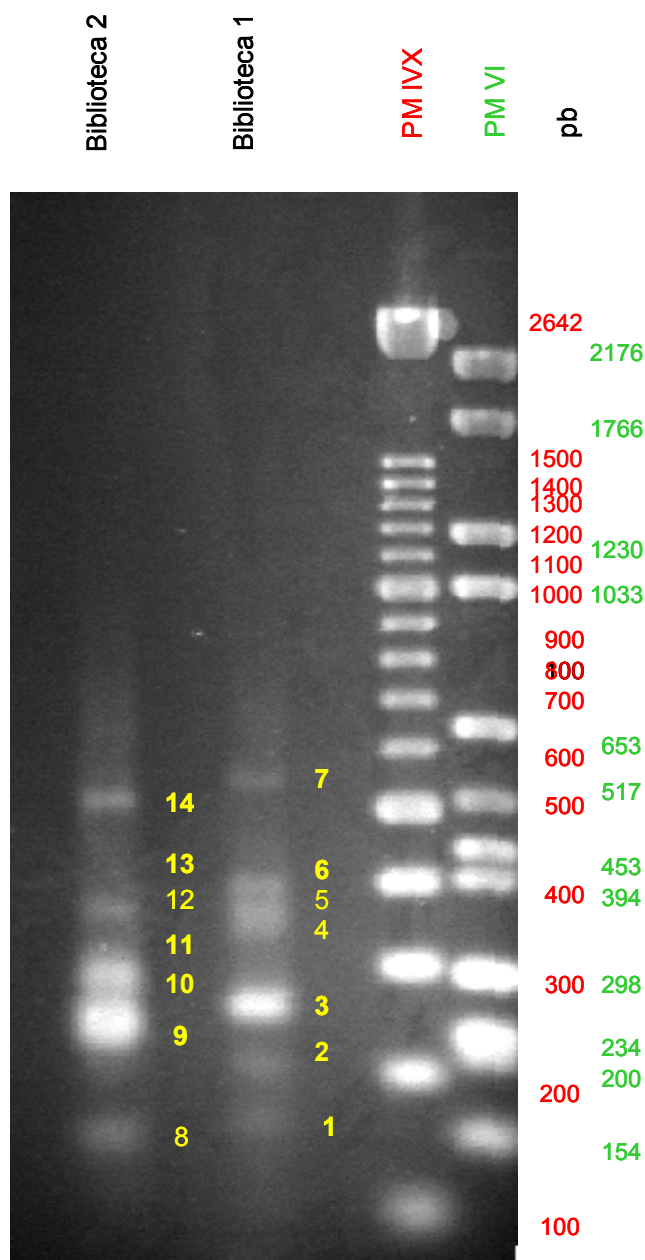


Figura 42.- Productos de PCR de las Bibliotecas de sustracción de c-DNA.

Para identificar y numerar las diferentes bandas se realizó una electroforesis en gel de agarosa debajo punto de fusión a bajo voltaje. Biblioteca 1: MN1.5 (H-2 de clase I +) como “tester” y MP5 (H-2 de clase I -) como “driver”. Biblioteca 2: MN1.5 (H-2 de clase I +) como “tester” y MP12 (H-2 de clase I -) como “driver”.

10.- EXTRACCIÓN DE LOS DISTINTOS FRAGMENTOS DE c-DNA OBTENIDOS EN LA BIBLIOTECA DE SUSTRACCIÓN

En el siguiente ensayo quisimos aislar los diferentes fragmentos de c-DNA obtenidos en dichas bibliotecas de sustracción para posteriormente clonarlos y secuenciarlos. Con este fin, se realizó una electroforesis con las distintas bibliotecas en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5%, a bajo voltaje y durante toda la noche a baja temperatura. Se utiliza cristal violeta (2mg/ml) para visualizar las bandas en vez de bromuro de etidio, ya que este último es un agente intercalante y podría dañar nuestro c-DNA. A continuación, las diferentes bandas debidamente separadas fueron cortadas con un bisturí estéril y numeradas. Con el fin de mejorar la calidad de los amplificadores se procedió a la purificación de este utilizando el kit S.N.A.P purification column.

Los amplificadores aislados y purificados de esta manera, fueron posteriormente reamplificados mediante PCR, usando los primers NestedPCR1 y NestedPCR2, para comprobar si efectivamente habíamos aislado una sola banda al cortar las bandas, o si por el contrario, habíamos arrastrado más de una banda perteneciente a bandas próximas. La **figura 43** muestra que la mayoría de las bandas aisladas, purificadas y reamplificadas no contienen un fragmento por banda, por tanto, en este caso sería necesario proceder a clonar los distintos fragmentos obtenidos, además del hecho de que un fragmento puede corresponder a más de un gen.

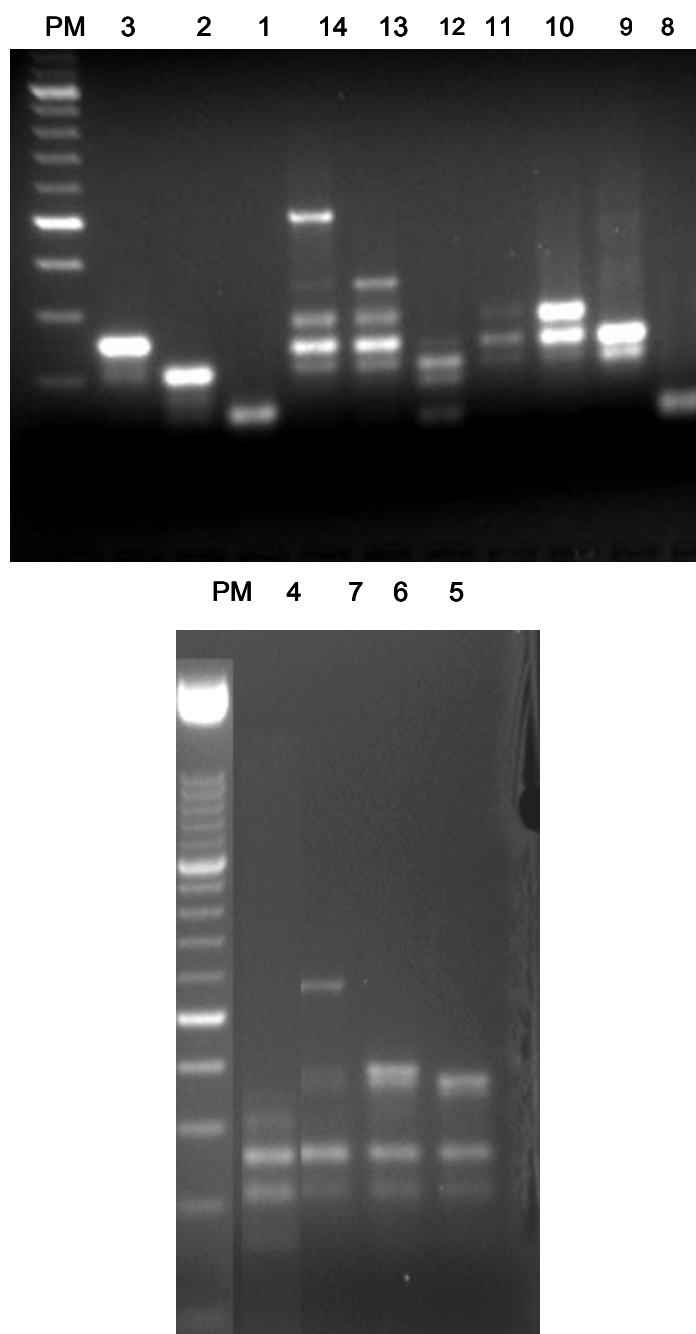


Figura 43.- Reamplificación por PCR de los c-DNAs aislados y purificados. En la figura se muestra la reamplificación por PCR de las distintas bandas obtenidas (1-14) usando los primers NestedPCR1 y Nested PCR2. Se observa que cada banda contiene más de un gen, por lo que se procedió a clonar los distintos fragmentos obtenidos.

11.- CLONACIÓN DE LOS DIFERENTES AMPLIFICADOS DE c-DNA

Se clonaron los diferentes fragmentos de c-DNA, para asegurarnos de que no partimos de una mezcla de genes, ya que posteriormente serán secuenciados.

Para llevar a cabo este ensayo se realiza la reacción de clonación incubando los productos de PCR con el vector a T^a ambiente y se procede a la transformación bacteriana mediante choque térmico, utilizando las bacterias E.coli TOP10. A continuación las bacterias transformadas se plaquean en placas LB-Agar-ampicilina, incubándolas a 37° durante 16-18h. Por último, cuando las colonias han crecido se seleccionan 10 colonias al azar y se procede a la extracción del plásmido. Posteriormente los plásmidos obtenidos son chequeados por PCR. En la **figura 44** se muestra el chequeo en gel de agarosa al 2% de los plásmidos obtenidos al picar 10 colonias al azar de uno de los fragmentos amplificados y clonados. Así, podemos observar que la colonia 5.3 y 5.7 del fragmento 5 no contienen inserto. Igualmente, en la figura se observa que en las colonias 5.4, 5.8 y 5.10 los plásmidos obtenidos contienen un fragmento del mismo tamaño, al igual que ocurre en las colonias 5.2 y 5.6. El mismo procedimiento fue seguido en todos los fragmentos clonados pertenecientes a las distintas Bibliotecas. De esta manera, se seleccionan los diversos fragmentos que serán secuenciados posteriormente.

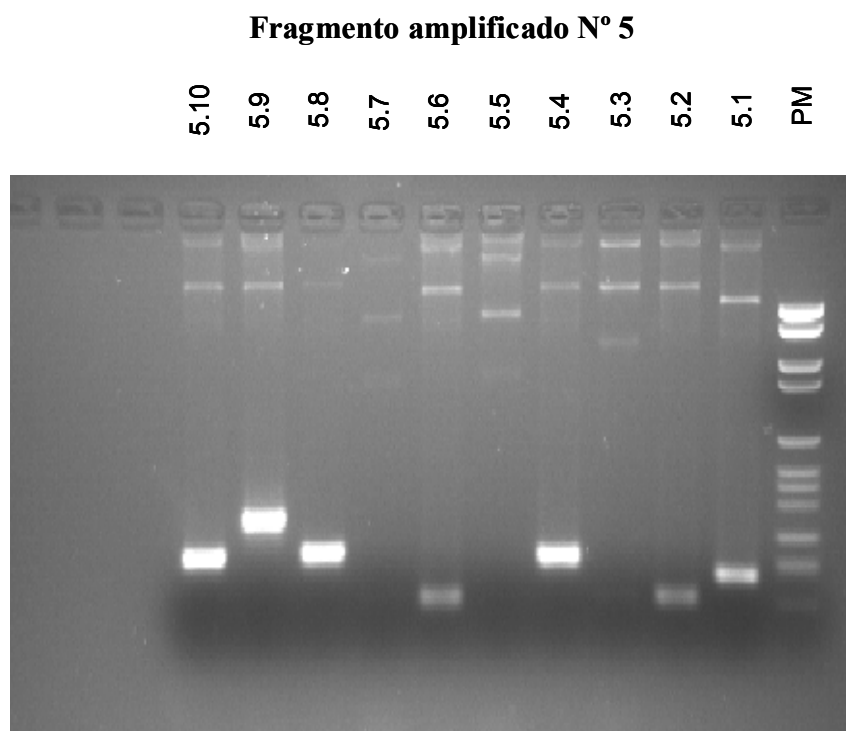


Figura 44.- Chequeo por PCR de los plásmidos obtenidos por clonación. Los distintos fragmentos obtenidos en las Bibliotecas de sustracción de c-DNA fueron cortados, reamplificados y clonados. En la figura se muestra el chequeo por PCR de 10 colonias elegidas al azar pertenecientes a uno de los fragmentos amplificados, en concreto, el fragmento 5. El mismo procedimiento se realizó en el resto de amplificados.

12.- SECUENCIACIÓN

Una vez que estos fragmentos han sido cortados, purificados, reamplificados y clonados son seleccionados para su secuenciación. Este ensayo se realizó en el secuenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosystems), con el fin de poder comparar los distintos genes aislados con distintas bases de datos y conocer así las homologías que presentan. Se utilizaron las bases de datos NCBI Blast y SANGER para contrastar las distintas

secuencias obtenidas. Se han podido identificar una serie de genes conocidos y también aparecen algunos genes desconocidos. Las secuencias obtenidas y sus homologías se muestran en la **Tabla 2**, donde hemos omitido los genes correspondientes a componentes del APM que ya conocíamos que estaban diferencialmente expresados.

