

UNIVERSIDAD DE GRANADA

HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR



LAURA PACO MATEU  
GRANADA, 2006



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

**TESIS DOCTORAL**

**IMPLICACIONES BIOLÓGICAS DE LA EXPRESIÓN DE GENES HLA EN  
LA LÍNEA DE MELANOMA ANDO-2: TRANSFECCIÓN DE GENES HLA  
DE CLASE I**

**Granada, 2006**

D. Angel Miguel García-Lora, Doctor en Ciencias Químicas, Investigador del Hospital Universitario Virgen de las Nieves

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado "IMPLICACIONES BIOLÓGICAS DE LA EXPRESIÓN DE GENES HLA EN LA LÍNEA DE MELANOMA ANDO-2: TRANSFECCIÓN DE GENES HLA DE CLASE I", ha sido realizado bajo mi dirección por D<sup>a</sup> Laura Paco Mateu, para optar al título de Doctor por la Universidad de Granada.

Granada, a 10 Mayo de 2006

Angel Miguel García Lora

D. Miguel Angel López Nevot, Doctor en Medicina y Cirugía, Facultativo Especialista del área del Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. Profesor Asociado a tiempo parcial, Área de Inmunología. Universidad de Granada

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado "IMPLICACIONES BIOLÓGICAS DE LA EXPRESIÓN DE GENES HLA EN LA LÍNEA DE MELANOMA ANDO-2: TRANSFECCIÓN DE GENES HLA DE CLASE I", ha sido realizado bajo mi dirección por D<sup>a</sup> Laura Paco Mateu, para optar al título de Doctor por la Universidad de Granada.

Granada, a 10 Mayo de 2006

Miguel Ángel López Nevot

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

CERTIFICA:

Que el presente trabajo titulado "IMPLICACIONES BIOLÓGICAS DE LA EXPRESIÓN DE GENES HLA EN LA LÍNEA DE MELANOMA ANDO-2: TRANSFECCIÓN DE GENES HLA DE CLASE I", ha sido realizado bajo mi dirección por D<sup>a</sup> Laura Paco Mateu, para optar al título de Doctor por la Universidad de Granada.

Granada, a 10 de Mayo de 2006

Federico Garrido Torres-Puchol

Como resultado de la realización de esta Tesis Doctoral, se ha llevado a cabo la siguiente publicación:

Paco L, García-Lora A, Cabrera CM, Maleno I, López-Nevot MA, Garrido F. An HLA class I positive melanoma becomes HLA negative after passage in nude mice. Submitted to *International Journal of Cancer*.

Las siguientes publicaciones relacionadas:

Maleno I, Cabrera CM, Cabrera T, Paco L, López-Nevot MA, Collado A, Ferrón A, 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* 56:244-53

Rodríguez T, Méndez R, Roberts CH, Ruiz-Cabello F, Dodi A, López-Nevot MA, Paco L, Maleno I, Marsh SGE, Pawelec G, Garrido F. 2005. High frequency of homozygosity of the HLA region in melanoma cell lines reveals a pattern compatible with extensive loss of heterozygosity. *Cancer Immunol Immunother* 54:141-48

Y las siguientes comunicaciones a congresos, publicadas en revistas nacionales e internacionales:

Paco L, Jiménez-Medina E, Martínez-Llamas M, Maleno I, García-Lora A, López-Nevot MA, Coulie P, Garrido F. Caracterización de la línea de melanoma ANDO-2. 2004. *Inmunología*, 23(1):152

Paco L, Martínez-Llamas M, Jiménez-Medina E, Maleno I, Palacios J, García-Lora A, López-Nevot MA, Coulie P, Garrido F. Reexpresión of the

HLA-A2 gene in a melanoma cell line with an haplotype loss. 2004. *Genes and Immunity*, 5(1):S64

Paco L, Maleno I, Jiménez-Medina E, Vilchez JR, Cabrera CM, García-Lora A, López-Nevot MA, Garrido F. 2005. A cDNA clone from HLA-B\*1302 retains intron 1. *Genes and Immunity*, 6 (1):162

Paco L, Jiménez-Medina E, Maleno I, Cabrera CM, Vilchez JR, García-Lora A, López-Nevot MA, Coulie P, Garrido F. 2005. A human cell line progress from phenotype II to phenotype I by downregulation of APM components after passage on nude mice. *Genes and Immunity*, 6 (1):32

Paco L, Jiménez-Medina E, Maleno I, Cabrera CM, Vilchez JR, García-Lora A, López-Nevot MA, Coulie P, Garrido F. 2005. Reexpresión de genes HLA de clase I en una línea de melanoma con pérdida de haplotipo. *Inmunología*, 24 (1):136

Paco L, García-Lora A, Jiménez-Medina E, Garrido F, López-Nevot MA. 2005. Recuperación de la inmunogenicidad de líneas celulares tumorales mediante la reexpresión de genes HLA de clase I. *Clinical Translation Oncology*, 7 (4):599



## AGRADECIMIENTOS

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

Al Dr. Miguel Ángel López-Nevot, director de esta Tesis y tutor, por su confianza y apoyo y por haberme transmitido su entusiasmo por la inmunología

Al Dr. Ángel García Lora, director de esta Tesis, por su esfuerzo incesante y por haberme enseñado a superar las dificultades que han surgido durante el desarrollo de este trabajo con optimismo y paciencia

Al Dr. Pierre Coulie, por darme la oportunidad de llevar a cabo parte de este trabajo en su laboratorio, en la unidad de Genética Celular (GECE) de la Universidad Católica de Bruselas, durante un período de tres meses.

A Eva Jiménez, por haberme dado el apoyo y ánimo necesarios para terminar este trabajo, por ser tan buena amiga y compañera

A Toñi Martín, Isa Maleno, Isa Linares, Jose Vilchez y Jorge Palacios por ser tan buenos compañeros y encontrar siempre un momento para reír

A todas las personas que han participado de alguna manera en la realización de esta tesis

*A Javi*

*A mis padres*

*A mis hermanos*





---

<b>I</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.	Teoría de la inmunovigilancia frente al desarrollo de tumores	3
1.1.-	La inmunovigilancia en modelos tumorales murinos	3
1.2.-	Inmunovigilancia en humanos	9
2.	Inmunovigilancia, escape tumoral e inmunoección	15
3.	Inducción de tolerancia inmunológica frente a los tumores	21
4.	Hipótesis unificadora: respuesta inmunológica vs tolerancia	24
5.	Antígenos asociados al tumor (TAAs)	27
5.1.-	Antígenos compartidos por distintos tumores y expresados en testículo,cáncer-testis (CTA)	30
5.2.-	Antígenos de diferenciación	35
5.3.-	Antígenos generados por mutaciones	37
5.4.-	Mucinas	40
5.5.-	Antígenos sobreexpresados en tumores	41
5.6.-	Antígenos virales	43
6.	Inmunoterapia antígeno-específica	44
6.1.-	Inmunoterapia pasiva o adoptiva	44
6.2.-	Inmunoterapia activa (AASIT)	45
6.3.-	factores limitantes en inmunoterapia	47
7.	Mecanismos de escape tumoral	48

---

7.1.- Mecanismos que inducen tolerancia y/o anergia	49
7.1.1.- Células T reguladoras (Treg)	49
7.1.2.- Ausencia de coestimulación	50
7.1.3.- Citoquinas inmunosupresoras	50
7.1.4.- Degradación enzimática del triptófano	52
7.1.5.- Señalización defectiva a través de los receptores de muerte	53
7.1.6.- Apoptosis de linfocitos T activados	54
7.2. Mecanismos de evasión	54
7.2.1.- Pérdida de antígenos tumorales e inmunodominancia	55
7.2.2.- Alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I	55
8. El complejo principal de histocompatibilidad (MHC)	56
8.1.- Moléculas HLA de clase I	56
8.2.- Moléculas HLA de clase II	58
8.3.- Genética del sistema HLA	58
8.4.- Procesamiento antigénico, transporte y ensamblaje de las moléculas HLA de clase I	60
9. Fenotipos alterados HLA de clase I	67
<b>II      OBJETIVOS</b>	<b>75</b>
<b>III     MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>79</b>

1. Cultivos celulares	81
1.1.- Líneas celulares	81
1.1.1.- Obtención de ANDO-2	81
1.1.2.- Obtención de ANDO-EBV	83
1.2.- Métodos de cultivo celular	83
1.3.- Congelación de células	84
1.4.- Lavado de las células	85
1.5.- Tratamiento de las células con IFN- $\gamma$	85
2. Análisis por citometría de flujo	85
2.1.- Análisis de la expresión de moléculas HLA de clase I y II en superficie	85
2.1.1.- Material	85
2.1.2.- Método	86
3. Extracción de ácidos nucleicos	86
3.1.- Extracción de DNA	86
3.1.1.- Material	86
3.1.2.- Método	87
3.2.- Extracción de mRNA	87
3.2.1.- Fundamento	87
3.2.2.- Material	88

3.2.3.- Método	88
4. Cuantificación de DNA, RNA y Oligos	89
5. Síntesis de cDNA	89
5.1.- Método	89
6. Estudio de LOH	90
6.1.- Fundamento	90
6.2.- Método	91
6.3.- Gel de Poliacrilamida	92
6.4.- Análisis de los fragmentos de PCR	92
7. Tipaje HLA	93
7.1.- Análisis con oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO)	93
7.1.1.- Fundamento	93
7.1.2.- Método	93
7.2.- Tipaje basado en la secuencia (SBT) para los genes HLA de clase I	94
7.2.1.- Reacción de amplificación	94
7.2.2.- Purificación en columnas	96
7.2.3.- Reacción de secuenciación	97
7.2.4.- Purificación de la reacción	97
7.2.5.- Electroforesis y Análisis	98



8. RT-PCR	100
8.1.- RT-PCR Semicuantitativa	100
8.2.- RT-PCR Cuantitativa	102
9. Electroforesis en gel de agarosa	104
9.1.- Material	104
9.2.- Preparación del gel	104
9.3.- Electroforesis	105
10. Clonación del gen HLA-A2 en el vector pcDNA3.1v5His-TOPO	105
10.1.- Fundamento	105
10.2.- Método	107
11. Extracción de plásmidos	109
12. Secuenciación de plásmidos	109
13. Transfecciones celulares	110
13.1.- Digestión de plásmidos con Scal	110
14. Clonación de células	110
15. Preparación de suero humano	111
16. Estimulación de CTLs mediante cultivo de células tumorales y linfocitos (MLTC) por dilución límite (LDA)	111

17. Ensayo de citotoxicidad mediante liberación de <sup>51</sup> cr	113
17.1.- Preparación de células diana	113
17.2.- Preparación de células efectoras	114
17.3.- Preparación del control min/max	114
17.4.- Medición de liberación de <sup>51</sup> cr	116
18. Cálculo de la frecuencia de precursores de CTLs por dilución límite (LDA)	116
19. Ensayos celulares <i>in vivo</i>	117
19.1.- Ratones	117
19.2.- Crecimiento y potencial oncogénico de las líneas tumorales utilizadas	117
<b>IV      RESULTADOS</b>	<b>119</b>
I)      MECANISMOS MOLECULARES QUE CONDICIONAN LAS ALTERACIONES DE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS HLA EN EL MODELO EXPERIMENTAL ANDO-2	121
<hr/>	
1. La línea ANDO-2 presenta un fenotipo II por delección de un cromosoma 6	122
1.1.- Fenotipo HLA	122
1.2.- Tipaje HLA genómico y análisis con microsatélites de la región 6p21.3	124

---

2. Pérdida total de la expresión de las moléculas HLA de clase I en la línea ANDO-2 tras el pase por ratones atímicos	126
2.1.- Obtención de la línea ANDO-NUDE	126
2.2.- La línea ANDO-NUDE1 presenta un fenotipo I	128
2.3.- Expresión de las moléculas c-kit y MCAM	130
2.4.- El fenotipo I de la línea ando-nude1 se debe a un descenso de los niveles de transcripción de los genes de la maquinaria de procesamiento antigénico	131
2.4.1.- Transcripción de los genes HLA de clase I y de Beta 2-microglobulina	131
2.4.2.- Transcripción de los genes de la maquinaria de procesamiento antigénico	132
2.5.- La pérdida de expresión de HLA de clase I de la línea ANDO-NUDE1 generada en ratones atímicos es un fenómeno reproducible	134
2.6.- La cuantificación de mRNA mediante PCR a tiempo real revela que el fenotipo I en las líneas ando-nude se debe a un descenso coordinado de la transcripción de los genes HLA de clase I y los de la maquinaria de procesamiento antigénico	136
2.6.1.- Transcripción de los genes HLA de clase I y del gen de la $\beta$ 2- microglobulina	136
2.6.2.- Transcripción de los genes de la maquinaria de procesamiento antigénico	138

---

2.7.- Transcripción del oncogen HER2/neu	138
II) RESPUESTA INMUNOLÓGICA MEDIADA POR LINFOCITOS CD8+ CITOTÓXICOS FRENTE A LA LÍNEA ANDO-2 DESPUÉS DE RECUPERAR LA EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA HLA-A2 POR TRANSFECCIÓN GÉNICA	141

---

1. Recuperación de la expresión de la molécula HLA-A2 en la línea ANDO-2 mediante transfección génica	143
1.1.- Amplificación del cDNA para HLA-A*0201	143
1.2.- Clonación del cDNA para HLA-A*0201 en el vector pcDNA3.1	143
1.3.- Transfección del cDNA para HLA-A*0201 en la línea de melanoma ANDO-2	144
2. La transfección de HLA-A2 en la línea ANDO-2 induce una respuesta mediada por los linfocitos CD8+ autólogos	146
2.1.- Selección de los linfocitos CD8+ del paciente ANDO	146
2.2.- Estimulación de los CTLs frente al clon ANDO-T1E3	147
2.3.- Frecuencia de precursores de CTLs frente al clon ANDO-T1E3	148
III) RELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD ONCOGÉNICA Y LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA TRAS LA INYECCIÓN DE LA LÍNEA ANDO-2 EN RATONES ATÍMICOS (NU/NU)	153

---

1. Ensayo de crecimiento en ratones nude (nu/nu) de las líneas tumorales ANDO-2, ANDO-NUDE y ANDO-T1E3	155
<b>V DISCUSIÓN</b>	<b>157</b>
<b>VI CONCLUSIONES</b>	<b>183</b>
<b>VII BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>187</b>



**INTRODUCCIÓN**

---





## 1.- TEORÍA DE LA INMUNOVIGILANCIA FRENTE AL DESARROLLO DE TUMORES

### 1.1.- La Inmunovigilancia en modelos tumorales murinos

La noción de que el sistema inmunológico podría proteger al huésped de una enfermedad neoplásica se propuso inicialmente por Erlich (Erlich P. 1909) y se estableció formalmente como la hipótesis de la inmunovigilancia 50 años más tarde por Burnet y Thomas (Thomas 1959; Burnet 1967; 1970; 1971). Ambos predijeron que los linfocitos eran los responsables de la eliminación de células transformadas. Años después, esta predicción no pudo ser confirmada experimentalmente cuando se utilizaron ratones nude, que carecen de células T. Específicamente, la cepa nude CBA/H, no desarrollaba mayor incidencia de tumores espontáneos o inducidos por MCA (metilcolantreno); ni mostraban menores tiempos de latencia tumoral al compararlos con los silvestres control (Stutman 1973; Stutman 1974; Rygaard & Povlsen 1974; Stutman 1979). De cualquier modo, pasaron algunas cuestiones desapercibidas en ese momento. En primer lugar, que los ratones nude son un modelo imperfecto de inmunodeficiencia ya que producen un bajo número de células T  $\alpha\beta$  funcionales y además pueden manifestar algún grado de inmunidad adaptativa (Ikehara et al. 1984; Maleckar & Sherman 1987). En segundo lugar, todavía no se había establecido muy bien la existencia de células natural killer (NK), presentes y funcionales en ratones nude, y se conocía muy poco acerca de su origen, acción y papel en la inmunidad innata (Herberman & Holden 1978). De hecho, no se conocía la profunda influencia de la inmunidad innata sobre la adaptativa (Janeway 1989). Además, la cepa de ratones utilizada en los experimentos de carcinogénesis por MCA de Stutman expresaba una isoforma activa de la enzima arilhidroxilasa que se requiere para metabolizar el MCA en su forma carcinogénica (Heidelberger 1975; Burke et al. 1977). De esta forma, es concebible que la

transformación celular inducida por MCA en estos ratones ocurría tan eficientemente que quedase enmascarado cualquier efecto protector de inmunidad. Además los tiempos de monitorización eran demasiado cortos para observar la formación de tumores espontáneos y el desarrollo de sistemas supresores intrínsecos. Por último, en las cepas de ratones utilizadas por Stutman, además de ser más sensibles a la formación de tumores inducidos por metilcolantreno, las dosis utilizadas en dichos ensayos eran únicas y elevadas.

En los años 90, se realizaron dos estudios que despertaron de nuevo el interés por la inmunovigilancia en el cáncer. El primero, demostraba que la producción endógena de IFN- $\gamma$  protegía al huésped contra el crecimiento de tumores trasplantados y la formación de tumores espontáneos o inducidos químicamente (Dighe et al. 1994; Kaplan et al. 1998). Los ratones 129/SvEv, que perdían el receptor de IFN- $\gamma$  (IFNGR1) o STAT1 (Bach et al. 1997), eran entre 10 y 20 veces más sensibles que la cepa silvestre control al desarrollo de tumores inducidos por MCA (Kaplan et al. 1998). Las células tumorales Meth A, modificadas para ser insensibles al IFN- $\gamma$ , por sobreexpresión de un mutante doble negativo para IFNGR1 crecían agresivamente en cepas singénicas silvestres y eran resistentes al rechazo tumoral inducido por LPS (Dighe et al. 1993; 1994). En el trabajo de Kaplan y cols emplearon una estrategia opuesta, se estudió el efecto sobre el crecimiento tumoral *in vivo*, tras la restauración de la sensibilidad a IFN- $\gamma$  en células tumorales generadas en ratones deficientes en IFNGR1 (Kaplan et al. 1998). Cuando estas células se trasplantaban en ratones silvestres, las células tumorales deficientes en el gen IFNGR1 eran muy tumorigénicas y formaban tumores incluso al ser inyectadas en bajo número. Por el contrario, cuando se las hacía respondedoras a IFN- $\gamma$ , por transferencia del gen IFNGR1, las células tumorales eran incapaces de crecer en cepas silvestres aún cuando eran inyectadas a elevadas dosis.

Otros estudios han mostrado que fibrosarcomas trasplantados crecían más rápidamente y de forma más eficiente en ratones tratados con

anticuerpos monoclonales que bloqueaban la producción de IFN- $\gamma$  (Street et al. 2001; 2002). Todos estos resultados constituyeron las bases para poder concluir que la célula tumoral es una diana fisiológica y relevante del IFN- $\gamma$  en el proceso de rechazo tumoral.

El segundo estudio, se basó en el uso de ratones con pérdida del gen de la perforina (pfp-/-). Estos ratones eran más susceptibles a tumores espontáneos e inducidos por MCA (van den Broek et al. 1996; Smyth et al. 2000). La perforina es un componente de los gránulos citotóxicos de las células T y NK, que juega un papel muy importante en la lisis dependiente de linfocitos (Russell & Ley 2002). Tras la inoculación de MCA, estos ratones dobles negativos para el gen de la perforina desarrollaban más tumores que los controles. Todas estas observaciones demostraron que el desarrollo de tumores en ratones estaba controlado por componentes del sistema inmunológico.

Varios estudios han puntualizado en cuáles son las propiedades del IFN- $\gamma$  que podrían ser responsables de la eliminación tumoral:

- a. Efecto directo antiproliferativo (Chin et al. 1996; Bromberg et al. 1996)
- b. Efecto proapoptótico (Xu et al. 1998) sobre determinadas células tumorales y actuando como un poderoso inhibidor de la angiogénesis (Strieter et al. 1995; Sgadari et al. 1996; Sgadari et al. 1997; Coughlin et al. 1998)
- c. Aumento de los componentes del procesamiento antigénico y vía de presentación del MHC de clase I que, se ha demostrado, es suficiente para producir el rechazo tumoral (Shankaran et al. 2001).
  
- d. Las células del huésped pueden ser también la diana para el IFN- $\gamma$ . En este caso, la polarización de células T CD4+ a Th1, facilita el desarrollo de la apropiada respuesta celular necesaria para producir el rechazo (Fallarino & Gajewski 1999; Kacha et al. 2000).

Puede incluso prevenir el desarrollo del tumor, tal y como se ha comprobado utilizando ratones deficientes para tres genes al mismo tiempo, GM-CSF, IL-3 e IFN- $\gamma$  (Enzler et al. 2003). Son más susceptibles a la infección bacteriana y desarrollan una elevada incidencia de tumores espontáneos de origen linfoide y no linfoide. El desarrollo tumoral se previene por la administración a estos ratones de antibióticos de amplio espectro desde el nacimiento. Esto sugiere un papel del IFN- $\gamma$  junto a GM-CSF en el control de infecciones crónicas que pueden inducir a un estado de inflamación crónica y desembocar finalmente en el desarrollo de cáncer.

El trabajo definitivo del papel del IFN- $\gamma$  y linfocitos en el desarrollo de la inmunovigilancia, se basó en experimentos que empleaban ratones Knock-out para el gen RAG-2 o RAG-1 (Shankaran et al. 2001), que no pueden reordenar los genes del receptor antigénico por lo que carecen de linfocitos T, B y NKT (Shinkai et al. 1992). Puesto que estos genes están limitados a las células del sistema inmunológico, estos ratones constituyen el modelo perfecto para estudiar los efectos de la inmunodeficiencia en el desarrollo tumoral. En estos ratones, al igual que en los estudios anteriores, se desarrollaban más tumores (sarcomas) y con mayor frecuencia que en los controles normales.

En cuanto al subgrupo de linfocitos implicados en la inmunovigilancia, numerosos estudios han demostrado que participan en el proceso los componentes de la inmunidad innata y de la adaptativa. Girardi y cols, examinaron las contribuciones relativas de diferentes subgrupos de células T en el bloqueo de la formación primaria del tumor en ratones Knock-out para células T  $\alpha\beta$  ó  $\gamma\delta$  (Girardi et al. 2001). El tratamiento con MCA de ambos ratones inducía un incremento en la incidencia de fibrosarcomas al compararlos con los controles. En un modelo de tumorigénesis de piel inducida por TPA y DMBA, los ratones TCR $\gamma\delta^{-/-}$  mostraron mayor susceptibilidad a la formación del tumor y una mayor incidencia de progresión de papiloma a carcinoma que los ratones control, mientras que no ocurrió así con los TCR $\alpha\beta^{-/-}$ . Lo que sugiere que la

inmunovigilancia es un proceso complejo en el que participan diferentes efectores de manera dependiente sobre el tipo de célula tumoral de origen, mecanismo de transformación, localización anatómica y mecanismo inmunológico de reconocimiento. Lo mismo ocurre con la población celular de la inmunidad innata, NK y NKT, en las que también se ha demostrado un efecto protector en la formación del tumor. Los ratones C57BL/6 en los que se eliminan ambas células (con el uso de un anticuerpo bloqueante NK1.1), son entre 3 y 4 veces más susceptibles al desarrollo de tumores inducidos por MCA que los controles (Smyth et al. 2000).

Todos estos estudios y otros adicionales son recogidos en la **tabla 1** en los que se demuestra que los componentes del sistema inmunológico están implicados en el control del desarrollo tumoral y sugieren por tanto que la inmunovigilancia es un proceso heterogéneo que requiere diferentes efectores, y que implica que el sistema inmunológico es capaz de reconocer y eliminar tumores primarios.

Nuestro grupo de investigación también ha obtenido evidencias directas de la implicación del sistema inmunológico en el desarrollo de tumores. Se observó una mayor producción de metástasis en ratones atímicos (5-7 por ratón) al compararlo con animales inmunocompetentes (1 por ratón), indicando que el sistema inmunológico puede actuar durante la evolución metastásica del tumor (García-Lora et al. 2001). Las metástasis generadas en nuestro modelo parecen ser seleccionadas en función del estado inmunológico del huésped. Un fibrosarcoma murino H-2 negativo generó metástasis espontáneas pulmonares H-2 negativas en ratones BALB/c inmunocompetentes mientras que en ratones atímicos nu/nu daba lugar a metástasis positivas H-2 (García-Lora et al. 2003). Estos resultados muestran que el sistema inmunitario es responsable de la selección de células tumorales con un fenotipo MHC de clase I específico, y que los cambios originados en las moléculas MHC de clase I durante la colonización metastásica no se originan al azar sino que pueden ser reproducidas en diferentes animales singénicos.

**Tabla 1.-** Susceptibilidad de ratones inmunodeficientes a la formación de tumores espontáneos e inducidos químicamente.-

Fenotipo	Inmunodeficiencia	Susceptibilidad Tumoral	Bibliografía
RAG-2 <sup>-/-</sup>	Células B, T y NKT	Sarcomas por MCA Neoplasias intestinales	(Shankaran et al. 2001)
RAG-2 <sup>-/-</sup> x STAT <sup>-/-</sup> RkSk	Células B, T y NKT No sensibles a INF- $\gamma$ y a IFN- $\alpha/\beta$	Sarcomas por MCA, neoplasia intestinal espontánea y mamaria	(Shankaran et al. 2001)
BALB/c SCID	Células B, T y NKT	Sarcomas por MCA	(Smyth 2001)
Perforina <sup>-/-</sup>	Pérdida de perforina	Sarcomas por MCA  Linfomas diseminados espontáneos	(Street et al. 2001) (Smyth et al. 2000)
TCR $\alpha$ 281 <sup>-/-</sup>	Células NKT	Sarcomas por MCA	(Street et al. 2001) (Smyth et al. 2000) (Smyth et al. 2001)
Ac antisialo GM1	Células NK y macrófagos activados	Sarcomas por MCA	(Smyth et al. 2001)
Ac anti NK1.1	Células NK y NKT	Sarcomas por MCA	(Smyth et al. 2000) (Smyth et al. 2001)
Ac anti Thy-1	Células T	Sarcomas por MCA	(Smyth et al. 2000) (Smyth et al. 2001)
Cel T $\alpha\beta$ <sup>-/-</sup>	Células T $\alpha\beta$	Sarcomas por MCA	(Girardi et al.2001)
Cel T $\gamma\delta$ <sup>-/-</sup>	Células T $\gamma\delta$	Sarcomas por MCA Tumores cutáneos inducidos por DMBA/TPA	(Girardi et al.2001) (Girardi et al.2001)
LMP2 <sup>-/-</sup>	Subunidad LMP2	Neoplasia espontánea en útero	(Hayashi & Faustman 2002)
STAT1 <sup>-/-</sup>	IFN- $\gamma$ , $\alpha$ , $\beta$	Sarcomas por MCA	(Shankaran et al. 2001) (Kaplan et al.1998)
IFNGR1 <sup>-/-</sup>	Insensibilidad a IFN- $\gamma$	Sarcomas por MCA	(Shankaran et al. 2001) (Kaplan et al.1998)
GM- CSF/IFN- $\gamma$ /-	GM-CSF, IFN- $\gamma$	Linfomas espontáneos Cáncer sólido de origen no linfoide	(Enzler et al. 2003)
Pfp <sup>-/-</sup> xIFN- $\gamma$	Perforina, IFN- $\gamma$	Sarcomas por MCA Linfomas diseminados espontáneos	(Street et al. 2001) (Street et al. 2002)
TRAIL <sup>-/-</sup>	TRAIL	Sarcomas por MCA	(Cretney et al. 2002)
Anti-TRAIL	Bloqueo TRAIL	Sarcomas por MCA Sarcomas espontáneos Linfomas diseminados	(Takeda et al. 2002)

Las metástasis generadas en ratones inmunodeficientes eran más inmunogénicas que las generadas en ratones normales, ya que cuando se inyectaban en ratones inmunocompetentes eran rechazadas, indicando que la interacción de las células tumorales con un sistema inmunológico intacto producía una disminución progresiva en la inmunogenicidad de las células tumorales.

Todos estos trabajos muestran evidencias experimentales del concepto de inmunovigilancia propuesto inicialmente por Thomas y Burnet.

### 1.2.- Inmunovigilancia en humanos

Dada la existencia de inmunovigilancia en ratones se plantea la posibilidad de que exista un proceso similar en humanos. Existen evidencias que sugieren que la inmunovigilancia puede ocurrir en humanos:

- a. individuos trasplantados inmunodeprimidos presentan mayor incidencia de cáncer de origen no viral que en poblaciones control inmunocompetentes (Chen et al. 1997)
- b. los pacientes con cáncer pueden desarrollar respuestas inmunológicas innatas y adaptativas frente al tumor que presentan (Allison et al. 1991)
- c. la presencia de linfocitos infiltrantes en el tumor puede ser un indicador pronóstico positivo de supervivencia (Zhang et al. 2003).

Existen datos que apoyan el concepto de que los pacientes con cáncer pueden desarrollar respuestas inmunológicas adaptativas específicas a antígenos tumorales. Debido a que las técnicas de trasplante utilizadas en ratones para demostrar la presencia de antígenos tumorales específicos no se pueden emplear en humanos, se han desarrollado técnicas *in vitro* para identificar las respuestas a antígenos tumorales en humanos. El seguimiento de las respuestas humorales y celulares de

pacientes frente a sus tumores se inició en los años 70 (Old 1981). La clonación de genes y el desarrollo de sistemas de expresión desarrollada por Boon y colaboradores han permitido identificar antígenos tumorales reconocidos por células T CD8+ (Traversari et al. 1992; van der Bruggen et al. 1991), y Pfreundschuh y colaboradores han desarrollado técnicas para la identificación de antígenos tumorales definidos por anticuerpos (Sahin et al. 1995). También ha sido posible identificar antígenos tumorales restringidos por MHC de clase II reconocidos por las células T CD4+ (Wang & Rosenberg 1999).

Existen dos ejemplos característicos del desarrollo de una respuesta inmunológica espontánea a tumores humanos de origen no viral. El primer ejemplo se encuentra en la respuesta espontánea a NY-ESO1, identificado por la técnica SEREX (serological expresión cloning technique, para detectar la respuesta humoral frente a tumores humanos) en un carcinoma celular esofágico (Chen et al. 1997). Anticuerpos frente a este antígeno estaban presentes únicamente en pacientes con tumores positivos para NY-ESO1. La presencia de estos anticuerpos está originada por el antígeno ya que tras la extirpación del tumor, por cirugía o tras quimioterapia, desaparecen. Se han detectado respuestas de células T CD4+ y CD8+ en pacientes con tumores NY-ESO1+, y se han definido un elevado número de epítomos NY-ESO1 restringidos por MHC de clase I y/o II (Jager et al. 2000; Zeng et al. 2000; Gnjatic et al. 2003). Las respuestas celulares están asociadas a una fuerte respuesta humoral a NY-ESO1, poniendo de manifiesto el desarrollo de una respuesta inmunológica espontánea integrada.

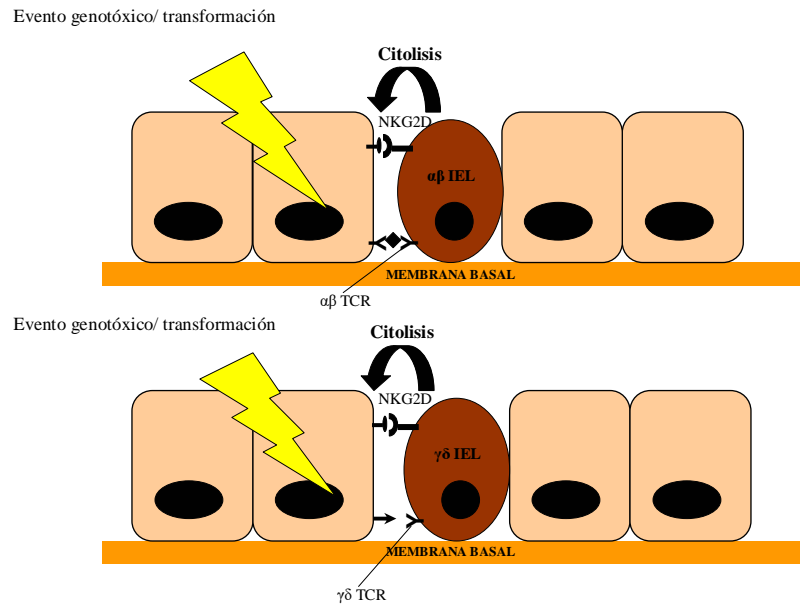
El segundo ejemplo procede del análisis de desórdenes/degeneraciones neurológicas paraneoplásicas (PNDs). Los PNDs son enfermedades neurológicas autoinmunes, raras, causadas por los efectos remotos de cáncer en el sistema nervioso, no están causadas ni por la invasión primaria del tumor ni por las metástasis, sino que se deben a la reactividad cruzada de una respuesta antitumoral con las células del



sistema nervioso (Posner & Furneaux 1990). Los PNDs pueden afectar cualquier parte del sistema nervioso y se asocian mayoritariamente con tumores de pulmón, mama y ovario. En los años 90, se estableció la relación entre la degeneración neuronal y la presencia de cáncer, tras el descubrimiento de elevados títulos de anticuerpos en el suero (Albert et al. 1998) y fluido cerebroespinal (Albert et al. 2000) de estos pacientes, que reaccionaban con antígenos neuronales presentes en la población neuronal afectada y en los expresados por las células tumorales. Además, se han identificado CTLs en sangre periférica y fluido cerebroespinal de pacientes con PND que pueden reaccionar con péptidos de uno de estos antígenos. Sin embargo, no se ha demostrado la reactividad y citotoxicidad de estos CTLs frente a células neuronales intactas. Existen datos que demuestran que la presencia de autoanticuerpos reactivos neuronales está asociada con un peor pronóstico en pacientes con cáncer (Dalmau et al. 1990; Darnell & DeAngelis 1993; Graus et al. 1997). Estos estudios ponen de manifiesto la correlación positiva entre la presencia de anticuerpos y la extensión de la enfermedad, la respuesta a la terapia anticáncer y la supervivencia.

Existen estudios que indican que el componente innato del sistema inmunológico humano puede también discriminar entre células tumorales y células normales, participando de este modo en la inmunovigilancia del cáncer. Estos estudios se han centrado principalmente en el receptor NKG2D y los linfocitos intraepiteliales (IELs). Los IELs representan un único subgrupo de linfocitos que se expresan en diversos tejidos epiteliales, la mayoría de los que se han estudiado residen en el intestino y la piel, aunque también se encuentran en otros órganos (Allison et al. 1991; Lefrancois et al. 1997). Presentan características del sistema inmune adaptativo e innato. El 50% de los IELs del intestino expresan el receptor TCR  $\alpha\beta$  y el 50% restante el receptor TCR  $\gamma\delta$ . Aunque sus ligandos no están bien definidos, parece que reconocen antígenos propios y su expresión está aumentada bajo condiciones inflamatorias o de estrés. La mayor evidencia del papel de

los IELs en la inmunovigilancia proviene de los trabajos de Girardi y Cols, que demostraron que tanto ratones Knock-out para TCR  $\alpha\beta$  como  $\gamma\delta$  eran mucho más susceptibles que las cepas silvestres para desarrollar cáncer de piel tras ser sometidos a la acción de carcinógenos (Girardi et al. 2001). A nivel molecular, es el receptor NKG2D el que juega un papel importante en la sensibilización inmunológica durante el evento carcinogénico en la piel, intestino y otros lugares posibles. NKG2D es un receptor activador de NK y se expresa, a diferencia de otros receptores que sólo se expresan en un subgrupo de NK, en todas las células NK y en una elevada proporción de células T  $\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ . Los IELs expresan elevados niveles de NKG2D. La primera evidencia del papel de NKG2D en la inmunovigilancia tumoral viene del hallazgo de que una elevada proporción de tumores expresan los dos ligandos para el receptor: MICA y MICB (Groh et al. 1996; 1998). Ambos ligandos se expresan diferencialmente sobre las células tumorales y funcionan también como ligando para NKG2D y el TCR de células T  $V\delta 1 \gamma\delta$ . MICA y MICB son glicoproteínas de superficie, altamente polimórficas del MHC de clase I no clásico. No se asocian con  $\beta 2$ -microglobulina ni requieren TAP para su expresión (Groh et al. 1996; Bahram 2000), y son inducidas por estrés. Los datos sobre la función de NKG2D en IELs, en combinación con la expresión inducida por estrés de sus ligandos, sugieren un sistema inmunológico intraepitelial de inmunovigilancia que puede ser relevante en la carcinogénesis y en las infecciones. El principal factor desencadenante de carcinogénesis en la piel, la luz UV, es una fuente importante de daño en el DNA o estrés genotóxico. Mientras que los guardianes del daño genómico son las vías autónomas celulares endógenas como la vía ATM-p53, es razonable pensar que el estrés genotóxico podría activar una vía supresora extrínseca a través de la expresión de los ligandos de NKG2D que rápidamente originaría la activación de IELs adyacentes (**figura 1**).



**Figura 1.-** Papel potencial de los linfocitos intraepiteliales (IELs) en el reconocimiento y eliminación de células epiteliales transformadas. Existen dos tipos de IELs residentes en el tejido epitelial de la piel (epidermis), intestino, pulmón, vagina, y otros órganos. Muchos expresan el receptor TCR  $\alpha\beta$  cuyo repertorio en la región V es a veces órgano específico, y otros expresan TCRs  $\gamma\delta$ . Estos IELs expresan el receptor NKG2D. Los ligandos para NKG2D (MICA, MICB y ULBP-3, en humanos, y Rae-1 $\alpha$ - $\epsilon$  y H60 en el ratón), son proteínas de membrana expresadas por las células epiteliales y algunos tumores. La expresión de estos ligandos es inducida por varias formas de estrés, posiblemente también se incluyan los daños genotóxicos que llevan a la transformación de la célula epitelial.

La unión del TCR y NKG2D en IELs es necesaria para activar la lisis. Así, además de representar una rápida respuesta a agentes infecciosos que intentan invadir la barrera epitelial, los IELs pueden representar un sistema de inmunovigilancia inmunológico intraepitelial para eliminar las células con daño en el DNA tras exposición carcinogénica. (Pardoll, D. Annu.Rev.Immunol. 2003, 21: 807-39)

Varios estudios relacionan el reconocimiento MICA/B con la inmunovigilancia. El primero, de Groh y Cols, demostró que las células que expresaban MIC eran reconocidas y lisadas por el subgrupo de células T V $\delta$ 1  $\gamma\delta$ , y observaron una fuerte correlación *in vivo* ( $p < 0,0001$ ) entre la expresión de MICA/B en tumores y la infiltración por células T V $\delta$ 1  $\gamma\delta$  (Groh et al. 1998). El segundo, ha demostrado una correlación entre la baja expresión de NKG2D en los linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) y la expresión de MICA/B en el tumor (Groh et al. 2002). Comparado con la expresión de NKG2D en linfocitos de pacientes con tumores MIC-, la expresión de NKG2D se redujo en las células T CD8+  $\alpha\beta$ , células T  $\gamma\delta$ , células NK y también sobre células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de individuos con tumores MIC+. También se ha observado una correlación entre la presencia de proteínas MIC solubles en la circulación de pacientes con cáncer y la baja expresión de NKG2D en los linfocitos (Salih et al. 2002). Estas observaciones establecen un mecanismo común de reconocimiento tumoral, y de potencial eliminación, por el sistema inmune innato y adaptativo. La presencia de las proteínas MIC solubles puede atenuar la función o expresión de NKG2D y de este modo proporcionar una posible explicación del escape del tumor al sistema inmunológico.

La tercera línea de evidencia de que el proceso de inmunovigilancia de cáncer existe en humanos, proviene de varios estudios en los que se demuestra que la presencia de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) en pacientes con melanoma primario o metastásico, tiene mejor pronóstico clínico para el individuo (Clark et al. 1989; Clemente et al. 1996; Mihm et al. 1996). Estudios más recientes, que implican pacientes con otro tipo de cáncer, determinan que la presencia o ausencia de TILs y la extensión del tumor residual son los únicos factores pronóstico independientes de supervivencia (Zhang et al. 2003). El mismo resultado se ha obtenido tras estudios que relacionan la presencia de NKs y la supervivencia de pacientes con carcinoma gástrico (Ishigami et al. 2000), carcinoma de pulmón (Villegas et al. 2002) y cáncer colorrectal (Coca et al. 1997). Por tanto,

existen muchos datos que reflejan la relación directa entre los diferentes subgrupos de TILs y el aumento de supervivencia de pacientes con cáncer. Puesto que los tumores pueden atraer a diferentes subgrupos de TIL dependiendo del tejido de origen (Balch et al. 1990), será importante clarificar qué grupo de células del sistema inmunológico son de valor pronóstico para cada tipo diferente de cáncer.

Se puede concluir que tras varias décadas de controversia, existen suficientes datos experimentales en ratones, que junto a los obtenidos en humanos, permiten afirmar que las células de la inmunidad innata y adaptativa, pueden reconocer e interactuar con la célula tumoral.

## 2.- INMUNOVIGILANCIA, ESCAPE TUMORAL E INMUNOEDICIÓN

El término de inmunovigilancia no es suficiente para describir las complejas interacciones que se producen entre el desarrollo del tumor y el sistema inmunológico del huésped. Tal y como se concebía originalmente, la inmunovigilancia es la función protectora del huésped llevada a cabo por el sistema inmunológico adaptativo sólo en estadios tempranos de la transformación celular. Pero hemos visto que tanto la inmunidad innata como la adaptativa participan en el proceso y sirven no sólo para proteger al huésped del desarrollo tumoral sino también para esculpir o editar la inmunogenicidad de los tumores que finalmente se forman. Por este motivo se propuso el término de “cáncer inmunoeediting” o inmunoeedición del cáncer, para establecer el papel dual de la inmunidad no sólo en prevención sino también en el modelado de la enfermedad neoplásica (Shankaran et al. 2001; Dunn et al. 2002).

Este proceso está compuesto de tres fases que han dado lugar a lo que actualmente se denomina “las tres Es de la inmunoeedición”: eliminación, equilibrio y escape (**figura 2**).

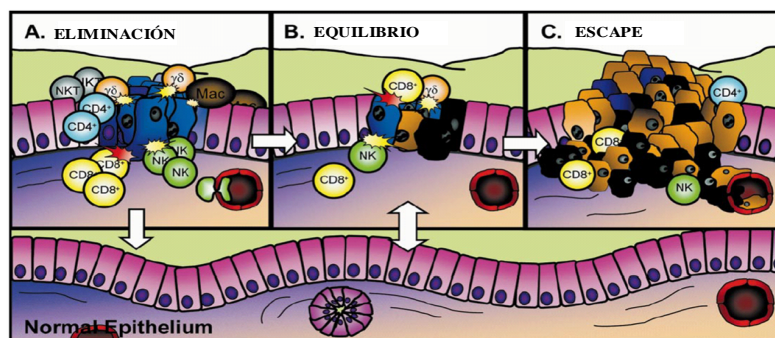


Figura 2.- Las tres Es de la inmunoección: eliminación, equilibrio y escape. El sistema inmune puede eliminar el tumor en la fase de eliminación o equilibrio, volviendo el tejido a la normalidad. (Dunn et al. Annu.Rev.Immunol. 2004, 22: 329-60)

La fase de eliminación representa el concepto original de inmunovigilancia (**figura 2a y figura 3**).

Los componentes que participan en esta fase se han identificado aunque el papel preciso de cada uno no está del todo claro. El rechazo inmunológico del tumor, al igual que en la defensa de un patógeno, requiere la respuesta integrada del sistema inmunológico innato y adaptativo (Janeway 1989). Se inicia cuando las células del sistema inmunológico se alertan de la presencia de un tumor (**figura 3a**), que produce la alteración del tejido local como resultado de los procesos de modelado estromal propios de los procesos fisiológicos del desarrollo de un tumor sólido, entre ellos, la angiogénesis (Hanahan & Folkman 1996; Carmeliet & Jain 2000) y el crecimiento invasivo del tumor (Sternlicht & Werb 2001). El modelado estromal que se origina por el crecimiento invasivo del tumor produce moléculas proinflamatorias que junto a quimioquinas producidas por el propio tumor (Vicari et al. 2002), atraen a las células del sistema inmunológico a esta área de “daño” local (Matzinger 1994; Wrenshall et al. 1999). Una vez reclutadas las células NKT, NK, células T $\gamma\delta$ , y/o macrófagos, reconocen moléculas que se expresan en las células tumorales bien por la incipiente inflamación bien por el propio proceso de transformación.

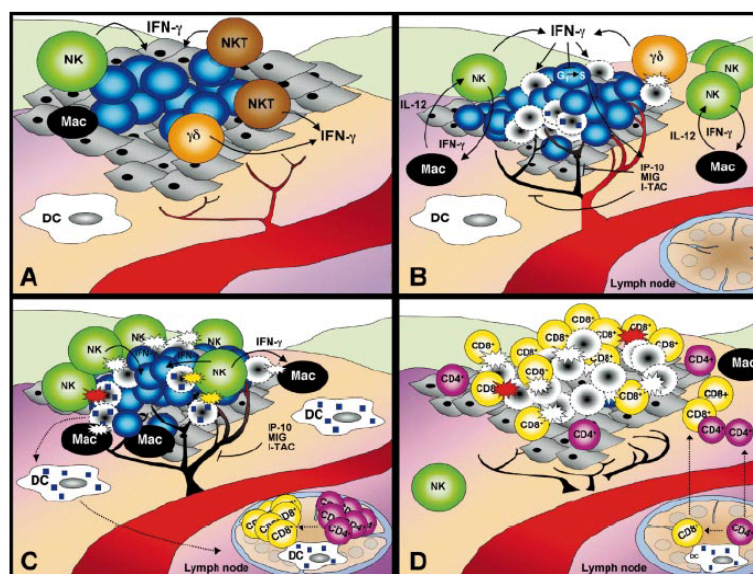


Figura 3.- Modelo propuesto para la fase de eliminación del proceso de inmunización. Las células tumorales en azul; las células no transformadas en gris; linfocitos, células dendríticas (DC) y macrófagos (Mac) están marcados y coloreados. Las células tumorales muertas se identifican con un gradiente de blanco a gris, y los antígenos tumorales como cuadros azules. En el panel A) se representa el inicio de la respuesta, las células de la inmunidad innata reconocen el tumor naciente. En B), el IFN- $\gamma$  producido comienza la cascada de reacciones de inmunidad innata que dan lugar a la muerte de algunas células tumorales a través de mecanismos inmunológicos y no inmunológicos. En C) inicio de la respuesta inmune adaptativa; las células tumorales muertas por el incremento de la actividad citocida de las células NK y macrófagos activados son ingeridas por DCs, que migran al ganglio linfático y presentan el antígeno a células T vírgenes CD4+ y CD8+. En D) las células T CD4+ y CD8+ se dirigen al tumor a través de un gradiente de quimioquinas donde reconocen y destruyen a las células tumorales que expresan antígenos tumorales característicos. (Dunn et al. Annu.Rev.Immunol. 2004, 22: 329-60)

En un segundo paso (**figura 3b**), se amplifican los efectos del reconocimiento inmune innato. El IFN- $\gamma$  secretado en el lugar del tumor induce la producción local de quimioquinas que reclutan más células del sistema inmunológico innato al tumor. Los productos generados durante el modelado de la matriz extracelular pueden inducir la producción de IL-12

(Hodge-Dufour et al. 1997) por los macrófagos infiltrantes de tumor que estimulan a las células NK a producir IFN- $\gamma$ , el cual a su vez activa a los macrófagos a producir más IL-12 incrementando la producción de IFN- $\gamma$  por las NK. Este sistema de retroalimentación positiva (Bancroft et al. 1991) y la unión de los receptores activadores de NKs a sus ligandos en las células tumorales estimula aún más la producción de IFN- $\gamma$  (Diefenbach et al. 2000), que puede ahora activar procesos dependientes del mismo, como efectos antiproliferativos (Bromberg et al. 1996), proapoptóticos (Kumar et al. 1997) y angiostáticos, que darán lugar a la lisis de una elevada proporción de células tumorales (Coughlin et al. 1998; Qin & Blankenstein 2000). Los macrófagos activados además, expresan agentes tumorocidas, como son los intermediarios de oxígeno y nitrógeno reactivos, contribuyendo junto a las NK a la eliminación de células tumorales (Schreiber et al. 1983; MacMicking et al. 1997).

En el tercer paso (**figura 3c**), se liberan antígenos tumorales al medio, por los efectos de la inmunidad innata, dirigiendo el desarrollo de respuestas inmunológicas específicas. Las células dendríticas inmaduras (DCs) reclutadas en el lugar del tumor se activan por la exposición al medio de citoquinas creado por el ataque al tumor o por la interacción con células NK infiltrantes de tumor (Gerosa et al. 2002). Estas DCs activadas pueden adquirir antígenos tumorales directamente por ingestión de desechos celulares del tumor. Las DCs maduras migran al ganglio linfático (Sallusto et al. 2000) para inducir la activación de células CD4<sup>+</sup> Th1 vírgenes, específicas de tumor, que facilitan el desarrollo de células T CD8<sup>+</sup> tumor-específicas a través de la presentación cruzada de péptidos tumorales antigénicos en moléculas de MHC de clase I sobre las DCs (Albert et al. 1998; Yu et al. 2003).

En el cuarto paso (**figura 3d**), el desarrollo de la inmunidad adaptativa específica del tumor capacita al huésped a la eliminación completa del tumor. Las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> participan en la lisis de las células tumorales positivas para el antígeno tumoral. Las CD4<sup>+</sup> producen IL-



2 que junto a la producción de IL-15 ayuda a mantener la función y viabilidad de las células T CD8+, que inducirán la muerte celular de forma directa (puesto que son citotóxicas) y de forma indirecta mediante la producción de IFN- $\gamma$  tras la interacción con sus dianas. Estos dos escenarios no son mutuamente excluyentes y se producen de forma simultánea; sin embargo, la contribución relativa de cada uno varía dependiendo del tipo de tumor. La fase de eliminación es un proceso continuo que debe ser repetido frente a células neoplásicas antigénicamente distintas. Por esta razón, el cáncer es más prevalente en la población de edad avanzada donde la función del sistema inmunológico, y con ello la inmunovigilancia del cáncer, empieza a declinar.

En la fase de equilibrio (**figura 2b**), el sistema inmunológico del huésped y las variantes tumorales que han sobrevivido a la fase de eliminación entran en una dinámica de equilibrio, donde los linfocitos y el IFN- $\gamma$  ejercen una potente presión selectiva sobre las células tumorales que es suficiente para mantener, no extinguir completamente, un tumor que contiene células tumorales inestables genéticamente y mutadas. Aunque muchas de las variantes del tumor original son destruidas, las nuevas variantes llevan mutaciones diferentes que les permiten aumentar la resistencia al ataque inmunológico. El resultado final de esta fase es una población nueva de variantes tumorales con inmunogenicidad reducida, originada de una población parental heterogénea tras ser modelada por el sistema inmunológico. Esta fase es probablemente la más larga de las tres y puede ocurrir en un periodo de varios años en humanos. De hecho, se ha estimado que para muchos tumores sólidos puede ser de un intervalo de 20 años entre la exposición inicial al carcinógeno y la detección clínica del tumor (Loeb et al. 2003). Durante este periodo, la heterogeneidad e inestabilidad genética de las células tumorales que sobreviven a la fase de eliminación son posiblemente las principales fuerzas que capacitan al tumor a la resistencia frente al huésped. Se ha propuesto que el “fenotipo mutador” de la célula tumoral (Loeb 1991) es el resultado de los tres tipos

de inestabilidad genética observada en el cáncer: inestabilidad en la reparación por excisión de nucleóticos (NIN), inestabilidad de microsatélites (MIN), e inestabilidad cromosómica (CIN) (Lengauer et al. 1998). De las tres, las CIN parece ser el mecanismo predominante responsable de la desestabilización de la integridad genómica, fundamentalmente por la ganancia o pérdida de cromosomas completos asociado a la pérdida del 25-50% de sus alelos.