BIBLIOTECA	
Fragmento	1.1
Secuencia	ACATATTGTGTGAGTTTCTTTGTGAATGTGTTACCTCACTCAGGATGAT GCCCTCCAGGTCCATCCATTTGGCTAGGAATTCATAAATTCATTCTTT TTAATAGCTGAGTAGT
Homología	Fhit : Gen Mus musculus diadenosin trifosfato hidroxilasa. Posible Gen supresor de tumores
Fragmento	1.4
Secuencia	AACTGTGCAGGAAAGCGGGCAAGCCCAGTGGCATGGCAGGCATCC
Homología	F13a : similar a la subunidad alfa del factor de coagulación XIII. Localizado en cromosoma 13.
Fragmento	2.4
Secuencia	ACACAAAGGAGCAGCTGCTGGACAGGATGTGTATGACTCTGGGCGGC CGTGTCTCCGAGGAAATCTTCTTTGGGAGAATTACAACCGGTGCCAG GACGACTTGAGGAAGGTTACCCAGAGTGCCTATGCCAGGTGAGTCT GCAGCCGGGCTCTGCCTCCTTTTCTT
Homología	Gen similar a AFG3 . Localizado en cromosoma 18. Presenta dominio de ATPasa, chaperon implicado en el ensamblaje de complejos proteicos
Fragmento	3.3
Secuencia	ATTAATTGCTTCAATAATTAGGTCCTTTGAGTAGAACCCCTGTTAGGAA TGGTATTCCTGTGAGGGCGAGGCTTCCGATTACTAGGCATGATGATGT GAATGGTATGATTTTTGTGATGTTTCCTATTTTTTCGGATGTCTTGTTTCG TCTGCCAGGCTATGAATGATTGAGCCAGAGCATATAAAGAGTATAGCT TTGAAGAATGCGTGGGT
Homología	Mt-ND5 : NADH deshidrogenasa 5 mitocondrial.
Fragmento	3.6
Secuencia	AGCATCTCTTCCCCCTGGGATTTGTGTCCTGTTGTGATAAACAGCTGC GATGGAAATAAGACAAAGTTGGATGGAAGGTTCTGGATTGACACAGA CACCACGTTAGGATCTGCTCATCTGCCCGGGGTGAGCACAGCCTCGG AACAGCCTCATGTAGCATGGT
Homología	Glis1 : miembro de la familia GLI-Kruppel. Localizado en cromosoma 4. Factor Transcripcional con actividad transactivadora y represora

Fragmento	4.6
Secuencia	ACCACCCCACCCCACCCCAACTTGCCAGATCTAGCCTGGGTCCATAT CTAGTGCCCTGATCTAGTCTGTCCACCTCTGCCTGTGTCTCAGCCAACC TCTAAGCTTCTTCTAAAACAC
Homología	Ebfl :early B- cell factor 1. Localizado en cromosoma 11. Factor transcripcional
Fragmento	4.9
Secuencia	TTCAAGTTCAACATATGACTTTTCGTCTTTTCATGATAGGTGAGCGTGG GAGTGACATGCTAGGTCAACAATTA AAACTACAGATGTAAGAAGGTG CAAGACCACTTTAAACAGTGTCACTTCTACTCTCGAAGTGGAGGATTT CCCCTGTAGCACCTCCCACAGAAGGTAGCACGTGGCTTTTTGTCAATTT CACTAAGAACAAGAACAGTGAGAGCACAGATCCATCTACAGCCTGGT GGGTGATGCTGAGTGACCCATCCCAGGT
Homología	Cables1 : Cdk5 y Abl enzima sustrato 1. Localizado en cromosoma 18.
Fragmento	5.9
Secuencia	ACATCTTGAGGTCAGGACATCCGGTGCTGACTTTCTCAGAGTGGTGCA TCTGGTGGCCCGCTTTTGACCCTCTTTTCTTCTCGGGGGAGGGGGGGA GGTCCAATTCAGAGATCAGGACAATAGTGTTCCTTAATAGCTCCCAA CAGGTTCAAAGAGAATAGCAGTTGCCAATGTCAGGTAGAGAGTAAAC TATAATTCAGGAGAAATAACAGAATGTCCAGCTATTGGAAGATTGTG AACCAAGAAGTGACAGAAATTTAGATCTTACAAGGCTTTTTAAAGTGC TTGTGTATTGGGAGCAAAGTAAGAGT
Homología	Kpna2 : Karyopherin (importina) alfa 2. Localizado en cromosoma 17
Fragmento	6.4
Secuencia	GGTGGCAAAGTTAGTCTTATTTTCAATGAATTGCATTGCAGAAAGTC AGATCAGATAAAAAGGAAGGAAGACACTTCTACACATCTTAGAGCAG ACTAAACAAGAATCAGGTCACATTGCAAAGACTTCAAATCAGACTG GATTCAAATGGTAATTTCTCCCTAGGTTTATGCGGAATTTGAGCGATT ATATAACTAAAGTCCTAATCCTCACAGTTAAAAGCAGTGACTAAGTG ATAACAGTATTAAGCAGAACAAGAAAAATAATGGCTTAACAACACT GACCTATTACAACCTGTGCAATGTATTTAATTGTCCTGACTGTAGATTTGT
Homología	Gen novel . Localizado en el cromosoma 19
Fragmento	7.1
Secuencia	ACTTTCTCTAGCTCCTCCATTGGGGGCCCTGTGTTCCATCCAATAGATG ACTGTGAGCATCCACTTCTGTATTTGCCAGGCACTGGCATAGCCTCAC ATGAAACAGCTATAACAGGGTCCCTTCAGCAAATCTTGCTGGCATAT GCAATAGTGTCTGGGTTTGGTGGTTGATTATGGGATGGATCCCCAGGT GGGGTAGTCTCTGGATGGTTATCCTTTCATCTTAGCTCCCACTTTGT CTCTGTAACCTCCATGGGTATTTTGTCCCTATTCTAAGAAGGAAT GAAGTATCCACATGTTGGTCTTCCTTCTTCTTGATTTTCTTGTGTTTTGC AAATGGTATCTTGGGTATTCTAAGTTTCTGGGCTAATATCCACTTATCA GTGAGTGCTTATCAAGTGACTTCTTTTGTGATTGGGTTACCTCACTCAG GATGATATCCTCCAGATACATCCATTTGCCCAAGATAAATTCATTGCT TGTAATAGCTGAGTAGC

Homología	Mep1b : meprin 1 beta. Localizado en cromosoma 18
Fragmento	7.7
Secuencia	ACATGTGTATGTGTGTGTGAGCGCTCTCGAACACTTTCTGTAACAATT AGAAATTTGACACTCTCATAATTTACATAGTGTGGGAGTGTAGTGGCC CAAGGCTTTCTTCCTTGGTTATACTTTACTTTCTGAGGCAGGGGTTCTC ACTGTAGCCAAAGCTGCTCGTTCCCACTGGCCTAGCTAGCCAGCATGC CTTGAGATCCCCTGTCTTTGCCTTCCCATGGCTGGGATGTAGACAGG CTCCACACTT
Homología	Oxct : 3-oxoacid CoA transferasa. Localizado en cromosoma 15. Implicado en la producción y conversión de energía.
Fragmento	7.8
Secuencia	AAGAAAAGGAGGCAGAGGCCCGGCTGCAGACTCACCTGGGCATAGGC ACTCTGGGTAACCTTCCTCAAGTCGTCCTGGGCACCGGTTGTAATTCT CCCAAAGAAGATCTCCTCGGAGACACGGCCGCCAGAGTCATACACA TCCTGTCCAGCAGCTGCTCCTTTGTGT
Homología	Gen similar a Riken Protein. Localizado en cromosoma 18. C. Presenta dominio de ATPasa dependiente de Zn. Chaperon implicado en modificaciones postranslacionales
Fragmento	8.1
Secuencia	ACTGGGGCATATACAGTTTGCGTGTCCAATGGGCCTCTCTTTCCAGTG ATGGCTGACTAGGCCATCTTTTGATACATATGTAAGTCAAGAG CTCCGGGGT
Homología	H2-Q8 : molécula H-2 de clase I no clásica. Localizado en cromosoma 17
Fragmento	8.5
Secuencia	ACCCCGGAGCTCTTGACTCTAGCTGCATATGTATCAAAGATGGCCTT GTCGGCCATCACTGGAAAGAGAGGCCCATTTGGACTTGCAAACCTTTATA TGCCCCAGT
Homología	Gen que codifica proteína con dominio Calpain-thiol-proteasa. Localizado en cromosoma 17 Oncogen vav3 , localizado en cromosoma 3
Fragmento	10.1
Secuencia	ACCACATTTTCTGTGTCCATTCCTCTGTTGAGGGGCATCTAGGTTCTTT CCAGCTTCTGGCTATTATAAATAAGGCTGCTATGAACATAGTGGAGCA TGTGTCTTCTTACCTGTTGGGGCATCTTCTGGATATATGCCAGGAGA GGTATTGCTGGATCCTCCGGTAGT
Homología	Clon RP23-30D1. Gen similar a Gag. Localizado en cromosoma 3
Fragmento	11.4
Secuencia	GCATAGGGAAGCAGACTACCCGGGACTGACCTGGGGCACAAGCCCCT TACGCTCCACTCGAGCCCCTTGATACCTTGCCAGCTGAGTCGCCTGAC

	ACCCGCAAGGGCCACACAGGATTCCACACGGGATCCTAAGA ACTCT AGTGAGTGGAACACA ACTTCTGCCAGGAGTCTGGTTCGAACACCAGA TATCTGGGT
Homología	Clon RP23-265D17. Tera enhancer . Localizado en cromosoma 1
Fragmento	12.9
Secuencia	AACCGTTGAAGACTTTGAGGTGGTTTGTAAAGGTCTCTATCGGGCATT GTGTATACGAGAGAAATACATGCAGAAGTCATTCCAGAGGTTCCCCA AGACCCCTCCAAGT
Homología	AMP deaminasa 1 . Localizado en cromosoma 3
Fragmento	13.1
Secuencia	ACTGGTATAGTGACAGACAAGTAGACCAATGGAACAGAATTGAAGAC CCAGAAATGAACCCACACACCTATGGTCACTTGATCTTTGACAAGGGA GCTAAAACCATCCAGTGGAAGAAAACAGCATTTCACAAATGGTG CTGGCACA ACTGGTTGTTATCATGTAGAAGAATGCGAATCGATCCATA CCTATCTCCTTGG
Homología	Clon RP23-5P1. IL 1 rap12 . Interleukin 1 receptor accessory protein-like2 localizado en cromosoma X.
Fragmento	13.7
Secuencia	ACCAGAAGACAGGGAGGCAGAGACTGGGAGCCGTGATGTGCCCTTGG GCTGAGCCCTAGACTTGGGGCTCTGT
Homología	Fgfr1 : fibroblast growth factor receptor 1. Localizado en cromosoma 8
Fragmento	14.6
Secuencia	GCTCACTGATAAGTGGATATTAGCCCCAATCCTAGGATACCCAAGATA TAAGATAACAATTTGCTAAACACATGAACTCAAGAAGAATGAAGACT GAAGTGTGGACACTATGCCCTCCTTAGAATTGGGAACAAAACACCC ATGGAAGGAGTTACAGAGACAAAGTTTGGAGCTGAGATGAAAGGATG GACCATGTAGAGACTGCCATATCCAGGGATCCACCCATAATCAGCAT CCAAACGCTGACACCATTGCATACCCTAGCAAGATTTTATCGAAAGGA CCCAGATGTAGCTGTCTCTTGTGAGACTATGCTGGGGCCTAGCAAACA CAGAAGTGGATGCTCACAGGTCAGCTAATGGGATGGGATCACAGGGC TCCCAATAGAGGGAAGCTAGAGAAAGGTAGCCCCAAGGAGCTTT
Homología	Clon RP23-63c10. localizado en cromosoma 2; similar a MOR248-10 Receptor olfatorio Clon RP23-10M12. localizado en cromosoma 11. Riken cDNA. Gen con producto de proteína, función desconocida

DISCUSIÓN

Si el sistema inmune juega un papel importante durante la aparición y desarrollo de un tumor sigue siendo un tema de controversia en la actualidad. Algunos autores piensan que el sistema inmune no es capaz de luchar contra un tumor, no detectando la aparición y desarrollo de un tumor porque detecta las células tumorales como células propias, o bien porque si las detecta es incapaz de hacer nada para frenarlo. En el otro lado se encuentran los autores defensores de la teoría de la inmunovigilancia tumoral, originariamente formulada por Ehrlich, Thomas y Burnet, que defienden todo lo contrario, es decir que el sistema inmune juega un papel muy activo en la lucha contra los tumores, y que por tanto las células tumorales deben de desarrollar mecanismos de escape que le permitan evadir la respuesta inmune (Ehrlich P, 1909; Thomas L, 1959; Burnet FM, 1957). De acuerdo con esto, el sistema inmune juega un papel de selección (inmunoselección) destruyendo las células tumorales que no evaden su respuesta, y dejando únicamente crecer aquellas que logran escapar a la inmunovigilancia. Recientemente, se ha introducido el término de “inmunoedición” en vez de inmunovigilancia, con lo que se intenta transmitir el concepto de que las células tumorales que crecen y metastatizan son de alguna manera seleccionadas y esculpidas a su manera por el propio sistema inmune (Dunn GP y cols, 2002).

Ante este debate, y teniendo en cuenta que las evidencias experimentales que apoyaban la teoría de la inmunoselección eran escasas, dentro de este contexto se planteó la realización de la presente tesis doctoral, para intentar encontrar evidencias experimentales que apoyaran o no la teoría de la inmunovigilancia tumoral. Partimos de un modelo tumoral murino, donde habíamos previamente encontrado que células tumorales habían perdido la expresión de moléculas del MHC de clase I (**Fig. 14**), y

también se había mostrado que durante el proceso metastásico se producían nuevos fenotipos MHC alterados. Partiendo de estos datos, quisimos investigar si la presencia o no de células T en el huésped modificaba el fenotipo MHC encontrado en las metástasis, concretamente pretendíamos determinar la implicación de las células T en la selección de variantes tumorales que desarrollan mecanismos de escape. Nos hemos centrado principalmente en el proceso metastásico, es decir en la evolución desde tumor primario a metástasis. Nuestros resultados muestran que las metástasis encontradas en ratones inmunocompetentes y nude a partir del mismo tumor primario son diferentes con respecto a su expresión en moléculas del MHC de clase I (**Fig. 22**). En ratones inmunocompetentes las metástasis obtenidas mantienen el mismo fenotipo H-2 de clase I negativo que el tumor primario (**Fig. 23**), en cambio en animales que carecen de células T y que tienen activadas las células NK, ratones nude, el fenotipo H-2 de clase I es diferente, presentando expresión de las tres moléculas K, D y L en condiciones basales (**Fig. 24**). En otras palabras, en presencia de células T son inmunoseleccionadas las células tumorales con no expresión de moléculas H-2 de clase I que dan lugar a metástasis pulmonares; cuando las células T están ausentes las metástasis que aparecen presentan expresión de moléculas del MHC de clase I, indicando que no ha habido inmunoselección por parte de las células T, y que en cambio ha podido existir una inmunoselección por las células NK. Para poder explicar el origen de estas células MHC de clase I positivas, que no están presentes, en principio, en el clon original B9 del que derivan, debemos de tener en cuenta en primer lugar que el clon original B9 no expresa moléculas del MHC de clase I en condiciones basales, pero si tras el tratamiento de las

células con IFN-gamma (**Fig. 15**). A partir de aquí, las hipótesis que se pueden plantear son dos:

1. El clon B9 puede presentar expresión de moléculas del MHC *in vivo* en ratones nude, debido a la presencia de IFN-gamma o de otras citoquinas se puede inducir la expresión de moléculas de clase I. Puede ocurrir que por un mecanismo que desconocemos actualmente estas células mantengan su expresión *in vitro*.
2. No podemos descartar totalmente, que aunque las células B9 son un clon, presenten una inestabilidad *in vitro* que de origen a que la expresión de clase I se revierta en alguna o algunas células, y que un número muy pequeño de células presenten expresión de moléculas MHC de clase I, antes de la inyección de las células en la pata del ratón. Esta posibilidad parece poco probable por varios motivos: en ninguno de nuestros ensayos hemos podido detectar estas células positivas mediante citometría o PCR; el clon B9 ha sido reclonado después de estar bastante tiempo en cultivo, y nunca hemos encontrado un clon positivo en basal para moléculas H-2; los ensayos de metástasis espontáneas han sido realizados con diferentes subclonos del B9 y siempre se han obtenido idénticos resultados. De todas formas, aunque estas células positivas estuvieran presentes en el clon B9, en muy pequeña proporción, lo importante es que mientras que en ratones inmunocompetentes se seleccionan las células MHC de clase I negativas, en ratones nude solo aparecen las positivas.

Otro dato importante que hemos obtenido es que en todos los ensayos realizados el número de metástasis pulmonares encontradas en ratones inmunocompetentes ha sido siempre de una, mientras que en ratones nude ha sido siempre superior, de 5 a 7 (**Fig. 22**), indicando el papel activo desempeñado por las células T en el proceso desde tumor primario a metástasis. En este sentido los trabajos previos de Svane y Engel mostraron que en ratones nude y en ratones SCID el número de sarcomas inducidos con metilcolantreno fue mayor que en ratones inmunocompetentes (Engel AM y cols, 1996; Svane IM y cols, 1996; Engel y cols, 1997). Estos trabajos presentan resultados opuestos a los obtenidos previamente por Stutman, en los que no encontró diferencias entre la aparición de tumores en ratones nude y ratones inmunocompetentes (Stutman O, 1974 y 1979). Pero los estudios de Stutman presentan numerosas limitaciones, sobretodo en cuanto a la dosis utilizada de metilcolantreno, y cuando fueron repetidos por Svane y Engel utilizando diferentes dosis de metilcolantreno si encontraron diferencias. Estudios posteriores mostraron que dos componentes del sistema inmune, IFN- γ (Dighe AS y cols, 1994; Kaplan DH, 1998) y perforina (Van de Broek MF y cols, 1996; Smith MJ, y cols 2000), previenen del desarrollo tumoral en ratones, mostrando de nuevo el papel supresor de tumores que ejerce el sistema inmune. Ratones deficientes en IFN- γ , deficientes en su receptor, o ratones deficientes para toda la familia de miembros de interferón, deficientes en Stat1, desarrollan tumores mas rápidamente y con mayor frecuencia cuando son tratados con diferentes dosis de metilcolantreno (Kaplan y cols, 1998). Posteriormente, estudios del mismo grupo muestran que en ratones deficientes en genes RAG-1, RAG-2 y STAT1, los linfocitos e IFN- γ colaboran en la protección contra el desarrollo de sarcomas inducidos con

carcinógenos y contra carcinomas epiteliales espontáneos (Shankaran y cols, 2001). Además de los trabajos mencionados anteriormente y de nuestros propios datos, en los últimos años han surgido numerosos trabajos donde se muestra evidencias experimentales de que en diferentes modelos murinos deficientes en componentes del sistema inmune la aparición y desarrollo tumoral es mayor que en ratones singénicos inmunocompetentes (**Tabla 1**).

Todos estos datos mencionados anteriormente, muestran que el término “inmunovigilancia” no es del todo correcto para describir este proceso, ya que este término sólo se refiere a los estadios iniciales e implica un papel únicamente protector del sistema inmune. Sería más adecuado utilizar el término “inmunoección” ya que describe de una forma más completa la acción protectora y de “escultura inmunológica” que ejerce el sistema inmune de forma continua en el desarrollo tumoral. Así, el sistema inmune puede promover la completa eliminación de algunos tumores, generar un estado de no protección en otros o bien favorecer un estado de anergia-tolerancia-indiferencia en otros (Dunn GP y cols, 2002).

En este contexto, otro resultado interesante que podemos destacar es la diferente inmunogenicidad encontrada entre las metástasis generadas en ratones nude y en ratones inmunocompetentes. Las metástasis MHC clase I negativas generadas en ratones inmunocompetentes son muy poco inmunógenas, teniendo un alto poder tumorigénico cuando son inyectadas en ratones inmunocompetentes (**Fig. 36**). Por el contrario, las metástasis generadas en ratones nude, MHC de clase I positivas, muestran una alta inmunogenicidad en ratones inmunocompetentes, siendo rechazados los tumores y no creciendo (**Fig. 36**). Ahora bien, en ratones nude estas metástasis pierden esa

inmunogenicidad, mostrando un alto poder tumorigénico con un número muy bajo de células (**Fig. 37**). Además, en ratones nude observamos un mayor crecimiento local de todas las líneas metastásicas inyectadas, tanto las H-2 de clase I (-) (MP5 y MP12), como las H-2 de clase I (+) (MN1.1 Y MN1.5) (**Fig. 37**). Estos resultados muestran un papel destacado de los linfocitos T en la inmunovigilancia tumoral: por un lado las metástasis generadas en ratones nude son más inmunógenas, por otro en ratones nude esta inmunogenicidad es perdida, y además el poder tumorigénico y el crecimiento local de los tumores es mayor en ratones nude que en ratones inmunocompetentes (**Fig. 45**).

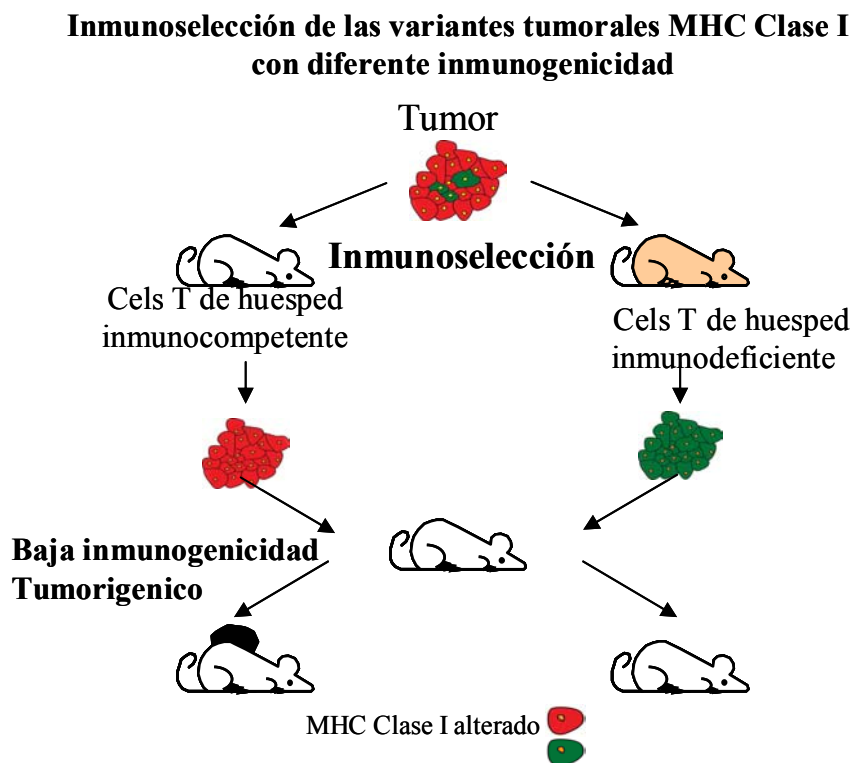


Figura 45.-Inmunoselección de las variantes tumorales MHC de clase I con diferente inmunogenicidad. La figura muestra como en el huésped inmunocompetente se seleccionan las variantes metastásicas con MHC de clase I alteradas, con baja inmunogenicidad y muy tumorigénicas a nivel local.

Estos resultados pueden ser explicados porque en ratones inmunocompetentes las metástasis generadas son inmunoseleccionadas por los linfocitos T, por lo tanto son metástasis que han desarrollado un mecanismo de escape, la pérdida de moléculas H-2, frente a los linfocitos T, por lo que al ser de nuevo inyectadas muestran una baja inmunogenicidad; esto no ocurre en ratones nude, y las metástasis generadas. MHC de clase I positivas son poco inmunógenas, siendo destruidas por los linfocitos T. Por otro lado, esta inmunogenicidad es perdida cuando son inyectadas en un huésped que carece de linfocitos T.

Los trabajos de Svane y Engel muestran resultados muy similares siendo los tumores inducidos con metilcolantreno en ratones nude y SCID más inmunogénicos cuando eran transplantados en ratones inmunocompetentes (Svane IM y cols, 1996; Engel y cols, 1997). Contrariamente a nuestros resultados, ellos no observaron relación entre la expresión en superficie de las moléculas de clase I y la inmunogenicidad de los tumores. Estos autores sugieren que existe un proceso de inmunoselección por células T en el huésped inmunocompetente, que es capaz de eliminar las células tumorales más altamente inmunógenas, permitiendo el crecimiento de las células tumorales poco inmunógenas.

En tumores producidos en ratones RAG2^{-/-} y en ratones IFNGR^{-/-}, se han encontrado los mismos resultados, cuando son transplantados en ratones singénicos estos tumores son rechazados (Shankaran V y cols, 2001). En el caso de sarcomas inducidos en ratones IFNGR^{-/-}, la transfección del gen TAP1 aumenta su inmunogenicidad.

Un papel destacado para los linfocitos CD8⁺ ha sido mostrado en el rechazo de sarcomas altamente inmunógenos generados en ratones nude (Boesen y cols, 2000). Estos autores han mostrado que los sarcomas inducidos con MCA derivados de ratones nude presentaban un mayor grado de rechazo al ser transplantados en ratones inmunocompetentes. Sin embargo, cuando antes del trasplante depleccionaron de células T CD8⁺ a los ratones receptores observaron que los sarcomas derivados de ratones nude no eran rechazados en estos huéspedes. Sugieren que durante el crecimiento tumoral en huéspedes inmunocompetentes existe una eliminación selectiva de las variantes tumorales con elevada inmunogenicidad, susceptibles a la lisis mediada por linfocitos T CD8⁺.

Todos estos resultados y los obtenidos por nosotros, avalan la hipótesis de que la inmunogenicidad de un tumor particular depende del estado inmune del huésped, apareciendo variantes tumorales con baja inmunogenicidad que escapan de la inmunovigilancia mediada por células T en ratones inmunocompetentes.

Asimismo hemos encontrado que las metástasis H-2 de clase I positivas, altamente inmunógenas, protegen contra el crecimiento de las negativas en ratones inmunocompetentes, en un porcentaje muy alto que abarca desde el 50 al 100% (**Fig. 39, 40**). Este resultado, nos indica que la respuesta generada contra las metástasis positivas, que logra el rechazo del tumor, es potente y rápida en el tiempo. Como ya se ha comentado anteriormente puede suceder que las metástasis negativas recuperen la expresión *in vivo*, y que sean destruidas por la respuesta T generada contra las positivas, en el caso de la inyección de mezcla de células el rechazo podría ser debido al infiltrado linfocitario producido por las metástasis positivas.

Una vez establecido el papel de los linfocitos T, y que las células tumorales desarrollan mecanismos para escapar del sistema inmune, debemos destacar que uno de los mecanismos más utilizados es la pérdida de moléculas del MHC de clase I. De ahí, el interés por determinar los mecanismos moleculares implicados en estas pérdidas de expresión, y en los últimos años se ha profundizado mucho en este campo (Algarra y Garrido, 2000; Garcia-Lora y cols, 2001). Hemos podido determinar que en el sistema tumoral B9 la pérdida de expresión de moléculas H-2 de clase I en condiciones basales es debida a la pérdida de expresión coordinada de varios componentes de la maquinaria de procesamiento antigénica: TAPs, LMPs, tapasina y calnexina (**Fig. 30, 31, 32**) (Garcia-Lora y cols, 2003). Otros componentes como calreticulina, ERP-59, ER-60 PA-28- α y PA-28- β mantienen su expresión (**Fig. 33, 34**). Todos los componentes del APM recuperan su expresión después del tratamiento con IFN- γ , lo que se acompaña con la expresión en superficie de moléculas de clase I (**Figura 35**). Un esquema de los resultados obtenidos es mostrado en la **Figura 46**.