El escenario clínico que puede ilustrar esta fase en humanos es la transmisión de cáncer por trasplante. Mackie y cols publicaron la aparición de melanoma 1-2 años post-trasplante en dos receptores que habían recibido los riñones desde un donante aparentemente sano (MacKie et al. 2003). Los melanomas que surgieron en los pacientes trasplantados tenían la huella genética del donante. El donante se diagnosticó, 16 años antes, de un melanoma primario, pero fue considerado libre de tumor en el momento de su muerte. La supresión farmacológica del sistema inmunológico de estos receptores trasplantados facilitó el crecimiento rápido y progresivo de tumores ocultos que previamente se habían mantenido en fase de equilibrio por el sistema inmunológico competente del donante.

En la fase de escape (**figura 2c**), las variantes tumorales seleccionadas en la fase de equilibrio ahora pueden crecer en un ambiente inmunológicamente intacto. Se origina mayoritariamente cuando los cambios epigenéticos y genéticos de la célula tumoral confieren resistencia a la detección inmunológica y/o eliminación, permitiendo a los tumores expandirse y ser clínicamente detectables. Puesto que existen los compartimentos inmunológicos (tanto innato como adaptativo), las células que crecen deben evadirlos. Las células tumorales emplean múltiples estrategias inmunoevasivas para eludir la poderosa respuesta integrada innata y adaptativa desencadenada frente a sus progenitores inmunogénicos.

### 3.- INDUCCIÓN DE TOLERANCIA INMUNOLÓGICA FRENTE A LOS TUMORES

Otros estudios han mostrado que la respuesta inmunológica frente a antígenos tumorales induce, más que activación, tolerancia. Al considerar el concepto de tolerancia es importante distinguir entre la inducción de mecanismos que evitan la respuesta, como sería la inducción de anergia o deleción clonal, de los mecanismos de resistencia o escape al reconocimiento y lisis de las células tumorales por efectores inmunológicos activados. Contrariamente a la inducción de tolerancia, que implica un fracaso de la inmunoselección, la presencia de mecanismos de escape, que evitan el reconocimiento por las células T o inhiben la función efectora de las mismas, implican que el tumor fue seleccionado o adaptado a sobrevivir en un ambiente en el que se generaron respuestas inmunológicas específicas frente al tumor.

Al contrario de lo que ocurre en los casos anteriores, donde existe una resistencia del tumor al desarrollo de una respuesta inmunológica, experimentos que emplean el uso de ratones transgénicos para TCR han proporcionado fuertes evidencias de la capacidad que tienen las células tumorales para inducir tolerancia a sus antígenos. La tolerancia parece operar predominantemente a nivel de las células T (Bogen et al. 1995); la tolerancia de células B es menos evidente puesto que hay varios datos que demuestran la inducción de anticuerpos en animales con tumores y en pacientes humanos. Sin embargo, la respuesta humoral, con excepción de los anticuerpos frente a miembros de la familia de receptores de TGF, es poco significativa o relevante.

La primera evidencia de la inducción de tolerancia en células T por los tumores se estableció por Bogen y Cols, que examinaron la respuesta de células T con TCR transgénico específicas de una inmunoglobulina expresada en un mieloma murino (Bogen 1996). Demostraron la inducción de tolerancia central a la proteína del mieloma, seguido por tolerancia

periférica. Usando la hemaglutinina de la influenza (HA) como modelo antigénico tumoral, Levitsky y Cols mostraron que la transferencia adoptiva de células T transgénicas para TCR y específicas de HA, se volvían anérgicas por linfomas que expresan HA y carcinomas renales que expresaban HA (Staveley-O'Carroll et al. 1998; Sotomayor et al. 2001). La inducción de tolerancia se ha demostrado tanto en células CD4 como en CD8. En general, se observa la activación inicial de las células T específicas de antígeno, sin embargo, este estadio de activación no se mantiene por lo que se origina el fracaso de la eliminación tumoral (Wick et al. 1997; Doan et al. 2000; den Boer et al. 2001). En la mayoría de casos, la inducción de tolerancia a través de células T específicas de antígeno, es un proceso activo que implica el reconocimiento antigénico.

Zinkernagel y Cols mostraron en un grupo de sistemas tumorales que la tolerancia de las células T a los tumores es una consecuencia de la ignorancia inmunológica, basada en el hecho de que la mayoría de los tumores nunca entran en el ganglio linfático por la existencia de una barrera física entre el tumor y el ganglio linfático (Speiser et al. 1997). En los casos en los que el tumor migra o metastatiza al ganglio linfático, existe activación inmunológica basada en el reconocimiento directo por las CD8+ de antígenos restringidos por MHC de clase I presentados directamente por el tumor. Otros investigadores han encontrado que la vía predominante de reconocimiento es a través de la presentación cruzada por células presentadoras de antígeno derivadas de médula ósea (Huang et al. 1994; Sotomayor et al. 2001; Nguyen et al. 2002). Las bases de la discrepancia entre Zinkernagel y otros investigadores en cuanto al papel de la presentación directa o cruzada de antígenos tumorales aún está vigente.

Una de las críticas de la conclusión de Zinkernagel de que los tumores evitan el reconocimiento por permanecer fuera de los órganos linfoides secundarios, es el hallazgo clínico de que las metástasis en ganglios linfáticos representan un pronóstico negativo en todos los tipos de cáncer. En respuesta a esta crítica, Ochsenbein y Cols mostraron que,

algunas pueden entrar en órganos linfoides secundarios de manera que previene directamente el reconocimiento directo de los linfocitos a través de la creación de un espacio fibroso alrededor del tumor. Estos tumores son capaces de entrar en tejido linfoide secundario sin activar respuestas inmunológicas específicas, mientras que los tumores que se entremezclan con los linfocitos que entran en los órganos linfoides secundarios se eliminan con la activación de células CD8 específicas (Ochsenbein et al. 2001).

Ya sea por presentación directa o cruzada (siendo esta última la más frecuentemente observada), el mayor interés se encuentra en definir qué es lo que ocurre tras el reconocimiento de los antígenos tumorales por las células T. La consecuencia en estos trabajos parece ser la inducción de tolerancia, aunque se ha observado una activación inicial de células T específicas de tumor (Nguyen et al. 2002). Sin embargo, puesto que el tumor continúa progresando implica que la activación es insuficiente para originar su eliminación (Willimsky & Blankenstein 2005). En algunos casos, se ha demostrado que esta activación insuficiente no implica tolerancia puesto que las células se han podido estimular tras el uso de anticuerpos específicos para CD40 (aumenta la actividad de las APCs). Otros estudios demuestran la inducción de tolerancia (Huang et al. 2003).

Debido a la gran cantidad de estudios retomados sobre las células T reguladoras (Maloy & Powrie 2001; Shevach 2002), inicialmente denominadas supresoras, es necesario considerar su papel potencial en la tolerancia tumoral. Hay poca información sobre su papel en la inducción de tolerancia en condiciones normales, sin embargo, hay estudios muy importantes que han mostrado que estas células limitan la eficiencia de la respuesta antitumoral inducida por vacunación (Sutmuller et al. 2001; Machiels et al. 2001). En los próximos años, se establecerá el papel de las células Treg en el bloqueo de la inmunidad antitumoral, ya que son una consecuencia natural de la inducción de tolerancia. Representan por tanto

una diana de inhibición como parte de estrategias combinadas de inmunoterapia.

Rosenberg y cols han mostrado mediante transfección de la citoquina IL-1beta, en una línea de carcinoma de mama de ratón, que estos ratones presentaban elevados niveles de células supresoras (MSC) (Bunt et al. 2006). Estas células también se encuentran en pacientes con cáncer e inhiben la activación de los linfocitos T CD4+ y CD8+. Este estudio sugiere que la inflamación promueve el desarrollo tumoral vía citoquinas proinflamatorias, como IL-1beta, que aumentan la supresión a través de la inducción de células supresoras (MSC), contrarrestando la inmunovigilancia y permitiendo la proliferación y crecimiento del tumor.

#### 4.- HIPÓTESIS UNIFICADORA: RESPUESTA INMUNOLÓGICA vs TOLERANCIA

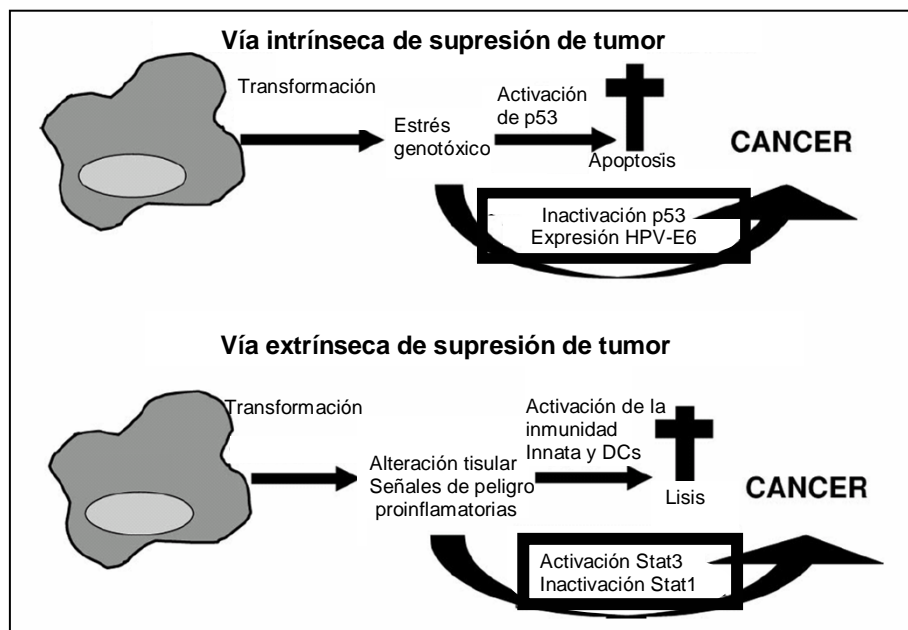
En principio, los conceptos de inmunovigilancia a tumores junto con la capacidad de los mismos para inducir tolerancia a sus antígenos representan una paradoja fundamental en la inmunología del cáncer. Cualquier hipótesis unificadora debe tener en cuenta los cambios epigenéticos y genéticos que se originan durante los estadios progresivos de la transformación, crecimiento y metástasis del cáncer. De hecho, los signos característicos del cáncer son la invasión tisular y la metástasis. Ambos procesos alteran la arquitectura tisular, incluso el propio tumor representa un tejido alterado. Cualquier alteración genera la liberación de señales de peligro, proinflamatorias en la forma de citoquinas, lo que ocasiona un estímulo activador para los componentes de la inmunidad innata y células dendríticas que inducirán finalmente la activación de las células T. Además, la alteración de las barreras epiteliales como el intestino y piel, generará más señales proinflamatorias por el influjo de productos de patógenos (PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos como son el lipopolisacárido o LPS). Si en el curso de la invasión tisular, el tumor

genera un neoantígeno debido a la gran inestabilidad genética que presenta, es posible que el neoantígeno sea presentado al sistema inmunológico en el contexto del ambiente inflamatorio asociado al daño o alteración tisular. Este neoantígeno se vería como extraño, induciendo una fuerte respuesta de células T que junto a la respuesta innata eliminaría el tumor. Así, un proceso de transformación maligna sería eliminado en una fase muy temprana antes de su detección clínica en un individuo inmunocompetente. Es notable que el mayor lugar de tumorigénesis en ratones deficientes en RAG-1 y STAT-1 se da en el intestino, que es también la mayor fuente de PAMPs proinflamatorios como el LPS. Este es un modelo que no implica la existencia de un sistema de inmunovigilancia específico del tumor sino más bien sugiere que las respuestas antitumorales se deben al efecto proinflamatorio generado por la invasión del tumor, junto a la expresión de un neoantígeno. Al contrario, el sistema basado en NKG2D de los linfocitos intraepiteliales (IELs) puede representar un mecanismo más específico de detección de las consecuencias inmediatas al estrés genotóxico en las células epiteliales. Sería similar por tanto al sistema celular endógeno que induce apoptosis de las células cuyo DNA está dañado y no se ha reparado (Pardoll 2003).

Está establecido que para que los tumores progresen y adquieran ventajas de crecimiento, deben inactivarse los mecanismos intrínsecos de supresión mediante mutaciones o deleciones, consecuencia de la inestabilidad genética de estas células. Por analogía, es razonable imaginar que de la misma forma los tumores pueden desarrollar mecanismos específicos que inhiban la supresión extrínseca ejercida por el sistema inmunológico. De hecho, existen trabajos que sugieren que la vía oncogénica natural puede tener estas consecuencias inmunológicas específicas (Catlett-Falcone et al. 1999; Niu et al. 2002).

Se puede considerar que la progresión tumoral se realiza a través de interacciones con el sistema inmune de forma análoga a la respuesta celular de daño en el DNA, el último iniciador de carcinogénesis. Para que

pueda invadir el tejido y originar metástasis sin activar una respuesta inmunológica letal frente al tumor, el tumor necesita activar sistemas que disminuyan la producción de señales de peligro (citoquinas proinflamatorias). La consecuencia es la transición de la respuesta inmunológica desde la activación a la tolerancia (**figura 4**). Esto es porque en ausencia de señales proinflamatorias de peligro, las APCs derivadas de médula ósea, presentan antígenos a las células T de forma que inducen tolerancia, porque no expresan las moléculas coestimuladoras necesarias (Adler et al. 1998; Steinman et al. 2000; Legge et al. 2002).



**Figura 4.-** La hipótesis integradora incorpora la noción de que el sistema inmunológico representa un mecanismo supresor extrínseco de tumorigénesis análogo a p53, el mayor mecanismo supresor intrínseco de tumorigénesis. La supresión por p53 se basa en su activación en respuesta a daño en el DNA y la siguiente inducción de apoptosis, terminando así el evento carcinogénico. La supresión tumoral por el sistema inmunológico se basa en el reconocimiento de neoantígenos que se expresan en el contexto de una respuesta proinflamatoria a la alteración tisular causada por la invasión y metástasis. Para que el tumor



pueda progresar debe inactivar genes supresores a través de mutaciones, deleciones o inducción de proteínas inactivadoras (como E6 del papilomavirus humano). Para que pueda sobrevivir a la supresión extrínseca del sistema inmunológico debe inhibir o disminuir la presencia de citoquinas proinflamatorias de daño (a través de Stat 3 por ejemplo). Los tumores que sobrepasan estas barreras pueden mover la balanza de la inmunidad desde la activación a la inducción de tolerancia (Pardoll Annu. Rev. Immunol. 2003. 21: 807-39).

---

## 5.- ANTÍGENOS ASOCIADOS AL TUMOR (TAAs)

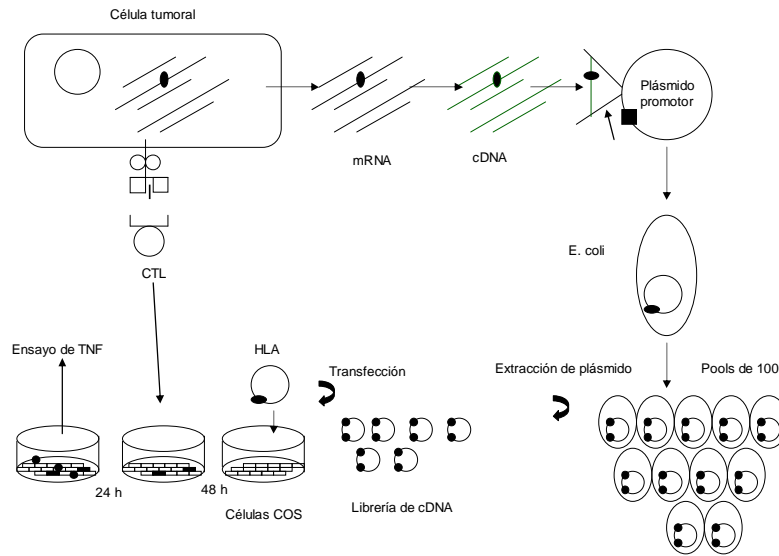
La base de la hipótesis de inmunovigilancia es que los tumores se originan con una frecuencia similar a las infecciones por patógenos y que el sistema inmunológico reconoce y es capaz de eliminar estos tumores basándose en la expresión de antígenos asociados al tumor (TAAs). El descubrimiento de estos TAAs se llevó a cabo mediante estudios de trasplante en modelos murinos. Se observó que los tumores inducidos en estos ratones eran rechazados cuando se trasplantaban en huéspedes singénicos, mientras que los trasplantes de tejido normal entre huéspedes singénicos eran aceptados totalmente (Gross 1943; Foley 1953; Baldwin 1955; Prehn 1957).

Los CTLs median el rechazo tumoral en varios modelos animales. En humanos, los inmunólogos están trabajando teniendo en cuenta que los linfocitos T son capaces de erradicar las células tumorales al igual que lo hacen con las células infectadas por virus. Se abre un campo excitante de identificación en las células cancerosas de antígenos específicos y diana de los CTLs, de forma que la manipulación de estos antígenos pueda conducir al inicio o a la amplificación de la respuesta nativa en el paciente, la cual es insuficiente.

El cultivo de células tumorales irradiadas con linfocitos de sangre periférica del paciente (linfocitos autólogos) permite obtener poblaciones de células respondedoras que muestran una actividad lítica contra las células tumorales (Boon et al. 1994). Las células respondedoras se pueden aislar desde ganglios linfáticos o linfocitos infiltrantes de tumor (TILs) y son una

fuelle de clones CTLs específicos. De todos los CTLs anti-tumor obtenidos, se han generado muchos que son específicos de melanoma, a causa de que las metástasis de melanoma se adaptan fácilmente a cultivo, dando lugar a dianas potentes y estimuladoras de CTLs. De todos modos, en otros tumores también se han encontrado numerosos antígenos reconocidos por los CTLs. Un antígeno reconocido por un CTL CD8+ consiste en un complejo formado por un péptido, la  $\beta$ 2-microglobulina y la cadena pesada de MHC de clase I: HLA-A, HLA-B, o C. Los péptidos antigénicos son producidos en el interior de la célula y proceden de la degradación de proteínas celulares. Son trasladados por transportadores específicos desde el citosol al retículo endoplásmico, donde se unen en una región específica de las moléculas HLA y una vez que se unen con la cadena invariante  $\beta$ 2-microglobulina, los complejos péptido-MHC se presentan en la superficie celular al TCR. Así, los péptidos procedentes de proteínas endógenas son continuamente expresados y preparados para ser analizados por los CTLs.

La caracterización de un antígeno potencialmente diana en las células tumorales requiere la identificación del péptido y su presentación por la molécula de HLA de clase I. Hay básicamente tres métodos que se han utilizado para identificar péptidos presentados a las células T tumor específicas. El primero es un método genético basado en la transfección de librerías de cDNA en células que expresan la molécula presentadora MHC, para aislar el gen que codifica la proteína de la que deriva el péptido (De Plaen et al. 1997) (**figura 5**). Una vez el gen ha sido aislado, el péptido antigénico es deducido desde la secuencia de la proteína teniendo en cuenta que debe tener de 8 a 9 aminoácidos y los puntos de anclaje específicos para la molécula HLA que lo presenta.



**Figura 5.-** Ensayo genético para la identificación de antígenos reconocidos por CTLs. El clon de CTL que reconoce el antígeno segrega TNF que se mide en el sobrenadante de los medios de cultivo.

El segundo método es mediante la purificación bioquímica de péptidos eluidos a partir de moléculas del MHC de clase I de la célula tumoral. Los péptidos tumorales son fraccionados por HPLC, y las diferentes fracciones son analizadas por su capacidad para sensibilizar las células diana mediante la lisis por los CTLs. La fracción positiva es entonces purificada y secuenciada. Normalmente se requieren métodos sofisticados de espectrometría de masas para llegar a la secuencia del péptido (Cox et al. 1994). Además cuando se originan modificaciones post-traduccionales en la proteína, la secuencia del péptido no se puede deducir de la secuencia de la proteína por lo que este método es la única vía de identificar el epítipo natural presentado en la superficie (Skipper et al. 1996). El tercer método de identificación es diferente a los dos anteriores y se ha utilizado para

identificar antígenos codificados por proteínas conocidas que son sobreexpresados o mutados en la célula tumoral. Los péptidos candidatos se identifican mediante los motivos de anclaje consenso para un determinado HLA. Tras comprobar su unión, se cargan sobre células presentadoras de antígeno y se utilizan para estimular los CTLs *in vitro* (Jung & Schluesener 1991).

La lista de antígenos tumorales reconocidos por las células T que se han identificado está creciendo continuamente. Basándonos en el patrón de expresión de la proteína parental, los antígenos tumorales pueden ser clasificados en seis grupos principales. Debido a la relativa facilidad de generar células T humanas que reconocen melanomas, la mayoría de los antígenos tumorales, identificados hasta la fecha, derivan de este tipo de tumor, aunque también se han identificado en otros tipos de tumores.

#### 5.1.- Antígenos compartidos por distintos tumores y expresados en testículo, Cáncer-Testis (CTA)

Codificados por genes que están silentes en tejido normal y activados en muchos tumores de diferente tipo histológico (**tabla 2**). La activación de genes específicos en tumores puede generar antígenos que son compartidos por tumores de distinto origen histológico. Los antígenos prototipo de este grupo son los codificados por los genes MAGE en humanos y P1A en ratón. Existen diferentes grupos:

-Familia MAGE: El primer antígeno caracterizado en un tumor humano estaba codificado por un gen de función desconocida denominado MAGE-1 (de melanoma antigen) (van der Bruggen et al. 1991). MAGE-1 pertenece a una familia de al menos 12 genes localizados en el brazo largo del cromosoma X, varios miembros de los cuales se expresan en una proporción de tumores de diferentes tipos histológicos (Rogner et al. 1995); (De Plaen et al. 1994). La presencia de regiones hidrofóbicas conservadas

en los miembros de la familia sugiere que la función de estas proteínas, todavía desconocida, pueda estar relacionada. Al contrario, los promotores de los 12 genes MAGE presentan variabilidad, sugiriendo que una función similar pueda estar regulada bajo diferentes controles transcripcionales, en diferentes tiempos y localizaciones. Cuatro genes adicionales relacionados con MAGE se localizan también en el cromosoma X pero en el brazo corto (Muscatelli et al. 1995; Dabovic et al. 1995; Lurquin et al. 1997). Las únicas células normales en las que se han detectado estos genes son en trofoblasto de la placenta y en células germinales testiculares (Takahashi et al. 1995). De este modo, estos antígenos pueden ser considerados específicos de tumor, ya que como las células normales, en las que estos genes se expresan, no presentan moléculas HLA de clase I no pueden por tanto presentar los antígenos (Haas et al. 1988).

Varios péptidos codificados por genes MAGE que se unen a diferentes moléculas HLA son reconocidos por CTLs y se han identificado. Curiosamente, todos los CTLs que reconocen antígenos codificados por genes MAGE derivaron del mismo paciente, que había producido metástasis pero al mismo tiempo había mostrado un extraño curso clínico favorable. Otros pacientes que expresaban algunos de los genes MAGE fueron estudiados pero no se obtuvieron CTLs tras la estimulación de sus linfocitos con las células tumorales autólogas.

Un interesante estudio, llamado SEREX, ha permitido la identificación de estos genes del tipo MAGE mediante anticuerpos (Sahin et al. 1997). Se basa en la observación de que el suero de pacientes a menudo contiene anticuerpos dirigidos contra proteínas intracelulares. El análisis de genotecas de expresión con los sueros de pacientes permitió aislar secuencias MAGE y también nuevas secuencias, NY-ESO-1 (Chen et al. 1997) y el gen SSX2 (Tureci et al. 1996).

La comparación de secuencias y análisis de todos los genes MAGE, permitió la clasificación en tres subgrupos de genes ácidos MAGEs, llamados A, B, y C; y un subgrupo de genes básico llamado MAGE-D, que

incluye la Necdina, Restina y otros (Zhao et al. 2002). Basándose en el patrón de expresión, los genes MAGE se clasificaron posteriormente en dos subgrupos: I y II. En el subgrupo I se encuentran los genes MAGE-A, -B y -C, que se expresan en tumores y testis pero no en tejido normal, por lo que serían los genes específicos de tumor (CT, de cancer-testis). Al contrario, el subgrupo II se expresa en tejido normal adulto (Barrer et al. 2002; Chiba et al. 2002)

-Familia BAGE (Boel et al. 1995) y GAGE (Van den Eynde et al. 1995): la distribución histológica de ambos genes en tumores está relacionada con la expresión de MAGE.

La familia BAGE (de antígenos de melanoma B) contiene 15 secuencias cercanas idénticas que se encuentran en las regiones yuxtacentroméricas de los cromosomas 9, 13, 18 y 21. Recientemente se ha descrito la hipometilación del loci BAGE como un nuevo marcador epigenético informativo en el diagnóstico del cáncer (Grunau et al. 2005).

-Gen RAGE: la mayoría de antígenos de este grupo se han caracterizado en melanoma, pero también se expresa en otros tipos de tumores. RAGE codifica un antígeno reconocido por los CTLs en carcinoma renal (Gaugler et al. 1996). Este gen no se expresa en tejido normal. De manera interesante se expresa en retina que, como la mayoría del tejido intra-ocular, no expresa moléculas MHC de clase I (Abi-Hanna et al. 1988). Además el ojo es un lugar inmunoprivilegiado y contiene una gran cantidad de potentes agentes inmunosupresores que lo protegen de reacciones inflamatorias destructivas.

-N-acetil glucosaminil transferasa V: En este caso, parece que la N-acetil-glucosaminil transferasa V, un gen que se expresa de forma ubicua, contiene un intrón cerca del extremo del promotor que se activa exclusivamente en células de melanoma (Guilloux Y et al. 1996). Esta activación atípica, que ocurre en más del 50% de melanomas, da lugar a un mensaje conteniendo una nueva pauta de lectura abierta (ORF), que codifica para el péptido antigénico en su parte intrónica.

Recientemente, se ha descubierto que la presentación cruzada de la metaloproteinasa 2 de la matriz extracelular (MMP-2) por las células de melanoma, de manera dependiente de la integrina  $\alpha\beta_3$ , da lugar a un nuevo antígeno tumoral presentado por la molécula HLA-A\*0201 (Godefroy et al. 2005).

Tabla 2.- Antígenos humanos compartidos tumor-específicos

Gen	HLA	Péptido	Posición	Referencias
MAGE-A1	A1	EADPTGHSY	161-169	Traversari et al. 1992
	A3	SLFRAVITK	96-104	Chaux et al. 1999
	A24	NYKHCPEI	135-143	Fujie et al. 1999
	A28	EVDGREHSA	222-231	Chaux et al. 1999a
	B7	RVRFFPSL	289-298	<sup>b</sup>
	B37	REPVTKAEML	127-136	Tanzarella et al. 1999
	B53	DPARYEFLW	258-266	Chaux et al. 1999a
	Cw2	SAFPTTINF	62-70	"
	Cw3	SAYGEPRKL	230-238	"
	Cw16	SAYGEPRKL	230-238	van der Bruggen et al. 1994
	DR13	LLKYRAREPVTKAE	114-127	Chaux et al. 1999b
DR15	EYVIKVSARVRF	281-292	<sup>b</sup>	
MAGE-A2	A2	YLQLVFGIEV	157-166	Kawashima et al. 1998
	A24	EYLQLVFGIE	156-165	Tahara et al. 1999
	B37	REPVTKAEML	127-136	Tanzarella et al. 1999
	DR13	LLKYRAREPVTKAE	121-134	Chaux et al. 1999b
MAGE-A3	A1	EVDPIGHLV	168-176	Gaugler et al. 1994
	A2	FLWGPRLV	271-279	Van der Bruggen et al. 1994
	A2	KVAELVHFL	112-120	Kawashima et al. 1998
	A24	IMPKAGLLI	195-203	Tanaka et al. 1997
	A24	TFPDLESEF	97-105	Oiso et al. 1999
	B37	REPVTKAEML	127-136	Tanzarella et al. 1999
	B40	AELVHLLL	114-122	<sup>b</sup>
	B44	MEVDPIGHLV	167-176	Herman et al. 1996
	DR13	AELVHLLLKYRAR	114-127	Chaux et al. 1999b
	DR13	LLKYRAREPVTKAE	121-134	"
	DR11	TSYVKVLHMHVKISG	281-295	Manici et al. 1999
	DP*0401	TQHFVQENYLEY	247-258	<sup>b</sup>

MAGE-A4	A2	GVYDGREHTV	230-239	Duffour et al. 1999
MAGE-A6	A34 B37 Cw16 DR13	MVKISGGPR REPVTKAEML ISGGPRISY LLKYRAREPVTKAE	290-298 127-136 299-303 121-134	Zorn & Recend . 1999 Tanzarella et al. 1999 <sup>b</sup> Chaux et al. 1999b
MAGE-A10	A2 B53	GLYDGMEHL DPARYEFLW	254-262 290-298	Huang et al. 1999 Chaux et al. 1999a
MAGE-A12	A2 Cw7 DR13	FLWGPRLV <sup>d</sup> VRIGHLYIL AELVHFLLLKYRAR	271-279 170-178 114-127	Van der Bruggen et al. 1994 Heidecker Chaux et al. 1999b
BAGE	Cw16	AARAVFLAL	2-10	Böel et al. 1995
GAGE-1,2,8	Cw6	YRPRPRRY	9-16	Van den Eynde et al. 1995
GAGE-3-7	A29	YYWPRPRRY	10-18	De Backer et al. 1999
NY-ESO-1	A2 A31 A31 HLA-A2	QLSLLMWITQC <sup>e</sup> ASGPGGGAPR LAAQERRVPR MLMAQEALAFI	155-165 53-62 alt-ORF alt-ORF	Jäger et al. 1998 Wang et al. 1998 " Aarnoudse et al. 1999
GnTV <sup>f</sup>	A2	VLPDVFIRC	38-64	Guilloux et al. 1996
TRP2-INT2 <sup>g</sup>	A*68011	EVISCKLIKR	intrón 2	Guilloux et al. 1996
HERV-K	A2	MLAVISCAV	alt-ORF	Coulie

<sup>a</sup>Virus recombinante ALVAC se utilizó para infectar células dendríticas

<sup>b</sup>P. Van der Bruggen, no publicado

<sup>c</sup>Adenovirus recombinante con el gen completo para infectar células dendríticas

<sup>d</sup>El mismo péptido que MAGE-A3/A2

<sup>e</sup>El péptido efectivo más corto todavía no se ha definido

<sup>f</sup>Tránsito aberrante de la N-acetil glusominil transferasa (GnTV) que sólo se encuentra en melanomas

<sup>g</sup>Tránsito con splicing incompleto encontrado sólo en melanomas



## 5.2.- Antígenos de diferenciación

Un gran número de clones de CTL generados contra melanomas autólogos y reconocedores de antígenos tumorales presentados por HLA-A2 son capaces de reconocer melanocitos normales HLA-A2 positivos. Esta observación indica que estos antígenos son antígenos de diferenciación de melanocitos, también expresados por tanto en melanomas (**tabla 3**).

Se conocen cuatro genes de diferenciación de melanocitos: tirosinasa, Melan-A/MART-1, gp100 y gp75 (Brichard et al. 1993; Wolfel et al. 1994; Coulie et al. 1994; Wang et al. 1996). La tirosinasa es una enzima implicada en la síntesis de melanina, mientras que el papel de las otras tres proteínas es desconocido. Estos cuatro genes no se expresan en tejido normal excepto en melanocitos, pero se expresan en todas las muestras de melanoma. La mayoría de los péptidos antigénicos identificados codificados por estos genes son presentados por HLA-A2, aunque también se han encontrado otras combinaciones péptido-HLA. El patrón de precursores de CTL dirigido contra estos antígenos de diferenciación es diferente del observado en los antígenos MAGE. La mayoría de los pacientes con melanoma tienen precursores de CTL que pueden ser reestimulados *in vitro* con células tumorales autólogas (Sensi et al. 1995; Brichard et al. 1996). Las poblaciones TIL también contienen estos CTLs (Robbins et al. 1994).

Pero, ¿qué hay de los posibles efectos colaterales de una inmunización pasiva o activa contra los antígenos de diferenciación de melanocitos?, el efecto colateral de mayor gravedad no es en la piel donde podría generar vitíligo debido a la destrucción de los melanocitos sino en la retina, donde los melanocitos están presentes en la capa coroidea. El vitíligo se ha asociado con un buen pronóstico en melanoma y también la transferencia adoptiva de TILs, sin lesiones en el ojo (Bystryk et al. 1987; Richards et al. 1992). Sin embargo, está más que justificada la cautela de los ensayos de inmunoterapia con estos antígenos.

Tabla 3.- Antígenos de diferenciación reconocidos por las células T sobre tumores humanos.

Gen/proteína	HLA	Péptido	Posición	Referencias
Tyrosinasa	A2	MLLAVLYCL	1-9	Wölfel et al. 1994
	A2	YMNGTMSQV	369-377	"
		YMDGTMSQV		Skipper et al. 1996
	A24	AFLPWHRLF	206-214	Kang et al. 1995
	B35	LPSSADVEF	312-320	Morel et al. 1999
	B44	SEIWRDIDF	192-200	Brichard et al. 1996
	A1	KCDICTDEY	243-251	Kittlesen et al. 1998
	A1	SSDYVIPIGTY	146-156	Kawakami et al. 1998
	DR4	QNILLSNAPLGPQFP	56-70	Topalian et al. 1996
	SYLQSDPDSFQD	450-462	"	
DR15	FLLHHAFVDSIFEQW	386-406	Kobayashi et al. 1998	
	LQRHRP			
gp100	A2	KTWGQYWQV	154-162	Kawakami et al. 1995
	A2	(A)MLGTHTMEV	177(8)-186	Tsai et al. 1997
	A2	ITDQVPFSV	209-217	Kawakami et al. 1995
	A2	YLEPGPVTA	280-288	Cox et al. 1994
	A2	LLDGTATLRL	457-466	Kawakami et al. 1994
	A2	VLYRYGSFSV	476-485	Kawakami et al. 1995
	A2	SLADTNSLAV	570-579	Tsai et al. 1997
	A2	RLMKQDFSV	619-627	Kawakami et al. 1998
	A2	RLPRIFCSC	639-647	"
	A3	LIYRRRLMK	614-622	"
	A3	ALLAVGATK	17-25	Skipper et al. 1996
A24	VIFFLPDHL	Intrón 4	Robbins et al. 1997	
Cw8	SNDGPTLI	71-78	Castelli et al. 1999	
MelanA/MAR T-1	A2	(E)AAGIGILTV	26(27)-35	Kawakami et al. 1994
	A2	ILTVILGVL	32-40	Castelli et al. 1995
	B45	AEEAAGIGIL(T)	24-34(33)	Schneider et al. 1998
gp75	A31	MSLQRQFLR	Alt.ORF	Wang et al. 1996a
TRP-2	A31/	LLGPGRPYR	197-205	Wang et al. 1996b
	33	SVYDFFVWL	180-188	Parkhurst et al. 1998
	A2	ANDPIFVVL	387-395	Castelli et al. 1999
	Cw8			
PSA	A2	FLTPKKLQCV	141-150	Correale et al. 1997
	A2	VISNDVCAQV	154-163	"
CEA	A2	YLSGANLNL	571-579	Tsang et al. 1995
	A2	IMIGVLVGV	691-699	Kawashima et al. 1998

El papel de los CTLs contra antígenos de melanoma en el rechazo no está claro, pero está demostrado por la asociación entre el vitíligo y una mayor supervivencia y la regresión espontánea de melanomas (Rosenberg & White 1996). En un estudio reciente, utilizando ratones transgénicos MT-ret (un modelo para el melanoma cutáneo humano), se investigó la respuesta antitumoral de células T. Se observó que una gran proporción de estos ratones desarrollaban vitíligo asociado al melanoma y se mostró una buena correlación entre el desarrollo de vitíligo y el control del melanoma (Lengagne et al. 2004). Las células que secretaban IFN- $\gamma$  en respuesta a las células de melanoma, fueron estadísticamente más frecuentes en ratones con melanoma que desarrollaban vitíligo que en los que no lo presentaban, sugiriendo un papel crucial de las células T secretoras de IFN- $\gamma$  en el control del tumor. Lo mismo ocurre en cuanto a los efectos colaterales de la aplicación del antígeno CEA, proteína oncofetal expresada en el epitelio normal de colon y en la mayoría de carcinomas intestinales (Tsang et al. 1995).

### 5.3.- Antígenos generados por mutaciones

Los trabajos iniciales realizados en ratones revelaron que las mutaciones puntuales también generan antígenos reconocidos en el tumor por los CTLs autólogos (**tabla 4**) (De Plaen et al. 1988; Lurquin et al. 1989). Las mutaciones se localizan en regiones que codifican péptidos antigénicos y originan el cambio de un aminoácido con dos posibles consecuencias: el nuevo aminoácido puede ser capaz de unirse a la molécula de HLA de clase I (nuevo agretopo) o bien constituir un nuevo epítipo reconocido por un CTL. La mayoría de los antígenos tumorales en ratón identificados hasta la fecha son resultado de mutaciones, las cuales pueden ser debidas a que muchos de los tumores de ratón estudiados estaban inducidos con radiación u otros carcinógenos. Sin embargo, antígenos de la misma categoría han sido encontrados en humanos. Dos de estas mutaciones que afectan a los

genes humanos CDK4 y  $\beta$ -catenina pueden estar implicadas en la oncogénesis, ya que se encontraron en tumores independientes y se ha demostrado el efecto sobre la actividad de las proteínas que codifican (Wolfel et al. 1995; Robbins et al. 1997; Rubinfeld et al. 1997). La mutación en CDK4 previene la unión de la proteína a su inhibidor p16. Esto altera la regulación del ciclo celular, favoreciendo el crecimiento descontrolado de las células tumorales. La mutación en  $\beta$ -catenina origina la estabilización de la proteína, lo cual favorece la formación constitutiva de complejos con factores de transcripción, como son Lef-1. Los complejos  $\beta$ -catenina/Lef-1 originan la transactivación persistente de genes diana todavía no identificados que estimulan la proliferación celular o inhiben la apoptosis.

Otra mutación que puede inhibir la apoptosis se identificó con CTLs específicos de un carcinoma de células escamosas (Mandrizzato et al. 1997). El antígeno está codificado por una forma mutada del gen CASP8, que codifica para la proteasa caspasa 8, FLICE o MACH $\alpha$ 1. Esta proteasa se requiere para la inducción de apoptosis a través de los receptores del Fas y TNFR1, y la actividad de la proteína mutada está disminuída. Estos estudios junto con las observaciones establecidas de las mutaciones en CDK4 y  $\beta$ -catenina, sugieren que el proceso de mutaciones puntuales generadoras de antígenos tumorales juega un papel importante en la transformación tumoral y la progresión del mismo.

Antígenos tumorales pertenecientes a esta categoría fueron encontrados en melanoma inicialmente pero también se han identificado en otros tipos de tumor. Las leucemias mieloides a menudo expresan la proteína quimérica bcr-abl, originada por la traslocación t(9,22). Las células CD4+, activadas *in vitro* contra un péptido procedente de la región de fusión de bcr-abl, reconocen blastos leucémicos HLA-DR4 que expresan bcr-abl (Bosch et al. 1996). Esto indica que otra fuente de antígenos tumor-específicos es la que codifica proteínas quiméricas procedentes de traslocaciones cromosómicas, estos antígenos pueden ser compartidos por muchas leucemias.

Tabla 4.-Antígenos tumorales procedentes de mutaciones.

	Tumor	HLA	Péptido <sup>1</sup>	Posición	Referencias
MUM-1 CDK4	Melanoma	B44	EEKL/VVLF	30-38	Coulie et al. 1995
	Melanoma	A2	ACDPHSGHF V	23-32	Wölfel et al. 1995
β-catenina HLA-A2 <sup>2</sup>	Melanoma	A24	SYLDSGIHF	29-37	Robbins et al. 1996
	Carcinoma renal	-	-	-	Brändle et al. 1996
bcr-abl	Leucemia mieloide crónica	DR4	ATGFKQSSKA LQRPVAS	-	Ten Bosch et al. 1996
CASP-8	Carcinoma de cabeza y cuello	B35	FPSDSWCYF	476-484	Mandrizzato et al. 1997
KIAA0205	Tumor de vejiga	B44	AEPINIQTW	262-270	Guéguen et al. 1998
K-ras	Adenocarcinoma pancreático	B35	VVVGAVGVG	7-15	Gjertsen et al. 1997
hsp70-2	Carcinoma renal	A2	SLFEG/DLT	286-295	Gaudin et al. 1999
MUM-2	Melanoma	B44 Cw6	SELFRRGLDS Y FRSGLDSYV	-	Chiari et al. 1999
EF-2	Carcinoma de pulmón	A68	ETVSEQSNV	581-589	Hogan et al. 1998
Triosafostafo isomerasa Proteína de fusión (receptor LDL/fucosiltransferasa AS)	Melanoma	DR1	GELIG/LNAAK VPAD	23-37	Pieper et al. 1999
	Melanoma	DR1	GGAPPVTWR RAPAPG		Wang et al. 1999
<b>Cdc27 (mutación fuera del epítipo)</b>	Melanoma	DR4	FSWAMDLDP KGA		Wang et al. 1999

<sup>1</sup> el residuo modificado por la mutación está en cursiva

<sup>2</sup> la mutación afecta al propio gen HLA-A2

Es razonable asumir que los antígenos producidos por mutaciones puntuales son específicos del tumor y que los precursores de CTLs dirigidos

contra estos antígenos no estarán sometidos ni a la depleción ni a la anergia que acompaña a los mecanismos de tolerancia natural. Sin embargo, el hecho de que sean únicos para un tumor individual o restringido a unos pocos, hace más difícil el desarrollo de vacunas. Los antígenos codificados por el gen B-Raf, un miembro de la cascada de proteínas MAP activado por mitógenos, son prometedores candidatos porque son antígenos mutados y compartidos. La misma mutación activadora de B-Raf se encuentra en más del 60% de melanomas (Davies et al. 2002). Recientemente, se ha mostrado que las células T CD4+ reconocen el péptido B-Raf codificado por la región mutada (Sharkey et al. 2004).

#### 5.4.- Mucinas:

Tras la estimulación de células de ganglio linfático, de pacientes con cáncer pancreático, con células tumorales pancreáticas alogénicas, se obtuvieron CTL CD8+ con el receptor  $\alpha\beta$  que lisaban la mayoría de células tumorales de páncreas y mama (Barnd et al. 1988; 1989). Sin embargo, funcionaban sin restricción MHC. Las mucinas pancreáticas y de mama están ambas codificadas por el gen MUC-1 (Gendler et al. 1988; Lancaster et al. 1990). Estas moléculas tienen un núcleo protéico glicosilado con un motivo repetido de 20 aminoácidos. En tumores de mama y células tumorales pancreáticas, las mucinas están poco glicosiladas, y esto parece que origina epítomos de péptidos de los motivos repetidos que pueden ser reconocidos tanto por anticuerpos específicos como por CTLs. Las células transfectadas con una construcción que contiene sólo dos repeticiones en tándem de los motivos de las mucinas estimulan a los CTL de forma muy eficiente ya que no están glicosiladas del todo (Magarian-Blander et al. 1993).

La inmunización contra mucinas no glicosiladas ofrece una posibilidad interesante de inmunoterapia. En un estudio clínico, un péptido de 105 aminoácidos, conteniendo cinco epítomos de motivos de repetición

de mucinas, fue inyectado con BCG a 67 pacientes con cáncer de mama, colon y cáncer pancreático. No se observaron beneficios clínicos. Sin embargo, se observó un aumento en la frecuencia de CTL mucina-específicos en los PBLs de la mayoría de los pacientes (Barratt-Boyes 1996).

### 5.5.- Antígenos sobreexpresados en tumores

Un elevado número de CTLs dirigidos contra células tumorales autólogas reconocen antígenos codificados por genes expresados tanto en tejidos normales como en tumores, aunque los CTL lisan específicamente el tumor (**tabla 5**).

Tabla 5.- Antígenos sobreexpresados en tumores humanos.

Gen	Expresión en tejido normal	HLA	Péptido	Posición	Referencias
HER-2/neu	Ubicua (bajo nivel)	A2 A2 A2 A2	KIFGSLAFL IISAVVGL ALCRWGLL L ILHNGAYSL	369-377 654-662 5-13 435-443	Fisk et al. 1995 Brossart et al. 1998 Kawashima et al. 1998 "
p53	Ubicua (bajo nivel)	A2	LLGRNSFE V	264-272	Röpke et al. 1996
PRAME <sup>1</sup>	Testis, ovario, endometrio, adrenales	A24	LYVDSLFFL	301-309	Ikeda et al. 1997
Carboxilesterasa intestinal	Hígado, intestino, riñón	B7	SPRWWPT CL	Alt. ORF	Rousin et al. 1999
RU2AS	Testis, riñón, vejiga	B7	LPRWPPPQ L	Antisentido	Van den Eynde
M-CSF	Riñón, hígado	B35	LPAVGLSP GEQEY	Alt. ORF	Probst-Kepper
Telomerasa	Testis, timo, médula ósea, ganglios linfáticos	A2	ILAKFLHWL	540-548	Vonderheide et al. 1999

<sup>1</sup> El antígeno es reconocido por CTLs que llevan un receptor inhibidor de las NK y previene la lisis de células que expresan determinadas moléculas de HLA-C

El oncogen HER-2/neu se encuentra a elevados niveles en aproximadamente el 30% de carcinomas de mama y ovario. Se encontró un péptido derivado de este gen que era la diana de linfocitos infiltrantes de tumor en algunos carcinomas de ovario HLA-A2 (Fisk et al. 1995; Lustgarten et al. 1997). De la misma forma, un clon CTL estimulado *in vitro* contra un péptido wild-type de p53 lisó células tumorales HLA-A2 que sobrepresaban p53 (Ropke et al. 1996; Gnjatic et al. 1998). La concentración de la proteína p53 está aumentada en muchas células tumorales, principalmente debido a una mayor vida media de las formas mutadas comparado con las silvestres. Es muy difícil saber si la inmunización contra antígenos como son HER2/neu o p53 inducen daño autoinmune en tejido normal, donde el mismo antígeno se expresa a bajos niveles. El reconocimiento de epítomos por CTL ha demostrado que requiere la expresión de genes con un determinado umbral (Lethe et al. 1997). En algunos casos, este umbral puede no encontrarse en tejido normal. Esto no es fácil de comprobar, debido principalmente a la escasez de líneas derivadas de tejido normal. En otros casos, la baja expresión medida a nivel de RNA en un tipo de tejido normal puede de hecho reflejar una alta expresión por sólo un subtipo de células las cuales entonces superarían el umbral. Dos estudios llevados a cabo *in vivo* en modelos de ratón sugieren que la transferencia adoptiva de CTLs dirigidos contra un antígeno tumoral que está presente a bajo nivel en tejido normal, no causa toxicidad autoinmune. Este estudio implicaba ratones transgénicos que expresaban un antígeno retroviral en todos sus tejidos (Hu et al. 1993). Otro estudio usaba CTLs dirigidos contra un péptido p53 wild-type, que fue aislado desde ratones knock-out p53 y transferidos en ratones normales (Vierboom et al. 1997). En otro estudio, ratones inmunizados contra péptidos HER2/neu desarrollaron CTLs y el rechazo del tumor sin toxicidad aparente en tejidos normales que expresan HER2/neu (Nagata et al. 1997).

El gen PRAME se expresa a elevados niveles en la mayoría de melanomas y en otros tipos de tumor (Ikeda et al. 1997; Kessler et al. 2001).



La survivina, una proteína antiapoptótica de la familia de proteínas inhibidoras de apoptosis (IAP), está sobreexpresada en muchos tipos de tumor, y se ha observado que las células de melanoma son lisadas por CTLs antisurvivina (Schmitz et al. 2000; Schmidt et al. 2003).

La enzima telomerasa también se ha sugerido como una buena diana de inmunoterapia ya que su presencia es esencial para la proliferación de las células tumorales. Un péptido codificado por la telomerasa se reconoció por CTLs (Vonderheide et al. 1999). Sin embargo, también se han publicado trabajos en los que los CTL obtenidos de pacientes vacunados con el péptido antigénico eran capaces de reconocer células cargadas con el péptido pero no podían reconocer las células tumorales que expresaban la telomerasa (Ayyoub et al. 2001; Parkhurst et al. 2004).

Los antígenos codificados por estos genes son compartidos entre muchos tumores pero no son tumor-específicos, por los que existe el riesgo potencial en la vacunación con estos antígenos de generar procesos autoinmunes.

#### 5.6.- Antígenos virales

Los antígenos derivados de virus oncogénicos constituyen otra categoría de antígenos tumorales interesante. Un número de antígenos virales han sido estudiados en detalle en tumores de ratón inducidos con virus y muestran ser importantes para el rechazo tumoral (Klarnet et al. 1989; Kast & Melief 1991). En humanos, el mejor ejemplo es la oncoproteína E7 del virus 16 del papiloma humano, el cual está presente en la mayoría de carcinomas de cervix. Los CTLs específicos de tumor se han obtenido por sensibilización *in vitro* con péptidos E7 presentados por HLA-A2 (Ressing et al. 1995). Ocho pacientes con cáncer cervix en estado terminal fueron vacunados con el virus vaccinia recombinante que expresaba las proteínas E6 y E7 del HPV16 y 18. No se observaron efectos

clínicos colaterales ni tampoco beneficio clínico. Cada paciente desarrolló anticuerpos contra la vacuna. Esta respuesta de anticuerpos se midió en tres pacientes y se observó respuesta de CTLs específicos de HPV en un solo paciente (Borysiewicz et al. 1996).

## 6.- INMUNOTERAPIA ANTÍGENO-ESPECÍFICA

La identificación molecular de antígenos asociados al tumor, en esta última década, ha facilitado la generación *in vitro* de células T anti tumorales, que pueden ser expandidas y utilizadas para terapia adoptiva (Rosenberg et al. 1998), y el desarrollo de una inmunoterapia activa específica de antígeno (AASIT).

### 6.1.- Inmunoterapia pasiva o adoptiva

La inmunoterapia adoptiva se caracteriza por la expansión *in vitro* “activa” de CTLs específicos de antígeno y su reinfusión en pacientes con enfermedad neoplásica. Los primeros estudios en humanos, antes de la identificación de antígenos asociados al tumor, implicaban la transferencia de células líticas activadas por linfocinas (LAK) con capacidad para reconocer y lisar células cancerosas *in vitro*, no restringida por HLA (Rosenberg 1987). A pesar del éxito del uso de estas células en el tratamiento de las micrometástasis en modelos murinos, los resultados clínicos en humanos fueron decepcionantes. Las técnicas de crecimiento de linfocitos infiltrantes de tumor (TILs), de tumores rechazados, permitieron la obtención de células T específicas de tumor en pacientes de melanoma. La transferencia adoptiva de estas células junto a IL-2 originó la regresión tumoral en el 35% de pacientes con melanoma metastásico (Rosenberg et al. 1988; 1994).