Falta de expresión de componentes del APM en las metástasis MHC de clase I(-)

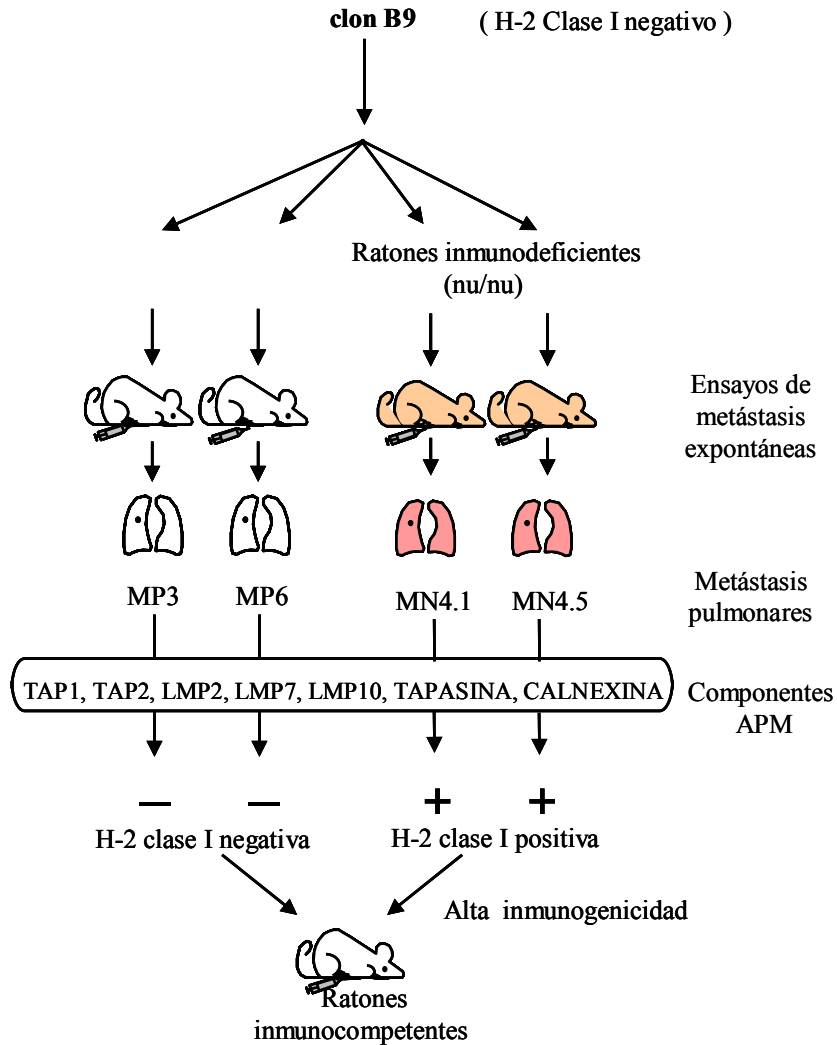


Figura 46.- Resumen del fenotipo H-2 de clase I y propiedades moleculares e inmunogénicas de las colonias metastásicas originadas en ratones inmunocompetentes y nude. Las líneas metastásicas originadas en ratones nude son H-2 de clase I (+), presentan todos los componentes del APM y son más inmunogénicas que las originadas en ratones BALB/c inmunocompetentes.

En los últimos años, numerosos trabajos han mostrado que la pérdida de expresión de componentes del APM es un mecanismo extendido implicado en la pérdida total de expresión de moléculas del MHC de clase I en tumores murinos y humanos. En tumores murinos inducidos químicamente y en el melanoma murino B16, se ha observado que la pérdida de expresión de moléculas H-2 de clase I es debido a una baja regulación coordinada de varios componentes del APM (Seliger y cols, 2000 y 2001). En ambos casos las moléculas TAPs y LMPs están implicadas, y a diferencia con nuestros resultados, también se encuentra baja expresión de PA28 α y PA28 β . Tanto la expresión de los componentes del APM, como la expresión de moléculas de clase I son recuperables tras el tratamiento con interferón. La transfección de los genes TAP-1 y TAP-2 en las células B16 no logra recuperar la expresión de moléculas de clase I. En humanos, se ha encontrado que en varias líneas celulares tumorales humanas de diferente origen histológico con falta de expresión de moléculas del MHC de clase I, también existía una baja regulación coordinada de miembros del APM (Johnsen A y cols 1998). En carcinoma de vejiga se ha determinado una relación entre la expresión de los transportadores TAP1/ TAP2 y el grado del tumor (Vitale M y cols 1998). Asimismo, en lesiones malignas primarias de melanoma se ha observado una asociación entre la no expresión de las subunidades LMP2, LMP7 y TAP1 con la pérdida de regresión espontánea (Dissemond y cols, 2003a y 2003 b). Otros autores sugieren una asociación entre el nivel de expresión de las moléculas MHC de clase I y la pérdida de expresión únicamente del gen LMP-7 (Yoon SJ y cols, 2000; Cabrera y cols 2003). Incluso la pérdida de la expresión de tapasina ha sido implicada en la pérdida de expresión específica de un alelo, como HLA-B44 (Cabrera y cols, 2004).

En todos los estudios anteriores con líneas celulares, la pérdida no es irreversible, sino que es reversible con el tratamiento con interferón. Esto muestra que la pérdida total de expresión de moléculas del MHC que esta asociada con pérdidas de la expresión de componentes del APM es un mecanismo reversible con tratamientos con diferentes inductores de la expresión de moléculas de clase I, lo que puede tener gran importancia en los tratamientos inmunoterapéuticos contra el cáncer y sobretodo en aquellos que utilizan péptidos antigénicos donde la expresión de moléculas del MHC es fundamental. Los trabajos publicados en los últimos años indican que la baja expresión de componentes del APM es un mecanismo muy extendido que implica la baja expresión de moléculas del MHC. Una baja expresión, pero no la pérdida total puede ser un mecanismo de escape perfecto para el tumor, ya que podría evadir la respuesta T CD8+, y por otro lado una expresión mínima podría evadir la respuesta NK.

En algunos tumores ha sido observado que la transfección de TAP1, conlleva una inmunogenicidad mayor e incluso el rechazo total del tumor. Así cuando el tumor CMT.64, carcinoma de pulmón de célula pequeña deficiente en TAP1, es transfectado se reduce enormemente el número de tumores generados en ratones (Alimonti y cols, 2000). En un modelo tumoral murino compuesto por líneas celulares TAP1 positivas y TAP1 negativas, derivadas de fibroblastos transformados se ha mostrado que la no expresión de TAP1 permite a algunos tumores evitar el reconocimiento inmune y la eliminación por las células T, sin mostrar un incremento a la lisis por células NK, mostrando que la deficiente expresión de TAP1 en células tumorales aumenta su tumorigenicidad (Johnsen y cols, 1999). Estos estudios muestran que cuando se inoculan células TAP1-negativas en ratones C57BL/6 se desarrollan tumores que

perduran en el tiempo, sin embargo cuando se inoculan células TAP1-positivas no ocurre lo mismo, pudiéndose desarrollar pequeños tumores que regresan espontáneamente. Tanto las células TAP-1 positivas como TAP-1 negativas producen tumores en ratones atímicos, lo que apoya la hipótesis de que las diferencias en tumorigénesis TAP dependientes son debidas a respuestas inmunes mediadas por células T. Además, la inoculación de mezclas celulares TAP1-positivas y TAP1-negativas en ratones C57BL/6 dan lugar a tumores formados exclusivamente por células TAP1-negativas, lo que sugiere la existencia de una selección in vivo de las células con déficit de TAP. Por tanto, la pérdida de TAP permite a ciertas células tumorales evadir la respuesta inmune mediada por células T, dando lugar a la selección de células tumorales deficientes en la maquinaria de procesamiento antigénico. En estudios posteriores llevados a cabo por otros autores se encontraron datos similares, en los que se mostraba que el déficit de TAP daba lugar a un mayor crecimiento tumoral en ratones DBA-1, creciendo igualmente las células TAP+ y TAP- en ratones inmunodeficientes BALB/c (nu/nu) (Qin Z y cols, 2002). La transfección del gen TAP1 en sarcomas derivados de ratones IFNGR^{-/-} (insensibles a IFN- γ), aumenta su inmunogenicidad en ratones inmunocompetentes (Shankaran V y cols, 2001).

Como hemos mencionado anteriormente una baja regulación en la expresión de los componentes del APM es un mecanismo de escape muy extendido desarrollado por las células tumorales para escapar del sistema inmune. Nuestros resultados y los mostrados por otros autores muestran que esta regulación coordinada debe de ocurrir en trans, ya que una misma alteración en cis en tantos genes es muy improbable, y además

debemos tener en cuenta que abarca genes que incluso se encuentran en diferentes cromosomas, como el LMP10. Esto nos hizo plantearnos el que nuestro modelo, compuesto por metástasis derivadas del mismo clon tumoral con expresión o no de los componentes del APM, sería muy bueno para poder determinar la existencia de un gen o genes reguladores de la expresión coordinada de estos componentes. La realización de una biblioteca de sustracción comparando ambas metástasis nos ha mostrado una serie de genes candidatos a ser reguladores de la expresión de la maquinaria de procesamiento antigénica (**Tabla 2**). Entre estos genes hay algunos genes nuevos con función desconocida, y otros cuya función si se conoce, entre estos últimos debemos destacar dos:

- **Gen FHIT:** una relación entre sitios frágiles comunes en cromosomas y frecuentes deleciones cromosómicas en cáncer ha sido observada desde hace dos décadas y condujo a la hipótesis de que genes en sitios frágiles pueden desempeñar una regla en el desarrollo de tumores, considerándose como genes supresores de tumores. El gen triad histidina frágil humano, FHIT, fue identificado en el sitio frágil FRA3B en la región 3p14.2. Pérdida o inactivación, en un alto numero de diferentes tumores resulta en ausencia o reducción de la proteína FHIT (Ishii y Furukawa, 2004; Ishii y cols, 2003a). La perdida de expresión de FHIT hace que los tumores sean mas tumorigénicos, invasivos y con peor pronostico. Análisis in vitro y estudios de tumorigenicidad in vivo muestran que la restauración de la expresión de FHIT induce supresión de tumores en un 50% de las líneas estudiadas (Roz y

cols, 2002; Sevinagni y cols, 2003); además, transferencia del gen en ratones deficientes no solamente impide, sino que también regresan, tumores inducidos por carcinógenos in vivo (Ishii y cols, 2003b; Dumon y cols, 2001). En nuestro caso, encontramos expresión de este gen en las metástasis derivadas en nude (H-2 positivas, poco tumorigénicas, muy inmunógenas), pero no en las metástasis generadas en inmunocompetentes, ni en el clon B9. No existe en la literatura ninguna relación entre la pérdida de expresión de FHIT y la expresión de los componentes del APM o la expresión de moléculas MHC de clase I, pero sería interesante determinar si esta relación existe y cuando se pierde Fhit se pierde la expresión de los componentes de la APM y la expresión en superficie de las moléculas de clase I.

- Glis 1: factor transcripcional perteneciente a la familia de zinc finger Kruppel, proteína similar a Gli1 (Kim y cols, 2002). Pertenece a la subfamilia de proteínas transcripcionales Gli, que están implicadas en la embriogénesis, y concretamente en la ruta de transducción de señales Sonic-Hedgehog-Patched-Gli (Ruppert y cols, 1988; Buscher y cols, 1997). También se ha implicado estas proteínas en cáncer: Gli1 actúa como un oncogen transformando células en cultivo, se ha visto una amplificación en glioblastomas y rhabdomiosarcomas (Kinzler y cols 1987; Hahn y cols 1998), y una sobreexpresión en varios tumores (Green y cols, 1998; Grachtchouk y cols, 2000; Ruiz i Altaba y cols, 2002). Genes cuya expresión es aumentada con la transfección de Gli1 son: genes implicados en el ciclo celular, como ciclina D2, y genes implicados en la adhesión celular, en transducción de

señales y en apoptosis (Yoon y cols, 2002). Su secuencia consenso de unión a DNA es: GACCACCCA. Secuencias similares a esta secuencia que son posibles a interaccionar con este factor transcripcional se encuentran en los promotores de los genes Tap1, Tap2, LMP2 y LMP7. Este factor transcripcional podría estar implicado en la expresión de estos genes, y su baja expresión en las metástasis producidas en ratones inmunocompetentes podría explicar la baja regulación de los componentes del APM, y en consecuencia la no expresión de moléculas MHC de clase I.

También debemos destacar que hemos encontrado la expresión de un gen MHC clase I no clásico perteneciente a la familia Qa-2, el gen *Q8*, en las metástasis producidas en ratones nude. La reexpresión de otro gen de esta familia, la molécula *Q9*, en líneas tumorales ha mostrado una fuerte respuesta de CTLs y la protección inmune contra el crecimiento tumoral en ratones (Chiang y cols, 2003 y 2005). De la misma manera podemos pensar que la expresión de la molécula *Q8* puede influir decisivamente en la alta inmunogenicidad de las metástasis producidas en ratones nude.

CONCLUSIONES

1.- En el sistema tumoral B9 se han generado metástasis con diferente fenotipo MHC de clase I dependiendo del sistema inmune del huésped: MHC de clase I negativas en ratones inmunocompetentes y MHC de clase I positivas en ratones nude. Además en ratones nude se han encontrado un número mayor de metástasis que en ratones inmunocompetentes.