La inmunización de pacientes contra TAAs definidos no sólo crea nuevas posibilidades para la inmunoterapia pasiva sino que también permite

identificar la característica celular exacta, requerida para mediar el rechazo tumoral (Walter et al. 1995; Dudley et al. 2000). En melanoma metastático se aplicó la transferencia adoptiva de células T policlonales, específicas de antígeno, junto a IL-2. Se obtuvo una respuesta clínica en 6 de 13 pacientes pero también se observó toxicidad, relacionada con la elevada dosis de IL-2, y el desarrollo de vitíligo y uveítis (Dudley et al. 2002). Estos resultados junto al tedioso cultivo de células T, que se requieren en un número elevado, limitan la aplicabilidad de esta tecnología.

#### 6.2.- Inmunoterapia activa (AASIT)

La identificación de antígenos tumorales ha permitido el desarrollo de nuevas vacunas contra el cáncer. Los antígenos mutados, resultado de la inestabilidad genética de la célula tumoral, serán específicos de paciente, no inducirán tolerancia y serán potentes antígenos de rechazo tumoral. Como la identificación de antígenos propios mutados de cada paciente, aunque técnicamente es posible, no es práctica, la alternativa es la vacunación con mezclas antigénicas derivadas de tumores autólogos. En modelos animales se observó que, a pesar de la baja proporción de antígenos en la mezcla, es un poderoso método para estimular la inmunidad antitumoral (Fields et al. 1998). El principal obstáculo de la vacunación con mezclas antigénicas autólogas es que el perfil antigénico del tumor que progresa está unido a cambios con el tiempo (Lengauer et al. 1998; Loeb 2001) y de este modo, la respuesta inmunológica que se origina durante la inmunización puede ir dirigida contra antígenos que se han perdido. Por tanto, la vacunación con antígenos compartidos es el método de elección. Estos antígenos, con algunas excepciones como hemos visto anteriormente, se corresponden con productos génicos normales y muchos inducirán tolerancia. Este problema puede solventarse con el desarrollo de potentes protocolos de vacunación que puedan activar y expandir el remanente de

células T de baja avididad por el antígeno y/o por vacunación con mezclas de antígenos tumorales (Gilboa 2004).

Los métodos de inmunización activa son varios y la mayoría han sido empleados en estudios clínicos de melanoma metastático. Los antígenos reconocidos por los CTLs, ya sean TAAs o antígenos virales, se originan normalmente en el interior de las células, cuyos epítomos son expresados en la superficie celular en la gruta de unión de la molécula de HLA de clase I. Por esta razón, la mimetización de la vía fisiológica sería lo más recomendable. Con este objetivo se han utilizado virus recombinantes, capaces de infectar las células presentadoras de antígeno (APCs), y varios estudios clínicos se han publicado utilizando diferentes vectores (Rosenberg et al. 1998; Zajac et al. 2003). Los virus recombinantes son los inmunógenos más efectivos, pero la inactivación de la capacidad replicativa de los vectores (por su bioseguridad) puede originar una baja expresión de los genes recombinantes. Además, la respuesta inmunológica específica de vector puede limitar su eficiencia. Alternativamente, las APCs pueden ser cargadas con el péptido ex vivo. Inicialmente se utilizaban DCs (células dendríticas) inmaduras obtenidas a partir del cultivo con IL-4 y GM-CSF de las CD14+ del PBMC o de células CD34+ derivadas de médula ósea (Nestle et al. 1998; Banchereau et al. 2001). Actualmente la mayoría de estudios utilizan DCs maduras en presencia de citoquinas por su mayor capacidad en inducir respuestas de CTLs (Thurner et al. 1999). El principal inconveniente es la estandarización de un protocolo. También se han inyectado los péptidos directamente, en presencia (Jager et al. 1996; Weber et al. 2003; Schaed et al. 2002) o ausencia (Marchand et al. 1999) de adyuvantes o citoquinas, y la principal desventaja es la baja inmunogenicidad y los efectos colaterales relacionados con el uso de citoquinas y/o adyuvantes.

### 6.3.- Factores limitantes en inmunoterapia

La identificación en los tumores que progresan de TILs con capacidad de reconocer específicamente antígenos tumorales y destruir las células tumorales *in vitro*, junto con la capacidad de inmunizar pacientes para alcanzar elevados niveles de estas células T antitumorales circulantes, nos plantea un gran problema, ¿cómo es posible que los tumores sigan creciendo ante la presencia de estas potentes reacciones inmunológicas?. Los factores limitantes de una inmunoterapia eficaz podrían dividirse en aquellos generados por el tumor y los correspondientes a los linfocitos. La mayoría de las células T que se encuentran en los tumores son células CD8+. En modelos murinos, y también en estudios preliminares en humanos, se ha observado que la supervivencia y efectividad de las células CD8+ depende de factores derivados de las células T CD4+ helper (Walter 1995). Así, el éxito de la inmunoterapia dependerá de la generación de células CD4+ y CD8+. Aunque las células T pueden reaccionar con el tumor, pueden encontrarse a unos niveles inadecuados para mediar la destrucción tumoral. Es posible que las células T generadas no tengan suficiente avidéz por las células tumorales o bien, que no produzcan citoquinas apropiadas o no tengan suficiente actividad lítica. Para estudiar este fenómeno, se están llevando a cabo estudios de clonación de linfocitos T con elevada avidéz por el antígeno tumoral o una única función inmunológica que nos ayude a conocer los tipos de células inmunológicas implicadas en el desarrollo de una adecuada respuesta inmunológica antitumoral (Dudley et al. 2000).

Hay una gran variedad de mecanismos activos que pueden limitar la efectividad de la estimulación inmunológica. Estos mecanismos incluyen la inducción de tolerancia o anergia de células T y la resistencia tumoral.

## 7.- MECANISMOS DE ESCAPE TUMORAL

Se puede establecer que la inmunovigilancia es la encargada de la eliminación de un grupo de tumores en un estadio temprano, pero los tumores que realmente nos interesan, son los que se encuentran en un estado avanzado y producen metástasis (clínicamente detectables), es decir, aquellos que han desarrollado mecanismos activos para romper el balance de la inmunidad desde la inmunovigilancia a tolerancia o escape.

Los mecanismos de escape tumoral al sistema inmunológico se pueden clasificar en dos grupos, aquellos que inhiben directa o indirectamente la activación de las células del sistema inmunológico y los mecanismos desarrollados por las células tumorales para evadir el control del sistema inmunológico, funcionalmente activo (**figura 6**).

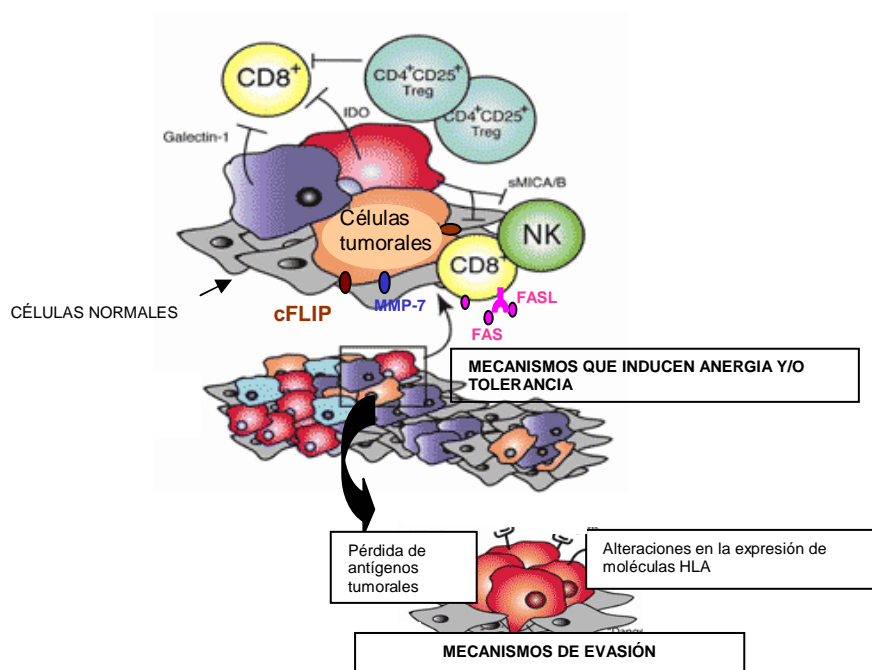


Figura 6.- Mecanismos de escape tumoral.

## 7.1.- Mecanismos que inducen tolerancia y/o anergia

Los mecanismos que inducen la anergia o tolerancia de las células T son varios. Las células tumorales o el estroma influenciado por las células tumorales pueden inducir la anergia de células T directa o indirectamente. Así podemos definir como mecanismos de anergia:

### 7.1.1.- Células T reguladoras (Treg)

Durante años, el papel de las células Tregs, inicialmente llamadas células T supresoras, ha sido revisado en varios trabajos (Sakaguchi et al. 1985; 2004). En humanos, las células T CD4+CD25+ pueden ejercer un efecto inhibitor *in vitro* sobre las células T CD4+CD25- (Dieckmann et al. 2001; Levins et al. 2001; Jonuleit et al. 2001). Clones de células T derivados de TILs y dirigidos contra un antígeno mutado LAGE tenían un perfil de células Treg (Wang et al. 2004). Estos hallazgos han permitido establecer que la respuesta inmunológica tumoral puede ser bloqueada por estas células Treg.

Las células Treg son críticas en el mantenimiento de la tolerancia, se originan en el timo y representan entre el 5-10% de las células T CD4+ en la periferia, expresan constitutivamente la cadena  $\alpha$  para el receptor de IL-2 (CD25), el antígeno 4 asociado a los linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) y un gen relacionado con la familia del receptor de TNF inducido por glucocorticoides (GITR) (Takahashi et al. 2000; Shimizu et al. 2002). También expresan un regulador transcripcional necesario para su desarrollo y función denominado Foxp3 y no producen IL-2 (Shevach 2002). Cuando se estimulan, suprimen la proliferación y producción de citoquinas de células CD4+CD25-, CD8+ y las células T establecidas como Th1 y Th2 (Suvas et al. 2003; Stassen et al. 2004). Estas células además producen citoquinas inmunosupresoras como IL-10 y TGF- $\beta$ . Existen otros dos grupos de células

Treg, las Tr1, secretoras de elevadas cantidades de IL-10 (Levings et al. 2001); y las T<sub>H</sub>3, que secretan grandes cantidades de TGF- $\beta$  (Weiner 2001).

#### 7.1.2.- Ausencia de coestimulación

La mayoría de tumores crecen en un microambiente no-inflamatorio en donde no se produciría la activación inmunológica. El reconocimiento de los antígenos tumorales por parte de las células dendríticas (DCs) en estas condiciones no daría lugar a la activación y maduración de las mismas. Además, la ausencia de expresión de moléculas coestimuladoras por parte de las células tumorales puede conducir a la anergia de células T (Schwartz 1990) y/o a una activación subóptima de las células de las mismas.

#### 7.1.3.- Citoquinas inmunosupresoras

Las células tumorales pueden secretar citoquinas y/o quimioquinas que alteran la maduración y función de las células del sistema inmunológico. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) es una citoquina secretada por muchos tumores (Toi et al. 1996). Estudios *in vitro* han demostrado que VEGF inhibe la diferenciación y maduración de las células dendríticas (DCs) a través de un factor supresor de la transcripción, NF- $\kappa$ B, en las células madre hematopoyéticas (Oyama et al. 1998). Estudios inmunohistoquímicos en tejidos con carcinoma gástrico mostraron una relación inversa entre la densidad de las DCs y la expresión de VEGF. Este hecho se asoció a un peor pronóstico de la enfermedad (Saito et al. 1998). En pacientes con cáncer de pulmón, cabeza, cuello y mama, se encontró una disminución en la función y en el número de DCs maduras, que se asoció con un incremento de las concentraciones plasmáticas de VEGF (Almand et al. 2000). Además, elevadas concentraciones de otra interleuquina, IL-10, se encuentran frecuentemente en suero de pacientes con cáncer. La IL-10 puede ejercer un efecto inhibitorio de la diferenciación



de las DCs desde sus precursores en las células madre (Girolomoni & Ricciardi-Castagnoli 1997). Esta citoquina también inhibe la presentación antigénica, la producción de IL-12 y la inducción de las respuestas *in vivo* a células T helper (De Smedt et al. 1997; Sharma et al. 1999). La IL-10 también potencia la apoptosis espontánea de las DCs (Ludewig et al. 1995), así como la susceptibilidad a la lisis por células NK (Carbone et al. 1999). La IL-10 puede ejercer un efecto protector en las células tumorales frente a los CTLs mediante una falta de expresión de las moléculas HLA de clase I y II e ICAM-1 (molécula intracelular de adhesión tipo 1) (Yue et al. 1999). La pérdida de expresión de las moléculas HLA de clase I también puede ser debida a una falta de expresión de las proteínas TAP1 y TAP2 en las células tumorales mediada por la IL-10 (Salazar-Onfray et al. 1997; Zeidler et al. 1997). El factor proinflamatorio prostaglandina E (PGE2) es otra citoquina que se expresa en tumores como resultado de un aumento de expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 en diversos tumores humanos (Ristimaki et al. 1997; Wolf et al. 1998). La PGE2, incrementa la producción de IL-10 por los linfocitos y macrófagos e inhibe la producción de IL-12 por los macrófagos (Huang et al. 1998). También se encuentran elevadas concentraciones de TGF- $\beta$  en pacientes con cáncer y se ha asociado a la progresión de la enfermedad (Gorsch et al. 1992) y a respuestas pobres en inmunoterapia (Doran et al. 1997). TGF- $\beta$  inhibe la activación, proliferación y actividad de los linfocitos *in vivo* (Fontana et al. 1989). De hecho, en un estudio reciente se ha mostrado que la presencia de células CD8+ insensibles a TGF- $\beta$  infiltrantes en tumores establecidos, originan apoptosis de las células tumorales mediante la secreción de citoquinas (Zhang et al. 2006). También se ha descrito la secreción de galectina-1 por parte de las células de melanoma, que inhibe la activación de células T (Rubinstein et al. 2004).

#### 7.1.4.- Degradación enzimática del triptófano

El sistema inmunológico tiene como principal función eliminar cualquier célula que considera como extraña. Sin embargo, durante el embarazo, el feto expresa péptidos antigénicos y moléculas HLA que son extrañas para la madre, pero en este caso no ocurre el ataque por parte de los CTLs. Munn, Mellor y colaboradores aportaron evidencias sobre este hecho que contribuye a la protección de la barrera materno-fetal. Así, la administración de 1-metiltriptófano (1MT) a ratones preñados mostró que se producía abortos en los fetos. Esta reacción dependía de las células T y de las disparidades antigénicas entre la madre y el feto (Munn et al. 1998; Mellor & Munn 2001). 1-MT es un inhibidor competitivo de la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), enzima citosólica que cataliza la degradación del triptófano y que se expresa en las células fetales y en la interfase materno-fetal. Estos datos indican que la expresión de IDO protege al feto de las células T maternas.

Van den Eynde y colaboradores han mostrado que las células tumorales utilizan el triptófano para evitar la activación del sistema inmunológico (Van den Eynde 2003). La IDO es una enzima metabólica que degrada el triptófano intracelular. Como el triptófano puede atravesar fácilmente la membrana plasmática mediante transportadores específicos, la bajada de concentración del triptófano intracelular se compensa por la entrada del mismo en la célula. Así, se va generando el agotamiento del triptófano del medio por las células que expresan IDO, que es el caso de muchas células tumorales, y se permite su crecimiento. Los linfocitos T dejan de crecer en estas condiciones, puesto que tienen un sistema de control (poco conocido todavía) que bloquea el ciclo celular en la fase G1, cuando la concentración de triptófano es inferior a 0,5-1  $\mu\text{M}$  (la concentración sérica normal es de 50  $\mu\text{M}$ ) (Munn et al. 1999). Otros estudios han propuesto que este efecto en la bajada de la concentración de triptófano más que influir en el ciclo celular, origina la apoptosis de linfocitos

T por la generación de los catabolitos producidos por laIDO (Terness et al. 2002; Fallarino et al. 2002).

Van den Eynde y colaboradores han mostrado también que la expresión deIDO por células tumorales de ratón inmunogénicas, previene su rechazo en ratones pre-inmunizados. Este efecto se acompañó de la pérdida de células T en el lugar del tumor y pudo ser revertido, parcialmente, tras tratamiento de los ratones con un inhibidor deIDO (1-MT), en ausencia de una toxicidad notable (van den Eynde 2003).

#### 7.1.5.- Señalización defectiva a través de los receptores de muerte

Los dos ligandos de receptores de muerte que intervienen en el proceso de inmunovigilancia frente al desarrollo tumoral son Fas-ligando (Fas-L) y TRAIL (Straus et al. 2001; Takeda et al. 2001). La señalización defectuosa a través de estos receptores es un mecanismo que puede contribuir a la supervivencia y proliferación de las células tumorales. Presentan secuencias citoplásmicas denominadas “dominios de muerte”, imprescindibles para la transmisión de señales apoptóticas a través de la cascada de las caspasas (Salvesen & Dixit 1999). El inhibidor de la caspasa 8 (cFLIP) se expresa en diversos tumores y puede hacer a las células tumorales resistentes a la apoptosis mediada por los receptores de muerte (Irmmler et al. 1997). La elevada expresión de cFLIP en las células tumorales puede contribuir a una inmunoresistencia a las células T *in vivo* (Medema et al. 1999).

La pérdida o falta de expresión de Fas en los tumores puede contribuir también a una resistencia a la apoptosis. Se han descrito mutaciones de pérdida de los genes que codifican Fas en mieloma múltiple (Landowski et al. 1997), linfoma de tipo no-Hodgkin (Gronbaek et al. 1998) y melanoma (Shin et al. 1999). Estas mutaciones dan lugar a la pérdida de función del receptor de muerte. En el caso de la apoptosis mediada por

TRAIL, puede darse una pérdida de expresión de los mismos por diversos mecanismos originando la resistencia a apoptosis mediada por TRAIL (Hersey & Zhang 2001).

Un estudio reciente *in vitro* ha mostrado la pérdida o ruptura de Fas por la metaloproteinasa 7 (MMP-7). Los resultados obtenidos ponen de manifiesto el papel de MMP-7 como mecanismo de escape al sistema inmunológico. La baja expresión de Fas y el aumento de la resistencia a la apoptosis mediada por FasL, se originó como consecuencia de una elevada expresión de MMP-7 por las células tumorales, en células de carcinoma colorectal. Los pacientes con elevada expresión de MMP-7 y baja expresión de Fas tenían una supervivencia más corta (Wang et al. 2006).

#### 7.1.6.- Apoptosis de linfocitos T activados

Uno de los mecanismos más controvertidos de escape tumoral es la expresión de ligandos de receptores de muerte por parte de las células tumorales. Así una amplia variedad de tumores expresan Fas-L, induciendo apoptosis sobre las células diana susceptibles Fas+. Entre ellos, carcinoma de pulmón (Niehans et al. 1997), melanoma (Hahne et al. 1996), carcinoma de colon (O'Connell et al. 1998) y carcinoma hepatocelular (Strand et al. 1996). Tras la activación de los linfocitos T como resultado del reconocimiento de antígenos tumorales, las células tumorales expresan niveles altos de Fas-L, induciendo la apoptosis de las propias células T ("suicida") y entre las propias células T ("fratricida") (Chappell et al. 1999; Zaks et al. 1999).

#### 7.2.- Mecanismos de evasión

Son los mecanismos desarrollados por las células tumorales para evitar el reconocimiento y lisis por parte de un sistema inmunológico funcionalmente activo.

### 7.2.1.- Pérdida de antígenos tumorales e inmunodominancia

La expresión de antígenos en tumores es heterogénea, incluso en el mismo tumor. Se puede originar la pérdida de expresión de antígenos tumorales independientemente de que exista una alteración en la expresión de moléculas HLA de clase I. Se ha definido el déficit en la expresión de antígenos de diferenciación de melanocitos (MDAs), tales como gp100, MELAN-MART1 y la tirosinasa, y se ha asociado a la progresión tumoral (de Vries et al. 1997). El mecanismo exacto que controla la pérdida de expresión de estos antígenos tumorales, no se conoce en la mayoría de los casos. Sin embargo, la propagación de estas variantes tumorales con pérdida antigénica se facilita por el fenómeno de inmunodominancia (Schreiber et al. 2002). La inmunodominancia sería el proceso por el que se detecta preferencialmente un epítipo entre todos los expresados en la célula tumoral diana.

Existen muchos estudios que demuestran que la pérdida de TAAs (antígenos asociados al tumor) es un mecanismo para escapar inmunoterapeuticamente a la respuesta antitumoral inducida (especialmente en melanoma).

### 7.2.2.- Alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I

De entre todos los mecanismos que explican el escape de las células tumorales de la inmunovigilancia, las alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I quizás sea el que se detecta con una mayor frecuencia y el que tiene una gran repercusión funcional, puesto que modula la susceptibilidad de las células tumorales a las lisis por CTLs y NKs (Garrido et al. 1993). Según la hipótesis de “pérdida de lo propio”, estas pérdidas hacen más susceptibles a las células tumorales a la lisis por células NK, ya que las NK monitorizan la expresión en superficie de

moléculas HLA de clase I a través de sus receptores KIRs y eliminan aquellas células que presentan una baja expresión de moléculas en superficie (Moretta et al. 1996). Sin embargo, a pesar de la existencia de un sistema inmunológico funcional, las células tumorales continúan creciendo, invadiendo y produciendo metástasis en el huésped inmunocompetente (Boon et al. 1994). Existen datos proporcionados por varios laboratorios que indican que se debe a una selección (todavía no entendida) de variantes de escape tumorales deficientes en estas moléculas de clase I (Festenstein & Garrido 1986; Garrido et al. 1997).

## 8.- EL COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

El descubrimiento de los antígenos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) en humanos en los años 50, se debió a la reacción de aglutinación originada al enfrentar suero de pacientes politransfundidos con leucocitos extraños. Existen dos grandes grupos de moléculas: las del MHC de clase I, representado en el hombre por las moléculas HLA-A, -B y -C; y las del MHC de clase II, que incluye las moléculas HLA-DP, -DQ y -DR. Las moléculas HLA de clase I se expresan en todas las células nucleadas de los vertebrados, mientras que las de clase II tienen una expresión más restringida a células especializadas en la presentación de antígenos.

### 8.1.- Moléculas HLA de clase I

Los antígenos de histocompatibilidad de clase I están constituidos por las moléculas clásicas (clase Ia) HLA-A, -B, -C (Bjorkman & Parham 1990) y las no clásicas (clase Ib) HLA-E, -F, -G (Shawar et al. 1994).

La molécula de HLA de clase I es un trímero constituido por una cadena polipeptídica  $\alpha$  o cadena pesada, de 45 KD, unida de forma no covalente a una cadena ligera soluble no polimórfica denominada  $\beta$ 2-

microglobulina, de 12 KD, (Jones 1997) y un péptido formado por unos 8-10 aminoácidos, que participa en el ensamblaje de la molécula de clase I y proporciona estabilidad al complejo. De manera que las moléculas HLA vacías son inestables (Townsend et al. 1990).

La cadena pesada contiene aproximadamente 340 aminoácidos organizada en tres regiones: extracelular, transmembrana e intracitoplasmática. La región extracelular se divide en tres dominios ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$ ) de unos 90 aminoácidos cada uno. La cadena pesada presenta un elevado polimorfismo, localizado a lo largo de los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ . En estos dominios existe una región hipervariable que constituye la gruta a la que se une el péptido antigénico (**figura 7**)

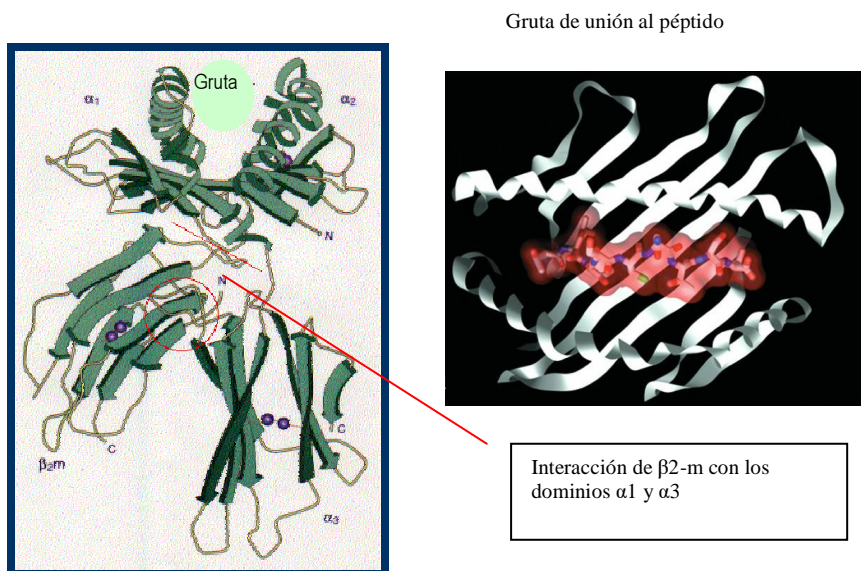


Figura 7.-Estructura de la molécula HLA de clase I. (Garland, Science 2005).

La gruta formada por los dominios  $\alpha 1$  y  $\alpha 2$ , donde se ancla el péptido, es la zona reconocida por el receptor de las células T (TCR).

### 8.2.- Moléculas HLA de clase II

Son heterodímeros compuestos por dos subunidades glicoproteicas, una cadena  $\alpha$  de 33-35 kD de peso molecular, y una cadena  $\beta$  de 25-30 kD, asociadas de forma no covalente (Kappes & Strominger 1988). Cada una de ellas consta de tres regiones: una región extracelular, una transmembrana y un segmento intracitoplasmático. La gruta de unión al péptido presenta las mismas características que la de clase I, pero es algo más amplia por lo que los péptidos presentados por las moléculas de clase II tienen mayor longitud (Rudensky et al. 1991).

### 8.3.- Genética del sistema HLA

Los genes de MHC están localizados en el brazo corto del cromosoma 6 en humanos, en la porción distal de la banda 6p21.3, ocupando un espacio aproximado de 4 Mbp (aproximadamente el 1% del genoma humano) (Campbell & Trowsdale 1993). La región genética formada por el sistema HLA se organiza en diferentes subregiones o locus estrechamente ligados entre sí, heredándose de forma mendeliana codominante, dando origen al sistema antigénico más polimórfico existente en humanos. Esta región contiene múltiples genes expresados y no expresados ordenados en tres grupos: la región de clase I, la de clase II y la de clase III (Aguado & Campbell 1999).

En la región de clase I se encuentran los genes que codifican la cadena pesada de las moléculas de clase I. Dentro de esta región, además de los genes HLA clásicos (HLA-A, -B y -C), se encuentran los genes no clásicos (HLA-E, -F, -G) y un grupo de genes MIC (MIC A-E). Estos genes presentan una expresión reducida y restringida a ciertos tejidos como el



timo, hígado, intestino o placenta. Además presentan bajo grado de polimorfismo. De los cinco genes MIC, sólo MIC A y MIC B (localizados entre el factor de necrosis tumoral o TNF y el locus HLA B) se expresan. Existen también pseudogenes (HLA-H, -J, -K, -L, -X), genes incompletos o truncados y genes de los que no se conoce su función (Beck et al. 1997).

En la región II (1000-1200 kb), a diferencia de la anterior, si se encuentran los genes que codifican las dos cadenas polipeptídicas ( $\alpha$  y  $\beta$ ) que constituyen las moléculas HLA de clase II. Estos genes se encuentran localizados en la región HLA-D, que se subdivide en tres regiones funcionales ordenadas por su proximidad al centrómero: HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR (Trowsdale et al. 1985). Otros genes localizados en esta región son los que codifican las proteínas transportadoras de los péptidos de las moléculas de clase I, TAP1 y TAP2 (Trowsdale et al. 1990); los genes relacionados con el proteosoma, LMP2 y LMP7 (Glynne et al. 1991; Kelly et al. 1991).

En la región de clase III (680 kb), que ocupa una posición central, no se localizan genes que codifican moléculas HLA sino otras proteínas relacionadas con el sistema inmunológico como son las proteínas del complemento, Factor B, C2 y C4; el TNF y los genes HSP70 (Aguado & Campbell 1999). También se localizan los genes BAT2 (G2) y BAT3 (G3), asociados a células B y otros genes no relacionados con el sistema inmunológico.

El gen de la  $\beta$ 2-microglobulina se localiza en el cromosoma 15, independiente por tanto del complejo MHC (Goodfellow et al. 1975).

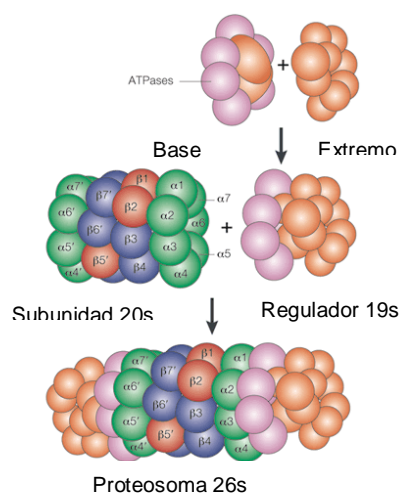
El sistema HLA es altamente polimórfico debido a los múltiples alelos presentes para cada uno de los genes conocidos. Mediante ensayos celulares y serológicos se ha podido determinar la existencia de aproximadamente 150 alelos distintos, pero actualmente mediante el tipaje genómico están encontrándose muchas especificidades nuevas que multiplican esa cifra inicial.

#### 8.4.- Procesamiento antigénico, transporte y ensamblaje de las moléculas HLA de clase I

Los péptidos presentados por las moléculas HLA-I tienen unas características propias: presentan en el extremo C-terminal residuos hidrofóbicos o básicos, y diferentes residuos de anclaje que son los que interaccionan con aminoácidos polimórficos de moléculas HLA-I. El cambio de residuo de anclaje puede ocasionar que un determinado péptido se una a un alelo particular HLA y no a otro. La mayoría de los péptidos que unen las moléculas MHC-I son derivados de proteínas sintetizadas en el citoplasma celular (Pamer & Cresswell 1998). Siempre se había considerado que estos péptidos procedían de proteínas celulares degradadas en el citoplasma en virtud del proceso de recambio celular de estructuras deterioradas o envejecidas. Sin embargo, estudios recientes indican que la principal fuente de péptidos presentados por MHC-I procede de proteínas nuevas recién sintetizadas (Reits et al. 2000; Schubert et al. 2000). Entre el 30-80% de las proteínas recién sintetizadas se degradan rápidamente. Estos sustratos han sido denominados productos defectivos ribosomales o DRiPs, y representan polipéptidos sintetizados prematuramente que no tienen la longitud correcta o proteínas mal plegadas. Estos productos generan una fuente rica de péptidos para la presentación antigénica por parte de moléculas MHC-I, y al mismo tiempo este sistema permite una rápida detección de productos virales o bien de células alteradas.

Gran parte de la actividad proteolítica del citoplasma está mediada por el proteosoma (Hershko & Ciechanover 1992). La mayoría de los sustratos del proteosoma se encuentran modificados covalentemente mediante la unión a ubiquitina. Tanto los polipéptidos como las proteínas mal plegadas y los DRiPs pueden unirse a ubiquitina para ser degradados por este complejo. Por lo tanto, es normal que el proteosoma genere la principal fuente de péptidos presentados por el MHC-I (Rock & Goldberg

1999). El proteosoma es un complejo constituido por 28 subunidades con estructura cilíndrica. Las diferentes subunidades se ordenan en cuatro anillos apilados formados cada uno por 7 de ellas, con un núcleo hueco recubierto por los centros activos de las subunidades catalíticas (Rechsteiner 2005), (figura 8).



**Figura 8.-Proteosoma.** El proteosoma 20s está constituido por 28 subunidades dispuestas en cuatro anillos heptaméricos. Los anillos externos contienen las subunidades  $\alpha$  y los internos las  $\beta$ . Hay seis sitios activos en el core o núcleo de los cuales tres lo constituyen las subunidades  $\beta 1$ ,  $\beta 2$ ,  $\beta 5$ . El complejo regulador 19s se compone de seis subunidades ATPasa, dos no ATPasa y el extremo, compuesto por seis subunidades ATPasa. Las subunidades LMP2, MECL1 y LMP7 se inducen con IFN, se incorporan al núcleo y forman el inmunoproteosoma junto al resto de subunidades. (Rechsteiner. Hill, *Trends Cell Biol*, 15:27–33, 2005).

Tres unidades constitutivas y sus correspondientes subunidades inducibles por IFN- $\gamma$  constituyen los centros catalíticos del inmunoproteosoma. Las subunidades inducibles LMP2 ( $\beta$ 1i) y LMP7 ( $\beta$ 5i) están codificadas en la región del MHC cerca de los genes TAP, y la tercera MECL-1 ( $\beta$ 2i), se codifica en una región diferente del MHC. La sustitución de las subunidades constitutivas ( $\beta$ 1,  $\beta$ 2,  $\beta$ 5) por las inducibles cambia la especificidad del proteosoma hacia sus sustratos generándose péptidos con extremos C-terminales de residuos hidrofóbicos y básicos; que son los péptidos preferidos para la presentación por moléculas MHC-I y que también son los péptidos preferentemente transportados por los transportadores de péptidos TAP. De este modo, existen dos tipos de proteosomas, el proteosoma constitutivo (c20S) que se expresa constitutivamente en todas las células y el inmunoproteosoma (i20S) que se origina tras la exposición de las células a IFN- $\gamma$ .

La función del proteosoma está controlada a varios niveles. El core o núcleo (constituído por las 28 subunidades) o proteosoma 20s es inactivo. Se debe a que sus centros catalíticos están localizados dentro del "lumen ahuecado" de su estructura cilíndrica, y por tanto, físicamente es imposible que los sustratos puedan acceder al interior del cilindro donde se encuentran los centros activos (Bochtler et al. 1999; Baumeister et al. 1998). Esta restricción se solventa a través de la unión de proteínas activadoras específicas que inducen un cambio conformacional en el proteosoma creándose poros estrechos a través de los cuales los sustratos pueden acceder al interior del mismo (Larsen & Finley 1997).

Las moléculas de MHC-I no solamente presentan péptidos derivados de proteínas citosólicas sino también de proteínas de membrana y secretadas, como por ejemplo proteínas de la envoltura vírica (Weissman et al. 1998; Brodsky & McCracken 1999). Las glicoproteínas de membrana y las secretadas se translocan normalmente al lumen del retículo endoplásmico (RE) durante su biosíntesis. Sin embargo, los péptidos presentados por moléculas HLA de clase I indican que estas proteínas son

degradadas en el citosol. Las proteínas del RE pueden regresar al citosol mediante el mismo sistema de translocación por el que fueron inicialmente transportadas a través de la membrana del retículo (Wiertz et al. 1996). Esta translocación inversa sería el procedimiento normal por el que proteínas mal plegadas en el RE son degradadas. Una vez en el citosol, los polipéptidos son degradados vía ubiquitina-proteosoma y los péptidos resultantes pueden ser transportados de nuevo al lumen del RE mediante los transportadores de péptidos TAP (Fiebiger et al. 2002).

La mayor parte de los péptidos que se generan se degradan completamente en el citosol y solamente unos pocos consiguen llegar al borde del RE, se transportan al interior gracias a un sistema ATP dependiente, constituido por las proteínas TAP1 y TAP2 (transportadores asociados con el procesamiento antigénico), que permiten el transporte selectivo de péptidos de 8 a 15 aminoácidos. Dentro del RE, las moléculas MHC-I vacías esperan a cargarse con estos péptidos. Los péptidos con una mayor longitud que entran en el RE parece que son procesados por una aminopeptidasa, identificada en estos últimos años, del lumen del RE que parece ser esencial en la producción de péptidos presentados por moléculas MHC-I. Se denomina ERAAP- de aminopeptidasa del RE asociada al procesamiento antigénico. La ERAAP rompe residuos N-terminales de Lys (K), Leu (L), Tyr (Y) y Asn (N) pero es incapaz de romper residuos X-Pro y supone una fuerte evidencia de que muchos de los péptidos presentados por las moléculas de clase I tengan la secuencia "X-Pro-Xn" (Serwold et al. 2002).

Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la proteólisis de precursores antigénicos en el citoplasma raramente produce el péptido final (Cascio et al. 2001; Toes et al. 2001). Si los péptidos en el RE son demasiado largos, sus extremos N-terminales son acortados por la enzima ERAAP hasta que adquieren la longitud óptima. La actuación de esta enzima explicaría por qué los péptidos presentados por las moléculas MHC-I poseen la longitud precisa. Los péptidos que no son capaces de unirse a

moléculas MHC-I son completamente destruidos por ERAAP y por esta razón no se encuentran extractos en células intactas (Falk et al. 1990).

La mayoría de oligopéptidos que se generan por acción del proteosoma son posteriormente degradados por aminopeptidasas y endopeptidasas en el citoplasma celular, siendo empleados los aminoácidos resultantes como fuente metabólica para la biosíntesis de proteínas o bien para el catabolismo celular (Hershko et al. 2000). Sin embargo, una fracción de estos péptidos son translocados al interior del lumen del RE mediante los transportadores TAP. TAP, es una proteína integral del RE formada por dos subunidades TAP1 y TAP2 codificadas dentro del MHC, próximas a LMP2 y LMP7. Al igual que éstos, la expresión de TAP1 y TAP2 es inducida tras la exposición de las células a IFN- $\gamma$ . No se conoce cómo se realiza el transporte de péptidos a través del complejo TAP, tal vez la unión del péptido origine un cambio conformacional responsable de la hidrólisis de ATP, que provocaría la apertura del poro, liberación del péptido de TAP y difusión hacia el interior del RE (Reits et al. 2000). En células deficientes en TAP, los heterodímeros de clase I no pueden ensamblarse con los péptidos (Van Kaer et al. 1992; de la Salle et al. 1994). En estas circunstancias las cadenas pesadas de clase I no ensambladas son posteriormente translocadas hacia el citosol y degradadas por el proteosoma. Por lo tanto, células deficientes en TAP no presentarían expresión de moléculas de clase I en superficie, exhibiendo una baja respuesta frente a linfocitos T citotóxicos (CTLs). Sin embargo, se han descrito rutas independientes de TAP y del proteosoma para la presentación de péptidos, que generan respuestas de CTLs. Aunque probablemente tengan un pequeño papel en la expresión de péptidos por parte de las moléculas MHC-I, pueden tener importancia en la generación de una respuesta efectiva de CTLs *in vivo*.

La carga de moléculas MHC-I con péptidos en el RE es un proceso altamente regulado que implica a varias proteínas accesorias (Cresswell 2000; Van Kaer 2001). Los pasos iniciales del ensamblaje de moléculas de clase I están controlados por chaperonas con dominios tipo lectina, como

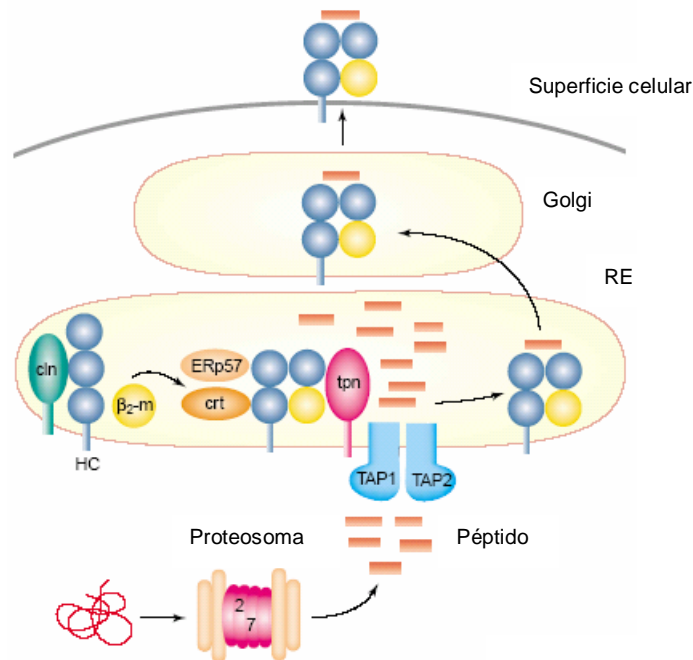
son la calnexina y la calreticulina, ambas reconocen proteínas N-glicosiladas. Tras su síntesis, MHC-I se une a la proteína calnexina. La unión de  $\beta 2m$  a cadena pesada induce el intercambio de calnexina por calreticulina en células humanas. Aunque la asociación de calnexina con cadena pesada de clase I es indispensable, su importancia para el ensamblaje de MHC-I no está clara, así se ha descrito que este proceso se produce normalmente en una línea celular humana deficiente para calnexina (Sadasivan et al. 1995). Una posible explicación para este fenómeno es que en células humanas, otras chaperonas como la proteína BiP (proteína de unión a cadena pesada tipo inmunoglobulina) realicen la función de la calnexina. Hay evidencias de que en humanos la proteína BiP se une a la cadena pesada de clase I durante los pasos tempranos del ensamblaje (Nossner & Parham 1995). La calreticulina en cambio, sí que juega un papel crítico en el ensamblaje de clase I, las células de ratón deficientes en calreticulina presentan un profundo defecto en la carga de péptidos a las moléculas de clase I (Gao et al. 2002).

Los heterodímeros de clase I que se encuentran unidos a calreticulina se asocian con otras proteínas residentes del RE, incluyendo la óxido-reductasa tiol-dependiente, ERp57/ER60, las dos subunidades de TAP y la tapasina (glicoproteína asociada a TAP) (Grande & Van Kaer 2001). Este complejo proteico multifactorial se denomina "complejo de carga peptídico de MHC-I" (**figura 9**).

La tapasina forma un enlace físico entre las dos subunidades de TAP y los heterodímeros de clase I (Ortmann et al. 1994; Suh et al. 1994). El dominio N-terminal de la tapasina interacciona con los dominios  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  de la cadena pesada de clase I, mientras que la región citoplasmática C-terminal y el dominio transmembrana interaccionan con TAP.

La calreticulina interacciona directamente con N-glicanos de cadena pesada de clase I (Sadasivan et al. 1996), y parece ser que se une de forma no-covalente con ERp57 (Frickel et al. 2002). Ésta interacciona

covalentemente con la tapasina a través de un puente disulfuro intercatenario.



**Figura 9.-** Formación del complejo de carga peptídico. Las cadenas pesadas se asocian con calnexina o BiP. La asociación con  $\beta$ 2-microglobulina desplaza a la calnexina generando el complejo de carga. Los péptidos degradados en el citosol vía proteosoma se transportan por los TAP hacia el lumen del RE de manera dependiente de ATP. En el complejo de carga peptídico los péptidos subóptimos se intercambian por péptidos óptimos mediante la tapasina. (Grande & van Kaer. Trends in immunology, 2001, 22:194-199).

Cln: calnexina, HC: cadena pesada, crt: calreticulina, tpn: tapasina, 2: LMP2, 7: LMP7.

La tapasina es un componente crítico del complejo de carga peptídico. En su ausencia, la calreticulina y ERp57 tienen una menor asociación con los heterodímeros de clase I (Grande et al. 2000). El orden preciso del ensamblaje de los diferentes componentes del complejo no está claro. Parece ser que inicialmente los heterodímeros TAP interactúan con



la tapasina y ERp57, el cual se encuentra unido no covalentemente a calnexina (Diedrich et al. 2001). Este complejo posteriormente se uniría a los heterodímeros clase I/β<sub>2</sub>m, con liberación de la calnexina y reclutamiento de la calreticulina, para generar el complejo de carga maduro. En ratones deficientes en tapasina (Garbi et al. 2000), la mayoría de las moléculas MHC-I están cargadas con péptidos de baja afinidad, que son inestables a temperaturas fisiológicas. Estas células por tanto expresan pocas moléculas de clase I en superficie y son defectivas en la presentación antigénica restringida a MHC-I. Como resultado, una de las funciones de la tapasina es editar el repertorio de péptidos catalizando el reemplazamiento de péptidos de baja afinidad por péptidos de alta afinidad (Androlewicz 1999; Cabrera et al. 2005).

La unión covalente entre la tapasina y ERp57 se ha observado que tiene una gran importancia para la completa oxidación de la cadena pesada (Dick et al. 2002). Así, mutaciones en la tapasina que impiden su unión con ERp57 no solamente impiden la completa oxidación de las moléculas de clase I sino que también previenen la carga de moléculas MHC-I con péptidos de alta afinidad. Este hallazgo sugiere que la tapasina influye en el repertorio de péptidos de las moléculas MHC-I al facilitar la formación de los puentes disulfuro de la cadena pesada de clase I.

#### 9.- FENOTIPOS ALTERADOS HLA DE CLASE I

La pérdida del antígeno MHC asociado a la molécula de clase I, H-2K<sup>k</sup>, se describió por primera vez en un linfoma murino en 1976 y un año más tarde se describieron las pérdidas de moléculas HLA en tumores humanos (Garrido et al. 1976; Pellegrino et al. 1977). En los años siguientes se ha detectado una elevada proporción de tumores con estas alteraciones (Garrido et al. 1993; Hicklin et al. 1999). La pérdida total o selectiva de antígenos HLA de clase I se ha descrito en diferentes tipos histológicos de tumor (Garrido et al. 1997). Estas alteraciones se han puesto de manifiesto

mediante estudios que implican técnicas inmunohistoquímicas o de inmunofluorescencia de células tumorales mediante el uso de anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente determinantes HLA de clase I, locus específicos (HLA-A, HLA-B) o alelo específicos (Garrido et al. 1997; Koopman et al. 2000). Las cifras de pérdidas de moléculas HLA de clase I son cercanas al 100% en algunos tumores: en carcinomas cervicales se presentan en un 96% (Koopman et al. 2000), en un 96% de cáncer de mama (Cabrera et al. 1996), en un 87% de carcinomas colorrectales (Cabrera et al. 1998), en un 97% de carcinomas de laringe (Cabrera et al. 2000) y en un 72% de carcinoma de vejiga (Cabrera et al. 2003). Debido a la heterogeneidad de poblaciones celulares en los tejidos tumorales, es importante definir de forma precisa el déficit de las moléculas HLA de clase I en estas células tumorales.

Garrido y colaboradores han agrupado estas alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I en siete grupos (García-Lora et al. 2003) o fenotipos (**figura 10**). De este modo, se encuentran:

- Fenotipo I: pérdida total o bajada de expresión de todos los alelos HLA.
- Fenotipo II: pérdida de un haplotipo HLA.
- Fenotipo III: pérdida de un locus HLA de clase I.
- Fenotipo IV: pérdida de un alelo HLA de clase I.
- Fenotipo V: fenotipo compuesto. Resultado de la combinación de dos alteraciones diferentes como por ejemplo, la pérdida de haplotipo más pérdida de locus, dando lugar a la expresión de un solo alelo HLA.
- Fenotipo VI: falta de respuesta al IFN- $\gamma$ .
- Fenotipo VII: baja expresión de moléculas HLA clásicas (Ia) con expresión aberrante de moléculas HLA no clásicas (Ib).

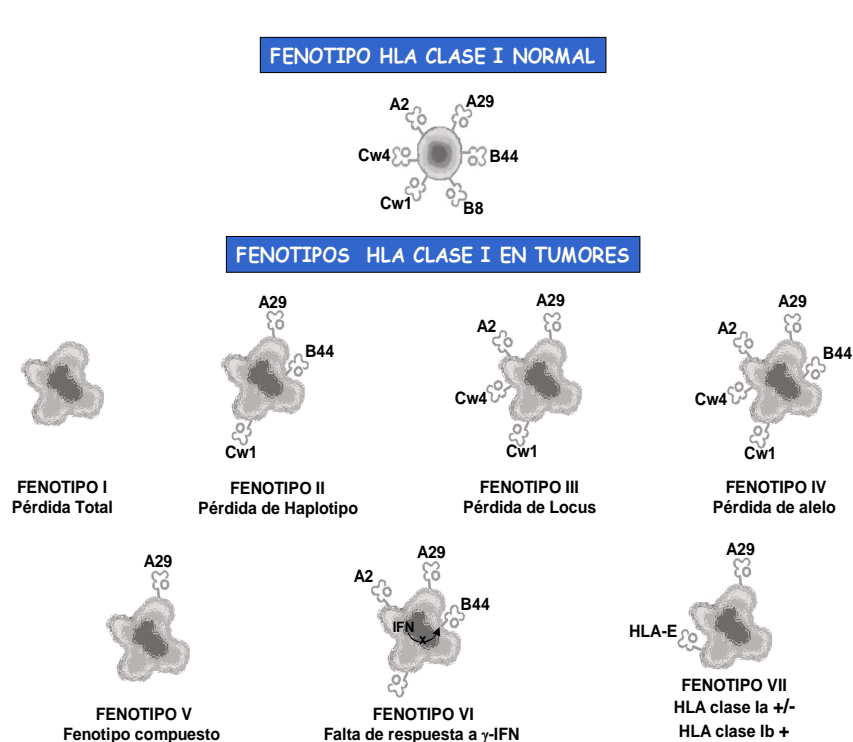


Figura 10.- Alteraciones en la expresión de moléculas HLA. Las células normales expresan 6 alelos HLA de clase I (HLA-A<sub>1,2</sub>, HLA-B<sub>1,2</sub>, HLA-Cw<sub>1,2</sub>). Las moléculas HLA pueden estar total o parcialmente ausentes en las células tumorales (fenotipo I a V). Puede que las células tumorales no respondan a tratamiento con IFN (fenotipo VI) o que expresen moléculas HLA-E aberrantes en células con baja expresión de HLA-A, -B o -C (fenotipo VII).

Existen diferentes mecanismos moleculares que pueden llevar a la pérdida total o parcial de la expresión de las moléculas MHC de clase I. Estas pérdidas pueden producirse en cualquiera de los pasos que se llevan a cabo en los procesos de síntesis, ensamblaje, transporte o expresión en la superficie celular de las moléculas de clase I (Garrido et al. 1997; Ruiz-Cabello & Garrido 1998). En el fenotipo I, se origina la pérdida total de HLA de clase I, que se puede asociar a la pérdida en la síntesis de  $\beta$ 2-microglobulina. Existen datos que establecen la presencia de mutaciones,

como ocurre en carcinomas colorrectales (Browning et al. 1996), melanomas (Benitez et al. 1998; Perez et al. 1999), adenocarcinoma de pulmón (Chen et al. 1996) y linfoma de Burkitt (Rosa et al. 1983). Otra de las alteraciones implicadas en este fenotipo radica en la maquinaria de procesamiento antigénico (APM). Estas alteraciones pueden ocasionar el defecto en el transporte de los péptidos desde el citoplasma al retículo endoplásmico (Restifo et al. 1993; Cabrera et al. 2003). En otros casos se origina la falta de expresión coordinada de varios componentes del APM (Ritz et al. 2001; García-Lora et al. 2003; Romero et al. 2005) y defectos estructurales en los genes del MHC que inducen una pérdida total de las moléculas HLA de clase I.