2.- En este sistema tumoral se ha producido un proceso de inmunoselección activa durante el proceso metastásico en ratones inmunocompetentes, no ocurriendo esto en ratones nude. Estos resultados implican que durante el proceso metastático el sistema inmune ha desempeñado una labor de inmunovigilancia tumoral

3.- La falta de expresión en superficie de moléculas H-2 de clase I en las variantes tumorales de nuestro sistema B9 es debida a una falta de expresión coordinada a nivel transcripcional de ciertos componentes del APM tales como: TAP1, TAP2, LMP2, LMP7, LMP10, Calnexina y Tapasina. La expresión de estos componentes del APM es recuperada tras tratamiento con interferón- γ , recuperándose también la expresión en la superficie celular de moléculas MHC de clase I.

4.- En los ensayos realizados in vivo en ratones inmunocompetentes se ha observado que existe una correlación directa entre la expresión de moléculas MHC de clase I en superficie y de los componentes del APM con la capacidad inmunógena e inversa con el crecimiento local. Las metástasis MHC de clase I positivas son muy inmunógenas en

ratones inmunocompetentes, en ratones nude esta capacidad inmunógena se pierde, lo que indica una participación directa de las células T.

5.- Los ensayos de inmunización muestran que las líneas celulares metastásicas H-2 de clase I positivas protegen mayoritariamente contra el crecimiento tumoral de las metástasis H-2 de clase I negativas, siendo los ratones inmunizados frente al crecimiento estas.

6.- La búsqueda de un mecanismo regulatorio común, que explique la baja expresión coordinada de ciertos componentes del APM, debemos destacar a los siguientes genes que pueden estar implicados: gen supresor de tumores Fhit y el factor transcripcional Glis 1.

BIBLIOGRAFÍA

- Abril, E., Mendez, R. E., Garcia, A., Serrano, A., Cabrera, T., Garrido, F., and Ruiz-Cabello, F. (1996). Characterization of a gastric tumor cell line defective in MHC class I inducibility by both alpha- and gamma-interferon. *Tissue Antigens* 47, 391-8.
- Adams, G. M., Falke, S., Goldberg, A. L., Slaughter, C. A., DeMartino, G. N., and Gogol, E. P. (1997). Structural and functional effects of PA700 and modulator protein on proteasomes. *J Mol Biol* 273, 646-57.
- Algarra, I., Cabrera, T., and Garrido, F. (2000). The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum Immunol* 61, 65-73.
- Algarra, I., Gaforio, J. J., Garrido, A., Mialdea, M. J., Perez, M., and Garrido, F. (1991). Heterogeneity of MHC-class-I antigens in clones of methylcholanthrene-induced tumors. Implications for local growth and metastasis. *Int J Cancer Suppl* 6, 73-81.
- Alimonti, J., Zhang, Q. J., Gabathuler, R., Reid, G., Chen, S. S., Jefferies, W. A. TAP expression provides a general method for improving the recognition malignant cells in vivo. *Nat Biotechnol.* 18 (5), 515-20. 2000.
- Almand, B., Resser, J. R., Lindman, B., Nadaf, S., Clark, J. I., Kwon, E. D., Carbone, D. P., and Gabrilovich, D. I. (2000). Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 6, 1755-66.
- Androlewicz, M. J. (1999). The role of tapasin in MHC class I antigen assembly. *Immunol Res* 20, 79-88.
- Apte, R. S., Mayhew, E., and Niederkorn, J. Y. (1997). Local inhibition of natural killer cell activity promotes the progressive growth of intraocular tumors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38, 1277-82.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727-9.
- Belich, M. P., Glynn, R. J., Senger, G., Sheer, D., and Trowsdale, J. (1994). Proteasome components with reciprocal expression to that of the MHC-encoded LMP proteins. *Curr Biol* 4, 769-76.
- Benham, A. M., Gromme, M., and Neefjes, J. (1998). Allelic differences in the relationship between proteasome activity and MHC class I peptide loading. *J Immunol* 161, 83-9.
- Beninga, J., Rock, K. L., and Goldberg, A. L. (1998). Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem* 273, 18734-42.

Benitez, R., Godelaine, D., Lopez-Nevot, M. A., Brasseur, F., Jimenez, P., Marchand, M., Oliva, M. R., van Baren, N., Cabrera, T., Andry, G., Landry, C., Ruiz-Cabello, F., Boon, T., and Garrido, F. (1998). Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 52, 520-9.

Bjorkman, P. J. and Parham, P. (1990). Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 59, 253-88.

Blanchet, O., Bourge, J. F., Zinszner, H., Tatari, Z., Degos, L., and Paul, P. (1991). DNA binding of regulatory factors interacting with MHC-class-I gene enhancer correlates with MHC-class-I transcriptional level in class-I-defective cell lines. *Int J Cancer Suppl* 6, 138-45.

Bochtler, M., Ditzel, L., Groll, M., Hartmann, C., and Huber, R. (1999). The proteasome. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, 295-317.

Boesen, M., Svane, I. M., Engel, A. M., Rygaard, J., Thomsen, A. R., and Werdelin, O. (2000). CD8+ T cells are crucial for the ability of congenic normal mice to reject highly immunogenic sarcomas induced in nude mice with 3-methylcholanthrene. *Clin Exp Immunol* 121, 210-5.

Boon, T., Cerottini, J. C., Van den Eynde, B., van der Bruggen, P., and Van Pel, A. (1994). Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12, 337-65.

Boshoff, C. and Weiss, R. (2002). AIDS-related malignancies. *Nat Rev Cancer* 2, 373-82.

Brady, C. S., Bartholomew, J. S., Burt, D. J., Duggan-Keen, M. F., Glenville, S., Telford, N., Little, A. M., Davidson, J. A., Jimenez, P., Ruiz-Cabello, F., Garrido, F., and Stern, P. L. (2000). Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer. *Tissue Antigens* 55, 401-11.

Bromberg, J. F., Horvath, C. M., Wen, Z., Schreiber, R. D., and Darnell, J. E. Jr (1996). Transcriptionally active Stat1 is required for the antiproliferative effects of both interferon alpha and interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7673-8.

Brown, M. G., Driscoll, J., and Monaco, J. J. (1991). Structural and serological similarity of MHC-linked LMP and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* 353, 355-7.

Browning, M., Petronzelli, F., Bicknell, D., Krausa, P., Rowan, A., Tonks, S., Murray, N., Bodmer, J., and Bodmer, W. (1996). Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue Antigens* 47, 364-71.

- Burnet, F. M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1-27.
- Burnet, F.M. (1964). Immunological factors in the process of carcinogenesis. *Br.Med.Bull* 20, 154-158.
- Burnet, F.M. (1957). Cancer, a biological approach. *Brit. Med.J* 1:841-847.
- Buscher, D., Bosse, B., Heymer, J., Ruther, U. (1997). Evidence for genetic control of Sonic hedgehog by Gli3 in mouse limb development. *Mech Dev.*, 62(2):175-82.
- Cabrera, C.M., Jiménez, P., Cabrera, T., Esparza, C, Ruiz-Cabello, F. and Garrido F. (2003). Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens*,61(3):211-9.
- Cabrera, T., Lopez-Nevot, M. A., Gaforio, J. J., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (2003). Analysis of HLA expression in human tumor tissues. *Cancer Immunol Immunother* 52, 1-9.
- Cabrera, T., Maleno, I., Lopez-Nevot, M. A., Redondo, M., Fernandez, M. A., Collado, A., and Garrido, F. (2003). High frequency of HLA-B44 allelic losses in human solid tumors. *Hum Immunol* 64, 941-50.
- Cabrera, T., Salinero, J., Fernandez, M. A., Garrido, A., Esquivias, J., and Garrido, F. (2000). High frequency of altered HLA class I phenotypes in laryngeal carcinomas. *Hum Immunol* 61, 499-506.
- Cabrera, T., Maleno, I., Lopez-Nevot, M.A., Redondo, M., Fernandez, M.A, Collado, A., Garrido, F. High frequency of HLA-B44 allelic losses in human solid tumors. *Hum Immunol* 64 (10), 941-50. 2003.
- Carbone, E., Ruggiero, G., Terrazzano, G., Palomba, C., Manzo, C., Fontana, S., Spits, H., Karre, K., and Zappacosta, S. (1997). A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J Exp Med* 185, 2053-60.
- Carbone, E., Terrazzano, G., Ruggiero, G., Zanzi, D., Ottaiano, A., Manzo, C., Karre, K., and Zappacosta, S. (1999). Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells. *Eur J Immunol* 29, 4022-9.
- Chappell, D. B., Zaks, T. Z., Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. (1999). Human melanoma cells do not express Fas (Apo-1/CD95) ligand. *Cancer Res* 59, 59-62.

Chen, H. L., Gabrilovich, D., Virmani, A., Ratnani, I., Girgis, K. R., Nadaf-Rahrov, S., Fernandez-Vina, M., and Carbone, D. P. (1996). Structural and functional analysis of beta2 microglobulin abnormalities in human lung and breast cancer. *Int J Cancer* 67, 756-63.

Chiang, E. Y., Henson, M., and Stroynowski, I. (2003). Correction of defects responsible for impaired Qa-2 class Ib MHC expression on melanoma cells protects mice from tumor growth. *J Immunol* 170, 4515-23.

Chiang, E.Y., Stroynowski, I. (2005). Protective immunity against disparate tumors is mediated by a nonpolymorphic MHC class I molecule. *J Immunol.*174(9):5367-74.

Chun, T., Granda, A. G. 3rd, Lybarger, L., Forman, J., Van Kaer, L., and Wang, C. R. (2001). Functional roles of TAP and tapasin in the assembly of M3-N-formylated peptide complexes. *J Immunol* 167, 1507-14.

Cole, K. E., Strick, C. A., Paradis, T. J., Ogborne, K. T., Loetscher, M., Gladue, R. P., Lin, W., Boyd, J. G., Moser, B., Wood, D. E., Sahagan, B. G., and Neote, K. (1998). Interferon-inducible T cell alpha chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 187, 2009-21.

Coughlin, C. M., Salhany, K. E., Gee, M. S., LaTemple, D. C., Kotenko, S., Ma, X., Gri, G., Wysocka, M., Kim, J. E., Liu, L., Liao, F., Farber, J. M., Pestka, S., Trinchieri, G., and Lee, W. M. (1998). Tumor cell responses to IFN γ affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity* 9, 25-34.

Coulie, P. G., Ikeda, H., Baurain, J. F., and Chiari, R. (1999). Antitumor immunity at work in a melanoma patient. *Adv Cancer Res* 76, 213-42.

Coux, O., Tanaka, K., and Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* 65, 801-47.

Cresswell, P. (1994). Assembly, transport, and function of MHC class II molecules. *Annu Rev Immunol* 12, 259-93.

Cromme, F. V., Airey, J., Heemels, M. T., Ploegh, H. L., Keating, P. J., Stern, P. L., Meijer, C. J., and Walboomers, J. M. (1994). Loss of transporter protein, encoded by the TAP-1 gene, is highly correlated with loss of HLA expression in cervical carcinomas. *J Exp Med* 179, 335-40.

D'Urso, C. M., Wang, Z. G., Cao, Y., Tatake, R., Zeff, R. A., and Ferrone, S. (1991). Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression. *J Clin Invest* 87, 284-92.

- Davidson, W. F., Giese, T., and Fredrickson, T. N. (1998). Spontaneous development of plasmacytoid tumors in mice with defective Fas-Fas ligand interactions. *J Exp Med* 187, 1825-38.
- de la Salle, H., Hanau, D., Fricker, D., Urlacher, A., Kelly, A., Salamero, J., Powis, S. H., Donato, L., Bausinger, H., Laforet, M., and et, a. l. (1994). Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science* 265, 237-41.
- De Smedt, T., Van Mechelen, M., De Becker, G., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1997). Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 27, 1229-35.
- de Vries, T. J., Fourkour, A., Wobbes, T., Verkroost, G., Ruiters, D. J., and van Muijen, G. N. (1997). Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. *Cancer Res* 57, 3223-9.
- Dighe, A. S., Richards, E., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (1994). Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1, 447-56.
- Dissemond, J., Gotte, P., Moors, J., Lindeke, A., Goos, M., Ferrone, S., Wagner, S. N. Association of TAP1 downregulation in human primary melanoma lesions with lack of spontaneous regression. *Melanoma Res.* 13 (3), 253-258. 2003.
- Dissemond J, Gotte, P., Moors, J., Lindeke, A., Goos, M., Ferrone, S., Wagner, S. N. Immunoproteasome subunits LMP2 and LMP7 downregulation in primary malignant melanoma lesions: association with lack of spontaneous regression. *Melanoma Reserch* 13 (4), 371-377. 2003.
- Doran, T., Stuhlmiller, H., Kim, J. A., Martin, E. W. Jr, and Triozzi, P. L. (1997). Oncogene and cytokine expression of human colorectal tumors responding to immunotherapy. *J Immunother* 20, 372-6.
- Dovhey, S. E., Ghosh, N. S., and Wright, K. L. (2000). Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line. *Cancer Res* 60, 5789-96.
- Dumon, K.R., Ishii, H., Fong, L.Y., Zanasi, N., Fidanza, V., Mancini, R., Vecchione, A., Baffa, R., Trapasso, F., D'Urso, M., Huebner, K. and Coce, C.M. (2001). FHIT gene therapy prevents tumor development in Fhit-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci*, 98(6):3346-51.
- Dunn, G. P., Bruce, A. T., Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991-8.

- Ehrlich, P. Ueber den jetzigen stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk* 5, 373-290. 1909.
- Elliott, J. G., Oliver, J. D., and High, S. (1997). The thiol-dependent reductase ERp57 interacts specifically with N-glycosylated integral membrane proteins. *J Biol Chem* 272, 13849-55.
- Elliott, T. (1997). Transporter associated with antigen processing. *Adv Immunol* 65, 47-109.
- Engel, A. M., Svane, I. M., Mouritsen, S., Rygaard, J., Clausen, J., and Werdelin, O. (1996). Methylcholanthrene-induced sarcomas in nude mice have short induction times and relatively low levels of surface MHC class I expression. *APMIS* 104, 629-39.
- Engel, A. M., Svane, I. M., Rygaard, J., and Werdelin, O. (1997). MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *Scand J Immunol* 45, 463-70.
- Farmery, M. R., Allen, S., Allen, A. J., and Bulleid, N. J. (2000). The role of ERp57 in disulfide bond formation during the assembly of major histocompatibility complex class I in a synchronized semipermeabilized cell translation system. *J Biol Chem* 275, 14933-8.
- Feenstra, M., Veltkamp, M., van Kuik, J., Wiertsema, S., Slootweg, P., van den Tweel, J., de Weger, R., and Tilanus, M. (1999). HLA class I expression and chromosomal deletions at 6p and 15q in head and neck squamous cell carcinomas. *Tissue Antigens* 54, 235-45.
- Ferrone, S. and Marincola, F. M. (1995). Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 16, 487-94.
- Festenstein, H. and Garrido, F. (1986). MHC antigens and malignancy. *Nature* 322, 502-3.
- Flanagan, S. P. (1966). 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res* 8, 295-309.
- Fontana, A., Frei, K., Bodmer, S., Hofer, E., Schreier, M. H., Palladino, M. A. Jr, and Zinkernagel, R. M. (1989). Transforming growth factor-beta inhibits the generation of cytotoxic T cells in virus-infected mice. *J Immunol* 143, 3230-4.
- Freeman, K. W., Gangula, R. D., Welm, B. E., Ozen, M., Foster, B. A., Rosen, J. M., Ittmann, M., Greenberg, N. M., and Spencer, D. M. (2003). Conditional activation of fibroblast growth factor receptor (FGFR) 1, but not FGFR2, in prostate cancer cells leads to increased osteopontin induction, extracellular signal-regulated kinase activation, and in vivo proliferation. *Cancer Res* 63, 6237-43.

- Frickel, E. M., Riek, R., Jelesarov, I., Helenius, A., Wuthrich, K., and Ellgaard, L. (2002). TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 1954-9.
- Fruci, D., Lauvau, G., Saveanu, L., Amicosante, M., Butler, R. H., Polack, A., Ginhoux, F., Lemonnier, F., Firat, H., and van Endert, P. M. (2003). Quantifying recruitment of cytosolic peptides for HLA class I presentation: impact of TAP transport. *J Immunol* 170, 2977-84.
- Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., and Ferrara, G. B. (2002). Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med* 196, 459-68.
- Galea-Lauri, J., Darling, D., Gan, S. U., Krivochtchapov, L., Kuiper, M., Gaken, J., Souberbielle, B., and Farzaneh, F. (1999). Expression of a variant of CD28 on a subpopulation of human NK cells: implications for B7-mediated stimulation of NK cells. *J Immunol* 163, 62-70.
- Gao, B., Adhikari, R., Howarth, M., Nakamura, K., Gold, M. C., Hill, A. B., Knee, R., Michalak, M., and Elliott, T. (2002). Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin. *Immunity* 16, 99-109.
- Garbi, N., Tan, P., Diehl, A. D., Chambers, B. J., Ljunggren, H. G., Momburg, F., and Hammerling, G. J. (2000). Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice. *Nat Immunol* 1, 234-8.
- Garcia-Lora, A., Algarra, I., Gaforio, J. J., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (2001). Immunoselection by T lymphocytes generates repeated MHC class I-deficient metastatic tumor variants. *Int J Cancer* 91, 109-19.
- Garcia-Lora, A., Algarra, I., and Garrido, F. (2003). MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape. *J Cell Physiol* 195, 346-55.
- Garcia-Lora, A., Martinez, M., Algarra, I., Gaforio, J. J., and Garrido, F. (2003). MHC class I-deficient metastatic tumor variants immunoselected by T lymphocytes originate from the coordinated downregulation of APM components. *Int J Cancer* 106, 521-7.
- Garrido, A., Perez, M., Delgado, C., Garrido, M. L., Rojano, J., Algarra, I., and Garrido, F. (1986). Influence of class I H-2 gene expression on local tumor growth. Description of a model obtained from clones derived from a solid BALB/c tumor. *Exp Clin Immunogenet* 3, 98-110.
- Garrido, F. and Algarra, I. (2001). MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 83, 117-58.

- Garrido, F., Cabrera, T., Concha, A., Glew, S., Ruiz-Cabello, F., and Stern, P. L. (1993). Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* 14, 491-9.
- Garrido, F., Festenstein, H., and Schirmacher, V. (1976). Further evidence for depression of H-2 and Ia-like specificities of foreign haplotypes in mouse tumour cell lines. *Nature* 261, 705-7.
- Garrido, F., Perez, M., and Torres, M. D. (1979). Absence of four H-2d antigenic specificities in an H-2d sarcoma. *J Immunogenet* 6, 83-6.
- Garrido, F., Ruiz-Cabello, F., Cabrera, T., Perez-Villar, J. J., Lopez-Botet, M., Duggan-Keen, M., and Stern, P. L. (1997). Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 18, 89-95.
- Garrido, M. L., Perez, M., Delgado, C., Rojano, J., Algarra, I., Garrido, A., and Garrido, F. (1986). Immunogenicity of H-2 positive and H-2 negative clones of a mouse tumour, GR9. *J Immunogenet* 13, 159-67.
- Gatti, R. A. and Good, R. A. (1971). Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* 28, 89-98.
- Geier, E., Pfeifer, G., Wilm, M., Lucchiari-Hartz, M., Baumeister, W., Eichmann, K., and Niedermann, G. (1999). A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science* 283, 978-81.
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., and Trinchieri, G. (2002). Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195, 327-33.
- Girardi, M., Oppenheim, D. E., Steele, C. R., Lewis, J. M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R. E., and Hayday, A. C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294, 605-9.
- Girolomoni, G. and Ricciardi-Castagnoli, P. (1997). Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunol Today* 18, 102-4.
- Glas, R., Franksson, L., Une, C., Eloranta, M. L., Ohlen, C., Orn, A., and Karre, K. (2000). Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype. An adaptive component of NK cell-mediated responses. *J Exp Med* 191, 129-38.
- Glynne, R., Powis, S. H., Beck, S., Kelly, A., Kerr, L. A., and Trowsdale, J. (1991). A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 353, 357-60.

- Gorsch, S. M., Memoli, V. A., Stukel, T. A., Gold, L. I., and Arrick, B. A. (1992). Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 52, 6949-52.
- Grachtchouk, M., Mo, R., Yu, S., Zhang, X., Sasaki, H., Hui, C.C., Dlugosz, A.A. (2000). Basal cell carcinomas in mice overexpressing Gli2 in skin. *Nat Genet.* 24(3):216-7.
- Grande, A. G. 3rd and Van Kaer, L. (2001). Tapasin: an ER chaperone that controls MHC class I assembly with peptide. *Trends Immunol* 22, 194-9.
- Green, J., Leigh, I.M., Poulsom, R., Quinn, A.G. (1998). Basal cell carcinoma development is associated with induction of the expression of the transcription factor Gli-1. *Br J Dermatol.* 139(5):911-5.
- Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K. H., and Spies, T. (1999). Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6879-84.
- Gronbaek, K., Straten, P. T., Ralfkiaer, E., Ahrenkiel, V., Andersen, M. K., Hansen, N. E., Zeuthen, J., Hou-Jensen, K., and Guldberg, P. (1998). Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 92, 3018-24.
- Hahn, H., Wojnowski, L., Zimmer, A.M., Hall, J., Miller, G. and Zimmer, A. (1998). Rhabdomyosarcomas and radiation hypersensitivity in a mouse model of Gorlin syndrome. *Nat Med.* 4(5):619-22.
- Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J., and Tschopp, J. (1996). Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274, 1363-6.
- Hanada, K., Yewdell, J. W., and Yang, J. C. (2004). Immune recognition of a human renal cancer antigen through post-translational protein splicing. *Nature* 427, 252-6.
- Hanahan, D. and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-64.
- Haney, P. M., Bolinger, L., Raefsky, C., and Patel, M. S. (1984). Turnover of succinyl-CoA:3-oxoacid CoA-transferase in glioma and neuroblastoma cells. Specific influence of acetoacetate in neuroblastoma cells. *Biochem J* 224, 67-74.
- Hayday, A. C. (2000). [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 18, 975-1026.

- Helenius, A. and Aebi, M. (2001). Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291, 2364-9.
- Hersey, P. and Zhang, X. D. (2001). How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer* 1, 142-50.
- Hicklin, D. J., Marincola, F. M., and Ferrone, S. (1999). HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today* 5, 178-86.
- Huang, M., Stolina, M., Sharma, S., Mao, J.T., Zhu, L., Miller, P.W., Wollman, J., Herschman, H., and Dubinett, S.M. (1998). Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and downregulation of interleukin 12 production. *Cancer Res* 58:1208-16.
- Hunig T. T-cell function and specificity in athymic mice. *Immunol. Today* 4, 84-87. 1983.
- Ikeda, H., Lethe, B., Lehmann, F., van Baren, N., Baurain, J. F., de Smet, C., Chambost, H., Vitale, M., Moretta, A., Boon, T., and Coulie, P. G. (1997). Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 6, 199-208.
- Ikeda, H., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2002). The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 95-109.
- Ishii, H., Ozawa, K. and Furukawa Y. (2003a). Alteration of the fragile histidine triad gene early in carcinogenesis: an update. *J Exp Ther Oncol.* 3(6):291-6.
- Ishii, H., Zanesi, N., Vecchione, A., Trapasso, F., Yendamuri, S., Sarti, M., Baffa, R., During, M.J., Huebner, K., Fong, L.Y. and Croce, C.M. (2003) Regression of upper gastric cancer in mice by FHIT gene delivery. *FASEB J.* 17(12):1768-70.
- Ishii, H. and Furukawa, Y. (2004). Alterations of common chromosome fragile sites in hematopoietic malignancies. *Int J Hematol.* 79(3):238-42.
- Ishii, H., Vecchione, A., Fong, L.Y., Zanesi, N., Trapasso, F., Furukawa, Y., Baffa, R., Huebner, K. and Croce, C.M. (2004). Cancer prevention and therapy in a preclinical mouse model: impact of FHIT viruses. *Curr Gene Ther.* 4(1):53-63.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., Rimoldi, D., French, L. E., and Tschopp, J. (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388, 190-5.

Jimenez, P., Canton, J., Collado, A., Cabrera, T., Serrano, A., Real, L. M., Garcia, A., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (1999). Chromosome loss is the most frequent mechanism contributing to HLA haplotype loss in human tumors. *Int J Cancer* 83, 91-7.

Johnsen, A., France, J., Sy, M. S., and Harding, C. V. (1998). Down-regulation of the transporter for antigen presentation, proteasome subunits, and class I major histocompatibility complex in tumor cell lines. *Cancer Res* 58, 3660-7.

Johnsen, A. K., Templeton, D. J., Sy, M., and Harding, C. V. (1999). Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *J Immunol* 163, 4224-31.

Jones, E. Y. (1997). MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol* 9, 75-9.

Kaplan, D. H., Shankaran, V., Dighe, A. S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7556-61.

Kaplan, H. S. (1971). Role of immunologic disturbance in human oncogenesis: some facts and fancies. *Br J Cancer* 25, 620-34.

Kim, I. S., Kim, D. H., Han, S. M., Chin, M. U., Nam, H. J., Cho, H. P., Choi, S. Y., Song, B. J., Kim, E. R., Bae, Y. S., and Moon, Y. H. (2000). Truncated form of importin alpha identified in breast cancer cell inhibits nuclear import of p53. *J Biol Chem* 275, 23139-45.

Kim, Y. S., Lewandoski, M., Perantoni, A. O., Kurebayashi, S., Nakanishi, G., and Jetten, A. M. (2002). Identification of Glis1, a novel Gli-related, Kruppel-like zinc finger protein containing transactivation and repressor functions. *J Biol Chem* 277, 30901-13.

Kinzler, K.W., Bigner, S.H., Bigner, D.D., Trent, J.M., Law, M.L., O'Brien, S.J., Wong, A.J. and Vogelstein, B. (1987). Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma. *Science*, 236:70-3.

Klein, G. (1966). Tumor antigens. *Annu Rev Microbiol* 20, 223-52.

Klein, G., Sjogren, H. O., Klein, E., and Hellstrom, K. E. (1960). Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* 20, 1561-72.

Kloetzel, P. M. (2001). Antigen processing by the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 179-87.