En el fenotipo II se produce la pérdida de un haplotipo, alteración que se encuentra en diferentes tejidos histológicos (Torres et al. 1996; Mendez et al. 2001). Se ha observado, mediante el uso de marcadores microsatélites que flanquean la región del MHC, que existen LOH de la región HLA del cromosoma 6 en el 46% de los carcinomas de cervix, el 36% de carcinoma de cabeza y nuca, en el 17% de carcinomas colorrectales y el 17% de carcinoma de mama (Koopman et al. 2000; Maleno et al. 2004).

En el fenotipo III, la falta de expresión de un locus (A, B o C), se asocia con alteraciones en la transcripción de los genes MHC de clase I (Soong & Hui 1992). En melanoma se ha observado una falta de expresión selectiva de HLA-B con un incremento en la transcripción de c-myc, que interfiere con la transcripción del gen HLA-B a nivel del promotor (Peltenburg & Schrier 1994).

El fenotipo IV se manifiesta con pérdida alélica, resultado de mutaciones puntuales, deleciones parciales de los genes HLA de clase I o recombinación genética (Brady et al. 2000; Serrano et al. 2000). Recientemente se ha establecido la pérdida selectiva del alelo HLA-B44 en carcinoma colorrectal como consecuencia de un defecto en la tapasina (Cabrera et al. 2005).

En el fenotipo V coexisten un conjunto de fenotipos por lo que se requiere al menos la combinación de alteraciones (Real et al. 1998).

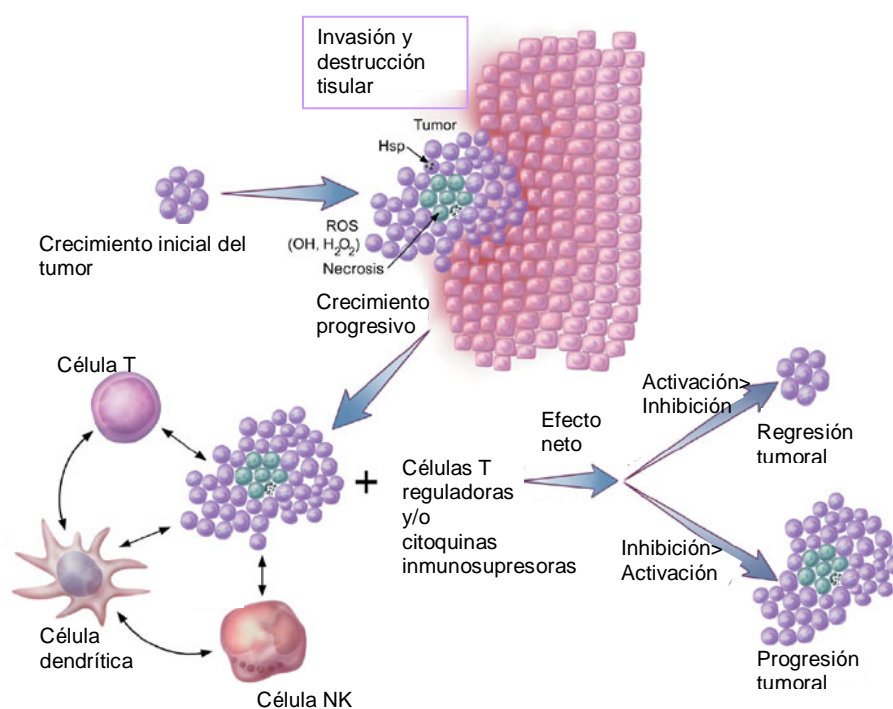
El fenotipo VI engloba a los tumores que no responden a interferón, resultado de la falta de expresión del factor transcripcional que se une al interferón (IRSE) (Abril et al. 1996) y de una expresión alterada de las moléculas TAP1 y LMP2 por una ruta defectiva de IFN- $\gamma$  (Dovhey et al. 2000).

El último fenotipo descrito es el fenotipo VII, consistente en la pérdida de expresión de HLA de clase Ia y la expresión aberrante de clase Ib. Se origina cuando el tumor reduce drásticamente la expresión de moléculas HLA A, B, C y al mismo tiempo expresan HLA-E, que produce la inhibición de las células NK tras interactuar con el receptor CD94/NKG2a (Marin et al. 2003).

La pérdida completa de moléculas HLA de clase I debería fracasar como mecanismo de escape debido a un aumento de la susceptibilidad a la lisis por las células NK, consecuencia directa de las pérdidas (Porgador et al. 1997). Se plantea la pregunta de por qué las variantes defectivas para HLA de clase I continúan creciendo y no son destruidas por las células NK. Las células NK expresan receptores activadores como NKG2D que se unen a ligandos que pueden estar expresados en células tumorales, MICA y MICB. La activación de las NK por esta vía podría contrarrestar el efecto inhibitorio de la unión de HLA-I con los receptores KIRs (Bauer et al. 1999; Groh et al. 1999) en aquellas células tumorales con expresión parcial de moléculas HLA de clase I. Así, a pesar de que los tumores negativos para HLA de clase I pueden ser susceptibles de la lisis por NKs, la ausencia de expresión de MICA o MICB permitiría tener a los tumores una ventaja de crecimiento, representando una estrategia potencial de escape. Esto no se ha demostrado en humanos (Garrido & Algarra 2001).

Otra posible explicación de por qué las células tumorales HLA-I negativas no son destruidas por las NK, puede derivarse del modelo activación-inhibición (**figura 11**). Las células NK son rápidamente activadas

en presencia de factores estimuladores como IL-12, IL-2, IL-15 o IFNs tipo I en respuesta a condiciones inflamatorias asociadas con una infección microbiana. En ambientes “estériles” estos efectos estimuladores pueden no originarse (Gerosa et al. 2002). Además, la ausencia de expresión de moléculas coestimuladoras, como B7-1, B7-2, CD40 y CD70 por parte de los tumores, puede impedir una activación adecuada de las células NK a través de la ruta de coestimulación CD28 y CD27 (Galea-Lauri et al. 1999; Takeda et al. 2000). Es posible que en algunas situaciones los tumores puedan producir citoquinas inmunomoduladoras, como el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) o el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) (Apte et al. 1997), que inhibe directamente la activación de las células NK.



**Figura 11.-**Modelo de activación/inhibición durante el progreso tumoral. La activación inmunológica se origina en los estadios iniciales de la progresión tumoral, como consecuencia de la expresión de neoantígenos por ejemplo. Otros factores que pueden producir la activación incluyen la generación de Hsps (heat shock protein) que resultan del estrés celular e intermediarios de oxígeno reactivos (ROI). Sin embargo, puede impedirse la activación por la ausencia de coestimulación adecuada, presencia de citoquinas inmunosupresoras (TGF- $\beta$ ), etc. El desarrollo del tumor sería el resultado del balance entre la activación y la resistencia o inhibición del sistema inmunológico. (Khong et al. Nature 2002, 999-1005).

---









En este trabajo se plantea la hipótesis de que las variantes tumorales con defectos en la expresión de moléculas HLA de clase I se generan al azar y posteriormente se seleccionan porque escapan a la respuesta celular mediada por linfocitos CD8+. Las moléculas HLA que se pierden durante la progresión tumoral, presentan péptidos antigénicos inmunodominantes que de ser reexpresados, originarían la eliminación por el sistema inmunológico de estas células tumorales. Si esta hipótesis es cierta, en el huésped de un tumor, la respuesta celular de linfocitos T CD8+ restringida por las moléculas HLA de clase I que se han perdido, ha debido generar clones de linfocitos T CD8+ memoria que pueden ser reestimulados si se recupera en el tumor la expresión de las moléculas HLA. Con esta hipótesis nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Caracterizar las lesiones moleculares, en la línea de melanoma ANDO-2, que condicionan la pérdida irreversible de la expresión de moléculas HLA de clase I
2. Recuperar de forma estable la expresión de las moléculas HLA de clase I, que se han perdido, mediante transfección génica.
3. Valoración de la respuesta inmunológica celular *in vitro* mediada por los linfocitos T CD8+ autólogos frente a la línea ANDO-2 transfectada para HLA de forma comparativa con la línea original mediante la determinación de la frecuencia de precursores de CTLs.
4. Estudio de las modificaciones fenotípicas HLA *in vivo*, al pasar la línea de melanoma ANDO-2 por ratones atímicos.
5. Influencia de la expresión de moléculas HLA en el comportamiento *in vivo* en ratones atímicos: ensayos de crecimiento local y potencial tumorigénico.



**MATERIALES Y MÉTODOS**

---



## 1.- CULTIVOS CELULARES

### 1.1.- LÍNEAS CELULARES

#### 1.1.1.- Obtención de ANDO-2

El paciente LB-41 o ANDO presentó un melanoma primario en la oreja izquierda que fue extirpado en 1987. En enero de 1990 se detectaron metástasis en la parótida izquierda y ganglio linfático cervical izquierdo que fueron extirpadas. En Julio de ese mismo año, se detectó una metástasis en el ganglio linfático supraclavicular izquierdo que tras ser extirpada se adaptó a cultivo. Esta línea se denominó ANDO-2 (figura 12).

El paciente ANDO ha estado sometido a vacunaciones hasta mayo de 2002 consistentes en la inyección de la línea tumoral autóloga ANDO-2 más IL-2. La línea ANDO-2 fue preincubada con IFN- $\gamma$ . Desde que la metástasis surgida en julio de 1990 fuera extirpada, no han existido evidencias de enfermedad en el paciente.

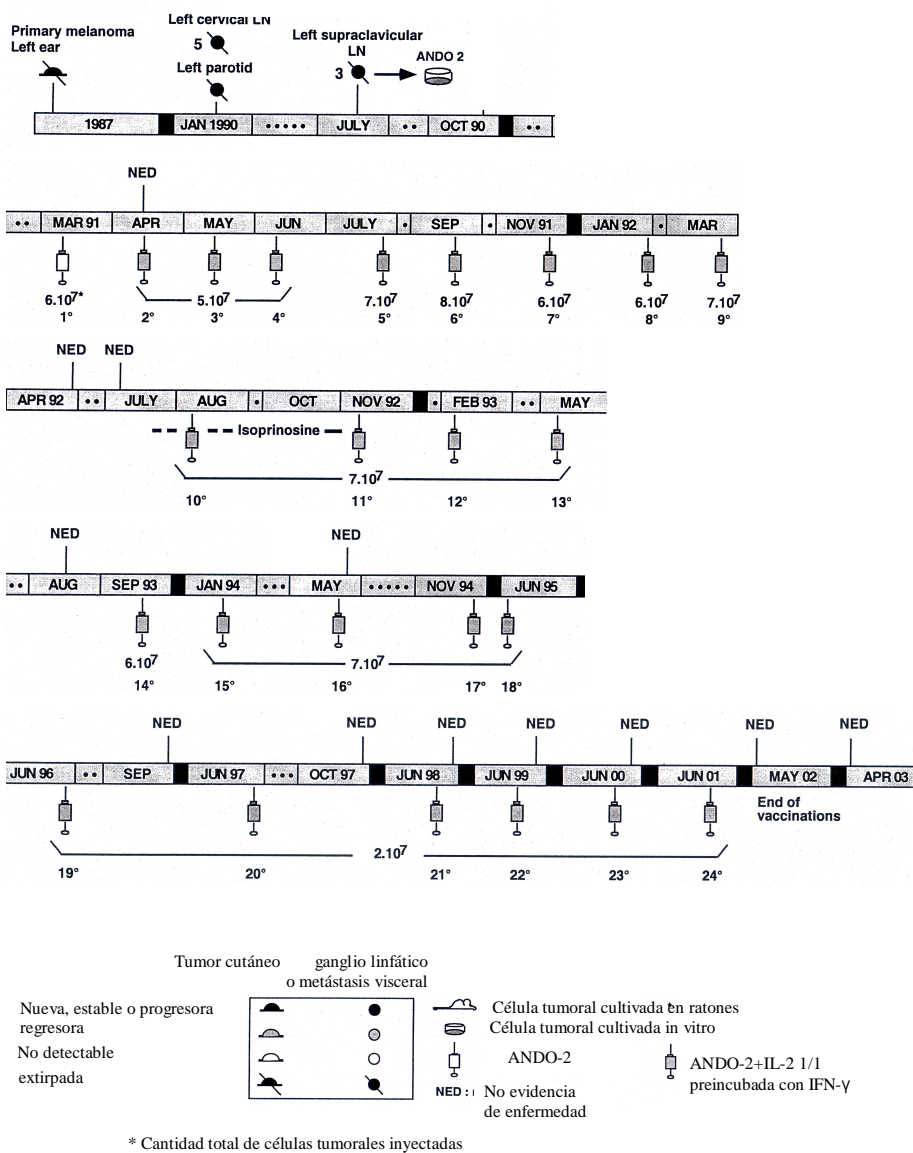


Figura 12.- Evolución del paciente ANDO-LB41



### 1.1.2.- Obtención de ANDO-EBV

La línea productora de EBV es bT6 transfectada con CD40L. Tras despegar con PBS-EDTA, las células se resuspenden en 1 ml de medio de cultivo Iscove completo a una concentración de  $1 \times 10^5$  células/ml y se siembran en un pocillo (placa de 24 pocillos). A continuación se procede a descongelar el PBL de ANDO, se resuspende en 10 ml de medio de cultivo y se centrifugan a 1800 rpm durante 5 minutos. Tras la centrifugación, los linfocitos se cuentan con trypan blue (V/V) y se resuspenden en 1 ml de medio de cultivo completo. Se mezclan en el pocillo en el que previamente se ha añadido la línea productora de virus y se añade ciclosporina A ( $1 \mu\text{g/ml}$ ), para impedir la proliferación de los linfocitos T.

El medio se cambia cada dos días. Se extrae 1ml del sobrenadante y se añade 1 ml de medio completo con ciclosporina A.

Tanto la línea ANDO-2 como ANDO-EBV fueron mantenidas en medio de cultivo ISCOVE (Gibco, Pisle, UK) suplementado con el 10% de suero fetal bovino (Life technologies, Milan, Italy), glutamina 2mM, ampicilina  $500\mu\text{g/ml}$  y gentamicina (Genta-Gobens)  $40\mu\text{g/ml}$ .

### 1.2.- MÉTODOS DE CULTIVO CELULAR

El cultivo 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 Iscove completo. Para el cultivo se utilizan frascos estériles y la incubación se lleva a cabo en una estufa a  $37^\circ\text{C}$ , en atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  y 90% de humedad.

En el caso de células adherentes al frasco de cultivo, el medio de cultivo fue cambiado de acuerdo con su acidificación, al menos una vez a la semana, para lo que se deben despegar las células adheridas al

plástico del frasco de cultivo añadiendo una solución de PBS-EDTA. Se incuban las células 10 min a 37°C, se golpea el frasco y las células se despegan debido a que el EDTA secuestra el Ca<sup>++</sup> 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 desecha 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 presenta una confluencia del 80-90%, las células se duplican en dos frascos de cultivo nuevos siguiendo el procedimiento anterior.

Las células que crecen en suspensión se cambiaron también de acuerdo a la acidificación del medio. Para ello, las células se vierten a un tubo universal y se centrifugan a 300xg durante 5 minutos. Se deshecha el sobrenadante y el pellet se resuspende en medio de cultivo nuevo, pasándolo entonces a un nuevo frasco de cultivo.

### 1.3.- CONGELACIÓN DE LAS CÉLULAS

Para conservar líneas celulares durante un largo período de tiempo, se congelan las células en nitrógeno líquido. El proceso consiste en centrifugar las células a 300xg en frascos universales durante 5 minutos y se resuspenden en suero fetal bovino inactivado más el 10% de DMSO. Se distribuyen en criotubos y se introducen rápidamente en el congelador de -80°C, pasándose a las 24 horas 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 frascos de cultivo.

#### 1.4.- 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 300xg durante 5 minutos y al botón celular se le añaden 20 ml de PBS estéril, volviéndose a centrifugar.

#### 1.5.- TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS CON IFN- $\gamma$

La inducción de la expresión de las moléculas HLA de clase I y II se realizó por incubación durante 48 horas con 800 U/ml de IFN- $\gamma$  humano (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany).

### 2.- ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO

#### 2.1.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA DE CLASE I Y II EN SUPERFICIE

##### 2.1.1.- Material

- PBS y PBS-EDTA (0,2g/l de EDTA en PBS)
- FACScan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA)
- Anticuerpos primarios monoclonales locus o alelo específicos: anti-HLA-locusA (A131), anti-HLA-locusB (Q6/64), anti-HLA-Bw4 (116-5-28), anti-HLA-Bw6 (126.39), anti-HLA-clasel (W6/32), anti-HLA-DR (GRB1), anti-HLA-DP (B7-21), anti-HLA-A2 (0475HA), anti-HLA-A32 (0136HA), anti-HLA-B13 (BIH0261, marcado con biotina), anti-HLA-B60 (0831HA) (ONE LAMBDA INC, USA); anti-HLA-G, anti-HLA-E, anti-CD117 y anti-CD146 (BD Biosciences pharmigen, Europe).

-Anticuerpo secundario marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (DakoA/S, Glostrup, Denmark).

-Estreptavidina-Phycoeritrina (BD Pharmingen, Europe).

#### 2.1.2.- 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-HLA-clase I y o clase II, a concentración saturante durante 30 minutos a 4°C. Tras un lavado con PBS se incuban con el segundo anticuerpo FITC a dilución 1/40 durante 30 minutos a 4°C. Por último, se lavan de nuevo y se analizan por citometría de flujo mediante FACScan. Se utilizaron como controles negativos, las células incubadas con un isotipo control y 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  $10^4$  células.

### 3.- EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS

#### 3.1.- EXTRACCIÓN DE DNA

La extracción del DNA se llevó a cabo con el kit comercial (QIAmp DNA Mini Kit, Qiagen, Inc. USA).

##### 3.1.1.- Material

- PBS
- Proteinase K
- Buffer AL (buffer de lisis)
- Etanol 70%

- Buffer de lavado (AW1, AW2)
- Buffer de elución (AE)

### 3.1.2.- Método

En primer lugar  $5 \times 10^5$  células se resuspenden en 200µl de PBS. Se mezcla en cada ependorf 20µl de proteinasa K (lisis), 200µl de células resuspendidas en PBS y 200µl de buffer AL (buffer de lisis). Esta mezcla se incuba a 56° durante 10 min. Tras la incubación, se añaden 200µl de etanol y se homogeniza. Posteriormente se centrifuga a 8000rpm durante 1 min. El sobrenadante se vierte a una columna de silica-gel y se centrifuga a 8000rpm durante 1min. Se desecha el tubo y se añade a la columna 500 µl de buffer AW1. Se centrifuga de nuevo a 8000rpm durante 1 min. Se desecha de nuevo el tubo y se pasa la columna a un nuevo tubo al que se añade 500µl de buffer AW2. Se centrifuga a 13000rpm durante 3 min. Los dos buffers de lavado utilizados, AW1 y AW2, aumentan la pureza del DNA extraído. Las condiciones de lavado también aseguran la completa eliminación de cualquier contaminante residual sin afectar a la unión del DNA. La columna se pasa a un ependorf y se añade 200 µl de tampón de elución. Se centrifuga a 8000rpm durante 1 min y el DNA obtenido se almacena a 4°C.

## 3.2.- EXTRACCIÓN DE mRNA

### 3.2.1.- Fundamento

El método utilizado se fundamenta en que la subpoblación de mRNA contiene una "cola" constituida por una secuencia poliadenilica (poliA) formada por unos 200 nucleótidos que posteriormente se acortan a unos 40-45 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 oligodT y se unen a streptavidina sobre un soporte sólido (bolitas magnéticas). El tRNA y rRNA que no contienen estas “colas”, se pierden con el lavado. Posteriormente, el mRNA se eluye del soporte sólido y es almacenado para su uso posterior.

### 3.2.2.- Material

- PBS-EDTA
- mRNA Isolation Kit (Roche) que incluye las siguientes soluciones:
  - o tampón de lisis
  - o partículas magnéticas unidas a Streptavidina
  - o Biotina-oligo(dT)
  - o Tampón de lavado
  - o Agua libre de RNAasa
  - o Tampón de almacenamiento

### 3.2.3.- Método

Se utilizaron  $2 \times 10^6$  células que se lavaron con tampón PBS y se pusieron en un tubo eppendorf. Seguidamente se añade 500µl de tampón de lisis y se hace pasar 6 veces por una jeringa 21-G. Se hibrida el lisado con 50pmol de oligo(dT) unido a biotina 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 al lavado del mRNA unido a las partículas magnéticas mediante 200µl 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 15µl de tampón de elución durante 2 minutos a 65°C y se transfiere el sobrenadante a un eppendorf limpio para estudios posteriores.

#### 4.- CUANTIFICACIÓN DE DNA, RNA y OLIGOS

Para la cuantificación se utiliza un espectrofotómetro ultravioleta a una longitud de onda de 260nm. Se realiza una dilución 1/20 y medimos la absorbancia o densidad óptica (D.O) de la muestra. Conocemos que 1 D.O corresponde a 50 µg/ml. La absorbancia a 260nm corresponde a DNA, mientras que la absorbancia a 280nm corresponde a la concentración de proteínas. La relación de la D.O. a 260nm/ D.O. a 280nm 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. Se obtiene la concentración de DNA directamente en µg/µl, y lo hace multiplicando la lectura obtenida a 260nm por 50 (ya que una unidad de absorbancia a 260nm se corresponde con una solución de DNA de 50µg/ml) y por la dilución. La concentración de RNA se obtiene del mismo modo pero multiplicando la lectura por 40, ya que una unidad de absorbancia a 260nm se corresponde con una solución de RNA de 40 µg/ml, y por el factor de dilución.

#### 5.- SÍNTESIS DE cDNA

##### 5.1.- Método

El cDNA fue sintetizado con 100 nanogramos de mRNA, con el kit de RT-PCR (SuperScript III Reverse Transcriptase, Invitrogen Corporation, California), en un volumen total de 20µl.

En un tubo de PCR se añade:

- 1µl de oligo(dT) (50µM)
- 1µl 10mM dNTPs
- 100ng de mRNA
- Agua destilada estéril, hasta un volumen de 13µl

Se calienta a 65°C durante 5 minutos y se incuba en hielo 1 minuto. Se añaden:

- 4µl de buffer 5X First-Strand
- 1µl de DTT 0,1M
- 1µl de RNasa Out (inhibidor de RNasa)
- 1µl de SuperScript III RT (200 unidades/µl)

Se mezcla bien por pipeteo y se incuba a 50°C durante 60 minutos. Posteriormente se inactiva la reacción a 70°C durante 15 minutos. Este cDNA fue diluido posteriormente hasta un volumen final de 100µl.

## 6.- ESTUDIO DE LOH

### 6.1.- Fundamento

Para estudiar el cromosoma 6 en 6p21.3, región HLA, se utilizaron 7 microsatélites, y uno para 6q. Las características de todos ellos se detallan a continuación en la tabla 6.

Cada uno de estos marcadores se escogió en base a dos criterios básicos, su localización y el grado de heterocigosidad que presentan.

La amplificación de cada marcador de microsatélites se realizó mediante PCR, utilizando parejas de oligonucleótidos situados a ambos lados de la secuencia de los microsatélites marcando una de las secuencias (5'-end) con 6-FAM (azul)/TET (verde) fluorescente (PE Biosystems®).

Aprovechando los diferentes tamaños de los microsatélites y los diferentes colores-fluorescencias de los marcadores-primers (6-FAM-azul, TET-verde), hacemos mezclas de los primers. Cada primer se ajustó a 1pmol/µl y de la mezcla cogemos 1.00µl/muestra.

MIX.1: D6S105, D6S276

MIX 2: D6S291, D6S265, D6S273

MIX 3: D6S311 y D15S209

MIX 4: C:1.2.C y C:1.2.5



	Lugar	Talla	Alelos	%Het	Marcaje	Secuencia
D6S311	6q24	230- 276	18	0.91	6-FAM	CA:5' ATGTCCTCATTGGTGTG3' GT:5' GATTCAGAGCCCAGGAAGAT3'
D6S291	6p21.3 región clase II	198- 210	7	0.70	6-FAM	CA:5' CTCAGAGGATGCCATGTCTAAAATA3' GT:5' GGGGATGACGAATTATCTACTAACT3'
D6S273	6p21.3 región clase III	120- 140	8	0.76	TET	CA:5' GCAACTTTTCTGTCAATCCA3' GT:5' ACCAAACTTCAAATTTTCGG3'
C.1.2.C	Región A tel MICB (62Kb)	260- 234	14	0.84	6-FAM	CA:5' GGATCCTAGGAACTCCCTCTG3' GT:5' GAGCAGAAGGGAGATGAAATG3'
C.1.2.5	Región A tel HLA-B (62Kb)	178- 220	20	0.89	6-FAM	CA:5' CAGTAGTAAGCCAGAAGCTATTAC3' GT:5' AAGTCAAGCATATCTGCCATTTGG3'
D6S265	Centr. HLA-A	118- 140	12	0.78	6-FAM	CA:5' ACGTTCGTACCCATTAACCT3' GT:5' ATCGAGGTAACAGCAGAAA3'
D6S105	Tel.HLA-A	116- 138	12	0.82	6-FAM	CA:5' GCCCTATAAAATCCTAATTAAC3' GT:5' GAAGGAGAATTGTAATCCG3'
D6S276	Tel HLA-A	198- 230	14	0.83	TET	CA:5' TCAATCAAATCATCCCCAGAAG3' GT:5' GGGTGCAACTTGTTCCTCCT3'

**Tabla 6.-** Características de los primers utilizados en el estudio de LOH.

## 6.2.- Método

La PCR se hizo de acuerdo con el Gene Scan® Reference Guide (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) con las siguientes modificaciones:

- 5µl de DNA (10-20 ng/µl)
- 1.00µl de primer mix, (5µM cada primer)
- 0.12µl de Taq Gold DNA polimerasa (5U/µl) (Applied biosystems, USA)
- 1.50µl de 10X PCR buffer incluyendo MgCl<sub>2</sub> (Applied Biosystems, USA)

- 1.50µl de dNTPs mix (250µl de cada dNTP)
- agua desionizada destilada hasta un volumen final de 15µl

El programa del termociclador (PTC-100 Cyclor, MJ Research) fue el siguiente:

- 95°C durante 12 minutos
- 10 ciclos incluyendo: 94°C durante 30s, 55°C durante 30s, 72°C durante 30s);
- 20 ciclos que incluyen: 89°C durante 30s, 55°C durante 30s, 72°C durante 30s, y una extensión final a 60°C durante 45 min.

### 6.3.- Gel de poliacrilamida

La electroforesis se realiza durante 2 horas en el gel de poliacrilamida 5% Long-Ranger®-6M urea, utilizando el secuenciador ABI PRISM 377 DNA con 36 calles a 2400 scan/hr. y 3000 v, el tamaño de los fragmentos es determinado automáticamente utilizando el software Gene Scan (PE Biosystems).

### 6.4.- Análisis de los fragmentos de PCR

El software Genotyper® interpreta los resultados del Gene Scan respecto al tamaño, altura o área de los fragmentos generados en la PCR y asigna el valor a los alelos que se encuentran dentro de unos parámetros previamente establecidos para un microsatélite en particular, además de proporcionar diferentes representaciones gráficas. Los alelos se definen por el tamaño de los fragmentos, que se estiman por la capilaridad de los productos de la PCR en la electroforesis.

Se ha decidido asignar como LOH cuando existe una reducción del 25% del tamaño de un alelo en el DNA obtenido del tumor comparado con los del control normal de la misma muestra.

El primer alelo es el fragmento más corto, el 2º alelo es más largo. Se considera para el cálculo de LOH que la altura y el área de los alelos da resultados comparables, utilizamos la altura como representación de la intensidad de la fluorescencia de cada alelo, porque el área es de más difícil cálculo por la presencia de stutters.

$$\text{LOH (x)} = \frac{\text{Altura del 2º alelo tumoral/ Altura del 1º}}{\text{Altura del 2º alelo normal/ Altura del 1º}}$$

Cuando la LOH se produce en el alelo más corto, la reducción de la señal debe ser calculada como la inversa de X, le llamamos Y= 1/X. Se considera que existe una pérdida de haplotipo cuando existe LOH de tres o más marcadores de los estudiados para cromosoma 6.

## 7. TIPAJE HLA

7.1.- Análisis con oligonucleótidos específicos de secuencia (SSO)

### 7.1.1.- Fundamento

El análisis con oligonucleótidos específicos de secuencia (SSOr) se realizó con el kit DYNAL RELI@SSO HLA-A, B, C, DR y DQ Typing kit. Para genotipar una muestra en HLA se realiza una amplificación del exón 2 y exón 3 para los genes de clase I, y el exón 2 para los genes de clase II, que codifican la región más polimórfica de estos genes.

### 7.1.2.- Método

Utilizamos 7.5µl de DNA, 15µl de la mezcla de primers, dNTPs y Taq polimerasa termorresistente, y 7.5µl de MgCl<sub>2</sub> incluidos en los distintos kits para cada uno de los locus o regiones del HLA (Dynal

RELI®) y son amplificados por PCR. El amplificado, se desnaturaliza para separar la doble cadena de DNA, y se añade a una bandeja donde se han colocado, inmersas en una solución astringente, las tiras reactivas (DynaL RELI®SSO Typing Trays) que contienen fijados por una membrana de nylon las distintas secuencias específicas de oligonucleótidos, al añadir el producto de PCR, van a capturar las secuencias complementarias.

Los primers están marcados con biotina. Se añade estreptavidina marcada con peroxidasa, que se fijará a la biotina. Y finalmente se añade TMB (tetrametilbencidina) y peróxido de hidrógeno para colorear el complejo. En los distintos pasos seguidos en el proceso de detección seguimos el protocolo y los reactivos incluidos en el kit de detección (DynaL RELI® SSO Strip Detection Reagent Kit)

En la tira reactiva se observa un patrón de bandas que se interpreta con un programa informático (DynaL RELI® SSO Pattern Matching Program 5.1).

7.2.- Tipaje basado en la secuencia (SBT) para los genes HLA de clase I

7.2.1.- Reacción de amplificación:

La reacción de amplificación se realiza en las siguientes condiciones:

a) Locus A.

1- Preparar las siguientes mezclas:

MIX 1: 5 µl dNTPs x nº de muestras +1

1 µl del primer A 5.4 x nº de muestras +1

1 µl del primer A 3.2 x nº de muestras +1

17 µl de agua bidestilada x nº de muestras +1

MIX 2: 0,70 µl de Taq polymerase (Boehringer Mannheim) x nº de muestras +1

5 µl de Buffer enzima 10 x (con Cl<sub>2</sub>Mg) x n° de muestras  
+1

19,30 µl de agua bidestilada x n° de muestras +1

- 2- Alicuotar 1µl de DNA (0,3 µg/µl) en cada tubo de PCR
- 3- Añadir 24 µl de la MIX 1 a cada tubo de PCR (puede pipetarse en pared para no tener que cambiar de punta por cada tubo de PCR)
- 4- Añadir 25 µl de MIX2 a cada tubo de PCR.
- 5- Colocar en el ciclador con el siguiente programa de amplificación:  
98° C 20 s  
98° C 5 s; 65° C 30 s, 68° 120 s [8 ciclos]  
96° C 5 s; 60° C 30 s; 68° C 120 s [32 ciclos]  
4° C

b) Locus B.

- Preparar las siguientes mezclas:

MIX 1: 10 µl dNTPs x n° de muestras +1

1 µl del primer BX1 x n° de muestras +1

1 µl del primer BINT3 x n° de muestras +1

37 µl de agua bidestilada x n° de muestras +1

MIX 2: 0,75 µl de Taq polymerase (Boehringer Mannheim) x n° de muestras +1

10 µl de Buffer enzima 10 x (con Cl<sub>2</sub>Mg) x n° de muestras

+1

39,25 µl de agua bidestilada x n° de muestras +1

- 2- Alicuotar 1µl de DNA (0,3 µg/µl) en cada tubo de PCR
  - 3- Añadir 49 µl de la MIX 1 a cada tubo de PCR (puede pipetarse en pared para no tener que cambiar de punta por cada tubo de PCR)
  - 4- Añadir 50 µl de MIX2 a cada tubo de PCR.
- Colocar en el ciclador con el siguiente programa de amplificación:

98° C 20 s

98° C 5 s; 65° C 30 s, 72° 120 s [8 ciclos]

96° C 5 s; 60° C 30 s; 72° C 120 s [32 ciclos]

4° C

c) Locus C

- Preparar las siguientes mezclas:

MIX 1:            5 µl dNTPs x nº de muestras +1  
                      1 µl del primer DMEX1 x nº de muestras +1  
                      1 µl del primer DMEX4 x nº de muestras +1  
                      17 µl de agua bidestilada x nº de muestras +1

MIX 2:            0,70 µl de Taq polymerase (Boehringer Mannheim) x nº  
de muestras +1

                      5 µl de Buffer enzima 10 x (con Cl<sub>2</sub>Mg) x nº de muestras  
+1

                      19,30 µl de agua bidestilada x nº de muestras +1

2- Alicuotar 1 µl de DNA (0,3 µg/µl) en cada tubo de PCR

3- Añadir 24 µl de la MIX 1 a cada tubo de PCR (puede pipetarse en  
pared para no tener que cambiar de punta por cada tubo de PCR)

5- Añadir 25 µl de MIX2 a cada tubo de PCR. Volumen final de la  
reacción 50 µl.

Colocar en el ciclador con el siguiente programa de amplificación:

98° C 20 s

98° C 5 s; 65° C 30 s, 72° 120 s    [8 ciclos]

96° C 5 s; 60° C 30 s; 72° C 120 s [32 ciclos]

4° Cr

La reacción de amplificación dura aprox. 3 horas en un ciclador PE 9600  
(para el que están ajustados los tiempos y temperaturas aquí señaladas).

#### 7.2.2.- Purificación en columnas:

Se utilizan columnas MICROCON Microconcentrators (Amicon).

- 1- Se añaden a la columna el producto de PCR junto con 410  $\lambda$  de agua b.d. Colocar la columna sobre un eppendorf colector.
- 2- Se tapa la columna y se centrifuga a 3.000 rpm 8 min. Desechar el eppendorf.
- 3- Dar la vuelta a la columna y añadir 25 $\mu$ l de agua y colocar sobre un nuevo tubo eppendorf.
- 4- Centrifugar nuevamente 3.000 rpm 2 min. El tubo eppendorf contiene el producto de PCR purificado.

#### 7.2.3.- Reacción de secuenciación:

- 4  $\mu$ l de BigDye (Perkin Elmer)
- 5  $\mu$ l del producto de PCR antes obtenido
- 5  $\mu$ l de agua bidestilada
- 1  $\mu$ l de primer de secuenciación.

Para el locus A esta mezcla debe realizarse con cada uno de los 6 primers descritos, de manera que serán 6 reacciones diferentes para secuenciar los exones 2,3 y 4 del locus A tanto en sentido directo (forward) como reverso (backward). En el locus B se emplean hasta 4 primers diferentes (4 reacciones independientes) para secuenciar los exones 2 y 3. De igual manera se procede para el locus C.

La PCR de secuenciación se llevó a cabo con las siguientes condiciones: 20 ciclos a 96°C durante 15sg, 55°C durante 10s, 60°C durante 4 min.

#### 7.2.4.- Purificación de la reacción de secuenciación:

Se utilizan columnas CentriSep Spin Columns (Applied Biosystems):

- 1- Abrir las columnas y añadir 800  $\mu$ l de agua b.d. Disolver el gel que incluye la columna sin que se formen burbujas. Incubar 30 min.
- 2- Quitar la tapa inferior de la columna y dejar gotear el agua sobre un tubo colector. Drenar la columna.
- 3- Centrifugar 3.000 rpm 2 min
- 4- Desechar el tubo colector
- 5- Transferir 20  $\mu$ l del producto de reacción de secuenciación. Echar en el centro de la columna.
- 6- Colocar un eppendorf en la parte inferior de la columna
- 7- Centrifugar 3.000 rpm 2 min. En el eppendorf se recoge la muestra ya purificada
- 8- Secar la muestra. 10-15 min en bomba de vacío.
- 9- La muestra puede almacenarse liofilizada a  $-20^{\circ}$  C hasta su uso posterior.

La muestra así obtenida está preparada para ser sometida a electroforesis en un gel de acrilamida. Esta muestra para ser cargada en el gel debe resuspenderse en 5  $\mu$ l de formamida más 1  $\mu$ l de buffer de carga por cada muestra. Se carga en el gel 1,75  $\mu$ l de la mezcla.

#### 7.2.5.- Electroforesis y Análisis

El software ABI PRISM Collection dispone una electroforesis a 3.000 v durante 3 horas (también puede realizarse a 7 horas).

Con el software MATCH TOOLS, MATCH MAKER y NAVIGATOR (Perkin Elmer) incorporados al secuenciador automático se compara la secuencia obtenida con la de los alelos descritos en los loci A, B, C. En ocasiones, si la secuencia tiene algo de fondo o en casos particulares, es preferible realizar una lectura manual de las secuencias.

Los primers utilizados en cada una de las reacciones de amplificación y secuenciación son:



a) **Locus A**

<i>Cebadores</i>	<i>Localiz</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Reacción</i>
A 5.4-Fw	Exón 1	5'CGC.CGA.GGA.TGG.CCG.TC 3'	Amplificación
A 3.2-Bw	Exón 5	5'GGA.GAA.C(C/T)A.GGC.CAG.CAA.TGA.TGC .CC 3'	Amplificación
A 5.9-Fw	Exón 2	5'CA.GGA.TCG.GGC.(A/G)GG.TCT.CAG.CC 3'	Secuenciación exón 2
B 3.6-Bw	Exón 2	5'CA.GGA.GAG.GCG.CCC.CGT.GGC 3'	Secuenciación exón 2
A 5.10-Fw	Exón 3	5'CA.GGA.GGG.CTC.GGG.GGA.C(C/T)G.GG 3'	Secuenciación exón 3
A 3.4-Bw	Exón 3	5'CA.GGA.CAC.TCA.CCG.GCC.TCG.CTC.TGG 3'	Secuenciación exón 3
A 5.11-Fw	Exón 4	5'CA.GGA.ATG.ACA.GAT.GC(C/A).AAA.TGC.C T 3'	Secuenciación exón 4
A 3.8-Bw	Exón 4	5'CA.GGA.AC.ACC.CCC.(A/T)TC.TCC.CTC.C 3'	Secuenciación exón 4

b) **Locus B**

<i>Cebadores</i>	<i>Locali.</i>	<i>Secuencia</i>	<i>Reacción</i>
BX1-Fw	Intrón 1	5'GGG.AGG.AGC.GAG.GGG.ACC.(G/C)CA.G 3'	Amplificación
BINT3-Bw	Intrón 3	5'GGA.GGC.CAT.CCC.CGG.CGA.CCT.AT 3'	Amplificación
BEX2-Fw	Intrón 1	5'GGG.CGC.AGG.ACC.(T/C)G(A/G).GGA 3'	Secuenciación exón 2
BEX2-Bw	Intrón 2	5'GGT.CAC.TCA.CCG.(G/T)CC.TCG 3'	Secuenciación exón 2
BEX3-Fw	Exón 3	5'GGG.GCC.AGG.GTC.TCA.CA 3'	Secuenciación exón 3
18CIN3- Bw	Intrón 3	5'CCC.ACT.GCC.CCT.GGT.ACC 3'	Secuenciación exón 3

## c) Locus C

Cebadores	Locali.	Secuencia	Reacción
DMEX1-Fw	Intrón 1	5'CTC.(C/A)TC.CTG.CTG.CTC.TCG.GGA 3'	Amplificación
DMEX4-Bw	Intrón 3	5'CCA.TCT.CAG.GGT.GAG.GGG.CTC 3'	Amplificación
DLF-Fw	Intrón 1	5'GAG.GGT.CGG.GCG.GGT.CTC.AG 3'	Secuenciación exón 2
DLR-Bw	Intrón 2	5'GGG.CCG.TCC.GTG.GGG.GAT.G 3'	Secuenciación exón 2
DLF-Fw	Intrón 2	5'GTT.TAG.GCC.AAA.ATC.CCC.GC 3'	Secuenciación exón 3
DLR-Bw	Intrón 3	5'CTC.CCA.CTG.CCC.CTG.GTA.CC 3'	Secuenciación exón 3

## 8.- RT-PCR

## 8.1.- RT-PCR semicuantitativa

Los cDNAs fueron amplificados por PCR en presencia de primers específicos para los genes siguientes:  $\beta$ 2-microglobulina, HLA-A, HLA-B,  $\beta$ -actina, TAP1, TAP2, Tapasina, LMP2 y LMP7 (Tabla 7). Las amplificaciones semicuantitativas se realizaron utilizando diferentes cantidades de cDNA y un número limitado de ciclos. Se llevaron a cabo en el termociclador Perkin Elmer con las siguientes condiciones: un ciclo de 94°C durante 9 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C durante 30 segundos, 65°C durante 30s, 72°C durante 3 minutos; finalmente un ciclo de 72°C durante 10 minutos. La PCR se realizó en un volumen de 50 $\mu$ l con 5 $\mu$ l de cDNA, 5 $\mu$ l de 10X PCR buffer, 50mM de MgCl<sub>2</sub>, 10mM de cada deoxinucleótido trifosfato, 10 $\mu$ M de cada primer y 2U de AmpliTaqGold DNA Polimerasa (Applied Biosystems, Branchburg, New Jersey, USA). Se analizaron 10 $\mu$ l de cada producto amplificado sobre un

gel de agarosa al 2%, teñidos con bromuro de etidio y fotografiados bajo la luz ultravioleta. Los amplificadores se confirmaron por secuenciación.

OLIGONUCLEÓTIDOS	SECUENCIA (5' - 3')
AS-Fw	GACAGCGACGCCGCGAGCCA
ANSA-Bw	GGCAGCGACCACAGCTCCAG
BSA-Fw	GACAGCGACGCCGCGAGTCC
BNSA-Bw	AGTAGCGACCACAGCTCCGA
HLA-ABC-Fw	GATTCTCCCCAGACGCCGAG
HLA-CO1-Bw	TCAGAGCCCTGGGCACTGTT
TAP1-Fw	GCAGAATCTGTACCAGCCCAC
TAP1-Bw	GGCTGTTTGCATCCAGGG
TAP2-Fw	AGGTGGTTTCAGTTGGGCAGG
TAP2-Bw	CTGCAGCCTGTGAGCAATCACC
TAPASINA-Fw	CTGATGCCAGCAACCCTTGC
TAPASINA-Bw	CCTGAAAGACCTGCTACCTCCAG
B-ACTINA-Fw	GTGGGGCGCCCCAGGCACCA
B-ACTINA-Bw	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC
B2-MICROGLOBULINA-Fw	GGGCATTCTGAAGCTGACA
B2-MICROGLOBULINA-Bw	TGCGGCATCTTCAAACCTCC
LMP2-Fw	CACCATGCTGCGGGCGGGAGAAGT
LMP2-Bw	TCACTCATCATAGAATTTTGGCAGTT
LMP7-Fw	CACCATGGCGCTACTAGATGTATGCG
LMP7-Bw	ATTATTGATTGGCTTCCCGGTA CTG

Tabla 7.- Primers utilizados en RT-PCR semicuantitativa

## 8.2.- RT-PCR cuantitativa

Los análisis de RT-PCR para los genes de  $\beta$ 2-microglobulina, HLA-A, HLA-B, HLA-C, TAP1, TAP2, LMP2, LMP7, Tapasina y Her2/neu se llevaron a cabo utilizando el cicladador SmartCycler II System y analizado con el software Cepheid. Los genes de GADPH y de la  $\beta$ -actina se utilizaron como control. El nivel de expresión de los genes de interés se determinó en relación al gen control, GADPH y/o  $\beta$ -actina, para normalizar las variaciones en la calidad del mRNA y la cantidad de cDNA utilizado. Para cada muestra, la cantidad de gen diana y control se determinó con una curva estándar. La curva estándar de cada gen se construyó con diluciones seriadas del cDNA de la línea de carcinoma celular Hela (100000 a 10pg), positiva para la expresión de HLA. La cantidad del gen diana se dividió por la del control para obtener un valor normalizado. Las reacciones de PCR se realizaron por triplicado, y el valor obtenido se expresó con su correspondiente desviación estándar (SD). La PCR cuantitativa se realizó con el kit de PCR QuantiTect SYBR green (Qiagen). Los primers, el tamaño del amplificado y las condiciones de PCR se especifican en la tabla 8.

<b>CEBADOR</b>	<b>SECUENCIA (5'→3')</b>	<b>SIZE (bp)</b>	<b>Annealing T(°C)</b>	<b>Melting T(°C)</b>
Beta2-m	Fw: TGACTTTGTCACAGCCCAAGATA Bw: AATCCAAATGCGGCATCTTC	85	55	78
GAPDH	Fw: GAAGGTGAAGGTCCGGAGTC Bw: GAAGATGGTGATGGGATTTTC	265	55	81
HLA-A	Fw: TCCTTGAGCTGTGATCGCT Bw: AAGGGCAGGAACAACCTTTG	197	55	83
HLA-B	Fw: TCCTAGCAGTTGTGGTCATC Bw: TCAAGCTGTGAGAGACACAT	130	55	84
HLA-C	Fw: TCCTGGTTGTCCTAGCTGTC Bw: CAGGCTTTACAAGTGATGAG	151	55	83
TAP1	Fw: CGCCTCACTGACTGGATTCTAC Bw: TCCGTCTCCTGGCGCAGGAC	194	60	84
TAP2	Fw: GTCGTGTCATTGACATCCTG Bw: TCAGCTCCCCTGTCTTAGTC	228	55	85
TAPASINA	Fw: AGTGACACGACCCCGCGGG Bw: CAGGCCGCTGGCCATTTTCG	120	58	89
LMP2	Fw: TTGTGATGGTTCTGATTCCCG Bw: CCATGTCGGCCACGGCTTGGG	141	60	86
LMP7	Fw: TCGCCTTCAAGTTCCAGCATGG Bw: GCTGCACAGCCAGACATGGTGCC	139	60	82
HER2	Fw: CCAGGACCTGCTGAACTGGT Bw: TGTACGAGCCGCACATCC	72	55	85

Tabla 8. Las condiciones de PCR fueron: 40 ciclos de 15 segundos de desnaturalización a 95°C, 30 segundos a la temperatura de annealing de cada gen y 35 segundos de extensión a 72°C.

## 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
- Solución TAE 50X (0,4 M Tris-acetato, 0,01M EDTA pH 8.0)
- Solución de Bromuro de Etidio (10mg/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 250ml se pesan 2,5g 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 7,5 µl de solución de bromuro de etidio. A continuación se vierte sobre el soporte del gel con 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 analizan de 10 a 20  $\mu$ l 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 se analiza 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.- CLONACIÓN DEL GEN HLA-A2 EN EL VECTOR pCDNA3.1v5His-TOPO

### 10.1.- Fundamento

El vector pcDNA 3.1D/V5-His-TOPO® es un vector de expresión de 5.5 kb diseñado para facilitar una clonación direccional rápida de productos de PCR para la expresión en células de mamífero. El vector permite un elevado nivel de expresión y contiene los siguientes elementos (figura 13):

- El promotor temprano del citomegalovirus humano (CMV) para obtener una elevada expresión del gen de interés en un amplio rango de células de mamífero (Andersson et al. 1989; Boshart et al. 1985; Nelson et al. 1987).

- Péptido carboxi-terminal que contiene el epítipo V5 y una cola de polihistidina (6xHis) para la detección y purificación de proteínas recombinantes.

- Gen de resistencia a la neomicina para la selección de líneas celulares de forma estable usando Geneticin® (Southern & Berg, 1982).

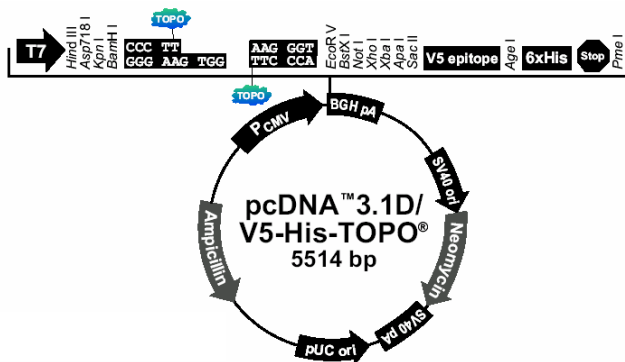


Figura 13.- Vector de expresión pcDNA3.1V5His-TOPO.

En este vector es posible realizar la clonación del producto de PCR en un solo paso, en muy poco tiempo, con una elevada eficiencia, y direccionalmente. La estrategia diseñada consiste en la adición de 4 nucleótidos al producto de PCR y adaptarlo a un vector. Los productos de PCR son clonados direccionalmente por la adición de cuatro bases al primer forward (CACC). El extremo libre en el vector de clonación (GTGG) invade el extremo 5' del producto de PCR, hibrida con las bases añadidas, y estabiliza el producto de PCR en la orientación correcta. Los insertos se pueden clonar en la orientación correcta con una eficiencia similar o superior al 90% (figura 14).



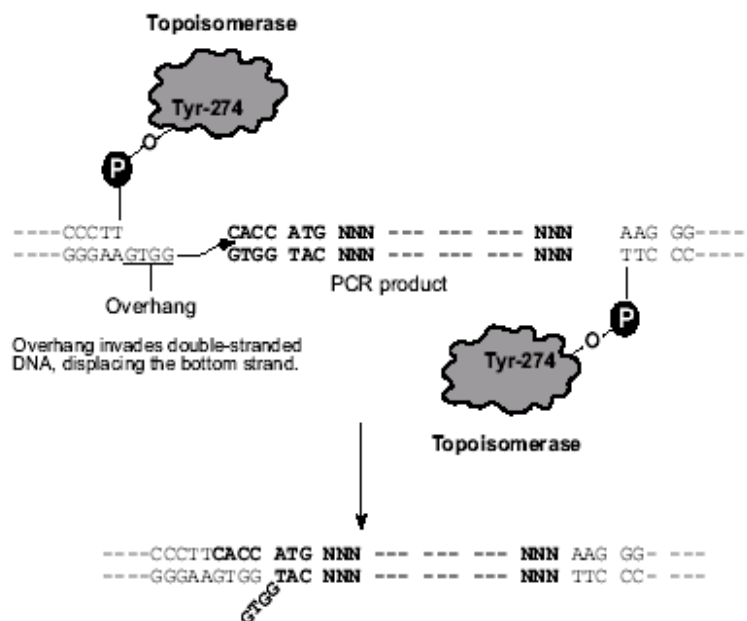


Figura.-14.- Estrategia de clonación en el vector pcDNA3.1v5His-TOPO.

## 10.2.- Método

El gen HLA-A\*0201 fue amplificado desde el vector pLNCX (IHW10003 A\*0201, Gene Bank), con los primers vcHLAFw (con una cola **CACC**- en el extremo 5') y vcABw.

vcHLA-Fw: 5' **CACCGG**ACTCAGAATCTCCCCAGACGCCGAG 3'

vcA-Bw: 5' TTGGGGAGGGAGCACAGGTCAGCGTGGAAG 3'

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: - un ciclo de 95°C durante 2 minutos, seguido por 30 ciclos de 95°C durante 30 segundos; 65°C durante 30 segundos; 72°C durante 2 minutos; y finalmente un ciclo de 72°C durante 10 minutos.

Tras comprobar la amplificación por electroforesis en gel de agarosa al 2X, se procedió a su secuenciación con los primers utilizados en la clonación y dos primers internos, As (situado en el exón 2) y ANSA (situado en el exón 5), figura 15.



Figura 15.- Estrategia seguida para la secuenciación del gen HLA-A\*0201. Las condiciones de Secuenciación fueron las siguientes: un ciclo de 96°C durante 10 s, seguido por 20 ciclos de 96°C 10s, 50°C 10s y 60°C 2min.

La secuenciación confirmó que el gen amplificado era el HLA-A\*0201.

Posteriormente se procedió a la reacción de clonación del gen A2 en el vector pcDNA3.1. Aproximadamente 2µl de amplificado se mezcló con 1µl de solución salina y 1µl de vector y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. La mezcla se utilizó para transformar químicamente bacterias TOP10 (Invitrogen). Las células se sembraron en placas de LB agar con 100µg/ml de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C. Se subcultivaron diferentes colonias en 5ml de medio LB con 100µg/ml de ampicilina y los plásmidos fueron purificados con un kit de extracción (QIAprep, QIAGEN Companies).

## 11.- EXTRACCIÓN DE PLÁSMIDOS

En primer lugar, se centrifuga el cultivo en medio LB-ampicilina a 3000rpm. El pellet bacteriano se resuspende en 200µl de solución de resuspensión y se añade 200µl de solución de lisis. Se añade solución neutralizante y se centrifuga a 13000rpm durante 15 minutos. Se hace pasar el lisado a través de una columna, y se lava para eliminar restos de sales y otros contaminantes. Finalmente se eluye el DNA con agua bidestilada y se almacena a -20°C.

Antes de la centrifugación inicial, 850µl de cultivo bacteriano se mezclaron con 150µl de glicerol y las bacterias fueron criopreservadas a -80°C.

## 12.- SECUENCIACIÓN DE PLÁSMIDOS

Cada reacción de secuenciación contiene:

- 400ng de DNA plasmídico
- 8µl de Big dye® terminador v.1.1
- 3.1pmol de Primer
- 20µl de Agua destilada estéril

Las condiciones de PCR utilizadas en el ciclador fueron:

- 96°C 10s
- 25 ciclos a 50°C 5s
- 60°C 4min

Posteriormente, las muestras fueron purificadas en columnas (Centri-sep Columns, Applera) tal y como se ha descrito previamente.

Los primers utilizados fueron:

5' —————> 3'

T7-Fw:	TAATACGACTCACTATAGGG
BGH-Bw:	TAGAAGGCACAGTCGAGG

### 13.- TRANSFECCIONES CELULARES

Para obtener células transfectadas de forma estable, dos días antes de la transfección, las células tumorales fueron plaqueadas en placas de 6 pocillos, cuando se alcanzó el 80% de confluencia las células fueron lavadas con medio de cultivo y cambiadas a 2 ml de OPTIMEM sin suero fetal bovino. Posteriormente se transfectaron utilizando 10 $\mu$ l de Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) y 3 $\mu$ g de vector de expresión por pocillo (digeridos previamente con la enzima de restricción Scal, Roche). Tras 8 horas el medio fue reemplazado por medio selectivo ISCOVE con 1mg/ml de geneticina y se seleccionaron en cultivo los clones resistentes.

Como control de transfección se utilizaron los vectores de expresión vacíos.

#### 13.1.- Digestión de plásmidos con Scal

Esta enzima reconoce la secuencia AGT/ACT y genera fragmentos con extremos romos.

Las condiciones de esta reacción son:

- DNA 1 $\mu$ g/25 $\mu$ l

- 10X SuRE/Cut Buffer H 2.5 $\mu$ l

- Agua estéril hasta un volumen de 25 $\mu$ l

- Enzima de restricción 1 unidad (es la actividad de enzima que rompe completamente 1 $\mu$ g de DNA en 1 hora a 37°C en un volumen total de 25 $\mu$ l de buffer).

### 14.- CLONACIÓN DE CÉLULAS

Todas las clonaciones celulares se han realizado por dilución límite. Las células fueron distribuidas en placas de 96 pocillos, con fondo

en V, partiendo de una concentración inicial de 1000 células por pocillo (1). Desde esta concentración se hicieron las sucesivas diluciones:

(2)- 100 células por pocillo, (3)- 10 células por pocillo, (4)- 1 célula por pocillo.

Las células fueron sembradas en medio IScove completo con o sin geneticina en función del tipo de célula a clonar.

#### 15.- PREPARACIÓN DE SUERO HUMANO

El suero humano se preparó a partir de un pool de plasma de donantes no seleccionados ABO. El plasma se suplementó con  $\text{CaCl}_2$  y trombina bovina (ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) para permitir la coagulación durante 3 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Tras la centrifugación, el suero fue descomplementado (30 min a  $56^\circ\text{C}$ ), filtrado con filtros de un tamaño de poro de  $0,22\text{-}\mu\text{m}$ , e inactivado con UV (Viralex procedures, PAA Laboratories, Linz, Austria).

#### 16.- ESTIMULACIÓN DE CTLs MEDIANTE CULTIVO DE CÉLULAS TUMORALES Y LINFOCITOS (MLTC) POR DILUCIÓN LÍMITE (LDA)

El PBMC (células mononucleares de sangre periférica) del paciente ANDO fue aislado mediante centrifugación por gradiente de densidad, Lymphoprep (Nycomed, Oslo, Norway), y criopreservado en medio Iscove suplementado con el 10% de suero humano (HS) y el 10% de DMSO.

El PBMC del paciente ANDO se descongela y se añade en 20ml de medio Iscove más el 10% de suero humano (HS) junto a  $20\mu\text{l}$  de DNAsa ( $10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Las células se incuban a  $37^\circ\text{C}$  durante 5 minutos, tiempo requerido para la actuación de la enzima. Posteriormente se cuenta el número de células mediante tripan blue (V/V). Se centrifugan a 1300rpm durante 5min y se procede al marcaje con el anticuerpo CD8+FITC

(1/10). Para ello se resuspenden las células en PBS y se añade el anticuerpo. Incubación durante 20min a 4°C en oscuridad.

Las células son lavadas con PBS y centrifugadas a 1300rpm durante 5 min. A continuación se resuspenden en 750 µl de PBS y se analizan en el sorted del citómetro FACScan. Tras seleccionar las células CD8+ se recogen en un tubo con 10ml de medio Iscove completo.

Las células son centrifugadas de nuevo a 1300 rpm durante 5 min y resuspendidas en 4ml de medio Iscove completo para proceder de nuevo a determinar el número de células CD8+ obtenidas.

Se toma una alícuota (50000 células) de estas células CD8+ y otra de las obtenidas como CD8- para realizar el control de la selección. Para ello ambas células son marcadas con el anticuerpo CD3+PE (1/30).

A continuación se preparan las sucesivas diluciones de células CD8+. De este modo se comienza con una primera dilución de 3000c/pocillo (48 pocillos), y de ésta se prepara el resto de diluciones: 1500c/p, 750c/p, 375c/p, 187c/p. Todas las diluciones se llevan a cabo en medio Iscove completo más IL-2 (20U/ml) e IL-7 (10ng/ml).

Tras añadir los CTLs a la placa (100 µl/pocillo), se preparan las células tumorales. Aproximadamente  $1 \times 10^6$  células tumorales ANDO-2-T1E3 se irradian a 10000rads durante 32 min.

Posteriormente, las células irradiadas se despegan con PBS-EDTA y se centrifugan a 1300rpm durante 5 min. Se resuspenden en medio Iscove completo más IL-2 (20U/ml) e IL-7 (10ng/ml).

Las células tumorales ya pueden añadirse a las placas en las que previamente hemos añadido los linfocitos CD8+, a razón de 3860 células por pocillo, y se incuban en la estufa a 37°C. Este será el día 0.

Durante los días 9, 16 y 27 se realizaron reestimulaciones. Para ello se extrajeron 100 µl de cada pocillo (del sobrenadante) y se reemplazaron por 100 µl de medio fresco (Iscove completo más IL-2 e IL-

7, junto a las células tumorales irradiadas, 3000 células por pocillo, tal y como se hizo en el día 0).

Todos los ensayos de MLTC se han realizado con medio de cultivo ISCOVE completo tal y como se describió anteriormente pero con el 10% de suero humano (HS) en lugar de FCS y con metiltriptófano (100µM).

#### 17.- ENSAYO DE CITOTOXICIDAD MEDIANTE LIBERACIÓN DE Cr<sup>51</sup>

Célula efectora: MLTC-ANDO-2-T1E3

Célula diana: ANDO-2-T1E3

ANDO-2

ANDO-EBV

K-562

##### 17.1.-Preparación células diana:

Para el marcaje con <sup>51</sup>Cr, se necesitan 2 x 10<sup>6</sup> células. Tras centrifugar las células a 1300rpm durante 5 min, se resuspenden en 50µl de medio Iscove con el 50% de suero humano.

Para un volumen de 50µl se necesitan 250µCi de <sup>51</sup>Cr. Tras el marcaje, las células se incuban a 37°C durante 1 hora, con agitaciones cada 10 min.

Tras la incubación, las células marcadas son lavadas con 10 ml de medio Iscove con el 2% de suero humano. Se centrifugan a 1300 rpm durante 5 min. Este lavado se repite dos veces.

Posteriormente se cogen las células necesarias, 1000 células por pocillo y se resuspenden en medio Iscove con el 10% de suero humano. Se siembran 50µl (1000 células) por pocillo. Tras añadir las células efectoras (50µl) y la línea K-562 (50000 células por pocillo, 50µl) sin

marcar, las placas se centrifugan a 1300 rpm durante 1 min para que las células se depositen al fondo.

Se incuban a 37°C durante 4 horas. A continuación se transfieren 50µl de sobrenadante a placas de fondo plano (Lumaplate 96, TOP Seal –A).

Se deja secar 24 horas.

#### 17.2.-Preparación de células efectoras:

Se extrae de cada pocillo, de las placas con MLTC, 50µl y se transfieren a placas correctamente rotuladas, tal y como se muestra en la figura.

A continuación se añade la línea K-562 sin marcar, 50000 células por pocillo. Esta línea se pone en exceso para impedir la lisis de la célula tumoral por las células NK.

#### 17.3.-Preparación del control min/Max:

Se divide la placa por la mitad y se añaden 50µl/pocillo de medio Iscove con el 10% de suero humano, en la primera mitad (lisis mínima), y 50µl/pocillo de medio Iscove con el 10% de suero humano más tritón (0,5%) en la otra mitad de la placa (lisis máxima).

Se añade a cada pocillo las células K-562 sin marcar, 50000 células por pocillo. Y por último se añaden las células diana. Para cada célula diana se necesitan al menos 12 pocillos.

Un esquema representativo de este ensayo se muestra en la figura 16.



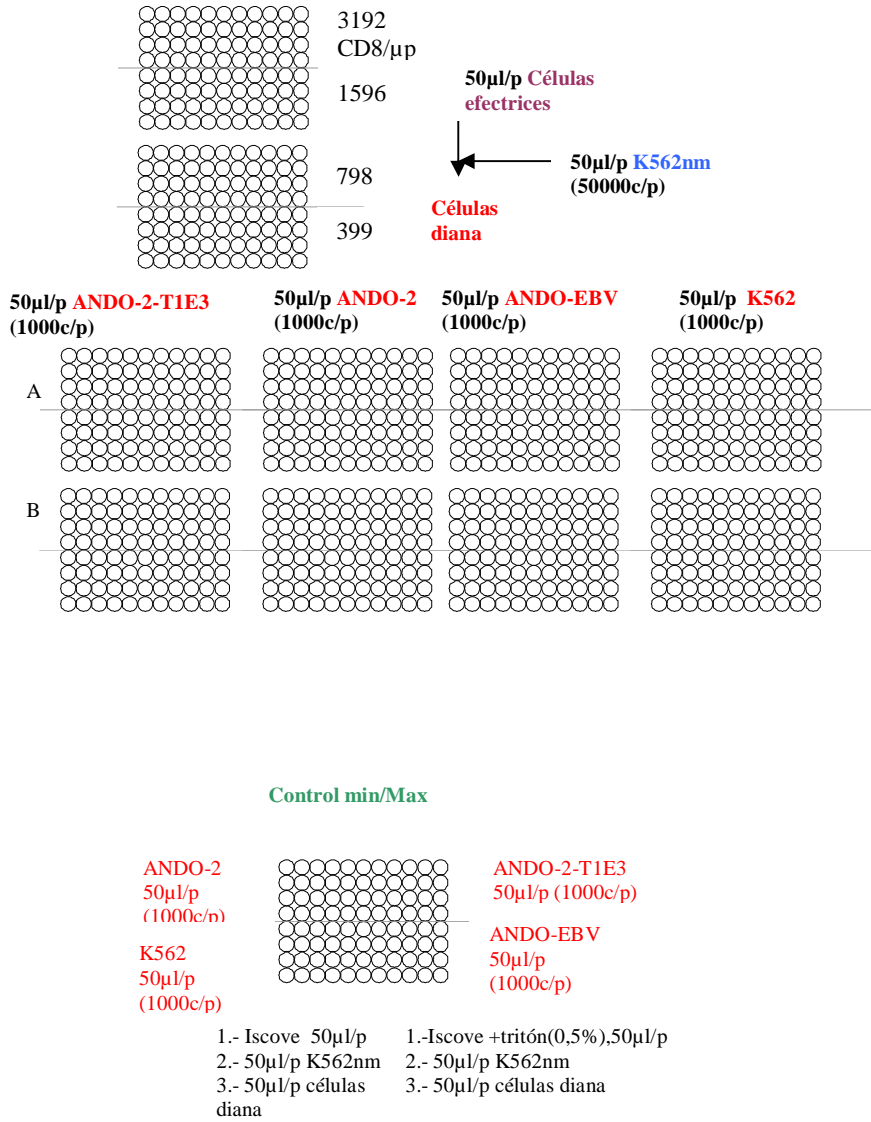


Figura 16.- Esquema de Test de lisis.

17.4.-Medición de liberación de  $^{51}\text{Cr}$ :

En primer lugar, se mide la liberación de cromo en un contador de centelleo de  $^{51}\text{Cr}$ , 1 o 2 min por muestra.

Posteriormente se calcula el porcentaje corregido de lisis para cada concentración de células efectoras:

$$\% \text{lisis corregido} = 100 \times \frac{\text{Secreción de } ^{51}\text{Cr} \text{ en muestra} - \text{secreción control}}{\text{Secreción máxima} - \text{secreción control}}$$

Donde la secreción en la muestra se refiere a las células efectoras con actividad CTL y los controles se refieren a las células no líticas o al medio libre de células. La secreción de células en medio sólo se refiere a menudo a la "lisis espontánea".

## 18.- CÁLCULO DE LA FRECUENCIA DE PRECURSORES DE CTLs POR DILUCIÓN LÍMITE (LDA)

Los ensayos de dilución límite, se requieren para proporcionar una estimación cuantitativa de células T presentes en una población de células mononucleares periféricas (PBMC) que son específicas de un antígeno particular. Estos ensayos nos proporcionan una estimación de la "frecuencia de precursores" de un tipo determinado de célula. Los resultados positivos en este ensayo (obtenidos a partir de ensayos de citotoxicidad) indican la presencia de células precursoras específicas de antígeno en el PBMC inicial, que ha sido activado y duplicado durante el periodo de cultivo celular. La función de estas células se mide por tanto mediante ensayos de citotoxicidad. En las condiciones de cultivo descritas, en las que el único factor limitante es el número de células

respondedoras específicas de antígeno presentes en la población inicial, y asumiendo una cinética de primer orden, el número de células no respondedoras sigue la distribución de Poisson. Representando en una escala semilogarítmica el porcentaje de cultivos no respondedores frente al número de células añadidas se obtiene una línea recta, y el número de células en el inicio que contienen un precursor específico se puede calcular desde el término cero de la distribución de Poisson.

## 19.- ENSAYOS CELULARES *IN VIVO*

### 19.1.- Ratones

Se han utilizado ratones atímicos nu/nu procedentes de Charles River (Barcelona), de 6 a 8 semanas de edad y con un peso medio aproximado de 20g por ratón. Los ratones fueron manipulados en condiciones libres de patógenos y conforme a las normas aprobadas por nuestra institución.

### 19.2.- Crecimiento y potencial oncogénico de las líneas tumorales utilizadas

Para los estudios de crecimiento y determinación del potencial oncogénico de las líneas tumorales obtenidas, se determinó la dosis mínima de células capaz de inducir el crecimiento del tumor. Se seleccionaron tres grupos de ratones atímicos, con 5 ratones en cada grupo, a los que se inyectó a nivel subcutáneo en la pata tres dosis distintas de células tumorales:  $1 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^6$  y  $5 \times 10^6$ . Sólo se observó crecimiento en los ratones que habían recibido  $5 \times 10^6$  células tumorales. Cuando el tumor local alcanza los 8-12 mm el tumor es extirpado y se adapta a cultivo. Todas las líneas se cultivaron en medio Iscove completo y crecían presentando adherencia al plástico. Su población se dobla en un tiempo de 56-72 horas.







**I) MECANISMOS MOLECULARES QUE CONDICIONAN LAS  
ALTERACIONES DE LA EXPRESION DE LAS MOLECULAS HLA EN  
EL MODELO EXPERIMENTAL ANDO-2**

## **1.- LA LINEA ANDO-2 PRESENTA UN FENOTIPO II POR DELECIÓN DE UN CROMOSOMA 6**

### **1.1 FENOTIPO HLA**

La línea tumoral ANDO-2 fue establecida en 1990 en el laboratorio del Dr. Pierre Coulie en Bruselas, a partir de una metástasis de melanoma maligno en el ganglio supraclavicular izquierdo del paciente ANDO o LB-41. Este paciente fue sometido a vacunaciones periódicas hasta mayo del 2002, consistentes en la inyección de la línea tumoral autóloga, ANDO-2 más IL-2. Desde que la metástasis surgida en julio de 1990 fuera extirpada, no han existido evidencias de enfermedad en el paciente. La línea transformada con el Virus de Epstein-Barr se obtuvo a partir de los linfocitos B autólogos.

El tipaje HLA de clase I del paciente ANDO por serología era: HLA-A2, 30; B13, B40. La línea ANDO-2 fue catalogada en Bruselas como que había perdido la expresión de HLA-A2. El estudio fenotípico para HLA de la línea de melanoma ANDO-2 realizado mediante inmunofluorescencia indirecta, utilizando anticuerpos monoclonales monomórficos, locus específicos y polimórficos confirmó la pérdida de expresión de HLA-A2 pero además se detectó también la pérdida simultánea de HLA-B13 (figura 17a). La expresión de HLA-A32 era inferior a la de HLA-B40 así como la del locus HLA-A frente al locus HLA-B. La línea ANDO-2 no expresaba las moléculas HLA de clase I no clásicas, HLA-G y HLA-E ni tampoco moléculas HLA de clase II (figura 17b).

El tratamiento con interferón gamma aumentó el nivel de expresión de HLA-A32 y de HLA-B40 e indujo la neoexpresión de las moléculas HLA de clase II (HLA-DR y HLA-DP) pero no recuperó la expresión de las moléculas HLA-A2 o HLA-B13 (Figura 17c).



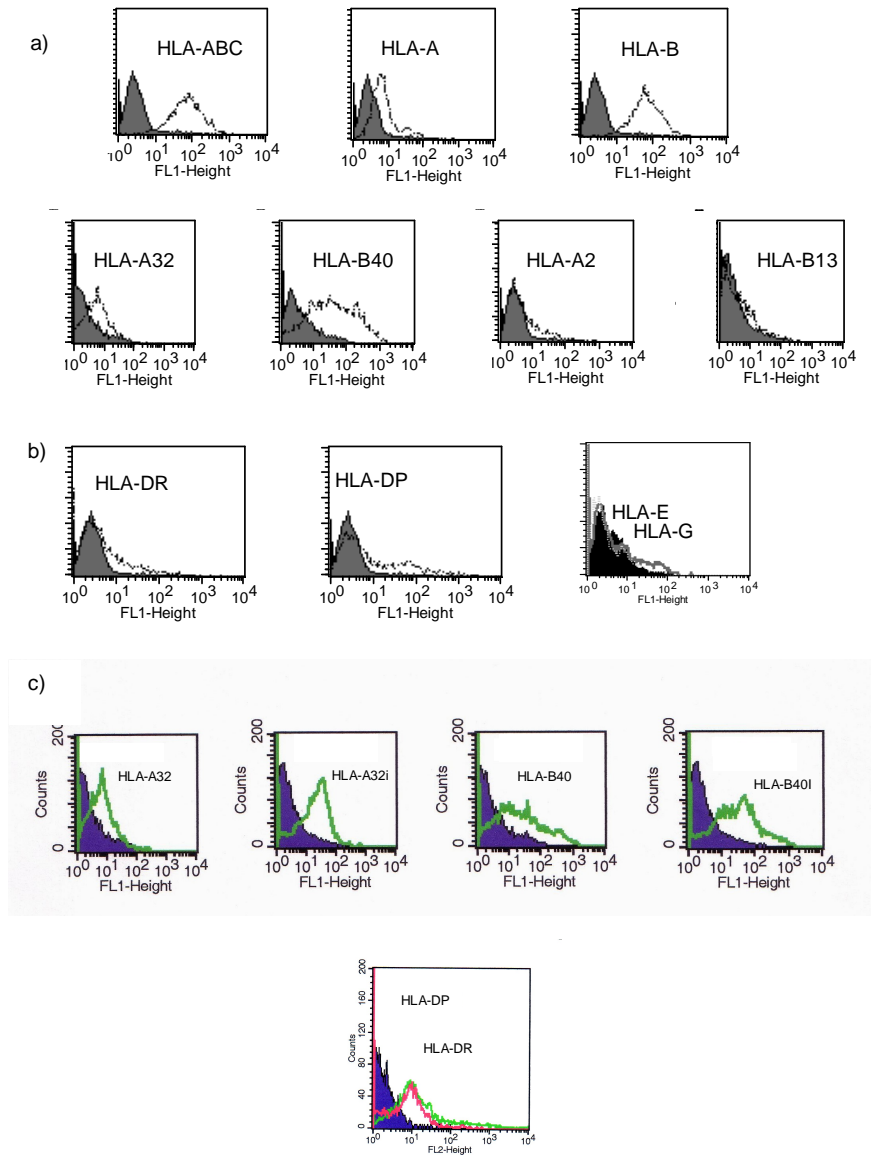
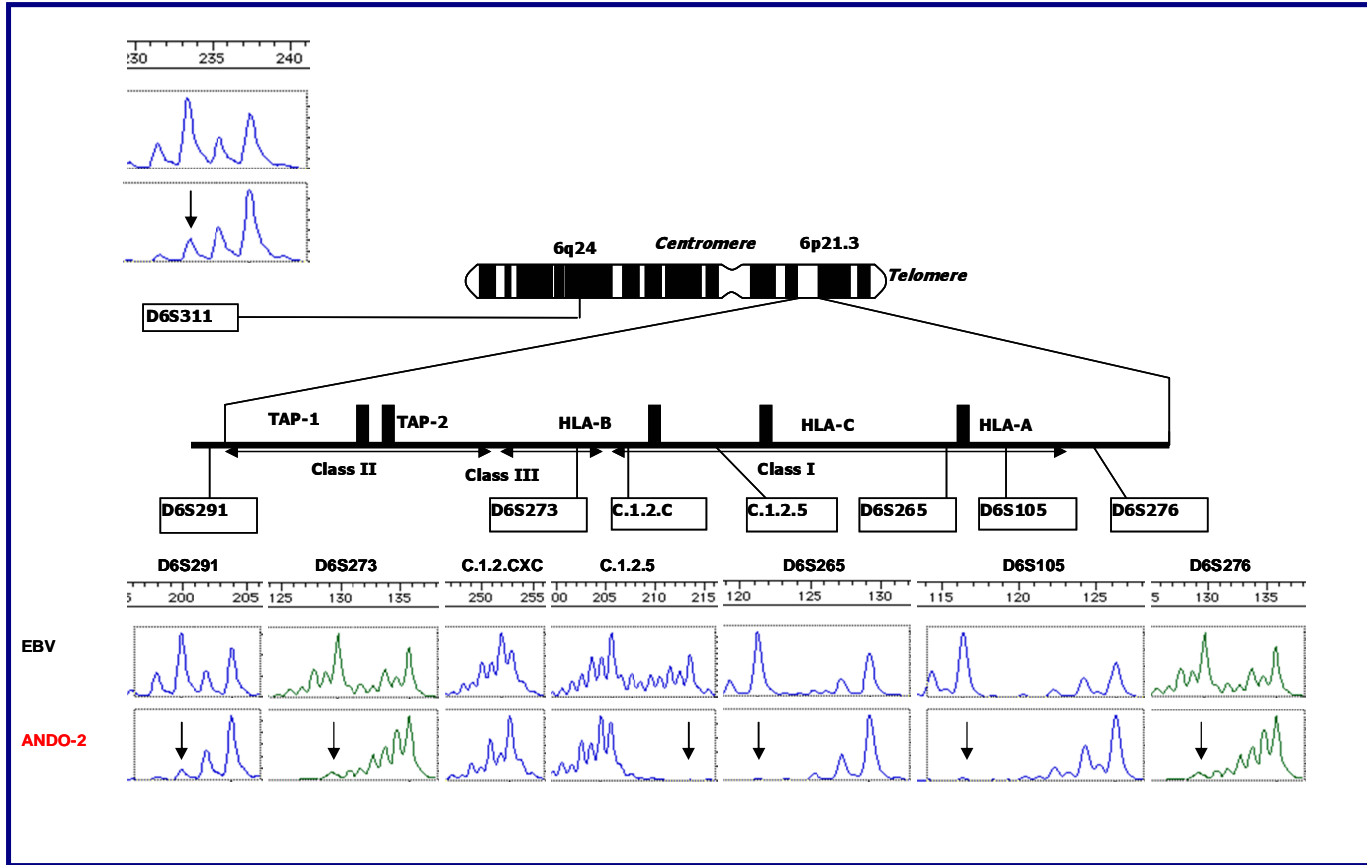


Figura 17.- Fenotipo HLA de la línea ANDO-2. a) La línea ANDO-2 pierde la expresión de HLA-A2 y HLA-B13 y retiene la de HLA-A32 y HLA-B40. b) La línea ANDO-2 no expresa HLA-G, HLA-E ni HLA de clase II (HLA-DR y HLA-DP). c) La expresión de HLA-A32 y HLA-B40 aumenta y la de HLA de clase II se induce tras el tratamiento con interferón gamma (i).

## 1.2.- TIPAJE HLA GENÓMICO Y ANÁLISIS CON MICROSATELITES DE LA REGIÓN 6p21.3

Los datos fenotípicos sugerían que se había producido la pérdida de un haplotipo HLA que contenía los genes que codifican para las especificidades HLA-A2 y HLA-B13. Esta posibilidad fue confirmada por tipaje HLA genómico por PCR-SSO y secuenciación. Mientras la línea autóloga presentaba un tipaje HLA normal : HLA-A\*0201, 3201; HLA-B\*1302, 4001; HLA-Cw\*0304, 0602; HLA-DRB1\*0101, 1501; HLA-DQB1\*0501, 0602; la línea de melanoma ANDO-2 tenía un tipaje hemicigoto: HLA-A\*3201, HLA-B\*4001, HLA-Cw\*0304, HLA-DRB1\*1501, HLA-DQB1\*0602 que se correspondía con las moléculas HLA de clase I expresadas y había perdido un haplotipo HLA completo que incluía los genes HLA-A\*0201 y HLA-B1302.

Para determinar la extensión de la deleción genómica, se llevó a cabo el estudio con microsatélites (STR secuencias repetidas en tándem) localizados en la región 6p21.3, lugar donde se encuentra el conjunto de genes HLA. La pérdida de heterocigosidad (LOH) en esta región se analizó con seis marcadores. DS6276 era el marcador más telomérico y DS291 el más centromérico. En la línea ANDO-2 al compararla con la línea EBV autóloga, se observó la pérdida de señal de uno de los dos alelos en cinco de los microsatélites (figura 18). El marcador c.1.2 no fue informativo por ser homocigoto en el paciente ANDO. Estos datos indican que la deleción genómica afecta a toda la región 6p21.3 en el brazo corto del cromosoma 6, que incluye el sistema HLA. El marcador STR situado en 6q también presenta una LOH lo que sugiere que se ha producido la deleción completa de un cromosoma 6 (figura 18).



---

Figura 18.-El análisis con marcadores STR de la región 6p21.3 muestra un patrón de LOH al comparar la línea tumoral ANDO-2 con la línea autóloga ANDO-EBV. El marcador de la región 6q también presenta LOH, tal y como muestra la pérdida de uno de los alelos (flechas), sugiriendo la delección de un cromosoma 6 completo.

---

## **2.- PÉRDIDA TOTAL DE LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS HLA DE CLASE I EN LA LÍNEA ANDO-2 TRAS EL PASE POR RATONES ATÍMICOS**

### **2.1.- OBTENCION DE LA LINEA ANDO-NUDE**

Para analizar la capacidad oncogénica de la línea ANDO-2, se llevaron a cabo ensayos de crecimiento local en ratones atímicos nu/nu. Los ratones fueron distribuidos en tres grupos (5 ratones por grupo), y se inyectó una dosis diferente de células tumorales a cada grupo:  $1 \times 10^6$ ,  $2,5 \times 10^6$  ó  $5 \times 10^6$ , a nivel subcutáneo en la pata. El crecimiento tumoral fue vigilado 3 veces por semana. Sólo se observó crecimiento de la línea ANDO-2 en los ratones que habían recibido una dosis de  $5 \times 10^6$  células tumorales (figura 19). Cuando los tumores alcanzaron unos 8-12 mm de diámetro, se extirparon y adaptaron a cultivo, denominando a estas líneas ANDO-NUDE-1, -2, -3 y -4 (figura 19).

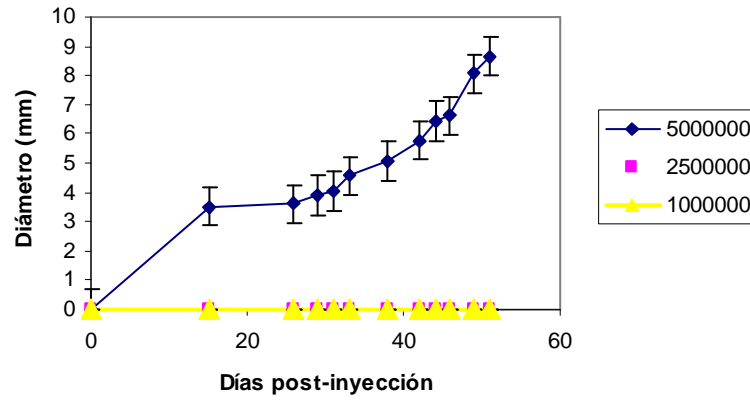


Figura 19.-Crecimiento local y potencial oncogénico de la línea ANDO-2 en ratones atímicos. Se inyectaron de  $1 \times 10^6$  a  $5 \times 10^6$  células tumorales ANDO-2 a nivel subcutáneo en la pata de ratones inmunodeficientes. Se observó crecimiento tumoral en los ratones que habían recibido  $5 \times 10^6$  células tumorales ANDO-2.

## 2.2- LA LINEA ANDO-NUDE1 PRESENTA UN FENOTIPO I

Al estudiar la expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I mediante inmunofluorescencia se observó que la línea ANDO-NUDE1 había perdido la expresión de todas las moléculas HLA de clase I tal y como se mostró con el anticuerpo monoclonal W6/32, los anticuerpos locus específicos (HLA-A y B) y los alelo-específicos anti-HLA-A32 y anti-HLA-B40 (Figura 20a). La línea ANDO-2 de la que deriva presentaba un fenotipo HLA II porque solo expresaba el haplotipo HLA-A32-B40; sin embargo, tras su pase por el ratón atímico sufrió la pérdida completa de expresión de las moléculas de HLA clase I, siendo por tanto la línea ANDO-NUDE1 de fenotipo HLA I.

Cuando la línea ANDO-NUDE1 se incubó con IFN- $\gamma$  durante 48 horas, se observó la reexpresión de los alelos HLA-A32 y HLA-B40. (Figura 20b).

Para obtener el fenotipo HLA completo de la línea ANDO-NUDE1 se realizó una inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos locus específicos para HLA de clase II. La expresión de las moléculas de clase II, HLA-DR y HLA-DP fue positiva en la línea ANDO-NUDE1, a diferencia de la línea ANDO-2. La línea tumoral ANDO-NUDE1, al igual que la línea ANDO-2, fue negativa para la expresión en superficie de las moléculas no clásicas, HLA-E y HLA-G (Figura 20c).

La línea ANDO-NUDE1 tiene el mismo tipaje HLA hemicígote por PCR-SSO e idéntico patrón de LOH para microsatélites de 6p21.3 que la línea ANDO-2 (datos no mostrados).

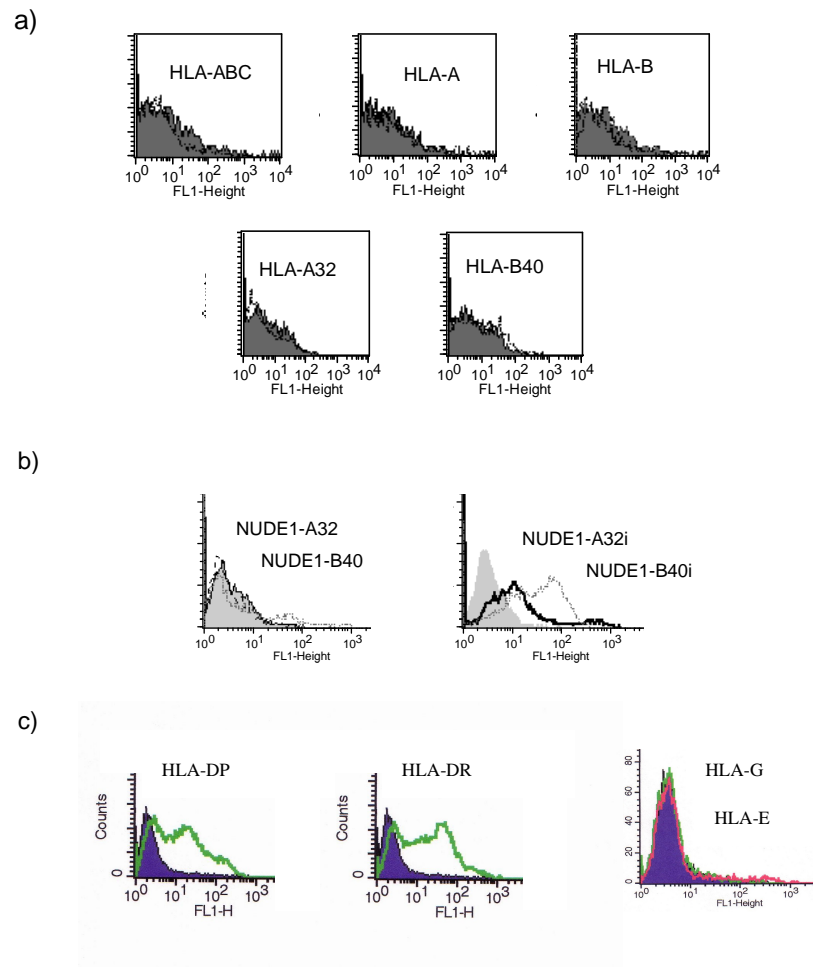


Figura 20.- Fenotipo HLA de la línea ANDO-NUDE1. a) La línea ANDO-NUDE1 no expresa moléculas HLA de clase I. b) Tras el tratamiento con IFN- $\gamma$  se reexpresaron las moléculas HLA-A32 y HLA-B40. c) Expresión de HLA-DR y HLA-DP pero no de HLA-E ni de HLA-G.

### 2.3.- EXPRESION DE LAS MOLECULAS c-Kit y MCAM

El c-Kit (CD117) es una glicoproteína de la superficie celular con actividad tirosina-quinasa que se encuentra en varios grupos de progenitores hematopoyéticos. Es esencial para el crecimiento normal y diferenciación de los melanoblastos embrionarios pero además se ha demostrado que la pérdida de este receptor contribuye al crecimiento tumoral y metástasis en la transición del melanoma desde su fase de crecimiento radial (RGP) a la fase de crecimiento vertical (VGP, fenotipo metastático).

La molécula MCAM (CD146) es una glicoproteína de membrana que se expresa en las células de melanoma, entre otras, y el aumento de su expresión se ha relacionado con la progresión tumoral y generación de metástasis ya que está implicada en mediar la interacción célula-célula o célula-matriz extracelular.

La línea ANDO-2 presentó niveles de expresión de ambos marcadores que aumentaron en la línea ANDO-NUDE1 (Figura 21).

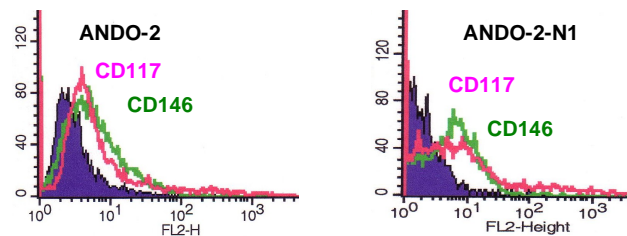


Figura 21.- Expresión en superficie de las moléculas CD117 y CD146 en las líneas tumorales ANDO-2 y ANDO-NUDE1.



## 2.4.- EL FENOTIPO I DE LA LINEA ANDO-NUDE1 SE DEBE A UN DESCENSO EN LOS NIVELES DE TRANSCRIPCION DE LOS GENES DE LA MAQUINARIA DE PROCESAMIENTO ANTIGENICO

La línea ANDO-2 tenía un fenotipo II y tras ser inyectada en ratones atímicos dió lugar a la línea ANDO-NUDE con un fenotipo I. La reversibilidad de este cambio tras la incubación con IFN- $\gamma$ , indujo a pensar en dos posibles mecanismos responsables de dicha alteración: defecto en la transcripción de la cadena pesada de los genes HLA de clase I y/o defecto en la maquinaria de procesamiento antigénico.

### 2.4.1.- TRANSCRIPCION DE LOS GENES HLA DE CLASE I Y DE BETA 2 MICROGLOBULINA

Mediante RT-PCR semicuantitativa se analizaron los niveles de transcripción de los genes para las cadenas pesadas, A, B y C, y de la  $\beta$ 2-microglobulina. En la figura 22 se muestran los resultados obtenidos, no observándose diferencias apreciables entre la línea ANDO-2 y la línea ANDO-NUDE. Como control se utilizó el gen de la  $\beta$ -actina.

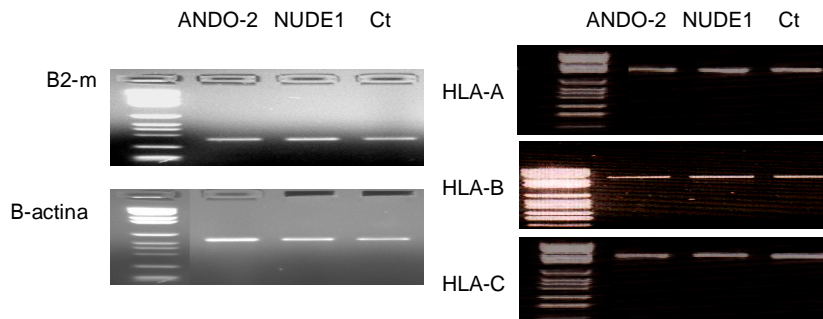
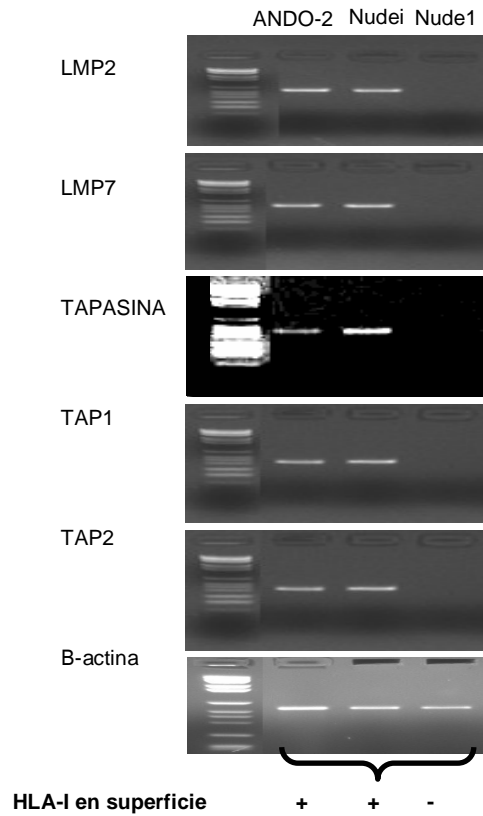


Figura 22.- Transcripción de los genes de HLA de clase I (A,B y C),  $\beta$ 2-microglobulina y Beta-actina en las líneas tumorales ANDO-2, ANDO-NUDE1 y en una línea de melanoma FM55, utilizada como control (Ct).

#### 2.4.2.- TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES DE LA MAQUINARIA DE PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO

La ausencia de expresión de las moléculas de HLA de clase I no puede explicarse por un defecto en la transcripción de los genes de las cadenas pesadas. Por tanto, el siguiente paso fue el estudio de varios de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico puesto que juegan un papel esencial en el ensamblaje y expresión en la superficie celular de los complejos péptido-HLA-I.

Se realizó RT-PCR semicuantitativa de varios de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico: TAP-1, TAP-2, LMP2, LMP7 y Tapasina mediante cebadores específicos, en las líneas tumorales ANDO-2 y ANDO-NUDE1, antes y después del tratamiento con IFN- $\gamma$ . Como control interno se analizó la expresión del mRNA del gen de la  $\beta$ -actina. Los niveles de expresión de estos genes en condiciones basales no se detectaron en la línea ANDO-NUDE1 (figura 23). Tras la inducción con IFN- $\gamma$ , el nivel de expresión aumentó y esto se acompañó de la reexpresión de las moléculas de HLA de clase I. La pérdida de expresión de moléculas de HLA clase I en la línea ANDO-NUDE1 se debía por tanto a un descenso en los niveles de transcripción de los genes que constituyen la maquinaria de procesamiento antigénico: TAP1, TAP2, LMP2, LMP7 y Tapasina. En la línea ANDO-2 los niveles de transcripción de estos genes fueron normales.



**Figura 23.-** Transcripción de los genes LMP2, LMP7, TAP1, TAP2 y TAPASINA en condiciones basales (ANDO-2 y ANDO-NUDE1) y tras la inducción con IFN- $\gamma$  (Nudei). En condiciones basales no se detecta mRNA para los genes del APM en la línea ANDO-NUDE1 que se correlaciona con la falta de expresión de las moléculas HLA de clase I. Tras la inducción con IFN- $\gamma$ , se recupera de forma coordinada la transcripción de los genes que forman parte del APM y en consecuencia las moléculas de HLA de clase I se detectan en la membrana de la línea ANDO-NUDE1.

## **2.5.- LA PÉRDIDA DE EXPRESIÓN DE HLA DE CLASE I DE LA LÍNEA ANDO-NUDE1 GENERADA EN RATONES ATÍMICOS ES UN FENÓMENO REPRODUCIBLE**

Con el objetivo de analizar si el cambio fenotípico producido en la línea ANDO-NUDE1 tras el pase por ratones atímicos era un fenómeno reproducible, se analizó la expresión de las moléculas HLA de clase I en las líneas ANDO-NUDE-2, -3 y -4 obtenidas tras la inyección de ANDO-2 en ratones atímicos.

Las tres líneas ANDO-NUDE 2, 3 y 4 habían perdido la expresión de moléculas HLA de clase I tal y como se mostró con el anticuerpo monoclonal W6/32 (figura 24). Como la línea ANDO-NUDE1, todas las líneas obtenidas de los ratones atímicos presentaron el fenotipo I, e igualmente recuperaron la expresión de las moléculas HLA de clase I cuando se trataron durante 48 horas con IFN- $\gamma$  (Figura 24).

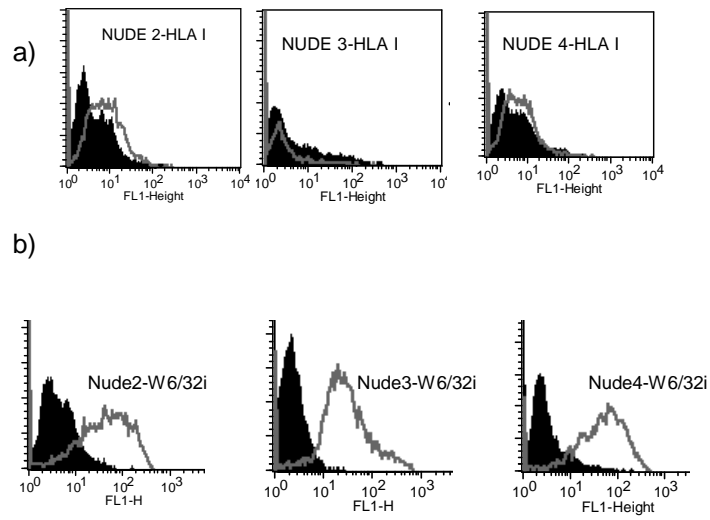


Figura 24.- Fenotipo HLA de las líneas ANDO-NUDE 2,3 y 4. a) Las tres líneas ANDO-NUDE 2, 3 y 4 son negativas para el anticuerpo monoclonal W6/32. b) Recuperación de la expresión de las moléculas HLA de clase I tras el tratamiento con IFN- $\gamma$ . (i) inducción con interferón gamma

**2.6.- LA CUANTIFICACIÓN DE mRNA MEDIANTE PCR A TIEMPO REAL REVELA QUE EL FENOTIPO I EN LAS LÍNEAS ANDO-NUDE SE DEBE A UN DESCENSO COORDINADO DE LA TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES HLA DE CLASE I Y LOS DE LA MAQUINARIA DE PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO.**

**2.6.1. TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES HLA DE CLASE I Y DEL GEN DE LA  $\beta$ 2-MICROGLOBULINA**

En la línea ANDO-2 se observó un desequilibrio en los niveles de transcripción de los genes HLA de clase I por PCR cuantitativa a tiempo real. Los locus B y C alcanzaron un nivel, en relación a la  $\beta$ -actina, superior a 2,5 mientras el locus A presentaba un descenso importante en su mRNA que no alcanzó el nivel de 0,5 (Figura 25).

En las líneas ANDO-NUDE (1-4), se apreció un descenso importante en el nivel de transcripción de los genes HLA de clase I (A, B y C), que fue más acusado para los locus B y C que para el locus A. La reducción para los locus B y C oscilaba entre el 73% para el locus C de la línea ANDO-NUDE3 hasta el 95% para el locus B de la línea ANDO-NUDE4, al compararlos con la línea ANDO-2. En cuanto al locus A presentó una reducción menor, entre el 33-59% en las líneas ANDO-NUDE (1-3) y del 86% en la línea ANDO-NUDE4 (Figura 25, Tabla 9).

Para el gen de la  $\beta$ 2-microglobulina, el nivel de transcripción aumentó para las líneas ANDO-NUDE (2-4) cuando se compararon con la línea original ANDO-2. Este aumento sólo fue estadísticamente significativo para la línea ANDO-NUDE3. La línea ANDO-NUDE1 presentó un descenso del nivel de mRNA para  $\beta$ 2-microglobulina que no era significativo (Figura 26).

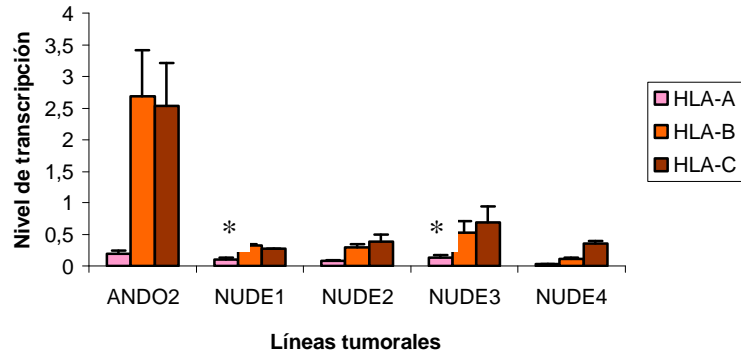


Figura 25.- Transcripción de los genes de HLA de clase I (A,B y C) en las líneas tumorales ANDO-2 y ANDO-NUDE. Se observa un descenso en los niveles de transcripción en las líneas ANDO-NUDE en relación a la línea original ANDO-2,  $p < 0,05$  (t-test). (\*) Las diferencias en los niveles de transcripción no son estadísticamente significativas. Se representa la media y desviación típica de los datos obtenidos en tres ensayos diferentes, en relación con el nivel de transcripción del gen de la beta actina

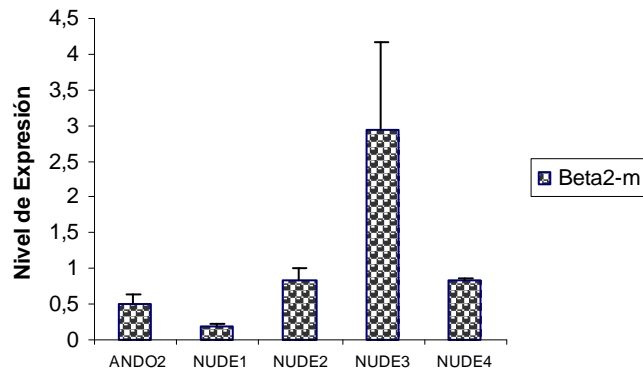


Figura 26.- Transcripción del gen de la  $\beta$ 2-microglobulina en relación con el gen de la  $\beta$ -actina en la línea tumoral ANDO-2 y en las líneas ANDO-NUDE.

### **2.6.2.- TRANSCRIPCIÓN DE LOS GENES DE LA MAQUINARIA DE PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO**

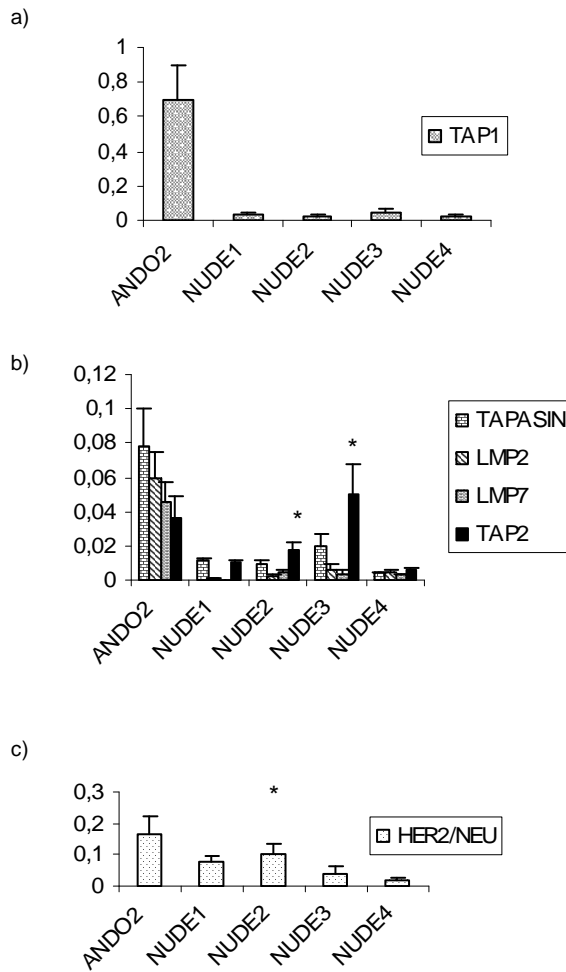
En la línea ANDO-2, el nivel de transcripción de los genes de la maquinaria de procesamiento antigénico fue sensiblemente inferior al de los genes HLA-B y HLA-C. El gen TAP1 alcanzaba un nivel de 0.7 mientras que para los genes TAP2, LPM2, LMP7 y Tapasina la transcripción de mRNA aún fue más baja oscilando sus niveles entre 0.077 y 0.048 (Figura 27a).