- Koopman, L. A., Corver, W. E., van der Slik, A. R., Giphart, M. J., and Fleuren, G. J. (2000). Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med* 191, 961-76.
- Kumar, A., Commane, M., Flickinger, T. W., Horvath, C. M., and Stark, G. R. (1997). Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* 278, 1630-2.
- Landowski, T. H., Qu, N., Buyuksal, I., Painter, J. S., and Dalton, W. S. (1997). Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 90, 4266-70.
- Larsen, C. N. and Finley, D. (1997). Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. *Cell* 91, 431-4.
- Lauvau, G., Kakimi, K., Niedermann, G., Ostankovitch, M., Yotnda, P., Firat, H., Chisari, F. V., and van Endert, P. M. (1999). Human transporters associated with antigen processing (TAPs) select epitope precursor peptides for processing in the endoplasmic reticulum and presentation to T cells. *J Exp Med* 190, 1227-40.
- Lehner, P. J., Surman, M. J., and Cresswell, P. (1998). Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line .220. *Immunity* 8, 221-31.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-9.
- Lewis, J. W. and Elliott, T. (1998). Evidence for successive peptide binding and quality control stages during MHC class I assembly. *Curr Biol* 8, 717-20.
- Liao, F., Rabin, R. L., Yannelli, J. R., Koniaris, L. G., Vanguri, P., and Farber, J. M. (1995). Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 182, 1301-14.
- Ljunggren, H. G. and Karre, K. (1990). In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today* 11, 237-44.
- Lopez-Botet, M., Llano, M., Navarro, F., and Bellon, T. (2000). NK cell recognition of non-classical HLA class I molecules. *Semin Immunol* 12, 109-19.
- Ludewig, B., Graf, D., Gelderblom, H. R., Becker, Y., Kroccek, R. A., and Pauli, G. (1995). Spontaneous apoptosis of dendritic cells is efficiently inhibited by TRAP (CD40-ligand) and TNF-alpha, but strongly enhanced by interleukin-10. *Eur J Immunol* 25, 1943-50.

- Luster, A. D. and Ravetch, J. V. (1987). Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J Exp Med* 166, 1084-97.
- Maleckar, J. R. and Sherman, L. A. (1987). The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. *J Immunol* 138, 3873-6.
- Maleno, I., Lopez-Nevot, M. A., Cabrera, T., Salinero, J., and Garrido, F. (2002). Multiple mechanisms generate HLA class I altered phenotypes in laryngeal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Cancer Immunol Immunother* 51, 389-96.
- Maleno, I., Cabrera, C.M., Cabrera, T., Paco, L., Lopez-Nevot, M.A., Collado, A., Ferron, A. and Garrido, F. (2004). Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Immunogenetics* 56(4), 244-53.
- Marin, R., Ruiz-Cabello, F., Pedrinaci, S., Mendez, R., Jimenez, P., Geraghty, D. E., and Garrido, F. (2003). Analysis of HLA-E expression in human tumors. *Immunogenetics* 54, 767-75.
- Marincola, F. M., Jaffee, E. M., Hicklin, D. J., and Ferrone, S. (2000). Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 74, 181-273.
- Matsuyama, A., Shiraishi, T., Trapasso, F., Kuroki, T., Alder, H., Mori, M., Huebner, K., and Croce, C. M. (2003). Fragile site orthologs FHIT/FRA3B and Fhit/Fra14A2: evolutionarily conserved but highly recombinogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 14988-93.
- Matzinger, P. (1994). Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12, 991-1045.
- Medema, J. P., de Jong, J., van Hall, T., Melief, C. J., and Offringa, R. (1999). Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med* 190, 1033-8.
- Melen, K., Fagerlund, R., Franke, J., Kohler, M., Kinnunen, L., and Julkunen, I. (2003). Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *J Biol Chem* 278, 28193-200.
- Mellor, A. L., Sivakumar, J., Chandler, P., Smith, K., Molina, H., Mao, D., and Munn, D. H. (2001). Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. *Nat Immunol* 2, 64-8.

- Mendez, R., Serrano, A., Jager, E., Maleno, I., Ruiz-Cabello, F., Knuth, A., and Garrido, F. (2001). Analysis of HLA class I expression in different metastases from two melanoma patients undergoing peptide immunotherapy. *Tissue Antigens* 57, 508-19.
- Mialdea, M. J., Martin, J., Gaforio, J. J., Algarra, I., Perez, M., Gonzalez, A., Ljunggren, H. G., and Garrido, F. (1992). Effect of MHC class-I transfection on local tumor growth and metastasis in an H-2-negative clone derived from a chemically induced fibrosarcoma. *Int J Cancer* 52, 153-8.
- Monaco, J. J. and McDevitt, H. O. (1986). The LMP antigens: a stable MHC-controlled multisubunit protein complex. *Hum Immunol* 15, 416-26.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Biassoni, R., Mingari, M. C., and Moretta, L. (1996). Receptors for HLA class-I molecules in human natural killer cells. *Annu Rev Immunol* 14, 619-48.
- Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A., and Mellor, A. L. (1999). Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 189, 1363-72.
- Munn, D. H., Zhou, M., Attwood, J. T., Bondarev, I., Conway, S. J., Marshall, B., Brown, C., and Mellor, A. L. (1998). Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281, 1191-3.
- Nandi, D., Jiang, H., and Monaco, J. J. (1996). Identification of MECL-1 (LMP-10) as the third IFN-gamma-inducible proteasome subunit. *J Immunol* 156, 2361-4.
- Neuwald, A. F., Aravind, L., Spouge, J. L., and Koonin, E. V. (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* 9, 27-43.
- Niehans, G. A., Brunner, T., Frizelle, S. P., Liston, J. C., Salerno, C. T., Knapp, D. J., Green, D. R., and Kratzke, R. A. (1997). Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* 57, 1007-12.
- Noguchi, Y., Jungbluth, A., Richards, E. C., and Old, L. J. (1996). Effect of interleukin 12 on tumor induction by 3-methylcholanthrene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11798-801.
- Norman, L. P., Jiang, W., Han, X., Saunders, T. L., and Bond, J. S. (2003). Targeted disruption of the meprin beta gene in mice leads to underrepresentation of knockout mice and changes in renal gene expression profiles. *Mol Cell Biol* 23, 1221-30.
- Old, L. J. and Boyse, E. A. (1964). Immunology of Experimental Tumors. *Annu Rev Med* 15, 167-86.

Oliver, J. D., Roderick, H. L., Llewellyn, D. H., and High, S. (1999). ERp57 functions as a subunit of specific complexes formed with the ER lectins calreticulin and calnexin. *Mol Biol Cell* 10, 2573-82.

Olsson-Alheim, M. Y., Salcedo, M., Ljunggren, H. G., Karre, K., and Sentman, C. L. (1997). NK cell receptor calibration: effects of MHC class I induction on killing by Ly49Ahigh and Ly49Alow NK cells. *J Immunol* 159, 3189-94.

Oyama, T., Ran, S., Ishida, T., Nadaf, S., Kerr, L., Carbone, D. P., and Gabrilovich, D. I. (1998). Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 160, 1224-32.

Pamer, E. and Cresswell, P. (1998). Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16, 323-58.

Pantelouris, E. M. (1968). Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 217, 370-1.

Pease, L. R., Horton, R. M., Pullen, J. K., and Cai, Z. L. (1991). Structure and diversity of class I antigen presenting molecules in the mouse. *Crit Rev Immunol* 11, 1-32.

Pellegrino, M. A., Ferrone, S., Reisfeld, R. A., Irie, R. F., and Golub, S. H. (1977). Expression of histocompatibility (HLA) antigens on tumor cells and normal cells from patients with melanoma. *Cancer* 40, 36-41.

Peltenburg, L.T. and Schrier, P.I. (1994). Transcriptional suppression of HLA-B expression by c-Myc is mediated through the core promoter elements. *Immunogenetics* 40, 54-61.

Penn, I. (1999). Posttransplant malignancies. *Transplant Proc* 31, 1260-2.

Penn, I. and Starzl, T. E. (1970). Malignant lymphomas in transplantation patients: a review of the world experience. *Int Z Klin Pharmakol Ther Toxikol* 3, 49-54.

Perez, B., Benitez, R., Fernandez, M. A., Oliva, M. R., Soto, J. L., Serrano, S., Lopez Nevot, M. A., and Garrido, F. (1999). A new beta 2 microglobulin mutation found in a melanoma tumor cell line. *Tissue Antigens* 53, 569-72.

Perez, M., Algarra, I., Ljunggren, H. G., Caballero, A., Mialdea, M. J., Gaforio, J. J., Klein, G., Karre, K., and Garrido, F. (1990). A weakly tumorigenic phenotype with high MHC class-I expression is associated with high metastatic potential after surgical removal of the primary murine fibrosarcoma. *Int J Cancer* 46, 258-61.

- Peyman, J. A. (1999). Repression of major histocompatibility complex genes by a human trophoblast ribonucleic acid. *Biol Reprod* 60, 23-31.
- Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E., and Valiante, N. M. (2002). Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells. *J Exp Med* 195, 335-41.
- Porgador, A., Mandelboim, O., Restifo, N. P., and Strominger, J. L. (1997). Natural killer cell lines kill autologous beta2-microglobulin-deficient melanoma cells: implications for cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13140-5.
- Purcell, A. W., Gorman, J. J., Garcia-Peydro, M., Paradela, A., Burrows, S. R., Talbo, G. H., Laham, N., Peh, C. A., Reynolds, E. C., Lopez De Castro, J. A., and McCluskey, J. (2001). Quantitative and qualitative influences of tapasin on the class I peptide repertoire. *J Immunol* 166, 1016-27.
- Qin, Z., Harders, C., Cao, X., Huber, C., Blankenstein, T., and Seliger, B. (2002). Increased tumorigenicity, but unchanged immunogenicity, of transporter for antigen presentation 1-deficient tumors. *Cancer Res* 62, 2856-60.
- Radzikowski, C., Rygaard, J., Budzynski, W., Stenvang, J. P., Schou, M., Vangsted, A., and Zeuthen, J. (1994). Strain- and age-dependent natural and activated in vitro cytotoxicity in athymic nude mice. *APMIS* 102, 481-8.
- Real, L. M., Jimenez, P., Canton, J., Kirkin, A., Garcia, A., Abril, E., Zeuthen, J., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (1998). In vivo and in vitro generation of a new altered HLA phenotype in melanoma-tumour-cell variants expressing a single HLA-class-I allele. *Int J Cancer* 75, 317-23.
- Rechsteiner, M., Realini, C., and Ustrell, V. (2000). The proteasome activator 11 S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J* 345 Pt 1, 1-15.
- Reits, E. A., Vos, J. C., Gromme, M., and Neefjes, J. (2000). The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 404, 774-8.
- Restifo, N. P., Antony, P. A., Finkelstein, S. E., Leitner, W. W., Surman, D. P., Theoret, M. R., and Touloukian, C. E. (2002). Assumptions of the tumor 'escape' hypothesis. *Semin Cancer Biol* 12, 81-6.
- Restifo, N. P., Esquivel, F., Kawakami, Y., Yewdell, J. W., Mule, J. J., Rosenberg, S. A., and Bennink, J. R. (1993). Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med* 177, 265-72.
- Ristimäki, A., Honkanen, N., Jankala, H., Sipponen, P., and Harkonen, M. (1997). Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 57, 1276-80.

- Ritz, U., Momburg, F., Pilch, H., Huber, C., Maeurer, M. J., and Seliger, B. (2001). Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. *Int J Oncol* 19, 1211-20.
- Rock, K. L. and Goldberg, A. L. (1999). Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 17, 739-79.
- Rosa, F., Berissi, H., Weissenbach, J., Maroteaux, L., Fellous, M., and Revel, M. (1983). The beta2-microglobulin mRNA in human Daudi cells has a mutated initiation codon but is still inducible by interferon. *EMBO J* 2, 239-43.
- Roz, L., Gramegna, M., Ishii, H., Croce, C.M. and Sois, G. (2002). Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in lung and cervical cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci*, 99(6):3615-20.
- Ruiz-Cabello, F. and Garrido, F. (1998). HLA and cancer: from research to clinical impact. *Immunol Today* 19, 539-42.
- Ruiz i Altaba A, Sanchez P, Dahmane N. (2002). Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer*, 2(5):361-72.
- Ruppert JM, Kinzler KW, Wong AJ, Bigner SH, Kao FT, Law ML, Seunanez HN, O'Brien SJ, Vogelstein B. (1988). The GLI-Kruppel family of human genes. *Mol Cell Biol*, 8(8):3104-13.
- Rygaard, J. and Povlsen, C. O. (1974a). Is immunological surveillance not a cell-mediated immune function? *Transplantation* 17, 135-6.
- Rygaard, J. and Povlsen, C. O. (1974b). The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta Pathol Microbiol Scand [B] Microbiol Immunol* 82, 99-106.
- Sadasivan, B., Lehner, P. J., Ortmann, B., Spies, T., and Cresswell, P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5, 103-14.
- Sadasivan, B. K., Cariappa, A., Waneck, G. L., and Cresswell, P. (1995). Assembly, peptide loading, and transport of MHC class I molecules in a calnexin-negative cell line. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 60, 267-75.
- Saito, H., Tsujitani, S., Ikeguchi, M., Maeta, M., and Kaibara, N. (1998). Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue. *Br J Cancer* 78, 1573-7.

Salazar-Onfray, F., Charo, J., Petersson, M., Frelund, S., Noffz, G., Qin, Z., Blankenstein, T., Ljunggren, H. G., and Kiessling, R. (1997). Down-regulation of the expression and function of the transporter associated with antigen processing in murine tumor cell lines expressing IL-10. *J Immunol* 159, 3195-202.

Salvesen, G. S. and Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10964-7.

Sanda, M. G., Restifo, N. P., Walsh, J. C., Kawakami, Y., Nelson, W. G., Pardoll, D. M., and Simons, J. W. (1995). Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 87, 280-5.

Sano, H., Kawahito, Y., Wilder, R. L., Hashiramoto, A., Mukai, S., Asai, K., Kimura, S., Kato, H., Kondo, M., and Hla, T. (1995). Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 55, 3785-9.

Saric, T., Chang, S. C., Hattori, A., York, I. A., Markant, S., Rock, K. L., Tsujimoto, M., and Goldberg, A. L. (2002). An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat Immunol* 3, 1169-76.

Schreiber, H., Wu, T. H., Nachman, J., and Kast, W. M. (2002). Immunodominance and tumor escape. *Semin Cancer Biol* 12, 25-31.

Schubert, U., Anton, L. C., Gibbs, J., Norbury, C. C., Yewdell, J. W., and Bennink, J. R. (2000). Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404, 770-4.

Schwartz, R. H. (1990). A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248, 1349-56.

Scott, J. E. and Dawson, J. R. (1995). MHC class I expression and transport in a calnexin-deficient cell line. *J Immunol* 155, 143-8.

Seifert, U., Maranon, C., Shmueli, A., Desoutter, J.F., Wesoloski, L., Janek, K., Henklein, P., Diescher, S., Andrieu, M., de la Salle, H., Weinschenk, T., Schild, H., Laderach, D., Galy, A., Haas, G., Kloetzel, P.M., Reiss, Y. and Hosmalin, A. (2003). An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat Immunol* 4, 375-9.

Seliger, B., Maeurer, M. J., and Ferrone, S. (2000). Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 21, 455-64.

Seliger, B., Wollscheid, U., Momburg, F., Blankenstein, T., and Huber, C. (2001). Characterization of the major histocompatibility complex class I deficiencies in B16 melanoma cells. *Cancer Res* 61, 1095-9.

Seliger, B., Wollscheid, U., Momburg, F., Blankenstein, T., and Huber, C. (2000). Coordinate downregulation of multiple MHC class I antigen processing genes in chemical-induced murine tumor cell lines of distinct origin. *Tissue Antigens* 56, 327-36.

Serrano, A., Brady, C. S., Jimenez, P., Duggan-Keen, M. F., Mendez, R., Stern, P., Garrido, F., and Ruiz-Cabello, F. (2000). A mutation determining the loss of HLA-A2 antigen expression in a cervical carcinoma reveals novel splicing of human MHC class I classical transcripts in both tumoral and normal cells. *Immunogenetics* 51, 1047-52.

Serrano, A., Tanzarella, S., Lionello, I., Mendez, R., Traversari, C., Ruiz-Cabello, F., and Garrido, F. (2001). Rexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer* 94, 243-51.

Serwold, T., Gaw, S., and Shastri, N. (2001). ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nat Immunol* 2, 644-51.

Serwold, T., Gonzalez, F., Kim, J., Jacob, R., and Shastri, N. (2002). ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419, 480-3.

Sevignani, C., Calin, G.A., Cesari, R., Sarti, M., Ishii, H., Yendamuri, S., Vecchione, A., Trapasso, F. and Croce CM. (2003). Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in breast cancer cell lines. *Cancer Res.* 2003 63(6):1183-7.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A. T., White, J. M., Swanson, P. E., Old, L. J., and Schreiber, R. D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-11.

Sharma, S., Stolina, M., Lin, Y., Gardner, B., Miller, P. W., Kronenberg, M., and Dubinett, S. M. (1999). T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J Immunol* 163, 5020-8.

Shastri, N., Schwab, S., and Serwold, T. (2002). Producing nature's gene-chips: the generation of peptides for display by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 20, 463-93.

Sheil, A. G. (2001). Donor-derived malignancy in organ transplant recipients. *Transplant Proc* 33, 1827-9.

Shin, M. S., Park, W. S., Kim, S. Y., Kim, H. S., Kang, S. J., Song, K. Y., Park, J. Y., Dong, S. M., Pi, J. H., Oh, R. R., Lee, J. Y., Yoo, N. J., and Lee, S. H. (1999). Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol* 154, 1785-91.

Silverstein AM . A History of Immunology. Academic San Diego CA . 1989.

Smyth, M. J., Crowe, N. Y., and Godfrey, D. I. (2001). NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol* 13, 459-63.

Smyth, M. J., Godfrey, D. I., and Trapani, J. A. (2001). A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2, 293-9.

Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., Cretney, E., Trapani, J. A., Taniguchi, M., Kawano, T., Pelikan, S. B., Crowe, N. Y., and Godfrey, D. I. (2000). Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 191, 661-8.

Smyth, M. J., Thia, K. Y., Street, S. E., MacGregor, D., Godfrey, D. I., and Trapani, J. A. (2000). Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 192, 755-60.

Soong, T. W. and Hui, K. M. (1992). Locus-specific transcriptional control of HLA genes. *J Immunol* 149, 2008-20.

Spies, T., Blanck, G., Bresnahan, M., Sands, J., and Strominger, J. L. (1989). A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science* 243, 214-7.

Spiliotis, E. T., Manley, H., Osorio, M., Zuniga, M. C., and Edidin, M. (2000). Selective export of MHC class I molecules from the ER after their dissociation from TAP. *Immunity* 13, 841-51.

Stoler, D. L., Chen, N., Basik, M., Kahlenberg, M. S., Rodriguez-Bigas, M. A., Petrelli, N. J., and Anderson, G. R. (1999). The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 15121-6.

Stoltze, L., Schirle, M., Schwarz, G., Schroter, C., Thompson, M. W., Hersh, L. B., Kalbacher, H., Stevanovic, S., Rammensee, H. G., and Schild, H. (2000). Two new proteases in the MHC class I processing pathway. *Nat Immunol* 1, 413-8.

Strand, S., Hofmann, W. J., Hug, H., Muller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S. M., Stremmel, W., Krammer, P. H., and Galle, P. R. (1996). Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 2, 1361-6.

Straus, S. E., Jaffe, E. S., Puck, J. M., Dale, J. K., Elkon, K. B., Rosen-Wolff, A., Peters, A. M., Sneller, M. C., Hallahan, C. W., Wang, J., Fischer, R. E., Jackson, C. M., Lin, A. Y., Baumler, C., Siegert, E., Marx, A., Vaishnav, A. K., Grodzicky, T., Fleisher, T. A., and Lenardo, M. J. (2001). The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 98, 194-200.

Street, S. E., Cretney, E., and Smyth, M. J. (2001). Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97, 192-7.

Street, S. E., Trapani, J. A., MacGregor, D., and Smyth, M. J. (2002). Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med* 196, 129-34.

Stronge, V. S., Saito, Y., Ihara, Y., and Williams, D. B. (2001). Relationship between calnexin and BiP in suppressing aggregation and promoting refolding of protein and glycoprotein substrates. *J Biol Chem* 276, 39779-87.

Stutman, O. (1979). Chemical carcinogenesis in nude mice: comparison between nude mice from homozygous matings and heterozygous matings and effect of age and carcinogen dose. *J Natl Cancer Inst* 62, 353-8.

Stutman, O. (1975). Immunodepression and malignancy. *Adv Cancer Res* 22, 261-422.

Stutman, O. (1973). Immunological aspects of resistance to the oncogenic effect of 3-methylcholanthrene in mice. *Isr J Med Sci* 9, 217-28.

Stutman, O. (1974). Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 183, 534-6.

Svane, I. M., Engel, A. M., Nielsen, M. B., Ljunggren, H. G., Rygaard, J., and Werdelin, O. (1996). Chemically induced sarcomas from nude mice are more immunogenic than similar sarcomas from congenic normal mice. *Eur J Immunol* 26, 1844-50.

Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nat Med* 7, 94-100.

Takeda, K., Oshima, H., Hayakawa, Y., Akiba, H., Atsuta, M., Kobata, T., Kobayashi, K., Ito, M., Yagita, H., and Okumura, K. (2000). CD27-mediated activation of murine NK cells. *J Immunol* 164, 1741-5.

Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2002). Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 195, 161-9.

Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Yamaguchi, N., Yagita, H., and Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in NK cell-mediated and IFN-gamma-dependent suppression of subcutaneous tumor growth. *Cell Immunol* 214, 194-200.

Tector, M. and Salter, R. D. (1995). Calnexin influences folding of human class I histocompatibility proteins but not their assembly with beta 2-microglobulin. *J Biol Chem* 270, 19638-42.

Thomas, L. In cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. Ed. Lawrence, H.S., Hoeber-Harper. New York, 529-532. 1959.

Thomas, L. (1982). On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med* 55, 329-33.

Toi, M., Taniguchi, T., Yamamoto, Y., Kurisaki, T., Suzuki, H., and Tominaga, T. (1996). Clinical significance of the determination of angiogenic factors. *Eur J Cancer* 32A, 2513-9.

Tomkinson, B. (1999). Tripeptidyl peptidases: enzymes that count. *Trends Biochem Sci* 24, 355-9.

Torres, M. J., Ruiz-Cabello, F., Skoudy, A., Berrozpe, G., Jimenez, P., Serrano, A., Real, F. X., and Garrido, F. (1996). Loss of an HLA haplotype in pancreas cancer tissue and its corresponding tumor derived cell line. *Tissue Antigens* 47, 372-81.

Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B. J. (2003). Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9, 1269-74.

van den Broek, M. E., Kagi, D., Ossendorp, F., Toes, R., Vamvakas, S., Lutz, W. K., Melief, C. J., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1996). Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* 184, 1781-90.

Van Kaer, L. (2001). Accessory proteins that control the assembly of MHC molecules with peptides. *Immunol Res* 23, 205-14.

Van Kaer, L., Ashton-Rickardt, P. G., Ploegh, H. L., and Tonegawa, S. (1992). TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell* 71, 1205-14.

Villunger, A. and Strasser, A. (1999). The great escape: is immune evasion required for tumor progression? *Nat Med* 5, 874-5.

Vitale, M., Rezzani, R., Rodella, L., Zauli, G., Grigolato, P., Cadei, M., Hicklin, D. J., and Ferrone, S. (1998). HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) down-regulation in high-grade primary breast carcinoma lesions. *Cancer Res* 58, 737-42.

Vitale, M., Zimmer, J., Castriconi, R., Hanau, D., Donato, L., Bottino, C., Moretta, L., de la Salle, H., and Moretta, A. (2002). Analysis of natural killer cells in TAP2-deficient patients: expression of functional triggering receptors and evidence for the existence of inhibitory receptor(s) that prevent lysis of normal autologous cells. *Blood* 99, 1723-9.

Wang, Z., Marincola, F. M., Rivoltini, L., Parmiani, G., and Ferrone, S. (1999). Selective histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 loss caused by aberrant pre-mRNA splicing in 624MEL28 melanoma cells. *J Exp Med* 190, 205-15.

Wilk, S., Chen, W. E., and Magnusson, R. P. (2000). Properties of the beta subunit of the proteasome activator PA28 (11S REG). *Arch Biochem Biophys* 384, 174-80.

Williams, A. P., Peh, C. A., Purcell, A. W., McCluskey, J., and Elliott, T. (2002). Optimization of the MHC class I peptide cargo is dependent on tapasin. *Immunity* 16, 509-20.

Wolff, H., Saukkonen, K., Anttila, S., Karjalainen, A., Vainio, H., and Ristimäki, A. (1998). Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 58, 4997-5001.

Yoon, J.W., Kita, Y., Frank, D.J., Majewski, R.R., Konicek, B.A., Nobrega, M.A., Jacob, H., Walterhouse, D., Iannaccone, P. (2002). Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. *J Biol Chem.* 277(7):5548-55.

Yoon, S. J., Kang, J. O., Park, J. S., Kim, N. K., and Heo, D. S. (2000). Reduced expression of MHC class I antigen in human cancer cell lines with defective LMP-7. *Anticancer Res* 20, 949-53.

York, I. A., Chang, S. C., Saric, T., Keys, J. A., Favreau, J. M., Goldberg, A. L., and Rock, K. L. (2002). The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat Immunol* 3, 1177-84.

York, I. A., Goldberg, A. L., Mo, X. Y., and Rock, K. L. (1999). Proteolysis and class I major histocompatibility complex antigen presentation. *Immunol Rev* 172, 49-66.

- York, I. A. and Rock, K. L. (1996). Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14, 369-96.
- Yu, D., Allman, D., Goldschmidt, M. H., Atchison, M. L., Monroe, J. G., and Thomas-Tikhonenko, A. (2003). Oscillation between B-lymphoid and myeloid lineages in Myc-induced hematopoietic tumors following spontaneous silencing/reactivation of the EBF/Pax5 pathway. *Blood* 101, 1950-5.
- Yue, F. Y., Dummer, R., Geertsens, R., Hofbauer, G., Laine, E., Manolio, S., and Burg, G. (1997). Interleukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II and ICAM-1 molecules. *Int J Cancer* 71, 630-7.
- Zaks, T. Z., Chappell, D. B., Rosenberg, S. A., and Restifo, N. P. (1999). Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J Immunol* 162, 3273-9.
- Zannini, L., Lecis, D., Lisanti, S., Benetti, R., Buscemi, G., Schneider, C., and Delia, D. (2003). Karyopherin-alpha2 protein interacts with Chk2 and contributes to its nuclear import. *J Biol Chem* 278, 42346-51.
- Zapun, A., Darby, N. J., Tessier, D. C., Michalak, M., Bergeron, J. J., and Thomas, D. Y. (1998). Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J Biol Chem* 273, 6009-12.
- Zeidler, R., Eissner, G., Meissner, P., Uebel, S., Tampe, R., Lazis, S., and Hammerschmidt, W. (1997). Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* 90, 2390-7.
- Zhang, Q. and Salter, R. D. (1998). Distinct patterns of folding and interactions with calnexin and calreticulin in human class I MHC proteins with altered N-glycosylation. *J Immunol* 160, 831-7.
- Zhang, Q., Tector, M., and Salter, R. D. (1995). Calnexin recognizes carbohydrate and protein determinants of class I major histocompatibility complex molecules. *J Biol Chem* 270, 3944-8.
- Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C. (1997). The discovery of MHC restriction. *Immunol Today* 18, 14-7.