En las líneas ANDO-NUDE se produjo un descenso importante en el nivel de transcripción de los genes de la maquinaria de procesamiento antigénico en relación con la línea original ANDO-2 que oscilaba entre el 96% de reducción de TAP1 y el 69% para TAP2 en la línea ANDO-NUDE1. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas salvo en el caso de TAP2 en la línea ANDO-NUDE2 (53% de reducción). Sólo en el caso de TAP2 y en la línea ANDO-NUDE3 se produjo un aumento del 39% en relación a la línea ANDO-2 que no alcanzó significación estadística. (Figura 27b y Tabla 9)

### **2.7 TRANSCRIPCIÓN DEL ONCOGEN HER2/neu**

La línea ANDO-2 mostraba transcripción de mRNA del oncogen HER/neu, aunque a un nivel bajo, inferior a 0.2. Las líneas ANDO-NUDE1, 3 y 4 presentaron una reducción considerable de los niveles de transcripción de HER/neu al compararlas con la línea original ANDO-2, que oscilaba entre el 55% y el 87%. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas. La línea ANDO-NUDE2 mostró una disminución solo del 40% que no alcanzó significación estadística (figura 27c).





**Figura 27.-** Transcripción de los genes del APM y del oncogen HER/neu. a).- Transcripción del gen TAP1. En todas las líneas ANDO-NUDE se observa un descenso de los niveles de transcripción de TAP1 en relación a ANDO-2 ( $p < 0,005$ ). b).- Transcripción de los genes TAP2, LMP2, LMP7 y Tapasina. Todas las líneas ANDO-NUDE presentan una reducción para LMP2, LMP7 y Tapasina como ANDO-NUDE1 y ANDO-NUDE4 para TAP2  $p < 0,05$ ). La línea ANDO-NUDE4 sufre un aumento de transcripción para TAP-2. c).- Transcripción del gen HER2/neu. Las líneas ANDO-NUDE presentan una menor transcripción de HER2/neu que la línea ANDO-2 ( $p < 0,05$ , t-test). Se representa la media y desviación estándar de los datos obtenidos en 3 ensayos diferentes (\*La diferencia no es estadísticamente significativa).

Genes	NUDE1		NUDE2	NUDE3	NUDE4
	C	S			
HLA-A	↓44%	+	↓59%	↓33%	↓86%
HLA-B	↓88%	+	↓89%	↓80%	↓95%
HLA-C	↓89%	+	↓85%	↓73%	↓86%
TAP1	↓97%	-	↓96%	↓94%	↓96%
LMP2	↓99%	-	↓95%	↓91%	↓91%
TAP2	↓69%	-	↓53%	↑39%	↓82%
LMP7	↓99%	-	↓88%	↓91%	↓92%
TAPASINA	↓85%	-	↓87%	↓74%	↓94%
<b>Exp.HLA-I</b>	Negativa		Negativa	Negativa	Negativa

Tabla 9.- Porcentajes de reducción de los niveles de transcripción de los genes del APM y HLA de clase I (A, B y C) en las líneas ANDO-NUDE referidos a la línea original ANDO-2 C: RT-PCR cuantitativa. S: RT-PCR semicuantitativa.

**II) RESPUESTA INMUNOLÓGICA MEDIADA POR LINFOCITOS CD8+  
CITOTÓXICOS FRENTE A LA LÍNEA ANDO-2 DESPUÉS DE  
RECUPERAR LA EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA HLA-A2 POR  
TRANSFECCIÓN GÉNICA**



---

## 1.- RECUPERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA HLA-A2 EN LA LINEA ANDO-2 MEDIANTE TRANSFECCION GENICA

### 1.1.- AMPLIFICACION DEL cDNA PARA HLA-A\*0201

El cDNA para HLA-A\*0201 fue amplificado a partir del inserto contenido en el vector pLNCX del plásmido IHW10003-HLA-A\*0201 proporcionado por Gene Bank (Efi). Se utilizó un cebador situado en la región 5' no codificante al que añadimos una cola de cuatro pares de bases, CACC, que permite la clonación direccional del amplificado en el vector pcDNA3.1. En la figura 28 se muestra el amplificado del cDNA para HLA-A\*0201.

---

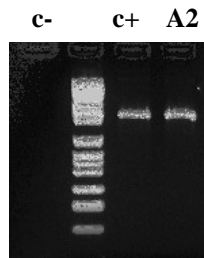


Figura 28.-Amplificación del gen HLA-A\*0201 desde el vector pCLNX.

---

### 1.2.- CLONACION DEL cDNA PARA HLA-A\*0201 EN EL VECTOR pcDNA3.1

El amplificado de cDNA para HLA-A\*0201 fue ligado en el vector de expresión pcDNA3.1 que contiene el promotor del citomegalovirus (CMV) que induce un elevado nivel de expresión del inserto en células de mamífero y el gen de resistencia a neomicina para su selección. Para determinar la orientación y secuencia del inserto, se utilizaron dos

cebadores situados en el vector, T7 en el sentido 5', y BGH en 3'. Para obtener la secuencia completa del gen HLA-A\*0201 utilizamos cuatro cebadores: AS-Fw, situado en el exón 2; ANSA-Bw, situado en el exón 5; vcHLA-Fw, en la región 5' no codificante (5'-UTR) y vcA-Bw, en la región 3' no codificante (3'-UTR) (figura 29).

Los cinco plásmidos obtenidos contienen el inserto del cDNA para A\*0201 sin errores en la secuenciación y con la orientación correcta.

Se seleccionó uno de ellos del que se obtuvo la cantidad necesaria para la transfección celular.

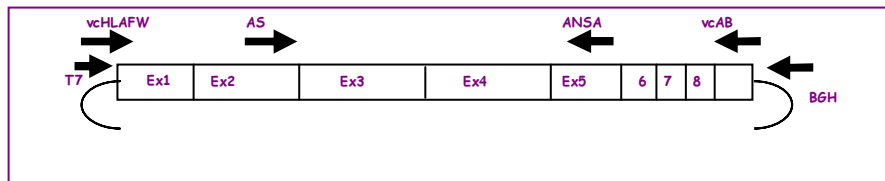


Figura 29.- Estrategia utilizada para la secuenciación de los plásmidos clonados.

### 1.3.- TRANSFECCION DEL cDNA PARA HLA-A\*0201 EN LA LINEA DE MELANOMA ANDO-2

Mediante el uso de liposomas se realizó la transfección estable de la línea tumoral ANDO-2 con el vector de expresión, pcDNA3.1-A2. Las células transfectadas se clonaron mediante dilución límite para evitar la heterogeneidad en cuanto a morfología celular y expresión del gen transfectado. Se obtuvieron varios clones (figura 30a) de los cuales el clon ANDO-T1E3 expresó en superficie niveles altos de la molécula HLA-A2 con un patrón similar al de la línea autóloga ANDO-EBV (figura 30b). La expresión de HLA-A2 aumentó después del tratamiento con IFN- $\gamma$  y con TNF- $\alpha$  en el clon ANDO-T1E3 (Figura 30b). Este clon fue seleccionado para los ensayos de respuesta celular mediada por linfocitos CD8+ citotóxicos.

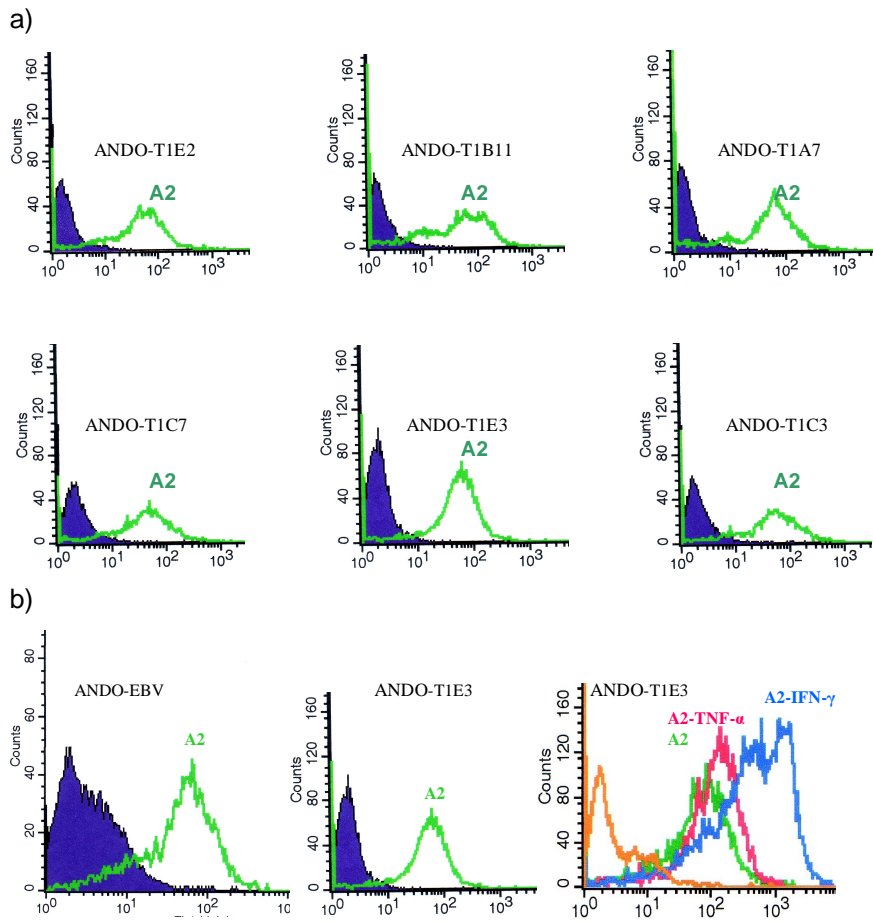


Figura 30.-a) Expresión de HLA-A2 en varios clones derivados de la transfección con pcDNA3.1-A2. b) La expresión de HLA-A2 aumenta en el clon ANDO-T1E3 con el tratamiento de TNF $\alpha$  e IFN- $\gamma$ .

## 2.- LA TRANSFECCION DE HLA-A2 EN LA LINEA ANDO-2 INDUCE UNA RESPUESTA MEDIADA POR LOS LINFOCITOS CD8+ AUTÓLOGOS

### 2.1.- SELECCIÓN DE LOS LINFOCITOS CD8+ DEL PACIENTE ANDO

Los linfocitos CD8+ del paciente ANDO fueron purificados por selección positiva en un citómetro a partir de  $30 \times 10^6$  células mononucleares de sangre periférica (PBMC), obtenidas en el año 1994. Se descartaron los linfocitos con expresión débil de CD8 (células NK). Se obtuvo un rendimiento del 71.34% en la población CD8+ (Figura 31) quedando solo un 5.88% en la población CD8 negativa sin seleccionar (Figura 32).

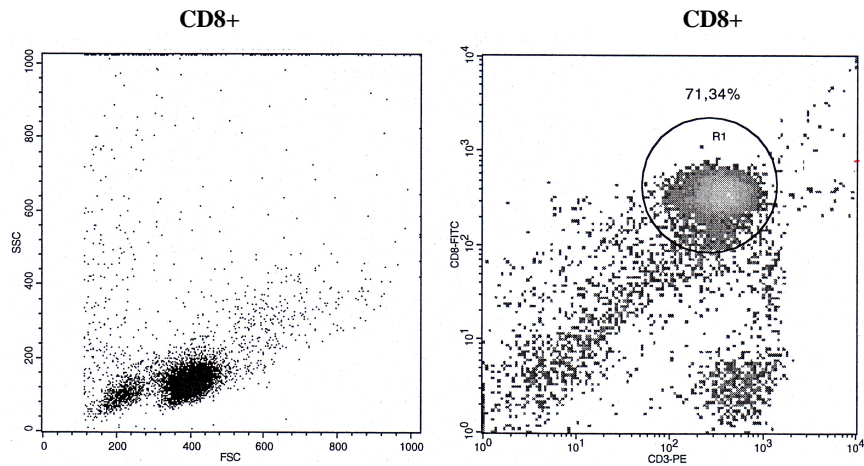


Figura 31.- Selección de CTLs desde los PBMCs. Se obtuvo un elevado porcentaje de las células CD8+ totales (71,34%).



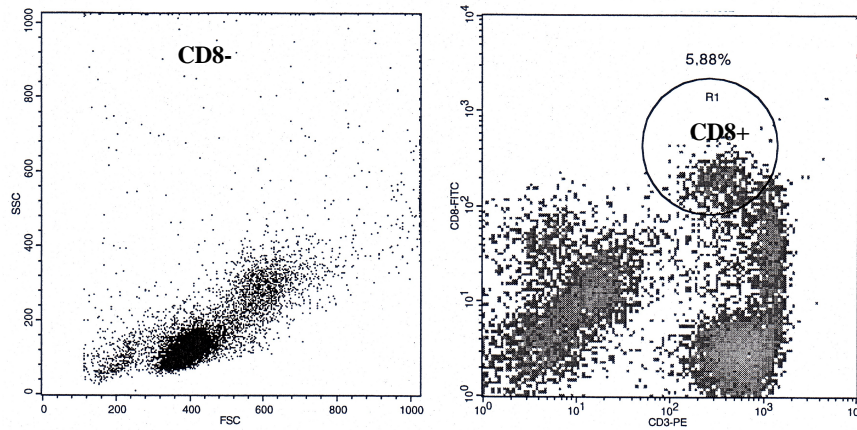


Figura 32.- Selección de CTLs desde los PBMCs. Como se observa en la imagen, en la población de células que no fueron seleccionadas, sólo había un 5,88% de células CD8+.

## 2.2 ESTIMULACION DE LOS CTLs FRENTE AL CLON ANDO-T1E3

Los linfocitos CD8 + se sembraron en placas de 96 pocillos con fondo de V (Nunc) en relación "linfocito:célula tumoral" de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8 y 1:16 (desde 3000 a 180 linfocitos por pocillo) y estimulados con la adición de las células tumorales (3600 en cada pocillo), transfectantes para el gen A\*0201 (ANDO-T1E3), irradiadas (10000 rads-32 min) en un volumen final de 200µl de medio Iscove suplementado con el 10% de suero humano, 100µM de 1-metil-triptófano, 20U/ml de IL-2 y 10ng/ml de IL-7. Un esquema del ensayo se representa en la figura 33. Los microcultivos fueron reestimulados cada semana por la adición del mismo número de células tumorales transfectantes irradiadas y la misma mezcla de citoquinas en 100 µl, retirando previamente 100 µl de sobrenadante.

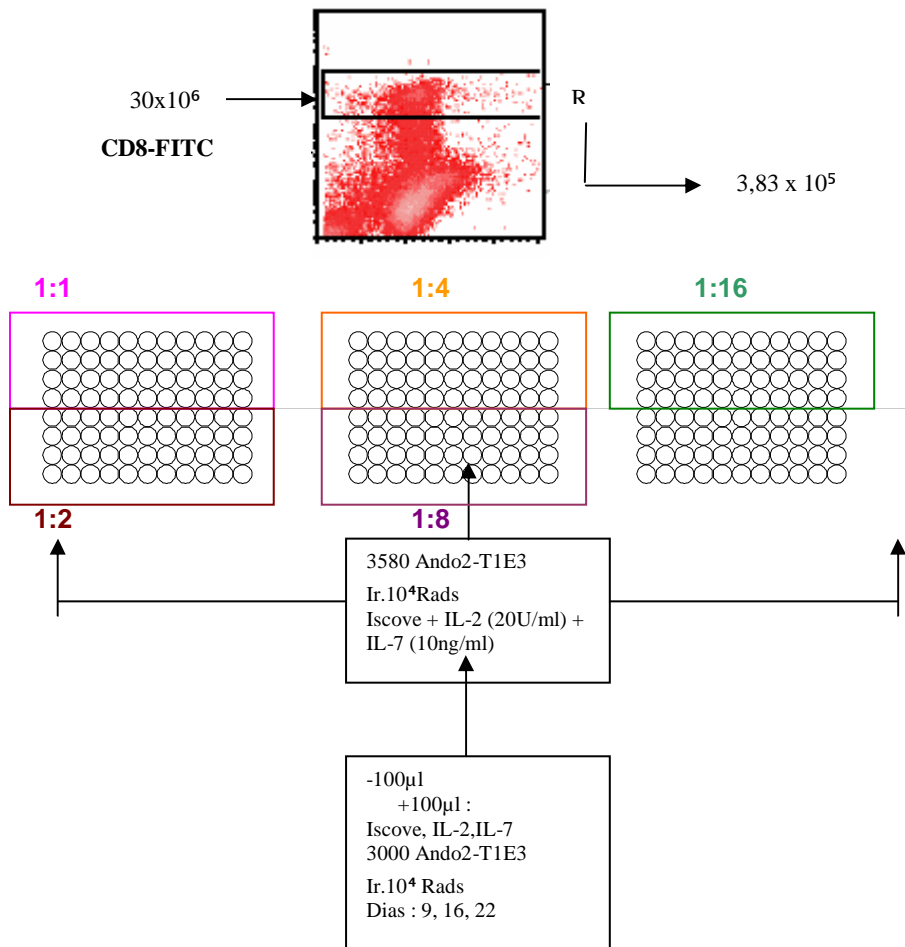


Figura 33.- Esquema de MLTC (mezcla de linfocitos con la célula tumoral).

### 2.3.- FRECUENCIA DE PRECURSORES DE CTLs FRENTE AL CLON ANDO-T1E3

El primer ensayo de lisis se realizó con los linfocitos CD8 + el día 22 post-estimulación. Como células diana se utilizaron (a razón de 1000 células/pocillo), la línea tumoral ANDO2, la línea transfectada con HLA-A\*0201, ANDO-T1E3 (estimuladora de los CTLs), la línea autóloga ANDO-EBV y la línea K562, todas marcadas con  $^{51}\text{Cr}$ . A todos los

pocillos se añadió también la línea K562 en exceso (50000 células / pocillo) y sin marcar para bloquear la actividad NK. En este primer ensayo se obtuvieron 11 microcultivos que lisaban específicamente al clon ANDO-T1E3 y uno que reconocía simultáneamente a las líneas ANDO2 y ANDO-T1E3.

El día 29 post-estimulación se repitió el ensayo de lisis. Se confirmaron los resultados del primer ensayo pero además se detectó un microcultivo adicional específico para ANDO-T1E3 con lo que su número final fue de 12 y surgieron 4 microcultivos específicos solo para la línea ANDO2 (Figura 34 Tabla 10).

CD8+ Células Diana Lisis de microcultivos por dilución límite (%)

		A1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	B1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3192	Ando2cB6.2-t1E3	18	0	0	1	2	7	6	1	9	40	22	1	0	2	0	0	0	0	8	1	0	3	5	4
	Ando2cB6.2	2	9	3	9	3	2	6	0	15	11	4	1	5	8	5	9	6	6	12	9	0	9	10	6
	Ando2-EBV	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K-562	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		E1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	F1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1596	Ando2cB6.2-t1E3	1	0	1	2	0	0	0	0	16	0	17	12	0	0	3	0	0	0	0	0	2	1	0	0
	Ando2cB6.2	4	0	0	4	0	0	1	3	3	6	2	3	1	4	10	2	4	5	7	2	2	7	2	0
	Ando2-EBV	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K-562	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		A1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	B1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
798	Ando2cB6.2-t1E3	0	0	0	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	
	Ando2cB6.2	0	1	0	1	8	0	0	1	0	4	1	1	2	5	1	1	2	4	3	2	8	6	3	1
	Ando2-EBV	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	K-562	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		E1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	F1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
399	Ando2cB6.2-t1E3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	30	0	5	0	0	0	0	0
	Ando2cB6.2	0	0	0	3	2	1	6	1	6	3	12	2	0	0	0	3	11	0	2	2	2	2	3	2
	Ando2-EBV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K-562	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		C1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	D1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3192	Ando2cB6.2-t1E3	5	0	0	0	27	3	20	1	1	5	5	6	0	0	0	7	0	0	8	12	4	7	7	1
	Ando2cB6.2	6	0	10	9	7	8	15	9	3	21	5	6	4	6	6	4	5	10	5	6	20	6	13	1
	Ando2-EBV	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	0	0	2	3	0	0	0
	K-562	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		G1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	H1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1596	Ando2cB6.2-t1E3	0	0	16	2	0	1	5	2	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	12	2	0
	Ando2cB6.2	7	0	5	12	5	2	8	2	7	8	3	0	4	3	3	0	1	0	5	4	1	2	2	0
	Ando2-EBV	3	0	1	0	0	0	0	0	4	1	0	2	0	0	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0
	K-562	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0
		C1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	D1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
798	Ando2cB6.2-t1E3	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ando2cB6.2	6	4	3	1	3	8	5	1	0	2	5	1	1	2	3	9	2	3	0	3	4	0	3	
	Ando2-EBV	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	99	0
	K-562	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		G1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	H1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
399	Ando2cB6.2-t1E3	0	0	1	2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ando2cB6.2	6	1	1	0	2	1	0	4	3	3	2	0	0	1	2	9	1	0	1	1	0	1	2	0
	Ando2-EBV	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	K-562	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

**Figura 34.-** Ensayo de lisis de los linfocitos CD8+ estimulados con el clon ANDO2-T1E3. En recuadros de color naranja aparecen los porcentajes de lisis de los microcultivos específicos frente a ANDO2-T1E3 que cumplen los tres criterios de lisis de ANDO-T1E3 >10%, relación de lisis de ANDO-T1E3/ lisis de ANDO-2 igual o superior a 3 y lisis inferior al 5% frente a las líneas ANDO-EBV y K562. En azul se marcan los porcentajes de lisis del pocillo donde existe lisis simultánea para ANDO2 y ANDO-T1E3. Se analizaron 250 microcultivos en cada ensayo y se muestran los resultados obtenidos en 192 pocillos contiguos.

Ensayo	microcultivos	células efectoras	microcultivos positivos	microcultivos negativos	%lisis negativa
1	48	3192	5	43	43/48
2	48	3192	5	43	43/48
1	48	1596	5	43	43/48
2	48	1596	5	43	43/48
1	48	798	0	48	48/48
2	48	798	1	47	47/48
1	48	399	1	47	47/48
2	48	399	1	47	47/48

**Tabla 10.-** Resultados obtenidos en los dos ensayos de lisis. Los microcultivos en los que hubo lisis específica para la línea transfectante fueron considerados positivos. Se consideraron negativos los pocillos donde la lisis no fue específica para la línea transfectante, en los que hubo lisis de la línea transfectante y de la línea parental ANDO-2.

La frecuencia de precursores de CTL (CTLp) anti-T1E3 (Figura 35) fue de  $1/16154$  ( $6,2 \times 10^{-5}$ ) de los linfocitos CD8 recogidos en mayo de 1994.

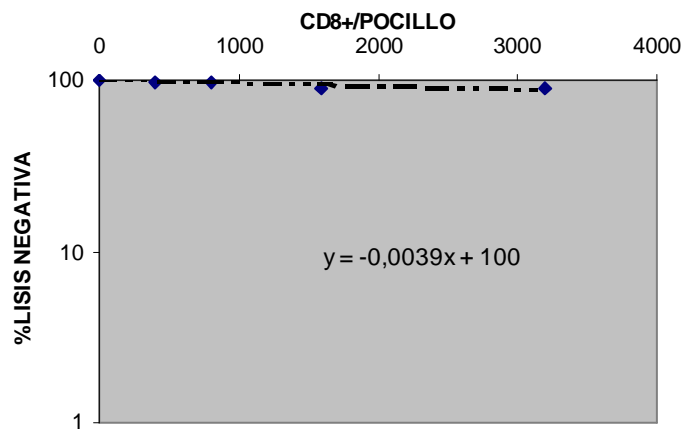


Figura 35.- Análisis de CTLp anti-ANDO-T1E3. A partir de la proporción de pocillos negativos frente a cada concentración de célula respondedora se puede determinar el número de precursores CTLs en la población original, de acuerdo al método estándar (Taswell et al. 1981). Los valores de frecuencia se determinaron desde el número de células en el cual el 37% de los pocillos fue negativo, usando el método del máximo de verosimilitud (khanna R et al. 1998).



**III) RELACION ENTRE LA CAPACIDAD ONCOGENICA Y LA  
EXPRESION DE MOLECULAS HLA TRAS LA INYECCIÓN DE LA  
LINEA ANDO2 EN RATONES ATÍMICOS (NU/NU)**





## 1.- ENSAYO DE CRECIMIENTO EN RATONES NUDE (NU/NU) DE LAS LÍNEAS TUMORALES ANDO-2, ANDO-NUDE Y ANDO-T1E3

En el modelo experimental ANDO-2 hay tres tipos de líneas diferentes en cuanto a la expresión de moléculas HLA de clase I. La línea ANDO-2 que presenta un fenotipo II, por la ausencia de un cromosoma 6 completo, la línea ANDO-2 transfectada con el gen A\*0201 (ANDO-T1E3) y la línea ANDO-NUDE que presenta un fenotipo I, por la falta global de expresión de moléculas HLA de clase I. Para valorar la influencia de la expresión en superficie de moléculas HLA en la capacidad oncogénica de las líneas tumorales, se seleccionaron 3 grupos de 5 ratones atímicos, nu/nu y se inyectaron a nivel subcutáneo  $5 \times 10^6$  células ANDO-2, ANDO-T1E3 y ANDO-NUDE. El crecimiento tumoral fue seguido cada dos días y cuando alcanzaron 7-10 mm de diámetro, los tumores se extirparon.

La línea ANDO-NUDE, aunque comenzó a crecer más tarde, a los 15 días post-inyección ya había alcanzado unos 4 mm de diámetro y a los 40 días post-inyección presentaba un diámetro de 9 mm (figura 36).

La línea ANDO-2 dio origen a un tumor a los 10 días de la inyección que alcanzó un tamaño máximo de unos 4 mm a los 15 días, a partir del cual se observó un período de unos 10 días, entre el día 15 y 25 post-inyección en el que crecía lentamente. Tras este período de adaptación creció rápidamente, alcanzando los 9 mm de diámetro en el día 58 post-inyección (figura 36).

La línea ANDO-T1E3 durante los 10 primeros días dió origen a una tumoración que llegó a tener un tamaño de 4 mm de diámetro, pero después de forma progresiva y lenta empezó a regresar, siendo totalmente rechazada a los 60 días post-inyección (figura 36).

Aunque la línea ANDO-NUDE tardó más tiempo en empezar a crecer no presentó el periodo de adaptación, de unos 10 días, observado en las líneas ANDO-2 y ANDO-T1E3, por lo que su progresión fue más rápida, alcanzando en tan solo 40 días 9mm de diámetro. La línea ANDO-NUDE presentó mayor capacidad oncogénica que ANDO-2 y ANDO-T1E3.

La expresión de moléculas HLA implica una menor capacidad oncogénica, tal y como se observa en la figura 36.

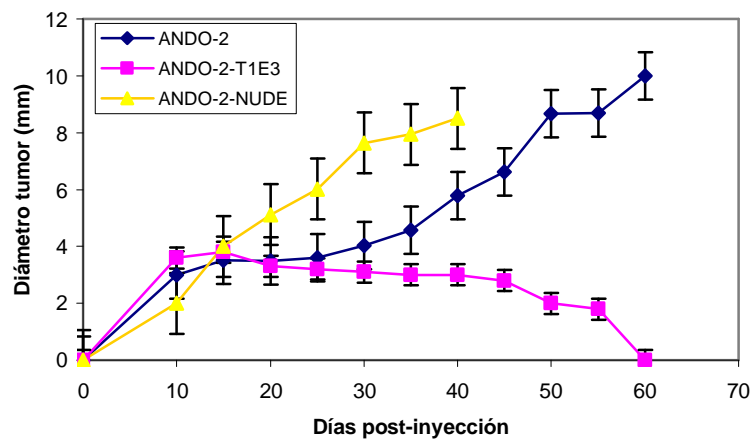


Figura 36.- Crecimiento de la línea ANDO-NUDE comparado con el de las líneas tumorales ANDO-2 y ANDO-T1E3. La línea ANDO-NUDE empieza a crecer más tarde que las otras dos líneas tumorales pero la progresión del tumor es mucho más rápida por lo que esta línea es más tumorigénica que las otras.

**DISCUSIÓN**

---



El desarrollo y establecimiento de un tumor sigue un proceso de varias etapas en las que a partir de una célula con mayor capacidad proliferativa, se van generando variantes, por acúmulo de lesiones moleculares, que presentan mayor capacidad invasiva y resistencia a la respuesta del sistema inmunológico (Vogelstein & Kinzler 1993). Las células tumorales durante su progresión presentan alteraciones en la expresión de las moléculas HLA de clase I siendo éste uno de los mecanismos de escape al sistema inmunológico más frecuentes (Garrido et al. 1993). Las pérdidas de expresión de las moléculas HLA de clase I se relacionan con un proceso de inmunoselección por parte de los linfocitos T CD8+ que eliminan a aquellas células tumorales que presentan péptidos antigénicos inmunodominantes a través de alelos HLA de clase I (Garrido et al. 1997). Las alteraciones en la expresión de moléculas HLA suponen una barrera para las vacunas antitumorales basadas en péptidos antigénicos presentados por las moléculas HLA de clase I al TCR de los linfocitos CD8+.

En nuestro estudio, la línea ANDO-2 derivada de una metástasis en ganglio supraclavicular izquierdo, fue hemicigota para los genes HLA de clase I y clase II mediante tipaje genómico, al compararla con la línea autóloga ANDO-EBV. Mediante el uso de 7 marcadores microsatélites que mapean en el cromosoma 6, tanto en 6q como 6p, se ha mostrado que la línea ANDO-2 ha perdido un cromosoma 6 completo (figura 18). La línea ANDO-2 expresa en superficie las moléculas HLA de clase I correspondientes al haplotipo retenido mientras que la expresión de las moléculas HLA de clase II fue negativa (figura 17). La retención de un haplotipo HLA y la pérdida de otro es un marcador de clonalidad en un elevado porcentaje de tumores (Schreiber et al. 2002).

La pérdida de haplotipo de los genes HLA de clase I es una de las alteraciones más frecuentes de genes relacionados con la función inmunológica y representa el principal mecanismo por el cual las células tumorales escapan al control del sistema inmunológico (Bodmer et al. 1993; Torres et al. 1996; Cabrera et al. 2003). La LOH en la región HLA de clase I

que da lugar al fenotipo II (Garrido et al. 1997), se encuentra en un elevado porcentaje de tumores de diferente histología: en el 46% de carcinomas de cervix, 36% de carcinomas de cabeza y cuello, 24% de carcinoma colorrectal, el 14% de carcinomas de mama y el 10% de melanomas (Feenstra et al. 1999; Jiménez et al. 1999; Maleno et al. 2002; Maleno et al. 2004; Rodríguez et al. 2005). Este fenotipo está causado por la pérdida de fragmentos de DNA genómico debido a la segregación cromosómica, la no-disyunción o la recombinación mitótica en el brazo corto del cromosoma 6 (Feenstra et al. 1999).

La pérdida de un haplotipo HLA en la línea ANDO-2, generada en este caso por la delección de un cromosoma 6 completo supone una lesión molecular irreversible y tiene varias consecuencias biológicas. El repertorio de péptidos antigénicos presentados por las moléculas HLA de clase I quedaría reducido a la mitad y por tanto también su capacidad para estimular a los linfocitos T CD8 citotóxicos. La pérdida de expresión de las moléculas HLA de clase I induciría una menor activación de las células CD8+, facilitando de este modo el crecimiento del tumor. Los genes TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7 se encuentran en la región HLA de clase II y también son polimórficos (McCluskey et al. 2004). La delección de un haplotipo HLA también supondría una reducción en la capacidad de procesamiento y transporte de péptidos antigénicos desde el citosol al retículo endoplásmico que afectaría al reconocimiento de los linfocitos CD8+.

Los genes MICA y MICB se localizan también en la región 6p21.3 dentro del sistema HLA. Estas moléculas son ligandos de receptores activadores en células NK (Bauer et al. 1999), células T  $\gamma\delta$  (Groh et al. 1998) y células T CD8+  $\alpha\beta$  (Groh et al. 2001). En modelos murinos, se ha mostrado que la expresión ectópica de la proteína RAE-1 (el homólogo en ratón de la familia de genes MIC) activa a las células NK para lisar las células tumorales que expresan las moléculas MHC de clase I en superficie (Cerwenca et al. 2001; Lanier 2001). La ausencia de expresión de los genes MICA y MICB de un haplotipo HLA en células tumorales con fenotipo II,

disminuye la capacidad para activar a las células del sistema inmunológico en situaciones de estrés.

Teniendo en cuenta el polimorfismo del sistema HLA se planteó la hipótesis de "la ventaja del individuo heterocigoto" que establece que en individuos heterocigotos se genera una respuesta inmunológica más efectiva frente a las infecciones, cuando se compara con la respuesta generada en individuos homocigotos. Este hecho se muestra en individuos infectados por VIH, en los que se observó una rápida progresión a SIDA en pacientes homocigotos para HLA (Dean et al. 2002).

El estudio de pérdida de heterocigosidad (LOH) en tumores humanos ha permitido identificar zonas calientes que sufren deleciones con elevada frecuencia y en las que se ha comprobado la existencia de genes supresores de tumor. La LOH podría ser utilizada como un mecanismo general para eliminar estos genes como paso previo al desarrollo del tumor (Atkin 1989). En el melanoma maligno se ha establecido un esquema de progresión tumoral basado en las pérdidas de material genómico en los cromosomas 1, 6, 9 y 10 (Poetsch et al 2003). La lesión más precoz y más frecuente que se encuentra en todas las etapas del melanoma es la deleción de la región 9p21 que aparece en los nevus común y displásico (Casorzo et al 2005). En los melanomas en fase de crecimiento radial junto a la LOH de 9p21 se detectan también pérdidas genómicas en 6q24.1 y 10q23.1 y en los melanomas en fase de crecimiento vertical se incrementan los porcentajes de LOH para estas tres regiones cromosómicas y surge la LOH para la región 1p36. También se ha encontrado una polisomía para el cromosoma 7 tanto en la fase radial como en la vertical del melanoma maligno (Casorzo et al. 2005).

La capacidad metastásica de los melanomas se ha relacionado con la pérdida de un cromosoma 6 o de la región del brazo largo comprendida entre 6q11 y 6q25. Varios genes han sido propuestos como candidatos de la acción supresora de las metástasis: el gen SOD2 que codifica para la manganeso superóxido dismutasa, localizado en 6p25 (Church et al. 1993),

el gen THW que pertenece a la familia de PMP22/gas3 de proteínas plasmáticas (Hidebrandt et al. 2001) y sobre todo el gen CRSP3 también denominado DRIP130 (receptor de vitamina D que interacciona con una proteína de 130Kd). Este gen se localiza en la región 6p16.3-q23 junto al marcador D6S457 y fue aislado tras la introducción de un cromosoma normal en líneas de melanoma lo que provocaba una reducción en su potencial metastático (Goldberg et al. 2003). El gen CRSP3 es un factor de transcripción que regula los niveles de expresión de TXNIP/VDUP1 (Thioredoxin binding protein) y de KISS1. El gen KISS1 codifica para un precursor de un neuropéptido denominado metastina que es el ligando del receptor unido a proteína G hGPR54 y que reduce la producción de metástasis de las líneas de melanoma. En la región 6p se localiza el gen AP2 alfa que también se considera como un gen supresor de tumor (Goldberg et al. 2003).

La línea ANDO-2 obtenida a partir de una metástasis ganglionar ha perdido un cromosoma 6 lo que le confiere capacidad invasiva, al perder genes supresores de metástasis y además reduce su potencial antigénico al perder alelos de HLA de clase I, de la maquinaria de procesamiento antigénico y de MICA y MICB.

El desgaste de los telómeros es la alteración genética más temprana y es la responsable de la inducción de aneuploidía, característica principal de todos los tumores sólidos. Los telómeros protegen a los cromosomas de la desintegración, fusión de los extremos y mantienen la integridad genómica durante las divisiones de células somáticas, ejerciendo un papel clave en el envejecimiento celular. El desarrollo de cáncer y la senectud están ligados ya que el cáncer se constituye como un conjunto de alteraciones genéticas complejas que se originan en las células senescentes en las que está implicado el desgaste de los telómeros. Los telómeros no funcionales son susceptibles de recombinación induciendo a la generación de cromosomas dicéntricos. Durante las divisiones celulares, las alteraciones cromosómicas originan la ruptura de los puentes de fusión y



pueden dar lugar a la pérdida de heterocigosidad (LOH) y a la amplificación génica (Pathak & Multan 2006).

En este estudio hemos caracterizado el crecimiento y la capacidad oncogénica de la línea de melanoma humano ANDO-2 tras la inyección subcutánea en la pata de ratones atímicos. La línea ANDO-2 fue oncogénica, sin dar lugar a metástasis, tras la inyección subcutánea. Cuando el tumor alcanzó unos 10mm de diámetro, se extirpó y adaptó a cultivo denominando a estas nuevas líneas, ANDO-NUDE1, -2, -3 y -4. Se estudió la expresión de las moléculas HLA de clase I y clase II en las líneas ANDO-NUDE y se observaron dos diferencias fenotípicas al compararlas con la línea de melanoma ANDO-2: a) las líneas tumorales ANDO-NUDE expresaban en superficie las moléculas HLA de clase II (figura 20); b) las líneas ANDO-NUDE mostraron una pérdida completa de antígenos HLA de clase I en superficie (figura 20). Es la primera vez que se describe el cambio de fenotipo, en cuanto a la expresión de moléculas HLA en superficie, de una línea tumoral tras su paso por ratones nude.

La expresión de antígenos HLA de clase II es una característica fenotípica de las células de melanoma maligno tanto en los tumores primarios (Broker et al. 1984) como también en las metástasis (Ruiter et al. 1984) y se ha considerado un marcador de mal pronóstico (Ostmeier et al. 2001). En condiciones fisiológicas y en células normales la expresión de HLA de clase II está restringida a células presentadoras de antígeno (APC) como células dendríticas, macrófagos y linfocitos B (Glimcher et al. 1992). Las moléculas HLA de clase II presentan péptidos procedentes del procesamiento exógeno de antígenos realizado en el fagolisosoma a los linfocitos CD4+. Durante un proceso inflamatorio las moléculas HLA de clase II se pueden inducir en células tisulares y en fibroblastos del mesénquima por la acción del interferón gamma.

La expresión constitutiva de HLA de clase II en líneas de melanoma maligno humano se debe a la presencia de dos isoformas del

transactivador de HLA de clase II, la isoforma de los linfocitos B (B-CIITA) que alcanza un nivel muy elevado (Deffrennes et al. 2001) y la isoforma de los fibroblastos (F-CIITA) (Barbieri et al. 2002). La actividad de los transactivadores de clase II en líneas de melanoma se reduce a la expresión de HLA de clase II y no está implicada en la progresión tumoral de forma directa (Baton et al. 2004).

Las células de melanoma presentan por las moléculas HLA de clase II péptidos antigénicos a los linfocitos CD4+ (Manici et al. 1999; Zeng et al. 2000) pero al carecer de moléculas coestimuladoras (CD80 o CD86) inducen anergización de las células CD4+ efectoras y por tanto tolerancia (Becker et al. 1993; Takahashi et al. 1995).

La expresión de HLA de clase II (HLA-DR y HLA-DQ) se produce de forma estable en la línea ANDO-NUDE y coincide con la pérdida de expresión de HLA de clase I. La línea ANDO-2 con fenotipo II, que implica la pérdida de haplotipo, pasó a fenotipo I por la pérdida total de expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I. Este fenómeno ocurrió *in vivo* ya que la línea de melanoma ANDO-2 mantenida *in vitro* tras múltiples pases no mostró ninguna disminución de la expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I.

La pérdida total de antígenos HLA de clase I en tumores humanos o líneas celulares se ha correlacionado con la pérdida de expresión y/o función de la  $\beta$ 2-microglobulina, debido a mutaciones que afectan al gen de la  $\beta$ 2-microglobulina (Benítez et al. 1998; Perez et al. 1999) y que afectan a la expresión de todas las moléculas HLA de clase I (Seliger et al. 2002; Paschen et al. 2003). Otro de los mecanismos implicados en la ausencia de expresión de moléculas HLA de clase I es la supresión de la transcripción de genes HLA ya sea por la presencia de silenciadores (Coral et al. 1999) o fenómenos epigenéticos como la hipermetilación (Serrano et al. 1996) y/o alteración de la estructura de la cromatina nuclear y de los promotores de los genes de la cadena pesada de HLA de clase I (Nie et al. 2001). Estas alteraciones se caracterizan por su resistencia a IFN- $\gamma$ . El descenso de la

expresión de los genes de la maquinaria de procesamiento antigénico es otro de los mecanismos que ocasionan la pérdida total de expresión de moléculas HLA de clase I, que se caracteriza por la reversibilidad de la alteración tras tratamiento con IFN- $\gamma$  (Ritz et al. 2001; Cabrera et al. 2003; Romero et al. 2005).

Para estudiar el mecanismo implicado en la pérdida completa de expresión de moléculas HLA de clase I, comenzamos con el análisis del nivel transcripcional de los genes de  $\beta$ 2-microglobulina y de los genes para las cadenas pesadas de HLA de clase I. Por RT-PCR semicuantitativa, el nivel de transcripción de la  $\beta$ 2-microglobulina en la línea ANDO-NUDE1 fue similar al observado en la línea ANDO-2 (figura 22). Mediante el análisis por RT-PCR cuantitativa a tiempo real, se observó que los niveles de mRNA de la  $\beta$ 2-microglobulina fueron similares en las líneas tumorales, ANDO-2 y ANDO-NUDE, incluso la línea ANDO-NUDE3 mostró niveles superiores de expresión (figura 26). Sólo la línea ANDO-NUDE1 mostró una reducción del nivel de transcripción aunque no fue significativa, indicando que la ausencia de expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I no se debía a un defecto en la transcripción del gen de la  $\beta$ 2-microglobulina. El estudio del nivel de mRNA de los genes para las cadenas pesadas en la línea ANDO-NUDE1 no mostró diferencias apreciables respecto al nivel de transcripción observado en la línea ANDO-2 por RT-PCR semicuantitativa (figura 22). Sin embargo, el estudio de los niveles de transcripción por RT-PCR a tiempo real mostró una nueva alteración en la línea ANDO-2, que consistía en un desequilibrio entre los distintos locus de HLA de clase I (figura 25). La línea original ANDO-2 presentó un descenso importante en el nivel de transcripción de mRNA del gen HLA-A en relación a los niveles mostrados por los genes HLA-B y HLA-C. Sin embargo, el nivel tan débil de transcripción del gen HLA-A en la línea ANDO-2 no impidió su expresión en la membrana celular, aunque fue también más baja que la mostrada por los otros genes, HLA-B y HLA-C. Este desequilibrio en el patrón de expresión de los distintos locus HLA de clase I se ha observado en otros modelos

experimentales. HLA-B se expresa a elevados niveles en células B de cordón umbilical transformadas con EBV, HLA-C se expresa a un nivel superior que los genes HLA-A y HLA-B, en células de linfoma Raji, leucemia K562, células de carcinoma HeLa y en células normales endoteliales en cultivo, y HLA-A se expresa a elevados niveles en líneas linfoblastoides B, JY y Pala (Jonson 2000). Los diferentes patrones de expresión de los genes HLA de clase I pueden deberse a que cada locus se transcribe en proporciones distintas o a que la estabilidad de los transcritos es también variable. Se han descrito promotores locus-específicos y el procesamiento de mRNA de cada locus está regulado de forma independiente (McCutcheon et al. 1995; Girdlestone et al. 1993). La expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I no se correlaciona con el nivel de transcripción de cada locus individual HLA de clase I (Jonson 2000). La relación entre el nivel de mRNA de HLA de clase I y la expresión de proteína es específica de cada alelo, y está condicionada por su interacción con los péptidos generados por los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM) (Peh et al. 1998; Cabrera et al. 2005). Dependiendo de la fase funcional de la célula, los péptidos pueden controlar la maduración y estabilidad (vida media) de las moléculas de HLA de clase I (Benham et al. 1998).

Las líneas tumorales ANDO-NUDE, presentaron un descenso en los niveles de transcripción de los genes HLA-B y HLA-C, estadísticamente significativa, al compararlos con los niveles transcripcionales de dichos genes en la línea de melanoma ANDO-2. El nivel de los genes HLA-A no mostró un descenso tan acusado en las líneas ANDO-NUDE al compararlo con los niveles de transcripción en la línea ANDO-2. Sólo las líneas ANDO-NUDE2 y ANDO-NUDE4 presentaron una disminución estadísticamente significativa del nivel de expresión del gen HLA-A (figura 25).

A pesar de que existe un descenso en los niveles transcripcionales de los genes para las cadenas pesadas en las líneas ANDO-NUDE, este descenso no explica la ausencia de expresión en superficie de las

moléculas HLA de clase I o al menos no debe ser el único mecanismo responsable de la ausencia de expresión.

Debido a la reversibilidad del fenotipo en las líneas ANDO-NUDE tras el tratamiento con IFN- $\gamma$ , que permitió la recuperación en superficie de las moléculas HLA de clase I (figura 20 y 24), decidimos analizar si los genes de la maquinaria de procesamiento antigénico estaban implicados. Mediante RT-PCR semicuantitativa no se detectó expresión de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico: TAP1, TAP2, LMP2, LMP7 y Tapasina en la línea ANDO-2-NUDE1 en condiciones basales (figura 23). Tras el tratamiento con IFN- $\gamma$ , se observó transcripción de todos los genes del APM analizados y se acompañó de la expresión de las moléculas HLA de clase I en superficie (figura 23). Por tanto, el cambio fenotípico de ANDO-2 tras su pase por ratones atímicos, de fenotipo II a fenotipo I, se debía principalmente a un descenso coordinado de los genes que forman parte de la maquinaria de procesamiento antigénico, genes que son esenciales para el transporte y ensamblaje en la membrana celular de los complejos péptido-HLA-I. El análisis de los genes de la maquinaria de procesamiento antigénico, a nivel cuantitativo permitió establecer diferencias significativas en los niveles de expresión (figura 27). TAP1 presentaba elevados niveles de expresión en la línea de melanoma ANDO-2 pero en las líneas tumorales ANDO-2-NUDE presentó un fuerte descenso, estadísticamente significativo ( $p < 0,005$ ), del nivel de transcripción. También se observó una disminución de los niveles de transcripción del resto de componentes del APM analizados aunque el nivel de mRNA de estos genes en la línea ANDO-2 era menor que el del gen TAP1.

Las alteraciones en la expresión de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM) se han identificado en varios tumores humanos: carcinoma de cervix (Ritz et al. 2001), melanoma cutáneo (Kageshita et al. 1999), carcinoma de mama (Kaklamanis et al. 1995), cáncer de pulmón (Korkolopoulou et al. 1996), cáncer de colon (Kaklamanis et al. 1994; Cabrera et al. 2003) y cáncer de vejiga (Romero et

al. 2005) y están asociadas normalmente con un descenso en los niveles de transcripción de las cadenas pesadas de los genes HLA de clase I y  $\beta$ 2-microglobulina,. A diferencia de lo descrito en los casos anteriores, en el modelo ANDO-2, el descenso del APM y de las cadenas pesadas no se acompaña de la disminución del gen de la  $\beta$ 2-microglobulina. También se ha observado en líneas tumorales humanas de origen epitelial en las que se mostró la disminución de los componentes TAP, LMP y cadenas pesadas sin detectarse el descenso de los niveles de  $\beta$ 2-microglobulina (Delp et al. 2000). El mismo resultado se ha observado en tumores murinos inducidos por carcinógenos químicos en los que la ausencia de expresión de moléculas de MHC de clase I se debía a la disminución coordinada de varios de los genes de la maquinaria de procesamiento antigénico pero no se observó la disminución en los niveles de  $\beta$ 2-microglobulina (Seliger et al. 2000; García-Lora et al. 2003).

Las variaciones detectadas entre los distintos tumores para los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico se pueden deber a la inmunobiología de cada tumor y al estado de proliferación de los tumores analizados (Seliger et al. 2000). En nuestro estudio, mostramos que una disminución coordinada del nivel de transcripción de todos los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico y de las cadenas pesadas HLA de clase I se traduce en la ausencia de expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I en las líneas tumorales ANDO-NUDE. El tratamiento con IFN- $\gamma$  originó el aumento en los niveles de transcripción de los genes permitiendo la recuperación de la expresión de las moléculas HLA de clase I. Se ha postulado que la proteína geranylgeranyl transferasa (GGT), está implicada en el control negativo de la vía de activación génica, incluyendo a TAP1 (Cramer et al. 2000), iniciada tras la unión del IFN- $\gamma$  a sus receptores en la membrana celular (Tilkin-Mariamé et al. 2005).

En las líneas ANDO-NUDE la disminución en el nivel de TAP1 fue más acusada que la del resto de genes que constituyen la maquinaria de

procesamiento antigénico. La disminución o pérdida de la expresión del gen TAP1 se ha encontrado en muchos tumores con frecuencias que van desde el 10 al 84% (Restito et al. 1993). El carcinoma de cervix (Cromme et al. 1994) y el melanoma (Seliger et al. 2001) son los tumores que pierden con mayor frecuencia TAP1 (>50%). Los mecanismos que originan la disminución de TAP1 en los tumores no se conoce bien. En un estudio reciente se ha mostrado que la deficiencia de TAP está causada por la pérdida de activación o expresión de activadores transcripcionales de TAP1, necesarios para la unión óptima del complejo de la RNA pol II al promotor de TAP1, o por la presencia de inhibidores transcripcionales que impiden su unión, y por la disminución de la estabilidad del mRNA de TAP1 (Setiadi et al. 2005). Se ha descrito también la relación entre deficiencias de TAP1 y LMP2 en carcinoma de mama, melanoma y carcinoma renal (Vitale et al. 1998; Kageshita et al. 1999a; Seliger et al. 2003); esta asociación se puede explicar porque ambos genes comparten el mismo promotor. Este promotor es bidireccional, se localiza entre los dos genes e incluye cinco regiones reguladoras en cis: SP1, ICS-1, ICS-2, GAS y CREB (Wright et al. 1995). En nuestro trabajo también observamos esta asociación, en todas las líneas ANDO-2-NUDE se produce una fuerte disminución, estadísticamente significativa, en los niveles de transcripción de LMP2, aunque el nivel de transcripción de LMP2 en la línea ANDO-2 es menor que el de TAP1 (figura 27). A diferencia de TAP1, el nivel de expresión del gen TAP2 aunque disminuyó en todas las líneas tumorales ANDO-NUDE, sólo en dos de ellas se mostró una disminución significativa en relación a la línea ANDO-2. TAP2 se ha estudiado en carcinoma de mama y en melanoma con un patrón heterogéneo de expresión y una frecuencia de baja expresión que oscila entre el 13 y 64% (Vitale et al. 1998).

El descenso en la expresión de componentes del APM en lesiones malignas, y la frecuente relación con la ausencia de expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I, tiene implicaciones clínicas. El descenso en la expresión de TAP en carcinoma de mama, carcinoma cervical y

melanoma se ha asociado con la progresión de la enfermedad (Khanna 1998; Hicklin et al. 1999). También en melanoma se ha asociado con un menor tiempo de progresión de la enfermedad y una menor supervivencia (Kageshita et al. 1999).

Existen varios trabajos en los que se establece una relación entre los componentes del APM y la expresión de HER2/neu en tumores. Nijman y colaboradores han mostrado un descenso de expresión de los genes de HLA de clase I y  $\beta$ 2-microglobulina en pacientes con carcinoma de ovario, positivo para HER2/neu, pero no pudieron establecer una correlación entre el nivel de HLA y la expresión de HER2/neu (Nijman et al. 2001). Hermann y colaboradores observaron la pérdida de actividad de los genes TAP en carcinoma de mama que expresaba HER2/neu y postularon una posible asociación entre la expresión del oncogen HER2/neu y una deficiente función y expresión del APM (Herrmann et al. 2004). En otro estudio se observó el aumento de expresión en superficie de los genes HLA de clase I tras el tratamiento de dos líneas tumorales, de pulmón y ovario, con HER2siRNA (small interfering RNA), sugiriendo que HER2/neu estaba directa o indirectamente implicado en la expresión en superficie de los genes HLA de clase I (Choudhury et al. 2004). De esta forma, los tumores con expresión de HER2/neu podrían escapar al control del sistema inmunológico por la ausencia de expresión de moléculas HLA de clase I. Nuestros resultados fueron opuestos a los observados por estos autores. HER2/neu se expresaba en la línea ANDO-2 pero disminuyó su expresión en las líneas ANDO-NUDE. Sólo una línea ANDO-NUDE no mostró una bajada en el nivel de mRNA estadísticamente significativa al compararla con la línea ANDO-2. Existió una correlación directa entre la expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I y HER2/neu, no observándose la sobreexpresión de HER2/neu en estas líneas de melanoma ANDO-2-NUDE (figura 27). Los melanocitos humanos no expresan HER2/neu, pero existe una gran controversia en la literatura en cuanto a la expresión del oncogen HER2/neu en melanomas (Fink-Puches et al. 2001; Eliopoulos et al. 2002;



Inman et al. 2003); con una expresión de entre el 2,5% (Persons et al. 2000) al 75% (Natali et al. 1994) en muestras de melanoma. Parece ser que HER2/neu se sobreexpresa en líneas de melanoma pero su prevalencia en tumores sólidos es muy baja, siendo más frecuente en tumores cutáneos primarios que en muestras metastásicas (Kluger et al. 2004).

También se ha mostrado en carcinoma de mama (Gee et al. 1999), carcinoma de colon (Ropponen et al. 2001) y en melanoma (Karjalainen et al. 1998) que la pérdida del gen supresor de tumor AP2 $\alpha$  se relaciona con la progresión tumoral. En carcinoma de mama AP2 $\alpha$  suprime la expresión de HER2/neu e induce la del receptor de estrógenos (ER $\alpha$ ) (Perissi et al. 2000; Newman et al. 2000). La pérdida de expresión de AP2 $\alpha$  en melanoma maligno condiciona la transición de la fase de crecimiento radial a la de invasión vertical que se asocia al aumento de expresión de MCAM y al descenso de c-Kit (Bar-Eli 2001). En las líneas ANDO-NUDE no pudimos observar ninguna diferencia significativa de expresión en superficie de estos dos receptores al compararla con la expresión en la línea ANDO-2. Aunque el nivel de expresión de MCAM fue ligeramente superior en la línea ANDO-NUDE, no se observó una disminución de c-Kit en relación a la línea tumoral ANDO-2 (figura 21). El factor transcripcional AP2- $\alpha$  podría ser otro de los reguladores responsable de la expresión de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico. La proteína codificada por este gen, se une a una secuencia consenso palindrómica GCCNNGGC, que se ha localizado en las regiones reguladoras de genes de la cadena pesada murina H-2 de clase I y el oncogen HER2/neu entre otros. El hecho de que las regiones promotoras de los genes HLA de clase I y de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico contengan la región consenso palindrómica y de que el gen AP-2 $\alpha$  se encuentre próximo a la región HLA, podría facilitar la interacción con los mecanismos reguladores de la expresión de HLA de clase I o de los componentes del APM. En nuestro laboratorio se ha desarrollado un modelo murino donde un tumor que no expresa las moléculas H-2 de clase I, debido al defecto en la

transcripción de los componentes del APM, al ser inyectado en ratones atímicos da lugar a metástasis que reexpresan las moléculas H-2 de clase I en la membrana celular y esta recuperación es estable y se mantiene *in vitro* (García-Lora et al. 2003). En el modelo de la línea de melanoma maligno ANDO-2 sucede lo contrario ya que al ser inyectada en ratones atímicos pierde la expresión de moléculas HLA de clase I.

Mediante hibridación sustractiva entre el tumor H-2 de clase I negativo y las metástasis H-2 negativas se definieron dos genes como posibles candidatos a ser reguladores de la expresión coordinada de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico (observaciones no publicadas). El gen FHIT, se encuentra en la región 3p14.2, en una región denominada frágil por la elevada susceptibilidad que presenta a la generación de deleciones. La pérdida o inactivación de este gen en muchos tumores se asocia con la disminución de la proteína FHIT y se traduce en una mayor tumorigenicidad, capacidad invasiva y peor pronóstico de los tumores (Ishii & Furukawa 2004). No existe en la bibliografía ningún dato acerca de la relación entre este gen y la maquinaria de procesamiento antigénico o la expresión de moléculas HLA de clase I pero sería interesante determinar si esta relación existe. El otro gen es el factor transcripcional Glis1 que actúa como un oncogen, transformando células en cultivo y se ha observado su sobreexpresión en varios tumores (Green et al. 1998; Grachtchouk et al. 2002; Ruiz i Altaba et al. 2002). La secuencia consenso de unión a DNA es GACCACCCA y se han encontrado secuencias similares en los promotores de los genes TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7 que podrían interaccionar con el factor transcripcional Glis1. El descenso en la expresión de Glis1 en metástasis desarrolladas en ratones inmunocompetentes (datos obtenidos en nuestro laboratorio, no publicados) podría explicar la disminución de la expresión de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico y en consecuencia, la falta de expresión de moléculas HLA de clase I.

En resumen, pocos datos concluyentes existen acerca de cómo se regulan de forma coordinada los genes de las cadenas pesadas de HLA de clase I,  $\beta$ 2-microglobulina y los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico para que todas las células diferenciadas expresen en su membrana las moléculas HLA de clase I. Los genes HLA de clase I se encuentran separados de los de TAP1, TAP2, Tapasina, LMP2 y LPM7 que se localizan en la región HLA de clase II por una extensa región cromosómica que es la región HLA de clase III, e incluso otros genes se encuentran en otros cromosomas como la  $\beta$ 2-microglobulina que está en el cromosoma 15. Los genes en los eucariotas están controlados por elementos reguladores en cis, que pueden estar separados por varias pares de bases de la región codificante. Sin embargo, la existencia de una regulación común en cis para diversos genes localizados en el mismo cromosoma o en cromosomas distintos es poco probable y sugiere la existencia de un mecanismo regulador que actúe en trans. Se ha observado que genes activos de distintos cromosomas se localizan en lugares transcripcionales compartidos debido a la conformación adquirida por los cromosomas (Osborne et al. 2004), incluso se establecieron las llamadas “fábricas de transcripción” (Cook 1999). En un estudio reciente se ha encontrado la colocalización de genes de diferentes cromosomas. En células T helper naïve, el locus del IFN- $\gamma$  se encuentra en el cromosoma 10 y se localiza junto al grupo de genes que codifican las citocinas Th2 en el cromosoma 11 (IL-4, IL-15, IL-13) (Spilianakis et al. 2005). Esta interacción se da en células T naïve que tienen la capacidad potencial de expresar bajos niveles de IFN- $\gamma$  o citocinas Th2 tras activación. Al contrario, las células Th1 o Th2 expresan IFN- $\gamma$  o citocinas Th2 pero no ambas, y las interacciones entre los locus se pierden porque adquieren modificaciones de histonas que son transcripcionalmente favorables.

El concepto de “fábrica transcripcional” se puede aplicar a la regulación de la expresión de HLA de clase I y plantear la posibilidad de interacciones intracromosómicas en 6p21.3 que permitan la aproximación

de los genes de las cadenas pesadas de HLA de clase I a los genes de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico y de interacciones inter cromosómicas que aproximen la región de la beta 2 microglobulina en el brazo largo del cromosoma 15 (15q21) a la de HLA en 6p21.3. Además de la acetilación y metilación de las histonas que estabilizan las interacciones cromosómicas para fijar el complejo genético serán necesarias moléculas de enlace y factores de transcripción, lo que permite suponer que existan interacciones inter cromosómicas adicionales. Durante la progresión tumoral las interacciones cromosómicas se rompen produciéndose una inactivación simultánea de todos los genes del complejo relacionado con la expresión de moléculas HLA dando lugar a un fenotipo I. La pérdida de un cromosoma 6 o de la región 6p21.3 podría facilitar este proceso de ruptura de las interacciones cromosómicas. En tumores como el carcinoma de colon (Maleno et al. 2004), carcinoma de laringe (Maleno et al. 2002) y carcinoma vesical (Maleno et al. 2006) se ha encontrado una pérdida de haplotipo HLA por delección de 6p21.3 o pérdida de un cromosoma 6 en casos con un fenotipo I.

La conversión de fenotipo II a fenotipo I en las líneas tumorales obtenidas tras el crecimiento de ANDO-2 en ratones atímicos, no tiene antecedentes en la bibliografía. Los ratones atímicos (nu/nu) se utilizan fundamentalmente para el establecimiento de líneas tumorales humanas y la determinación del potencial oncogénico de líneas tumorales establecidas *in vitro*. El mecanismo responsable del cambio fenotípico en las líneas ANDO-NUDE no se conoce, pero la pérdida de expresión de moléculas HLA de clase I en la línea ANDO-2 plantea dos cuestiones:

- ¿es el resultado de la acción de factores intrínsecos de la propia línea ANDO-2, que permiten o mejoran su capacidad adaptativa al medio?
- ¿está condicionada por la interacción con el sistema inmunológico del huésped?

Los ratones atímicos carecen de células T pero tienen células NK, sin embargo, no existen datos sobre la interacción entre células NK murinas y líneas tumorales humanas. Para discernir el mecanismo responsable del cambio fenotípico en ANDO-2, sería necesaria la inyección de la línea tumoral en ratones SCID, en los que al carecer de células NK, el mismo cambio fenotípico permitiría descartar la interacción del sistema inmunológico. Para concluir que se trata de un fenómeno reproducible, sería necesario además analizar la expresión de moléculas de HLA de clase I en más líneas tumorales tras su pase por ratones atímicos.

Actualmente existe una gran controversia en cuanto al papel que desempeña el sistema inmunológico frente a la progresión tumoral, los tumores surgen y progresan en individuos inmunocompetentes. La presencia de linfocitos en el ambiente tumoral no es necesariamente un indicador de reacción inmunológica específica antitumoral. Si se asume la intervención activa de un sistema inmunológico frente al desarrollo y progresión tumoral, necesariamente los tumores deben generar mecanismos que los hagan resistentes. La gran inestabilidad genética y epigenética que experimentan las células cancerosas junto a la intervención activa del sistema inmunológico, podría explicar la generación de variantes tumorales que escapan del sistema inmunológico y progresan indefinidamente.

Uno de los principales mecanismos de escape de las células tumorales se basa en la alteración de la expresión en la superficie celular de las

moléculas HLA de clase I. Se pueden plantear dos hipótesis para explicar la generación de fenotipos HLA alterados en tumores:

-la primera hipótesis sería que desde el inicio del tumor existe una tolerancia inmunológica que impide el ataque del sistema inmunológico. Las alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I estarían ligadas al proceso intrínseco de adaptación y progresión tumoral y serían por tanto, independientes del sistema inmunológico.

-la segunda hipótesis estaría fundamentada en el concepto de inmunoección e implicaría que las alteraciones en la expresión de las moléculas HLA de clase I se generarían al azar y posteriormente serían seleccionadas porque escaparían a la respuesta celular mediada por los linfocitos CD8+. Las moléculas HLA de clase I que se han perdido durante la progresión tumoral presentan péptidos antigénicos inmunodominantes que originan la eliminación por el sistema inmunológico de las células tumorales que las expresan. Las moléculas HLA de clase I retenidas presentan péptidos antigénicos débiles que son tolerados y por tanto los tumores que las expresan no son eliminados. Si esta hipótesis es cierta, en el huésped de un tumor, la respuesta celular de linfocitos T CD8+ restringida por las moléculas HLA de clase I que se han perdido ha debido generar clones de linfocitos T CD8+ memoria que pueden ser reestimulados si se recupera en el tumor la expresión de las moléculas HLA.

Para determinar si el sistema inmunológico ha seleccionado a la línea ANDO-2, se llevó a cabo la reexpresión del gen HLA-A\*0201 por transfección génica. La reexpresión del gen A2 permite valorar la existencia de células T CD8+ memoria restringidas por este gen en el paciente ANDO y determinar la frecuencia o proporción de células efectoras específicas frente a la línea ANDO-T1E3, transfectante para el gen HLA-A2. Los linfocitos se pueden obtener de sangre periférica o de TILs, los linfocitos infiltrantes de tumor. Son estas células T las que permiten la caracterización de antígenos tumorales que se utilizan actualmente para la vacunación y generalmente estas células T antitumorales son inefectivas *in vivo* para

mediar el rechazo del tumor porque se encuentran en una frecuencia demasiado baja (Khong et al. 2002), o porque los linfocitos son funcionalmente deficientes ya sea por la inducción de anergia o tolerancia, o porque el péptido antigénico frente al que van dirigidos con mayor afinidad ha desaparecido por la pérdida de moléculas HLA en el tumor (Lee et al. 1999; Zippelius et al. 2004).

Los linfocitos obtenidos desde sangre periférica del paciente ANDO se reestimularon *in vitro* durante varias semanas con la célula tumoral ANDO-T1E3. Los linfocitos utilizados en el ensayo fueron obtenidos en mayo de 1994, y habían sido estimulados *in vivo* mediante 16 inmunizaciones consistentes en la línea tumoral ANDO-2 e IL-2. En los ensayos de citotoxicidad se obtuvieron más microcultivos positivos frente a la línea transfectante que frente a la línea tumoral parental (12:4) (figura 34). La frecuencia de precursores frente a la línea ANDO-2-T1E3, del orden de  $6 \times 10^{-5}$  (figura 35) aunque baja tiene gran relevancia. El paciente ANDO había estado sometido a vacunación durante 12 años, en los cuales no se produjo recidiva. Estas vacunaciones consistían en las células tumorales ANDO-2 junto a IL-2. Los linfocitos del paciente se estimularon *in vivo* con una línea que presentaba una pérdida de haplotipo y que probablemente había sido inmunoseleccionada. A pesar de no existir recidiva en el paciente ANDO en el periodo de vacunación la proporción de células efectoras frente a la línea ANDO-2 fue mucho menor que la encontrada para la transfectante. Este resultado podría indicar que la ausencia de enfermedad en este paciente no se debe a la vacunación. Previamente a la extirpación del tumor primario, se podrían haber generado micrometástasis en las que se encontraban diferentes variantes tumorales. Sólo las metástasis generadas por las variantes con la pérdida de haplotipo, la línea obtenida ANDO-2, fueron inmunoseleccionadas por su baja inmunogenicidad, progresaron y se hicieron clínicamente detectables. Las metástasis generadas por variantes con una expresión normal de moléculas HLA en superficie fueron controladas por los linfocitos CD8+. De ahí que se encuentre mayor

proporción de células efectoras frente a la línea transfectante que expresa HLA-A2. La LOH en la línea ANDO-2 puede ser el resultado de un proceso de inmunoselección por el cual la pérdida de haplotipo de moléculas HLA de clase I podría haber ocurrido en una pequeña población de células ANDO-2 en un estadio temprano de la carcinogénesis, en el que las células que presentaban una expresión normal de moléculas HLA en superficie pudieron ser atacadas y erradicadas por los linfocitos T CD8+ permitiendo a las células ANDO-2, con una pérdida de haplotipo, progresar en el paciente ANDO.

El grupo de investigación de Slingluff ha descrito un caso de melanoma en que el paciente sobrevivió durante 16 años al tumor y falleció por otras causas diferentes al proceso tumoral (Slingluff et al. 2005). A los cinco años de la extirpación del melanoma primario localizado en la espalda se detectaron 12 metástasis ganglionares que fueron tratadas quirúrgicamente quedando el paciente libre de enfermedad hasta la aparición de otra metástasis ganglionar aislada después de otros seis años que también fue extirpada. El paciente no recibió ningún otro tratamiento. En la primera oleada metastásica el melanoma había perdido un haplotipo HLA-A11, -B44 y -Cw7, y mantenía la expresión de HLA-A2. La respuesta celular en ese momento iba dirigida frente a un epítipo de MART-1 presentado por HLA-A2, en la segunda metástasis la mayoría de las células tumorales (88%), habían perdido la expresión de todas las moléculas HLA de clase I por una mutación del gen de la  $\beta$ 2-microglobulina y el resto era reconocido por linfocitos específicos de un péptido de la tirosinasa presentado también por la molécula HLA-A2. En este caso, se aprecia que las alteraciones en la expresión de HLA se van acumulando de forma progresiva durante el desarrollo de las metástasis y que al mismo tiempo la respuesta inmunológica se va adaptando a los cambios fenotípicos del tumor. Pero lo más importante y lo que se asemeja este caso al nuestro de ANDO es que la extirpación de la segunda metástasis, donde la mayoría de las células tumorales escapaban al control de los linfocitos CD8+ por perder



la expresión de HLA, fue suficiente para la curación del paciente sin ningún tratamiento adicional. El paciente ANDO continuó libre de enfermedad después de la extirpación de la segunda metástasis que había perdido la expresión de HLA-A2 y había por tanto escapado al control de los linfocitos T CD8+ que reconocían antígenos inmunodominantes como los demuestra el ensayo de precursores de CTL. La vacuna con las células autólogas de la línea ANDO-2 no generó una respuesta inmunológica importante, pero después de la extirpación quirúrgica de la segunda metástasis el paciente quedó libre de enfermedad por la existencia probablemente de otros mecanismos de control de la expansión tumoral distintos a la acción de los linfocitos CD8+.

En un estudio reciente, de características similares al nuestro, se ha mostrado que en la línea de cáncer de pulmón A904L, con una pérdida de haplotipo HLA, al ser transfectada con el gen HLA-B\*3901 era reconocida y lisada por un clon específico de CTL (G3b) de forma restringida por este alelo. El alelo B\*3901 presentaba un antígeno, procedente de una proteína implicada en la regulación del ciclo celular, que era reconocido por un clon de CTL incapaz de lisar a la célula tumoral parental con la pérdida de haplotipo. Sugiriendo que la pérdida de haplotipo en la línea A904L fue inmunoseleccionada *in vivo* (So et al. 2005).

Nuestro estudio es un paso previo para la caracterización del antígeno tumoral presentado por HLA-A2 que requiere la clonación de los microcultivos. Los cuatro microcultivos (figura 34) que lisaban específicamente a la línea parental ANDO-2 y no mostraron lisis frente a la transfectante de A2 podrían explicarse por un procesamiento del antígeno distinto entre ambas líneas. Algunos péptidos antigénicos son procesados mejor por el inmunoproteosoma y otros por el proteosoma estándar (Van den Eynde & Morel. 2001; Schultz et al. 2002). Las endopeptidasas de estos proteosomas difieren en su especificidad, el inmunoproteosoma corta mejor detrás de residuos hidrofóbicos y el estándar tras residuos ácidos. Esto puede afectar no sólo al extremo C-terminal sino también al grado de

destrucción del péptido antigénico por sus cortes internos. En un ambiente no inflamatorio, las células tumorales expresan solamente proteosomas estándar y por tanto, sólo antígenos tumorales procesados por estos proteosomas. La propia transfección del gen HLA-A2 podría acompañarse de modificaciones en la preferencia de los cortes proteolíticos del proteosoma. Se ha observado que la transfección de la molécula de clase I murina, H-2K, en células de melanoma B16BL6 modificaba la especificidad del proteosoma. Las células deficientes en la molécula H-2K tenían una actividad proteosomal como la quimiotripsina, implicada en el recambio dinámico de proteínas de vida media corta, que se perdía tras la transfección induciéndose la expresión de los componentes del inmunoproteosoma (Tsory et al. 2006). Los microcultivos que lisan a la línea tumoral ANDO-2 podrían contener algún CTL que reconociese un antígeno procesado por el proteosoma estándar de la célula tumoral ANDO-2, que podría ser diferente del procesado en el inmunoproteosoma de la célula transfectante ANDO-T1E3.

La línea ANDO-T1E3 estimularía linfocitos CD8+ con baja afinidad por péptidos presentados por los alelos del haplotipo HLA retenido que no serían capaces de lizarla pero sí a la línea original ANDO-2 que presentaría diferentes péptidos de idénticos antígenos tumorales que serían reconocidos con mayor afinidad por los linfocitos CD8+ provocando su activación y la lisis celular. La identificación de antígenos restringidos por las moléculas HLA de clase I perdidas o delecionadas después de recuperar su expresión por transfección génica, nos puede ayudar a entender los mecanismos de escape tumoral y permitir el desarrollo de una inmunoterapia frente al cáncer más efectiva.

Por último, se ha comparado el crecimiento de las líneas tumorales ANDO-2, ANDO-NUDE1 y ANDO-T1E3 en ratones atímicos. La línea ANDO-NUDE1 no mostró ningún período de adaptación y en sólo 15 días se observó en el ratón un tumor de unos 4mm de diámetro en el lugar de la

inyección. La línea ANDO-2 mostró un período de adaptación de unos 15 días durante los cuales podría estar produciéndose el paso de fenotipo II a fenotipo I, tras el cual comenzó a progresar.

La línea ANDO-T1E3 mostró crecimiento inicialmente seguido de un periodo, similar al periodo de adaptación mostrado por la línea ANDO-2, a partir del cual comenzó a regresar hasta llegar a desaparecer. En la gráfica de crecimiento tumoral (figura 36) se observa que la línea tumoral con fenotipo I, que carece de expresión de moléculas HLA de clase I, es la que mayor capacidad oncogénica presenta, seguida por la línea tumoral con fenotipo II, que expresa un haplotipo HLA. La línea tumoral con menor capacidad oncogénica fue la transfectante, que expresaba un alelo más que la línea con capacidad oncogénica intermedia ANDO-2. Este resultado sugeriría que la expresión de moléculas HLA disminuye la capacidad oncogénica del tumor. Un resultado similar se ha encontrado en la línea de melanoma murino B16, en la que la transfección de la molécula H-2K, de clase I, aumentó su inmunogenicidad y atenuó su capacidad para formar tumores cuando se trasplantaban en animales singénicos (Tsory et al. 2006).



CONCLUSIONES

---

CONCLUSIONES

---



1. La línea de melanoma ANDO-2 presenta un fenotipo II por deleción de un cromosoma 6, perdiendo de forma irreversible la expresión de los alelos HLA-A2, -B13,-Cw6 y mantiene la de HLA-A32, -B40, -Cw3. Además la expresión de HLA-A32 es inferior a la de HLA-B40.
2. La transfección del gen HLA-A\*0201 en la línea ANDO-T1E3 induce una mayor respuesta inmunológica mediada por linfocitos T CD8+ *in vitro* que la línea original ANDO-2. Estos datos sugieren la existencia de linfocitos T CD8+ memoria que reconocen péptidos inmunodominantes presentados por la molécula HLA-A2 y que eliminarían a las células tumorales que expresaran esta molécula.
3. El pase de la línea ANDO-2 por ratones atímicos induce la conversión de fenotipo HLA II a fenotipo I, con pérdida total de la expresión de moléculas HLA de clase I y neoexpresión de moléculas HLA de clase II.
4. La pérdida total de la expresión de moléculas HLA de clase I se debe a un descenso importante en la transcripción de los genes de cadena pesada de HLA de clase I y de los genes de la maquinaria de procesamiento antigénico: TAP1, TAP2, LMP2, LMP7 y Tapasina.
5. La pérdida de expresión de moléculas HLA de clase I se correlaciona con la capacidad oncogénica en ratones atímicos: la línea ANDO-NUDE, que tiene un fenotipo I, crece con mayor rapidez, mientras la línea ANDO-2 requiere un período de adaptación hasta realizar la conversión a fenotipo I para continuar de forma acelerada su crecimiento. La línea celular transfectante para HLA-A2, ANDO-T1E3, comienza creciendo, para posteriormente regresar y ser finalmente rechazada.

6. Este trabajo es un paso previo para la caracterización de CTLs que puedan definir antígenos tumorales inmunodominantes, que facilitarían la inducción de una potente respuesta inmunológica celular.







- Aarnoudse C, van den Doel P, Heemskerk B, Schrier P. 1999. Interleukin-2-induced, melanoma-specific T cells recognize camel, an unexpected translation product of LAGE-1. *Int. J. Cancer* 82: 442-48
- Abi-Hanna D, Wakefield D, Watkins S. 1988. HLA antigens in ocular tissues. I. In vivo expression in human eyes. *Transplantation* 45:610-13
- Abrams SI, Stanziale SF, Lunin SD, Zaremba S, Schlom J. 1996. Identification of overlapping epitopes in mutant ras oncogene peptides that activate CD4+ and CD8+ T cell responses. *Eur J Immunol* 26:435-43
- Abril E, Mendez RE, Garcia A, Serrano A, Cabrera T, Garrido F, 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* 47:391-98
- Adler AJ, Marsh DW, Yochum GS, Guzzo JL, Nigam A, Nelson WG, Pardoll DM. 1998. CD4+ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells. *J Exp Med* 187:1555-564
- Aguado B, Campbell RD. 1999. Characterization of a human MHC class III region gene product with S-thioesterase activity. *Biochem J* 341 ( Pt 3):679-89
- Albert ML, Darnell JC, Bender A, Francisco LM, Bhardwaj N, Darnell RB. 1998. Tumor-specific killer cells in paraneoplastic cerebellar degeneration. *Nat Med* 4:1321-324
- Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 392:86-9
- Albert ML, Austin LM, Darnell RB. 2000. Detection and treatment of activated T cells in the cerebrospinal fluid of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration. *Ann Neurol* 47:9-17
- Allison JP, Asarnow DM, Bonyhadi M, Carbone A, Havran WL, Nandi D, Noble J. 1991. Gamma delta T cells in murine epithelia: origin, repertoire, and function. *Adv Exp Med Biol* 292:63-9
- Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP, Gabilovich DI. 2000. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 6:1755-766
- Androlewicz MJ. 1999. The role of tapasin in MHC class I antigen assembly. *Immunol Res* 20:79-88
- Apte RS, Mayhew E, Niederkorn JY. 1997. Local inhibition of natural killer cell activity promotes the progressive growth of intraocular tumors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:1277-282
- Atkin NB, Baker MC. 1989. Chromosome 17p loss in carcinoma of the cervix uteri. *Cancer Genet Cytogenet* 37:229-33
- Ayyoub M, Migliaccio M, Guillaume P, Lienard D, Cerottini JC. 2001. Lack of tumor recognition by hTERT peptide 540-548-specific CD8+ T cells from melanoma patients reveals inefficient antigen processing. *Eur.J.Immunol.* 31: 2642-651
- Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol* 15:563-91

- Bahram S. 2000. MIC genes: from genetics to biology. *Adv Immunol* 76:1-60
- Bakker AB, Wu J, Phillips JH, Lanier LL. 2000. NK cell activation: distinct stimulatory pathways counterbalancing inhibitory signals. *Hum Immunol* 61:18-27
- Balch CM, Riley LB, Bae YJ, Salmeron MA, Platsoucas CD. 1990. Patterns of human tumor-infiltrating lymphocytes in 120 human cancers. *Arch. Surg.* 125:200-05
- Baldwin RW. 1955. Immunity to methylcholanthrene-induced tumours in inbred rats following atrophy and regression of the implanted tumours. *Br J Cancer* 9:652-57
- Banchereau J, Palucka AK, Dhodapkar M, Burkeholder S, Taquet N, Rolland A, Taquet S, Coquery S, Wittkowski KM, Bhardwaj N, Pineiro L, Steinman R, Fay J. 2001. Immune and clinical responses in patients with metastatic melanoma to CD34(+) progenitor-derived dendritic cell vaccine. *Cancer Res* 61:6451-458
- Bancroft GJ, Schreiber RD, Unanue ER. 1991. Natural immunity: a T-cell-independent pathway of macrophage activation, defined in the scid mouse. *Immunol Rev* 124:5-24
- Bar-Eli M. 2001. Gene regulation in melanoma progression by the AP-2 transcription factor. *Pigment Cell Res.* 14:78-5
- Barbieri G, Deffrennes V, Prodhomme T, Vedrenne J, Baton F, Cortes C. 2002. Isoforms of the class II transactivator protein. *Int immunol* 14: 839-48
- Barnd DL, Kerr LA, Metzgar RS, Finn OJ. 1988. Human tumor-specific cytotoxic T cell lines generated from tumor-draining lymph node infiltrate. *Transplant Proc* 20:339-41
- Barnd DL, Lan MS, Metzgar RS, Finn OJ. 1989. Specific, major histocompatibility complex-unrestricted recognition of tumor-associated mucins by human cytotoxic T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7159-163
- Barratt-Boyes SM. 1996. Making the most of mucin: a novel target for tumor immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 43:142-51
- Basombrio MA. 1970. Search for common antigenicities among twenty-five sarcomas induced by methylcholanthrene. *Cancer Res* 30:2458-462
- Basombrio MA, Prehn RT. 1972. Studies on the basis for diversity and time of appearance of antigens in chemically induced tumors. *Natl Cancer Inst Monogr* 35:117-24
- Baton F, Deruyffelaere C, Chapin M, Prodhomme T, Charron D, Al-Daccak R, Alcaide-Loridan C. 2004. Class II transactivator (CIITA) isoform expression and activity in melanoma. *Melanoma Res.* 14:453-61
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285:727-29
- Baumeister W, Walz J, Zuhl F, Seemuller E. 1998. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 92:367-80

- Beck S, Cann HM, Campbell RD, Dunham I, Inoko H, Jazwinska EC, Ragoussis J, Trowsdale J, Ziegler A. 1997. Third single chromosome 6 workshop: meeting report. *DNA Seq* 8:113-29
- Becker JC, Brabletz T, Czemy C, Termeer C, Brocker EB. 1993. Tumor escape mechanisms from immunosurveillance: induction of unresponsiveness in a specific MHC-restricted CD4+ human T cell clone by the autologous MHC class II + melanoma. *Int Immunol* 5:1501-508
- Benham AM, Gromme M, Neefjes J. 1998. Allelic differences in the relationship between proteasome activity and MHC class I peptide loading. *J Immunol* 161:83-9
- Benitez R, Godelaine D, Lopez-Nevot MA, Brasseur F, Jimenez P, Marchand M, Oliva MR, van Baren N, Cabrera T, Andry G, Landry C, Ruiz-Cabello F, Boon T, 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* 52:520-29
- Bjorkman PJ, Parham P. 1990. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem* 59:253-88
- Blanchet O, Bourge JF, Zinszner H, Israel A, Kourilsky P, Dausset J, Degos L, Paul P. 1992. Altered binding of regulatory factors to HLA class I enhancer sequence in human tumor cell lines lacking class I antigen expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3488-492
- Bodmer WF, Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Bicknell DC, Bodmer JG. 1993. Tumor escape from immune response by variation in HLA expression and other mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 690:42-9
- Boel P, Wildmann C, Sensi ML, Brasseur R, Renauld JC, Coulie P, Boon T, van der Bruggen P. 1995. BAGE: a new gene encoding an antigen recognized on human melanomas by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 2:167-75
- Bogen B, Munthe L, Sollien A, Hofgaard P, Omholt H, Dagnaes F, Dembic Z, Lauritzsen GF. 1995. Naive CD4+ T cells confer idiotype-specific tumor resistance in the absence of antibodies. *Eur J Immunol* 25:3079-086
- Bogen B. 1996. Peripheral T cell tolerance as a tumor escape mechanism: deletion of CD4+ T cells specific for a monoclonal immunoglobulin idiotype secreted by a plasmacytoma. *Eur J Immunol* 26:2671-679
- Boon T, Cerottini JC, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Van Pel A. 1994. Tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 12:337-65
- Borysiewicz LK, Fiander A, Nimako M, Man S, Wilkinson GW, Westmoreland D, Evans AS, Adams M, Stacey SN, Bournsnel ME, Rutherford E, Hickling JK, Inglis SC. 1996. A recombinant vaccinia virus encoding human papillomavirus types 16 and 18, E6 and E7 proteins as immunotherapy for cervical cancer. *Lancet* 347:1523-527

- Bosch GJ, Joosten AM, Kessler JH, Melief CJ, Leeksa OC. 1996. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary in vitro immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood* 88:3522-527
- Brady CS, Bartholomew JS, Burt DJ, Duggan-Keen MF, Glenville S, Telford N, Little AM, Davidson JA, Jimenez P, Ruiz-Cabello F, Garrido F, Stern PL. 2000. Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer. *Tissue Antigens* 55:401-11
- Brandle D, Brasseur F, Weynants P, Boon T, Van den Eynde B. 1996. A mutated HLA-A2 molecule recognized by autologous cytotoxic T lymphocytes on a human renal cell carcinoma. *J. Exp. Med.* 183: 2501-508
- Brent L, Medawar P. 1966. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. 8. The effects of irradiation. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 165:413-23
- Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Wolfel C, De Plaen E, Lethe B, Coulie P, Boon T. 1993. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 178:489-95
- Brichard VG, Herman J, Van Pel A, Wildmann C, Gaugler B, Wolfel T, Boon T, Lethe B. 1996. A tyrosinase nonapeptide presented by HLA-B44 is recognized on a human melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur J Immunol* 26:224-30
- Brocker EB, Sulter L, Sorg C. 1984. HLA-DR antigen expression in primary melanomas of the skin. *J Invest Dermatol* 82:244-47
- Brodsky JL, McCracken AA. 1999. ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol* 10:507-13
- Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE 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* 93:7673-678
- Brossart P, Stuhler G, Flad T, Stevanovic S, Rammensee H, Kanz L, Brugger W. 1998. Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by *in vitro* induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 58: 732-36
- Browning M, Petronzelli F, Bicknell D, Krausa P, Rowan A, Tonks S, Murray N, Bodmer J, Bodmer W. 1996. Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue Antigens* 47:364-71
- Brunner KT, Mael J, Cerottini JC, Chapuis B. 1968. Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* 14:181-96
- Bunt SK, Sinha P, Clements VK, Leips J, Ostrand-Rosenberg S. 2006. Inflammation induces myeloid-derived suppressor cells that facilitate tumor progression. *J Immunol* 176:284-90

- Burke MD, Mayer RT, Kouri RE. 1977. 3-methylcholanthrene-induced monooxygenase (O-deethylation) activity of human lymphocytes. *Cancer Res* 37:460-63
- Burnet FM. 1967. Immunological aspects of malignant disease. *Lancet* 1:1171-174
- Burnet FM. 1970. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13:1-27
- Burnet FM. 1971. Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev* 7:3-25
- Bystryn JC, Rigel D, Friedman RJ, Kopf A. 1987. Prognostic significance of hypopigmentation in malignant melanoma. *Arch Dermatol* 123:1053-055
- Cabrera CM, Jimenez P, Cabrera T, Esparza C, Ruiz-Cabello F, 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* 61:211-19
- Cabrera CM, Lopez-Nevot MA, Jimenez P, Garrido F. 2005. Involvement of the chaperone tapasin in HLA-B44 allelic losses in colorectal tumors. *Int J Cancer* 113:611-18
- Cabrera T, Angustias Fernandez M, Sierra A, Garrido A, Herruzo A, Escobedo A, Fabra A, Garrido F. 1996. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Hum Immunol* 50:127-34
- Cabrera T, Collado A, Fernandez MA, Ferron A, Sancho J, Ruiz-Cabello F, Garrido F. 1998. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tissue Antigens* 52:114-23
- Cabrera T, Salinero J, Fernandez MA, Garrido A, Esquivias J, Garrido F. 2000. High frequency of altered HLA class I phenotypes in laryngeal carcinomas. *Hum Immunol* 61:499-506
- Cabrera T, Lopez-Nevot MA, Gaforio JJ, Ruiz-Cabello F, Garrido F. 2003. Analysis of HLA expression in human tumor tissues. *Cancer Immunol Immunother* 52:1-9
- Cabrera T, Pedrajas G, Cozar JM, Garrido A, Vicente J, Tallada M, Garrido F. 2003. HLA class I expression in bladder carcinomas. *Tissue Antigens* 62:324-27
- Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. 1996. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res* 56:2488-492
- Campbell RD, Trowsdale J. 1993. Map of the human MHC. *Immunol Today* 14:349-52
- Carbone E, Terrazzano G, Ruggiero G, Zanzi D, Ottaiano A, Manzo C, Karre K, Zappacosta S. 1999. Recognition of autologous dendritic cells by human NK cells. *Eur J Immunol* 29:4022-029
- Carmeliet P, Jain RK. 2000. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-57

- Cascio P, Hilton C, Kisselev AF, Rock KL, Goldberg AL. 2001. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J* 20:2357-366
- Casorzo L, Luzzi C, Narcacchione A, Picciotto F, Pisacane A, Risio M. 2005. Fluorescent in situ hybridization (FISH) evaluation of chromosomes 6, 7, 9 and 10 throughout human melanocytic tumorigenesis. *Melanoma Res*, 15: 155-60
- Castelli C, Storkus W, Maeurer M, Martin D, Huang E, Pramanik B, Nagabhushan T, Parmiani G, Lotze M. 1995. Mass spectrometric identification of a naturally processed melanoma peptide recognized by CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 181: 363-68
- Castelli C, Tarsini P, Mazzocchi A, Rini F, Rivoltini L, Ravagnani F, Belli F, Parmiani G. 1999. Novel HLA-Cw8 restricted T-cell epitopes derived from TRP-2 and gp100 melanoma antigens. *J. Immunol* 162: 1739-748
- Catlett-Falcone R, Landowski TH, Oshiro MM, Turkson J, Levitzki A, Savino R, Ciliberto G, Moscinski L, Fernandez-Luna JL, Nunez G, Dalton WS, Jove R. 1999. Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* 10:105-15
- Cerwenka A, Bakker AB, McClanahan T, Wagner J, Wu J, Phillips JH, Lanier LL. 2000. Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice. *Immunity* 12:721-27
- Cerwenka A, Baron JL, Lanier LL. 2001. Ectopic expression of retinoic acid early inducible-1 gene (RAE-1) permits natural killer cell-mediated rejection of a MHC class I-bearing tumor in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11521-1526
- Chappell DB, Zaks TZ, Rosenberg SA, Restifo NP. 1999. Human melanoma cells do not express Fas (Apo-1/CD95) ligand. *Cancer Res* 59:59-62
- <sup>a</sup>Chaux P, Luiten R, Demotte N, Vantomme V, Stroobant V, Traversari C, Russo V, Schultz E, Cornelis G, Boon T, van der Bruggen P. 1999. Identification of five MAGE-A1 epitopes recognized by cytolytic T lymphocytes obtained *in vitro* stimulation with dendritic cells transduced with MAGE-A1. *J. Immunol* 163: 2928-936
- <sup>b</sup>Chaux P, Vanomme V, Stroobant V, Thielemans K, Corthals J, Luiten R, Eggermont A, Boon T, van der Bruggen P. 1999. Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4+ T lymphocytes. *J. Exp. Med* 189: 767-78
- Chen HL, Gabrilovich D, Virmani A, Ratnani I, Girgis KR, Nadaf-Rahrov S, Fernandez-Vina M, Carbone DP. 1996. Structural and functional analysis of beta2 microglobulin abnormalities in human lung and breast cancer. *Int J Cancer* 67:756-63
- Chen YT, Scanlan MJ, Sahin U, Tureci O, Gure AO, Tsang S, Williamson B, Stockert E, Pfreundschuh M, Old LJ. 1997. A testicular antigen aberrantly expressed in human cancers detected by autologous antibody screening. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:1914-918



- Chiari R, Foury F, De Plaen E, Baurain J, Thonnard J, Coulie P. 1999. Two antigens recognized by autologous CTL on a melanoma result from a single point mutation in an essential housekeeping gene. *Cancer Res.* 59: 5785-792
- Chin YE, Kitagawa M, Su WC, You ZH, Iwamoto Y, Fu XY. 1996. Cell growth arrest and induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 WAF1/CIP1 mediated by STAT1. *Science* 272:719-22
- Choudhury A, Charo J, Parapuram SK, Hunt RC, Hunt DM, Seliger B, Kiessling R. 2004. Small interfering RNA (siRNA) inhibits the expression of the Her2/neu gene, upregulates HLA class I and induces apoptosis of Her2/neu positive tumor cell lines. *Int J Cancer* 108:71-7
- Church SL, Grant J, Ridnour L, Oberley L, Swanson P, Meltzer PS. 1993. Increased manganese superoxide dismutase expression suppresses the malignant phenotype of human melanoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3113-117
- Clark WH, Elder DE, Guerry D, Braitman LE, Trock BJ. 1989. Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression. *J.Natl.Cancer.* 81: 1893-904
- Clemente CG, Mihm MC, Bufalino R, Zurrida S, Collini P, Cascinelli N. 1996. Prognostic value of tumor infiltrating lymphocytes in the vertical growth phase of primary cutaneous melanoma. *Cancer* 77: 1303-310
- Coca S, Perez-Piqueras J, Martínez D, Colmenarejo A, Saez MA. 1997. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 79: 2320-328
- Cook PR. 1999. The organization of replication and transcription. *Science* 284:1790-795
- Coral S, Sigalotti L, Gasparollo A, Cattarossi I, Visintin A, Cattelan A, Altomonte M, Maio M. 1999. Prolonged upregulation of the expression of HLA class I antigens and costimulatory molecules on melanoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR). *J Immunother* 22:16-24
- Cormier JN, Abati A, Fetsch P, Hijazi YM, Rosenberg SA, Marincola FM, Topalian SL. 1998. Comparative analysis of the in vivo expression of tyrosinase, MART-1/Melan-A, and gp100 in metastatic melanoma lesions: implications for immunotherapy. *J Immunother* 21:27-31
- Cormier JN, Panelli MC, Hackett JA, Bettinotti MP, Mixon A, Wunderlich J, Parker LL, Restifo NP, Ferrone S, Marincola FM. 1999. Natural variation of the expression of HLA and endogenous antigen modulates CTL recognition in an in vitro melanoma model. *Int J Cancer* 80:781-90
- Correale P, Walmsley K, Nieroda C, Zaremba S, Zhu M, Schlom J, Tsang K. 1997. *In vitro* generation of human cytotoxic T lymphocytes specific for peptides derived from prostate-specific antigen. *J Natl Cancer Inst* 89: 293-300
- Coughlin CM, Salhany KE, Gee MS, LaTemple DC, Kotenko S, Ma X, Gri G, Wysocka M, Kim JE, Liu L, Liao F, Farber JM, Pestka S, Trinchieri G,

- Lee WM. 1998. Tumor cell responses to IFN $\gamma$  affect tumorigenicity and response to IL-12 therapy and antiangiogenesis. *Immunity* 9:25-34
- Coulie PG, Brichard V, Van Pel A, Wolfel T, Schneider J, Traversari C, Mattei S, De Plaen E, Lurquin C, Szikora JP, Renauld JC, Boon T. 1994. A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 180:35-42
- Coulie PG, Lehmann F, Lethé B, Herman J, Lurquin C, Andrawiss M, Boon T. 1995. A mutated intron sequence codes for an antigenic peptide recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 7976-980
- Cox AL, Skipper J, Chen Y, Henderson RA, Darrow TL, Shabanowitz J, Engelhard VH, Hunt DF, Slingluff CL Jr. 1994. Identification of a peptide recognized by five melanoma-specific human cytotoxic T cell lines. *Science* 264:716-19
- Cramer LA, Nelson SL, Klemsz MJ. 2000. Synergistic induction of the Tap-1 gene by IFN- $\gamma$  and lipopolysaccharide in macrophages is regulated by STAT1. *J Immunol* 165:3190-197
- Cresswell P. 2000. Intracellular surveillance: controlling the assembly of MHC class I-peptide complexes. *Traffic* 1:301-05
- Cretney E, Takeda K, Yagita H, Glaccum M, Peschon JJ, Smyth MJ. 2002. Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol* 168:1356-361
- Cromme FV, Airey J, Heemels MT, Ploegh HL, Keating PJ, Stern PL, Meijer CJ, Walboomers JM. 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
- Dabovic B, Zanaria E, Bardoni B, Lisa A, Bordignon C, Russo V, Matessi C, Traversari C, Camerino G. 1995. A family of rapidly evolving genes from the sex reversal critical region in Xp21. *Mamm Genome* 6:571-80
- Dahl AM, Beverley PC, Stauss HJ. 1996. A synthetic peptide derived from the tumor-associated protein mdm2 can stimulate autoreactive, high avidity cytotoxic T lymphocytes that recognize naturally processed protein. *J Immunol* 157:239-46
- Dalmau J, Furneaux HM, Gralla RJ, Kris MG, Posner JB. 1990. Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer--a quantitative western blot analysis. *Ann Neurol* 27:544-52
- Darnell RB, DeAngelis LM. 1993. Regression of small-cell lung carcinoma in patients with paraneoplastic neuronal antibodies. *Lancet* 341:21-2
- Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones

- K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949-54
- Dean M, Carrington M, O'Brien SJ. 2002. Balanced polymorphism selected by genetic versus infectious human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3:263-92
- De Backer O, Arden K, Boretti M, Vantomme V, De Smet C, Czekay S, Viars C, De Plaen E, Brasseur F, Chomez P, Van den Eynde B, Boon T, van der Bruggen P. 1999. Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis. *Cancer Res* 59:3157-165
- Deffrennes V, Vedrenne J, Stolzenberg MC, Piskurich J, Barbieri G, Ting JP. 2001. Constitutive expression of MHC class II genes in melanoma cell lines results from the transcription of class II transactivator abnormally initiated from its B cell-specific promoter. *J Immunol* 167:98-106
- De la Salle H, Hanau D, Fricker D, Urlacher A, Kelly A, Salamero J, Powis SH, Donato L, Bausinger H, Laforet M, et al. 1994. Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science* 265:237-41
- Delp K, Momburg F, Hilmes C, Huber C, Seliger B. 2000. Functional deficiencies of components of the MHC class I antigen pathway in human tumors of epithelial origin. *Bone Marrow Transplant* 25 Suppl 2:S88-95
- De Plaen E, Arden K, Traversari C, Gaforio JJ, Szikora JP, De Smet C, Brasseur F, van der Bruggen P, Lethe B, Lurquin C, et al. 1994. Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40:360-69
- De Plaen E, Lurquin C, Lethe B, van der Bruggen P, Brichard V, Renauld JC, Coulie P, Van Pel A, Boon T. 1997. Identification of genes coding for tumor antigens recognized by cytolytic T lymphocytes. *Methods* 12:125-42
- De Plaen E, Lurquin C, Van Pel A, Mariame B, Szikora JP, Wolfel T, Sibille C, Chomez P, Boon T. 1988. Immunogenic (tum-) variants of mouse tumor P815: cloning of the gene of tum- antigen P91A and identification of the tum- mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2274-278
- De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. 1997. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 27:1229-235
- De Vries TJ, Fourkour A, Wobbles T, Verkroost G, Ruiters DJ, van Muijen GN. 1997. Heterogeneous expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, and tyrosinase in human melanoma cell lines and in human melanocytic lesions. *Cancer Res* 57:3223-229
- Den Boer AT, Diehl L, van Mierlo GJ, van der Voort EI, Franssen MF,

- Krimpenfort P, Melief CJ, Offringa R, Toes RE. 2001. Longevity of antigen presentation and activation status of APC are decisive factors in the balance between CTL immunity versus tolerance. *J Immunol* 167:2522-528
- Dick TP, Bangia N, Peaper DR, Cresswell P. 2002. Disulfide bond isomerization and the assembly of MHC class I-peptide complexes. *Immunity* 16:87-98
- Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. 2001. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. *J Exp Med* 193:1303-310
- Diedrich G, Bangia N, Pan M, Cresswell P. 2001. A role for calnexin in the assembly of the MHC class I loading complex in the endoplasmic reticulum. *J Immunol* 166:1703-709
- Diefenbach A, Jamieson AM, Liu SD, Shastri N, Raulet DH. 2000. Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages. *Nat Immunol* 1:119-26
- Dighe AS, Farrar MA, Schreiber RD. 1993. Inhibition of cellular responsiveness to interferon-gamma (IFN gamma) induced by overexpression of inactive forms of the IFN gamma receptor. *J Biol Chem* 268:10645-0653
- Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. 1994. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity* 1:447-56
- Doan T, Herd KA, Lambert PF, Fernando GJ, Street MD, Tindle RW. 2000. Peripheral tolerance to human papillomavirus E7 oncoprotein occurs by cross-tolerization, is largely Th-2-independent, and is broken by dendritic cell immunization. *Cancer Res* 60:2810-815
- Donawho C, Kripke ML. 1990. Immunogenicity and cross-reactivity of syngeneic murine melanomas. *Cancer Commun* 2:101-07
- Doran T, Stuhlmiller H, Kim JA, Martin EW Jr, Triozzi PL. 1997. Oncogene and cytokine expression of human colorectal tumors responding to immunotherapy. *J Immunother* 20:372-76
- Dovhey SE, Ghosh NS, Wright KL. 2000. Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line. *Cancer Res* 60:5789-796
- Dudley ME, Ngo LT, Westwood J, Wunderlich JR, Rosenberg SA. 2000. T-cell clones from melanoma patients immunized against an anchor-modified gp100 peptide display discordant effector phenotypes. *Cancer J* 6:69-77
- Dudley ME, Wunderlich JR, Robbins PF, Yang JC, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Sherry R, Restifo NP, Hubicki AM, Robinson MR, Raffeld M, Duray P, Seipp CA, Rogers-Freezer L, Morton KE, Mavroukakis SA, White DE, Rosenberg SA. 2002. Cancer regression and autoimmunity in patients after clonal repopulation with antitumor lymphocytes. *Science* 298:850-54
- Duffour M, Chaux P, Lurquin C, Cornelis G, Boon T, van der Bruggen P.

1999. A MAGE-A4 peptide presented by HLA-A2 is recognized by cytolytic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 29: 3329-337
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. 2002. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-98
- Eliopoulos P, Mohammed MQ, Henry K, Retsas S. 2002. Overexpression of HER-2 in thick melanoma. *Melanoma Res* 12:139-45
- Enzler T, Gillessen S, Manis JP, Ferguson D, Fleming J, Alt FW, Mihm M, Dranoff G. 2003. Deficiencies of GM-CSF and interferon gamma link inflammation and cancer. *J Exp Med* 197:1213-219
- Erlich P. 1909. Ueber den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 5 (Part 1): 273-90
- Falk K, Rotzschke O, Rammensee HG. 1990. Cellular peptide composition governed by major histocompatibility complex class I molecules. *Nature* 348:248-51
- Fallarino F, Gajewski TF. 1999. Cutting edge: differentiation of antitumor CTL in vivo requires host expression of Stat1. *J Immunol* 163:4109-13
- Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi R, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Puccetti P. 2002. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ* 9:1069-077
- Feenstra M, Veltkamp M, van Kuik J, Wiertsema S, Slootweg P, van den Tweel J, de Weger R, 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
- Festenstein H, Garrido F. 1986. MHC antigens and malignancy. *Nature* 322:502-03
- Fiebiger E, Story C, Ploegh HL, Tortorella D. 2002. Visualization of the ER-to-cytosol dislocation reaction of a type I membrane protein. *EMBO J* 21:1041-053
- Fields RC, Shimizu K, Mule JJ. 1998. Murine dendritic cells pulsed with whole tumor lysates mediate potent antitumor immune responses in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:9482-487
- Fink-Puches R, Pilarski P, Schmidbauer U, Kerl H, Soyer HP. 2001. No evidence for c-erbB-2 overexpression in cutaneous melanoma. *Anticancer Res* 21:2793-795
- Fisk B, Blevins T, Wharton J, Ioannides C. 1995. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocytes lines. *J. Exp. Med.* 181: 2109-117
- Fisk B, Savary C, Hudson JM, O'Brian CA, Murray JL, Wharton JT, Ioannides CG. 1995. Changes in an HER-2 peptide upregulating HLA-A2 expression affect both conformational epitopes and CTL recognition: implications for optimization of antigen presentation and tumor-specific CTL induction. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 18:197-209
- Foley EJ. 1953. Antigenic properties of methylcholanthrene-induced tumors in mice of the strain of origin. *Cancer Res* 13:835-47

- Fontana A, Frei K, Bodmer S, Hofer E, Schreier MH, Palladino MA Jr, Zinkernagel RM. 1989. Transforming growth factor-beta inhibits the generation of cytotoxic T cells in virus-infected mice. *J Immunol* 143:230-234
- Frickel EM, Riek R, Jelesarov I, Helenius A, Wuthrich K, Ellgaard L. 2002. TROSY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1954-959
- Fujie T, Tahara K, Tanaka F, Mori K, Takesako K, Akiyoshi T. 1999. A MAGE-1 encoded HLA-A24-binding synthetic peptide induces specific anti-tumor cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Cancer* 80: 169-72
- Galea-Lauri J, Darling D, Gan SU, Krivochchapov L, Kuiper M, Gaken J, Souberbielle B, 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 MC, Hill AB, Knee R, Michalak M, 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 AD, Chambers BJ, Ljunggren HG, Momburg F, Hammerling GJ. 2000. Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice. *Nat Immunol* 1:234-38
- Garcia-Lora A, Algarra I, Gaforio JJ, Ruiz-Cabello F, 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, 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 JJ, 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* 106:521-27
- Garrido F, Festenstein H, Schirmacher V. 1976. Further evidence for depression of H-2 and Ia-like specificities of foreign haplotypes in mouse tumour cell lines. *Nature* 261:705-07
- Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern PL. 1993. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* 14:491-99
- Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL. 1997. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 18:89-95
- Garrido F, Algarra I. 2001. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 83:117-58
- Gaudin C, Kremer F, Angevin E, Scott V, Triebel F. 1999. A hsp70-2 mutation recognized by CTL on a human renal cell carcinoma. *J. Immunol.* 162: 1730-738
- Gaugler B, Van den Eynde B, van der Bruggen P, Romero P, Gaforio J, De

- Plaen E, Lethé B, Brasseur F, Boon T. 1994. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med* 179: 921-30
- Gaugler B, Brouwenstijn N, Vantomme V, Szikora JP, Van der Spek CW, Patard JJ, Boon T, Schrier P, Van den Eynde BJ. 1996. A new gene coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human renal carcinoma. *Immunogenetics* 44:323-30
- Gee JM, Robertson JF, Ellis IO, Nicholson RI, Hurst HC. 1999. Immunohistochemical analysis reveals a tumour suppressor-like role for the transcription factor AP-2 in invasive breast cancer. *J Pathol* 189:514-20
- Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Rothbard J, Burchell J. 1988. A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *J Biol Chem* 263:12820-2823
- Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 195:327-33
- Gilboa E. 2004. The promise of cancer vaccines. *Nature* 4: 401-11
- Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, Hayday AC. 2001. Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294:605-09
- Girdlestone J, Isamat M, Gewert D, Milstein C. 1993. Transcriptional regulation of HLA-A and -B: differential binding of members of the Rel and IRF families of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11568-1572
- Girolomoni G, Ricciardi-Castagnoli P. 1997. Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunol Today* 18:102-04
- Gjertsen M, Bjorheim J, Saeterdal I, Myklebust J, Gaudernack G. 1997. Cytotoxic CD4+ and CD8+ T lymphocytes, generated by mutant p21-ras (12Val) peptide vaccination of a patient, recognize 12 Val-dependent nested epitopes present within the vaccine peptide and kill autologous tumour cells carrying this mutation. *Int. J. Cancer* 72: 784-90
- Glimcher LH, Kara CJ. 1992. Sequences and factors: a guide to MHC class II transcription. *Ann Rev Immunol* 10:13-50
- Globerson A, Feldman M. 1964. Antigenic specificity of benzo(a)pyrene-induced sarcomas. *J Natl Cancer Inst* 32:1229-243
- Glynne R, Powis SH, Beck S, Kelly A, Kerr LA, 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
- Gnjatic S, Cai Z, Viguier M, Chouaib S, Guillet JG, Choppin J. 1998. Accumulation of the p53 protein allows recognition by human CTL of a wild-type p53 epitope presented by breast carcinomas and melanomas. *J Immunol* 160:328-33
- Gnjatic S, Atanackovic D, Jager E, Matsuo M, Selvakumar A, Altorki NK, Maki

- RG, Dupont B, Ritter G, Chen YT, Knuth A, Old LJ. 2003. Survey of naturally occurring CD4+ T cell responses against NY-ESO-1 in cancer patients: correlation with antibody responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8862-867
- Godefroy E, Moreau-Aubry A, Diez E, Dreno B, Jotereau F, Guilloux Y. 2005. alpha v beta3-dependent cross-presentation of matrix metalloproteinase-2 by melanoma cells gives rise to a new tumor antigen. *J Exp Med* 202:61-72
- Goldberg EF, Miele ME, Hatta N, Takata M, Paquette-Straub C. 2003. Melanoma metastasis suppression by chromosome 6: evidence for a pathway regulated by CRSP3 and TXNIP. *Cancer Res* 63: 432-40
- Goodfellow PN, Jones EA, Van Heyningen V, Solomon E, Bobrow M, Miggiano V, Bodmer WF. 1975. The beta2-microglobulin gene is on chromosome 15 and not in the HL-A region. *Nature* 254:267-69
- Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, Gold LI, Arrick BA. 1992. Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 52:6949-952
- Grachtchouk M, Mo R, Yu S, Zhang X, Sasaki H, Hui CC, Dlugosz AA. 2000. Basal cell carcinomas in mice overexpressing Gli2 in skin. *Nat Genet* 24:216-17
- Grande AG 3rd, Golovina TN, Hamilton SE, Sriram V, Spies T, Brutkiewicz RR, Harty JT, Eisenlohr LC, Van Kaer L. 2000. Impaired assembly yet normal trafficking of MHC class I molecules in Tapasin mutant mice. *Immunity* 13:213-22
- Grande AG 3rd, Van Kaer L. 2001. Tapasin: an ER chaperone that controls MHC class I assembly with peptide. *Trends Immunol* 22:194-99
- Graus F, Dalmou J, Rene R, Tora M, Malats N, Verschuuren JJ, Cardenal F, Vinolas N, Garcia del Muro J, Vadell C, Mason WP, Rosell R, Posner JB, Real FX. 1997. Anti-Hu antibodies in patients with small-cell lung cancer: association with complete response to therapy and improved survival. *J Clin Oncol* 15:2866-872
- Green J, Leigh IM, Poulsom R, Quinn AG. 1998. Basal cell carcinoma development is associated with induction of the expression of the transcription factor Gli-1. *Br J Dermatol* 139:911-15
- Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:12445-2450
- Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T. 1998. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science* 279:1737-740
- Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, 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* 96:6879-884



- Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. 2001. Costimulation of CD8 $\alpha$  T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2:255-60
- Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419:734-38
- Gronbaek K, Straten PT, Ralfkiaer E, Ahrenkiel V, Andersen MK, Hansen NE, Zeuthen J, Hou-Jensen K, Guldberg P. 1998. Somatic Fas mutations in non-Hodgkin's lymphoma: association with extranodal disease and autoimmunity. *Blood* 92:3018-024
- Gross L. Intradermal immunization of C3H mice against a sarcoma that originated in an animal of the same line. *Cancer Res* 1943; 3: 326-33
- Guéguen M, Patard J, Gaugler B, Brasseur F, Renauld J, Van Cangh P, Boon T, Van den Eynde B. 1998. An antigen recognized by autologous CTL on a human bladder carcinoma. *J. Immunol.* 160: 6188-194
- Guilloux Y, Lucas S, Brichard V, Van Pel A, Viret C, De Plaen E, Brasseur F, Lethé B, Jotereau F, Boon T. 1996. A peptide recognized by human cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas is encoded by an intron sequence of the N-acetylglucosaminyltransferase V gene. *J. Exp. Med* 183: 1173-183
- Haas GG Jr, D'Cruz OJ, De Bault LE. 1988. Distribution of human leukocyte antigen-ABC and -D/DR antigens in the unfixed human testis. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 18:47-51
- Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. 1996. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274:1363-366
- Hanahan D, Folkman J. 1996. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-64
- Hayashi T, Faustman DL. 2002. Development of spontaneous uterine tumors in low molecular mass polypeptide-2 knockout mice. *Cancer Res* 62:24-7
- Heidelberger C. 1975. Chemical carcinogenesis. *Annu Rev Biochem* 44:79-121
- Hellstrom KE, Hellstrom I. 1969. Cellular immunity against tumor antigens. *Adv Cancer Res* 12:167-223
- Herberman RB, Holden HT. 1978. Natural cell-mediated immunity. *Adv Cancer Res* 27:305-77
- Herman J, van der Bruggen P, Luescher I, Mandruzzato S, Romero P, Thonnard J, Fleischhauer K, Boon T, Coulie P. 1996. A peptide encoded by the human gene MAGE-3 and presented by HLA-B44 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3. *Immunogenetics* 43: 377-83
- Herrmann F, Lehr HA, Drexler I, Sutter G, Hengstler J, Wollscheid U, Seliger B. 2004. HER-2/neu-mediated regulation of components of the MHC

- class I antigen-processing pathway. *Cancer Res* 64:215-20
- Hersey P, Zhang XD. 2001. How melanoma cells evade trail-induced apoptosis. *Nat Rev Cancer* 1:142-50
- Hershko A, Ciechanover A. 1992. The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 61:761-807
- Hershko A, Ciechanover A, Varshavsky A. 2000. Basic Medical Research Award. The ubiquitin system. *Nat Med* 6:1073-081
- Hicklin DJ, Marincola FM, Ferrone S. 1999. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Mol Med Today* 5:178-86
- Hildebrandt T, Van Dijk M, Van Muijen G, Weidle U. 2001. Loss of heterozygosity of gene THW is frequently found in melanoma metastases. *Anticancer Res.* 21: 1071-080
- Hodge-Dufour J, Noble PW, Horton MR, Bao C, Wysoka M, Burdick MD, Strieter RM, Trinchieri G, Pure E. 1997. Induction of IL-12 and chemokines by hyaluronan requires adhesion-dependent priming of resident but not elicited macrophages. *J Immunol* 159:2492-500
- Hogan K, Eisinger K, Cupp S, Lekstrom K, Deacon D, Shabanowitz J, Hunt D, Engelhard V, Slingluff C, Ross M. 1998. The peptide recognized by HLA-A68.2-restricted, squamous cell carcinoma of the lung-specific cytotoxic T lymphocytes is derived from a mutated elongation factor 2 gene. *Cancer Res.* 58: 5144-150
- Hu J, Kindsvogel W, Busby S, Bailey MC, Shi YY, Greenberg PD. 1993. An evaluation of the potential to use tumor-associated antigens as targets for antitumor T cell therapy using transgenic mice expressing a retroviral tumor antigen in normal lymphoid tissues. *J Exp Med* 177:1681-690
- Huang AY, Golumbek P, Ahmadzadeh M, Jaffee E, Pardoll D, Levitsky H. 1994. Role of bone marrow-derived cells in presenting MHC class I-restricted tumor antigens. *Science* 264:961-65
- Huang CT, Huso DL, Lu Z, Wang T, Zhou G, Kennedy EP, Drake CG, Morgan DJ, Sherman LA, Higgins AD, Pardoll DM, Adler AJ. 2003. CD4+ T cells pass through an effector phase during the process of in vivo tolerance induction. *J Immunol* 170:3945-953
- Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H, Dubinett SM. 1998. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res* 58:1208-216
- Huang L, Brasseur F, Serrano A, De Plaen E, van der Bruggen P, Boon T, Van Pel A. 1999. Cytolytic T lymphocytes recognize an antigen encoded by MAGE-A10 on a human melanoma. *J. Immunol* 162: 6849-854
- Ikeda H, Lethé B, Lehmann F, Van Baren N, Baurain J, De Smet C, Chambost H, Vitale M, Moretta A, Boon T, Coulie P. 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
- Ikehara S, Pahwa RN, Fernandes G, Hansen CT, Good RA. 1984. Functional T cells in athymic nude mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:886-8
- Inman JL, Kute T, White W, Pettenati M, Levine EA. 2003. Absence of HER2 overexpression in metastatic malignant melanoma. *J Surg Oncol* 84:82-8
- Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 388:190-95
- Ishigami S, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X. 2000. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 88: 577-83
- Ishii H, Furukawa Y. 2004. Alterations of common chromosome fragile sites in hematopoietic malignancies. *Int J Hematol* 79:238-42
- Jager E, Ringhoffer M, Dienes HP, Arand M, Karbach J, Jager D, Ilsemann C, Hagedorn M, Oesch F, Knuth A. 1996. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor enhances immune responses to melanoma-associated peptides in vivo. *Int J Cancer* 67:54-62
- Jager E, Chen Y, Drijfhout J, Karbach J, Ringhoffer M, Jager D, Arand M, Wada H, Noguchi Y, Stochert E, Old L, Knuth A. 1998. Simultaneous humoral and cellular immune response against cancer-testis antigen NY-ESO-1: definition of human histocompatibility leukocyte antigen HLA-A2-binding peptide epitopes. *J. Exp. Med* 187: 265-70
- Jager E, Nagata Y, Gnjatic S, Wada H, Stockert E, Karbach J, Dunbar PR, Lee SY, Jungbluth A, Jager D, Arand M, Ritter G, Cerundolo V, Dupont B, Chen YT, Old LJ, Knuth A. 2000. Monitoring CD8 T cell responses to NY-ESO-1: correlation of humoral and cellular immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:4760-765
- Janeway CA Jr. 1989. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1:1-13
- Jimenez P, Canton J, Collado A, Cabrera T, Serrano A, Real LM, Garcia A, Ruiz-Cabello F, 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 AK, Templeton DJ, Sy M, Harding CV. 1999. Deficiency of transporter for antigen presentation (TAP) in tumor cells allows evasion of immune surveillance and increases tumorigenesis. *J Immunol* 163:4224-31
- Johnson DR. 2000. Differential expression of human major histocompatibility class I loci: HLA-A, -B, and -C. *Hum Immunol* 61:389-96
- Jones EY. 1997. MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol* 9:75-9
- Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp*

- Med* 193:1285-294
- Jung S, Schluesener HJ. 1991. Human T lymphocytes recognize a peptide of single point-mutated, oncogenic ras proteins. *J Exp Med* 173:273-76
- Kacha AK, Fallarino F, Markiewicz MA, Gajewski TF. 2000. Cutting edge: spontaneous rejection of poorly immunogenic P1.HTR tumors by Stat6-deficient mice. *J Immunol* 165:6024-028
- Kageshita T, Hirai S, Ono T, Hicklin DJ, Ferrone S. 1999. Down-regulation of HLA class I antigen-processing molecules in malignant melanoma: association with disease progression. *Am J Pathol* 154:745-54
- Kaklamanis L, Townsend A, Doussis-Anagnostopoulou IA, Mortensen N, Harris AL, Gatter KC. 1994. Loss of major histocompatibility complex-encoded transporter associated with antigen presentation (TAP) in colorectal cancer. *Am J Pathol* 145:505-09
- Kaklamanis L, Leek R, Koukourakis M, Gatter KC, Harris AL. 1995. Loss of transporter in antigen processing 1 transport protein and major histocompatibility complex class I molecules in metastatic versus primary breast cancer. *Cancer Res* 55:5191-194
- Kang X, Kawakami Y, El-Gamil M, Wang R, Sakaguchi K, Yannelli J, Appella E, Rosenberg S, Robbins P. 1995. Identification of a tyrosinase epitope recognized by HLA-A24-restricted, tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol*. 155: 1343-348
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. 1998. Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7556-561
- Kappes D, Strominger JL. 1988. Human class II major histocompatibility complex genes and proteins. *Annu Rev Biochem* 57:991-1028
- Karjalainen JM, Eskelinen MJ, Nordling S, Lipponen PK, Alhava EM, Kosma VM. 1998. Mitotic rate and S-phase fraction as prognostic factors in stage I cutaneous malignant melanoma. *Br J Cancer* 77:1917-925
- Kast WM, Melief CJ. 1991. Fine peptide specificity of cytotoxic T lymphocytes directed against adenovirus-induced tumours and peptide-MHC binding. *Int J Cancer Suppl* 6:90-4
- Kawakami Y, Eliyahu S, Delgado C, Robbins P, Sakaguchi K, Appella E, Yannelli J, Adema G, Miki T, Rosenberg S. 1994. Identification of a human melanoma antigen recognized by tumor-infiltrating lymphocytes associated with in vivo tumor rejection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 6458-462
- Kawakami Y, Eliyahu S, Sakaguchi K, Robbins P, Rivoltini L, Yannelli J, Appella E, Rosenberg S. 1994. Identification of the immunodominant peptides of the MART-1 human melanoma antigen recognized by the majority of HLA-A2-restricted tumor infiltrating lymphocytes. *J. Exp. Med.* 180: 347-52
- Kawakami Y, Eliyahu S, Jennings C, Skaguchi K, Kang X, Southwood S, Robbins P, Sette A, Appella E, Rosenberg S. 1995. Recognition of multiple epitopes in the human melanoma antigen gp100 by tumor-

- infiltrating T lymphocytes associated with *in vivo* tumor progression. *J. Immunol.* 154: 3961-968
- Kawakami Y, Robins P, Wang X, Tupesis J, Parkhurst M, Kang X, Sakaguchi K, Appella E, Rosenberg S. 1998. Identification of new melanoma epitopes on melanosomal proteins recognized by tumor infiltrating T lymphocytes restricted by HLA-A1, A2, and A3 alleles. *J. Immunol.* 161: 6985-992
- Kawashima I, Hudson S, Tsai V, Southwood S, Takesako K, Appella E, Sette A, Celis E. 1998. The multi-epitope approach for immunotherapy for cancer: identification of several CTL epitopes from various tumor-associated antigens expressed on solid epithelial tumors. *Hum. Immunol* 59: 1-14
- Kelly A, Powis SH, Glynn R, Radley E, Beck S, Trowsdale J. 1991. Second proteasome-related gene in the human MHC class II region. *Nature* 353:667-68
- Khanna R, Khanna S, Chaturvedi S, Arya NC. 1998. Spectrum of breast disease in young females: a retrospective study of 1315 patients. *Indian J Pathol Microbiol* 41:397-401
- Khong HT, Restifo NP. 2002. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nat Immunol* 3:999-1005
- Kittlesen D, Thompson L, Gulden P, Skipper J, Colella T, Shabanowitz J, Hunt D, Engelhard V, Slingluff C. 1998. Human melanoma patients recognize an HLA-A1 restricted CTL epitope from tyrosinase containing two cysteine residues: implications for tumor vaccine development. *J. Immunol.* 160: 2099-106
- Klarnet JP, Kern DE, Okuno K, Holt C, Lilly F, Greenberg PD. 1989. FBL-reactive CD8+ cytotoxic and CD4+ helper T lymphocytes recognize distinct Friend murine leukemia virus-encoded antigens. *J Exp Med* 169:457-67
- Klein G, Sjogren HO, Klein E, Hellstrom KE. 1960. Demonstration of resistance against methylcholanthrene-induced sarcomas in the primary autochthonous host. *Cancer Res* 20:1561-572
- Kluger HM, DiVito K, Berger AJ, Halaban R, Ariyan S, Camp RL, Rimm DL. 2004. Her2/neu is not a commonly expressed therapeutic target in melanoma -- a large cohort tissue microarray study. *Melanoma Res* 14:207-10
- Kobayashi H, Kokubo T, Sato K, Kimura S, Asano K, Tkahashi H, Iizuka H, Miyokawa N, Katagiri M. 1998. CD4+ T cells from peripheral blood of a melanoma patient recognize peptides derived from nonmutated tyrosinase. *Cancer Research* 58: 296-01
- Koopman LA, Corver WE, van der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. 2000. Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med* 191:961-76
- Korkolopoulou P, Kaklamanis L, Pezzella F, Harris AL, Gatter KC. 1996. Loss

- of antigen-presenting molecules (MHC class I and TAP-1) in lung cancer. *Br J Cancer* 73:148-53
- Kripke ML, Borsos T. 1974. Editorial: Immune surveillance revisited. *J Natl Cancer Inst* 52:1393-395
- Kumar A, Commane M, Flickinger TW, Horvath CM, Stark GR. 1997. Defective TNF-alpha-induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* 278:1630-632
- Lancaster CA, Peat N, Duhig T, Wilson D, Taylor-Papadimitriou J, Gendler SJ. 1990. Structure and expression of the human polymorphic epithelial mucin gene: an expressed VNTR unit. *Biochem Biophys Res Commun* 173:1019-029
- Landowski TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS, Dalton WS. 1997. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 90:4266-270
- Lanier LL. 1998. Activating and inhibitory NK cell receptors. *Adv Exp Med Biol* 452:13-8
- Lanier LL. 2001. On guard--activating NK cell receptors. *Nat Immunol* 2:23-7
- Larsen CN, Finley D. 1997. Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. *Cell* 91:431-34
- Lee KH, Wang E, Nielsen MB, Wunderlich J, Migueles S, Connors M, Steinberg SM, Rosenberg SA, Marincola FM. 1999. Increased vaccine-specific T cell frequency after peptide-based vaccination correlates with increased susceptibility to in vitro stimulation but does not lead to tumor regression. *J Immunol* 163:6292-300
- Lefrancois L, Fuller B, Huleatt JW, Olson S, Puddington L. 1997. On the front lines: intraepithelial lymphocytes as primary effectors of intestinal immunity. *Springer Semin Immunopathol* 18:463-75
- Legge KL, Gregg RK, Maldonado-Lopez R, Li L, Caprio JC, Moser M, Zaghouani H. 2002. On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity. *J Exp Med* 196:217-27
- Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-49
- Lethe B, van der Bruggen P, Brasseur F, Boon T. 1997. MAGE-1 expression threshold for the lysis of melanoma cell lines by a specific cytotoxic T lymphocyte. *Melanoma Res* 7 Suppl 2:S83-8
- Levings MK, Sangregorio R, Roncarolo MG. 2001. Human cd25(+)cd4(+) t regulatory cells suppress naive and memory T cell proliferation and can be expanded in vitro without loss of function. *J Exp Med* 193:1295-302
- Loeb LA. 1991. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 51:3075-079
- Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. 2003. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:776-81
- Ludewig B, Graf D, Gelderblom HR, Becker Y, Kroczeck RA, 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* 25:1943-950

- Lupetti R, Pisarra P, Verrecchia A, Farina C, Nicolini G, Anichini A, Bordignon C, Sensi M, Parmiani G, Traversari C. 1998. Translation of a retained intron in tyrosinase-related protein (TRP)-2 mRNA generates a new cytotoxic T lymphocyte (CTL)-defined and shared human melanoma antigen not expressed in normal cells of the melanocytic lineage. *J. Exp. Med* 188: 1005-016
- Lurquin C, Van Pel A, Mariame B, De Plaen E, Szikora JP, Janssens C, Reddehase MJ, Lejeune J, Boon T. 1989. Structure of the gene of tum- transplantation antigen P91A: the mutated exon encodes a peptide recognized with Ld by cytolytic T cells. *Cell* 58:293-03
- Lurquin C, De Smet C, Brasseur F, Muscatelli F, Martelange V, De Plaen E, Brasseur R, Monaco AP, Boon T. 1997. Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins. *Genomics* 46:397-08
- Lustgarten J, Theobald M, Labadie C, LaFace D, Peterson P, Disis ML, Cheever MA, Sherman LA. 1997. Identification of Her-2/Neu CTL epitopes using double transgenic mice expressing HLA-A2.1 and human CD.8. *Hum Immunol* 52:109-18
- Machiels JP, Reilly RT, Emens LA, Ercolini AM, Lei RY, Weintraub D, Okoye FI, Jaffee EM. 2001. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. *Cancer Res* 61:3689-697
- Mackie RM, Reid R, Junor B. 2003. Fatal melanoma transferred in a donated kidney 16 years after melanoma surgery. *N Engl J Med* 348:567-8
- MacMicking J, Xie QW, Nathan C. 1997. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15:323-50
- Magarian-Blander J, Domenech N, Finn OJ. 1993. Specific and effective T-cell recognition of cells transfected with a truncated human mucin cDNA. *Ann N Y Acad Sci* 690:231-43
- Maleckar JR, Sherman LA. 1987. The composition of the T cell receptor repertoire in nude mice. *J Immunol* 138:3873-876
- Maleno I, Lopez-Nevot MA, Cabrera T, Salinero J, 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 CM, Cabrera T, Paco L, Lopez-Nevot MA, Collado A, Ferron A, 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* 56:244-53
- Maleno I, Romero JM, Cabrera T, Paco L, Aptsiauri N, Cozar JM, Tallada M, López-Nevot MA, Garrido F. 2006. LOH at 6p21.3 region and HLA class I altered phenotypes in bladder carcinomas. *In press*
- Maloy KJ, Powrie F. 2001. Regulatory T cells in the control of immune

- pathology. *Nat Immunol* 2:816-22
- Mandrizzato S, Brasseur F, Andry G, Boon T, van der Bruggen P. 1997. A CASP-8 mutation recognized by cytolytic T lymphocytes on a human head and neck carcinoma. *J Exp Med* 186:785-93
- Manici S, Sturniolo T, Imro M, Hammer J, Sinigaglia F, Noppen C, Spagnoli G, Mazzi B, Bellone M, Dellabona P, Protti M. 1999. Melanoma cells present a MAGE-3 epitope to CD4(+) cytotoxic T cells in association with histocompatibility leukocyte antigen DR11. *J. Exp. Med* 189: 871-76
- Marchand M, van Baren N, Weynants P, Brichard V, Dreno B, Tessier MH, Rankin E, Parmiani G, Arienti F, Humblet Y, Bourlond A, Vanwijck R, Lienard D, Beauduin M, Dietrich PY, Russo V, Kerger J, Masucci G, Jager E, De Greve J, Atzpodien J, Brasseur F, Coulie PG, van der Bruggen P, Boon T. 1999. Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 80:219-30
- Marin R, Ruiz-Cabello F, Pedrinaci S, Mendez R, Jimenez P, Geraghty DE, Garrido F. 2003. Analysis of HLA-E expression in human tumors. *Immunogenetics* 54:767-75
- Matzinger P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991-1045
- McCutcheon JA, Gumperz J, Smith KD, Lutz CT, Parham P. 1995. Low HLA-C expression at cell surfaces correlates with increased turnover of heavy chain mRNA. *J Exp Med* 181:2085-095
- Medema JP, de Jong J, van Hall T, Melief CJ, Offringa R. 1999. Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med* 190:1033-038
- Mellor AL, Munn DH. 2001. Tryptophan catabolism prevents maternal T cells from activating lethal anti-fetal immune responses. *J Reprod Immunol* 52:5-13
- Mendez R, Serrano A, Jager E, Maleno I, Ruiz-Cabello F, Knuth A, Garrido F. 2001. Analysis of HLA class I expression in different metastases from two melanoma patients undergoing peptide immunotherapy. *Tissue Antigens* 57:508-19
- Mihm MC, Clemente CG, Cascinelli N. 1996. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases: a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab. Invest.* 74: 43-7
- Morel S, Ooms A, Van Pel A, Wolferl T, Brichard V, van der Bruggen P, van den Eynde B, Degiovanni G. 1999. A tyrosinase peptide presented by HLA-B35 is recognized on a human melanoma by autologous cytotoxic T lymphocytes. *In. J. Cancer* 83: 755-59
- Moretta L, Mingari MC, Pende D, Bottino C, Biassoni R, Moretta A. 1996. The molecular basis of natural killer (NK) cell recognition and function. *J Clin Immunol* 16:243-53
- Moretta A, Bottino C, Vitale M, Pende D, Cantoni C, Mingari MC, Biassoni R,



- Moretta L. 2001. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 19:197-23
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281:1191-193
- Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. 1999. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 189:1363-372
- Muscatelli F, Walker AP, De Plaen E, Stafford AN, Monaco AP. 1995. Isolation and characterization of a MAGE gene family in the Xp21.3 region. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:4987-991
- Nagata Y, Furugen R, Hiasa A, Ikeda H, Ohta N, Furukawa K, Nakamura H, Furukawa K, Kanematsu T, Shiku H. 1997. Peptides derived from a wild-type murine proto-oncogene c-erbB-2/HER2/neu can induce CTL and tumor suppression in syngeneic hosts. *J Immunol* 159:1336-343
- Natali PG, Nicotra MR, Digiesi G, Cavaliere R, Bigotti A, Trizio D, Segatto O. 1994. Expression of gp185HER-2 in human cutaneous melanoma: implications for experimental immunotherapeutics. *Int J Cancer* 56:341-46
- Nestle FO, Alijagic S, Gilliet M, Sun Y, Grabbe S, Dummer R, Burg G, Schadendorf D. 1998. Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat Med* 4:328-32
- Nguyen LT, Elford AR, Murakami K, Garza KM, Schoenberger SP, Odermatt B, Speiser DE, Ohashi PS. 2002. Tumor growth enhances cross-presentation leading to limited T cell activation without tolerance. *J Exp Med* 195:423-35
- Nie Y, Yang G, Song Y, Zhao X, So C, Liao J, Wang LD, Yang CS. 2001. DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 22:1615-623
- Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP, Liston JC, Salerno CT, Knapp DJ, Green DR, Kratzke RA. 1997. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* 57:1007-012
- Nijman HW, van Diest PJ, Poort-Keesom RJ, von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten RA, Kummer A, Meijer CJ, Melief CJ, Hilgers J, Kenemans P. 2001. T cell infiltration and MHC I and II expression in the presence of tumor antigens: An immunohistochemical study in patients with serous epithelial ovarian cancer. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 94:114-20
- Niu G, Wright KL, Huang M, Song L, Haura E, Turkson J, Zhang S, Wang T, Sinibaldi D, Coppola D, Heller R, Ellis LM, Karras J, Bromberg J, Pardoll D, Jove R, Yu H. 2002. Constitutive Stat3 activity up-regulates VEGF expression and tumor angiogenesis. *Oncogene* 21:2000-008
- Nossner E, Parham P. 1995. Species-specific differences in chaperone interaction of human and mouse major histocompatibility complex

- class I molecules. *J Exp Med* 181:327-37
- O'Connell J, Bennett MW, O'Sullivan GC, Roche D, Kelly J, Collins JK, Shanahan F. 1998. Fas ligand expression in primary colon adenocarcinomas: evidence that the Fas counterattack is a prevalent mechanism of immune evasion in human colon cancer. *J Pathol* 186:240-46
- Ochsenbein AF, Siervo S, Odermatt B, Pericin M, Karrer U, Hermans J, Hemmi S, Hengartner H, Zinkernagel RM. 2001. Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. *Nature* 411:1058-064
- Oiso M, Eura M, Katsura F, Takiguchi M, Sobao Y, Masuyama K, Nakashima M, Itoh K, Ishikawa T. 1999. A newly identified MAGE-3-derived epitope recognized by HLA-A24-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Int. J. Cancer* 81: 387-94
- Old LJ, Clarke DA, Benacerraf B, Stockert E. 1962. Effect of prior splenectomy on the growth of sarcoma 180 in normal and Bacillus Calmette-Guerin infected mice. *Experientia* 18:335-36
- Old LJ. 1981. Cancer immunology: the search for specificity--G. H. A. Clowes Memorial lecture. *Cancer Res* 41:361-75
- Ortmann B, Androlewicz MJ, Cresswell P. 1994. MHC class I/beta 2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 368:864-67
- Osborne CS, Chakalova L, Brown KE, Carter D, Horton A, Debrand E, Goyenechea B, Mitchell JA, Lopes S, Reik W, Fraser P. 2004. Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription. *Nat Genet* 36:1065-071
- Ostmeier H, Fuchs B, Otto F, Mawick R, Lppold A, Krieg V. 2001. Prognostic immunohistochemical markers of primary human melanomas. *Br J Dermatol* 145:203-09
- Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP, Gabrilovich DI. 1998. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 160:1224-232
- Pamer E, Cresswell P. 1998. Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 16:323-58
- Pardoll D. 2003. Does the Immune System see tumors as foreign or self?. *Annu.Rev.Immunol.* 21:807-39
- Parkhurst M, Fitzgerald E, Southwood S, Sette A, Rosenberg S, Kawakami Y. 1998. Identification of a shared HLA-A\*0201-restricted T-cell epitope from the melanoma antigen tyrosinase-related protein 2 (TRP2). *Cancer Res* 58: 4895-901
- Paschen A, Mendez RM, Jimenez P, Sucker A, Ruiz-Cabello F, Song M, Garrido F, Schadendorf D. 2003. Complete loss of HLA class I antigen expression on melanoma cells: a result of successive mutational events. *Int J Cancer* 103:759-67
- Pasternak G, Graffi A, Horn KH. 1964. [The Demonstration of Individual

- Specific Antigenicity in UV-induced mouse sarcoma.]. *Acta Biol Med Ger* 13:276-79
- Pathak S, Multani AS. 2006. Aneuploidy, stem cells and cancer. *EXS*49-64
- Peace DJ, Smith JW, Chen W, You SG, Cosand WL, Blake J, Cheever MA. 1994. Lysis of ras oncogene-transformed cells by specific cytotoxic T lymphocytes elicited by primary in vitro immunization with mutated ras peptide. *J Exp Med* 179:473-79
- Peh CA, Burrows SR, Barnden M, Khanna R, Cresswell P, Moss DJ, McCluskey J. 1998. HLA-B27-restricted antigen presentation in the absence of tapasin reveals polymorphism in mechanisms of HLA class I peptide loading. *Immunity* 8:531-42
- Pellegrino MA, Ferrone S, Reisfeld RA, Irie RF, Golub SH. 1977. Expression of histocompatibility (HLA) antigens on tumor cells and normal cells from patients with melanoma. *Cancer* 40:36-41
- Peltenburg LT, Schrier PI. 1994. Transcriptional suppression of HLA-B expression by c-Myc is mediated through the core promoter elements. *Immunogenetics* 40:54-61
- Penn I. 1996. Malignant melanoma in organ allograft recipients. *Transplantation* 61:274-78
- Perez B, Benitez R, Fernandez MA, Oliva MR, Soto JL, Serrano S, Lopez Nevot MA, Garrido F. 1999. A new beta 2 microglobulin mutation found in a melanoma tumor cell line. *Tissue Antigens* 53:569-72
- Perissi V, Menini N, Cottone E, Capello D, Sacco M, Montaldo F, De Bortoli M. 2000. AP-2 transcription factors in the regulation of ERBB2 gene transcription by oestrogen. *Oncogene* 19:280-88
- Persons DL, Arber DA, Sosman JA, Borelli KA, Slovak ML. 2000. Amplification and overexpression of HER-2/neu are uncommon in advanced stage melanoma. *Anticancer Res* 20:1965-968
- Petersson M, Charo J, Salazar-Onfray F, Noffz G, Mohaupt M, Qin Z, Klein G, Blankenstein T, Kiessling R. 1998. Constitutive IL-10 production accounts for the high NK sensitivity, low MHC class I expression, and poor transporter associated with antigen processing (TAP)-1/2 function in the prototype NK target YAC-1. *J Immunol* 161:2099-105
- Pieper R, Christian R, Gonzales M, Nishimura M, Gupta G, Settlege R, Shabanowitz J, Rosenberg S, Hunt D, Topalian S. 1999. Biochemical identification of a mutated human melanoma antigen recognized by CD4+ T cells. *J. Exp. Med.* 189: 757-65
- Poetsch M, Dittberner T, Woenckhaus C. 2003. Human genome and disease: review. *Cell. Mol. Life Sci.* 60: 1923-932
- Porgador A, Mandelboim O, Restifo NP, Strominger JL. 1997. Natural killer cell lines kill autologous beta2-microglobulin-deficient melanoma cells: implications for cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13140-3145
- Posner JB, Furneaux HM. 1990. Paraneoplastic syndromes. *Res Publ Assoc Res Nerv Ment Dis* 68:187-19
- Prehn RT, Main JM. 1957. Immunity to methylcholanthrene-induced sarcomas.

- J Natl Cancer Inst* 18:769-78
- Qin Z, Blankenstein T. 2000. CD4+ T cell--mediated tumor rejection involves inhibition of angiogenesis that is dependent on IFN gamma receptor expression by nonhematopoietic cells. *Immunity* 12:677-86
- Rachez C, Lemon B, Suldan Z, Bromleigh V, Gamble M, Näär A, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Freedman LP. 1999. Ligand-dependent transcription activation by nuclear receptors requires the DRIP complex. *Nature* 398:824-28
- Ramarathinam L, Sarma S, Maric M, Zhao M, Yang G, Chen L, Liu Y. 1995. Multiple lineages of tumors express a common tumor antigen, P1A, but they are not cross-protected. *J Immunol* 155:323-329
- Real LM, Jimenez P, Canton J, Kirkin A, Garcia A, Abril E, Zeuthen J, Ruiz-Cabello F, 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
- Reits EA, Griekspoor AC, Neeffjes J. 2000. How does TAP pump peptides? insights from DNA repair and traffic ATPases. *Immunol Today* 21:598-600
- Reits EA, Vos JC, Gromme M, Neeffjes J. 2000. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 404:774-78
- Ressing ME, Sette A, Brandt RM, Ruppert J, Wentworth PA, Hartman M, Oseroff C, Grey HM, Melief CJ, Kast WM. 1995. Human CTL epitopes encoded by human papillomavirus type 16 E6 and E7 identified through in vivo and in vitro immunogenicity studies of HLA-A\*0201-binding peptides. *J Immunol* 154:5934-943
- Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, Bennink JR. 1993. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med* 177:265-72
- Restifo NP, Kawakami Y, Marincola F, Shamamian P, Taggarse A, Esquivel F, Rosenberg SA. 1993. Molecular mechanisms used by tumors to escape immune recognition: immunogenetherapy and the cell biology of major histocompatibility complex class I. *J Immunother* 14:182-90
- Richards JM, Mehta N, Ramming K, Skosey P. 1992. Sequential chemoimmunotherapy in the treatment of metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 10:1338-343
- Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. 1997. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 57:1276-280
- Ritz U, Momburg F, Pilch H, Huber C, Maeurer MJ, Seliger B. 2001. Deficient expression of components of the MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. *Int J Oncol* 19:1211-220
- Robbins PF, el-Gamil M, Kawakami Y, Stevens E, Yannelli JR, Rosenberg SA. 1994. Recognition of tyrosinase by tumor-infiltrating lymphocytes from a patient responding to immunotherapy. *Cancer Res* 54:3124-126
- Robbins PF, El-Gamil M, Li YF, Fitzgerald EB, Kawakami Y, Rosenberg SA.

1997. The intronic region of an incompletely spliced gp100 gene transcript encodes an epitope recognized by melanoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes. *J Immunol* 159:303-08
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78:761-71
- Rock KL, Goldberg AL. 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu Rev Immunol* 17:739-79
- Rodriguez T, Mendez R, Roberts CH, Ruiz-Cabello F, Dodi IA, Lopez Nevot MA, Paco L, Maleno I, Marsh SG, Pawelec G, Garrido F. 2005. High frequency of homozygosity of the HLA region in melanoma cell lines reveals a pattern compatible with extensive loss of heterozygosity. *Cancer Immunol Immunother* 54:141-48
- Rogner UC, Wilke K, Steck E, Korn B, Poustka A. 1995. The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28. *Genomics* 29:725-31
- Romero JM, Jimenez P, Cabrera T, Cozar JM, Pedrinaci S, Tallada M, Garrido F, Ruiz-Cabello F. 2005. Coordinated downregulation of the antigen presentation machinery and HLA class I/beta2-microglobulin complex is responsible for HLA-ABC loss in bladder cancer. *Int J Cancer* 113:605-10
- Ronsin C, Chung-Scott V, Pullion I, Aknouche N, Gaudin C, Triebel F. 1999. A non-AUG-defined alternative open reading frame of the intestinal carboxyl esterase mRNA generates an epitope recognized by renal cell carcinoma-reactive tumor-infiltrating lymphocytes *in situ*. *J Immunol* 163: 483-90
- Ropke M, Hald J, Guldborg P, Zeuthen J, Norgaard L, Fugger L, Svejgaard A, Van der Burg S, Nijman HW, Melief CJ, Claesson MH. 1996. Spontaneous human squamous cell carcinomas are killed by a human cytotoxic T lymphocyte clone recognizing a wild-type p53-derived peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:14704-4707
- Ropponen KM, Kellokoski JK, Pirinen RT, Moisio KI, Eskelinen MJ, Alhava EM, Kosma VM. 2001. Expression of transcription factor AP-2 in colorectal adenomas and adenocarcinomas; comparison of immunohistochemistry and *in situ* hybridisation. *J Clin Pathol* 54:533-38
- Rosa F, Berissi H, Weissenbach J, Maroteaux L, Fellous M, 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
- Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, Linehan WM, Robertson CN, Lee RE, Rubin JT, a. I. et. 1987. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 316:889-97

- Rosenberg SA, Packard BS, Aebersold PM, Solomon D, Topalian SL, Toy ST, Simon P, Lotze MT, Yang JC, Seipp CA, et al. 1988. Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *N Engl J Med* 319:1676-680
- Rosenberg SA, Yannelli JR, Yang JC, Topalian SL, Schwartzentruber DJ, Weber JS, Parkinson DR, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. 1994. Treatment of patients with metastatic melanoma with autologous tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin 2. *J Natl Cancer Inst* 86:1159-166
- Rosenberg SA, White DE. 1996. Vitiligo in patients with melanoma: normal tissue antigens can be targets for cancer immunotherapy. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol* 19:81-4
- Rosenberg SA, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian NP, Restifo ME, Dudley SL, Schwarz PJ, Spiess JR, Wunderlich SL, Parkhurst MR, Kawakami Y, Seipp CA, Einhorn JH, White DE. 1998. Immunologic and therapeutic evaluation of a synthetic peptide vaccine for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Nat Med* 4:321-27
- Rosenberg SA, Zhai Y, Yang JC, Schwartzentruber DJ, Hwu P, Marincola FM, Topalian SL, Restifo NP, Seipp CA, Einhorn JH, Roberts B, White DE. 1998. Immunizing patients with metastatic melanoma using recombinant adenoviruses encoding MART-1 or gp100 melanoma antigens. *J Natl Cancer Inst* 90:1894-900
- Rouse BT, Rollinghoff M, Warner NL. 1972. Anti-theta serum-induced suppression of the cellular transfer of tumour-specific immunity to a syngeneic plasma cell tumour. *Nat New Biol* 238:116-17
- Rubinfeld B, Robbins P, El-Gamil M, Albert I, Porfiri E, Polakis P. 1997. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science* 275:1790-792
- Rudensky AY, Preston-Hurlburt P, Hong SC, Barlow A, Janeway CA Jr. 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353:622-27
- Ruiter DJ, Bergman W, Welvaart K, Scheffer E, van Vloten WA, Russo C. 1984. Immunohistochemical analysis of malignant melanomas and nevocellular nevi with monoclonal antibodies to distinct monomorphic determinants of HLA antigens. *Cancer Res* 44:3930-935
- Ruiz-Cabello F, 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* 2:361-72
- Russell JH, Ley TJ. 2002. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 20:323-70
- Rygaard J, Povlsen CO. 1974. 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 BK, Cariappa A, Waneck GL, 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
- Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, Spies T, 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
- Sahin U, Tureci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I, Pfreundschuh M. 1995. Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:11810-1813
- Sahin U, Tureci O, Pfreundschuh M. 1997. Serological identification of human tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9:709-16
- Saito H, Tsujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, 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* 78:1573-577
- Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. 1985. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med* 161:72-87
- Sakaguchi, S. 2004. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22:531-62
- Salazar-Onfray F, Charo J, Petersson M, Frelund S, Noffz G, Qin Z, Blankenstein T, Ljunggren HG, 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
- Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. 2002. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 169:4098-102
- Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. 2000. The role of chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 18:593-620
- Salvesen GS, Dixit VM. 1999. Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10964-0967
- Schaed SG, Klimek VM, Panageas KS, Musselli CM, Butterworth L, Hwu WJ, Livingston PO, Williams L, Lewis JJ, Houghton AN, Chapman PB. 2002. T-cell responses against tyrosinase 368-376(370D) peptide in HLA\*A0201+ melanoma patients: randomized trial comparing incomplete Freund's adjuvant, granulocyte macrophage colony-stimulating factor, and QS-21 as immunological adjuvants. *Clin Cancer Res* 8:967-72
- Schneider J, Brichard V, Boon T, Meyer K, Wolfel T. 1998. Overlapping

- peptides of melanocyte differentiation antigen Melan-A/MART-1 recognized by autologous cytolytic T lymphocytes in association with HLA-B45.1 and HLA-A2.1. *Int. J. Cancer* 75: 451-58
- Schreiber H, Wu TH, Nachman J, Kast WM. 2002. Immunodominance and tumor escape. *Semin Cancer Biol* 12:25-31
- Schreiber RD, Pace JL, Russell SW, Altman A, Katz DH. 1983. Macrophage-activating factor produced by a T cell hybridoma: physicochemical and biosynthetic resemblance to gamma-interferon. *J Immunol* 131:826-32
- Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. 2000. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 404:770-74
- Schultz ES, Chapiro J, Lurquin C, Claverol S, Burlet-Schiltz O, Warnier G, Russo V, Morel S, Levy F, Boon T, Van den Eynde BJ, van der Bruggen P. 2002. The production of a new MAGE-3 peptide presented to cytolytic T lymphocytes by HLA-B40 requires the immunoproteasome. *J Exp Med* 195:391-99
- Schwartz RH. 1990. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 248:1349-356
- Seliger B, Wollscheid U, Momburg F, Blankenstein T, 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
- Seliger B, Ritz U, Abele R, Bock M, Tampe R, Sutter G, Drexler I, Huber C, Ferrone S. 2001. Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res* 61:8647-650
- Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S. 2002. HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol* 12:3-13
- Seliger B, Atkins D, Bock M, Ritz U, Ferrone S, Huber C, Storkel S. 2003. Characterization of human lymphocyte antigen class I antigen-processing machinery defects in renal cell carcinoma lesions with special emphasis on transporter-associated with antigen-processing down-regulation. *Clin Cancer Res* 9:1721-727
- Sensi M, Traversari C, Radrizzani M, Salvi S, Maccalli C, Mortarini R, Rivoltini L, Farina C, Nicolini G, Wolfel T, et al. 1995. Cytotoxic T-lymphocyte clones from different patients display limited T-cell-receptor variable-region gene usage in HLA-A2-restricted recognition of the melanoma antigen Melan-A/MART-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5674-678
- Serrano A, Garcia A, Abril E, Garrido F, Ruiz-Cabello F. 1996. Methylated CpG points identified within MAGE-1 promoter are involved in gene repression. *Int J Cancer* 68:464-70
- Serrano A, Brady CS, Jimenez P, Duggan-Keen MF, Mendez R, Stern P, Garrido F, 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* 51:1047-052
- Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, Shastri N. 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419:480-83
- Setiadi AF, David MD, Chen SS, Hiscott J, Jefferies WA. 2005. Identification of mechanisms underlying transporter associated with antigen processing deficiency in metastatic murine carcinomas. *Cancer Res* 65:7485-492
- Sgadari C, Angiolillo AL, Cherney BW, Pike SE, Farber JM, Koniaris LG, Vanguri P, Burd PR, Sheikh N, Gupta G, Teruya-Feldstein J, Tosato G. 1996. Interferon-inducible protein-10 identified as a mediator of tumor necrosis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13791-3796
- Sgadari C, Farber JM, Angiolillo AL, Liao F, Teruya-Feldstein J, Burd PR, Yao L, Gupta G, Kanegane C, Tosato G. 1997. Mig, the monokine induced by interferon-gamma, promotes tumor necrosis in vivo. *Blood* 89:2635-643
- Shankaran V, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. 2001. IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410:1107-111
- Sharma S, Stolina M, Lin Y, Gardner B, Miller PW, Kronenberg M, Dubinett SM. 1999. T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J Immunol* 163:5020-028
- Shawar SM, Vyas JM, Rodgers JR, Rich RR. 1994. Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules. *Annu Rev Immunol* 12:839-80
- Shevach EM. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2:389-00
- Shin MS, Park WS, Kim SY, Kim HS, Kang SJ, Song KY, Park JY, Dong SM, Pi JH, Oh RR, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. 1999. Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol* 154:1785-791
- Shinkai Y, Rathbun G, Lam KP, Oltz EM, Stewart V, Mendelsohn M, Charron J, Datta M, Young F, Stall AM, et al. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855-67
- Skipper J, Stauss HJ. 1993. Identification of two cytotoxic T lymphocyte-recognized epitopes in the Ras protein. *J Exp Med* 177:1493-498
- Skipper J, Kittlesen D, Hendrickson R, Deacon D, Harthun N, Wagner S, Hunt D, Engelhard V, Slingluff C. 1996. Shared epitopes for HLA-A3-restricted melanoma-reactive human CTL include a naturally processed epitope from Pmel-17/gp100. *J Immunol* 157: 5027-033
- Skipper JC, Hendrickson RC, Gulden PH, Brichard V, Van Pel A, Chen Y, Shabanowitz J, Wolfel T, Slingluff CL Jr, Boon T, Hunt DF, Engelhard VH. 1996. An HLA-A2-restricted tyrosinase antigen on melanoma cells results from posttranslational modification and suggests a novel pathway for processing of membrane proteins. *J Exp Med* 183:527-34

- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, Cretney E, Trapani JA, Taniguchi M, Kawano T, Pelikan SB, Crowe NY, Godfrey DI. 2000. Differential tumor surveillance by natural killer (NK) and NKT cells. *J Exp Med* 191:661-68
- Smyth MJ, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. 2000. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med* 192:755-60
- Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. 2001. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nat Immunol* 2:293-99
- So T, Takenoyama M, Mizukami M, Ichiki Y, Sugaya M, Hanagiri T, Sugio K, Yasumoto K. 2005. Haplotype loss of HLA class I antigen as an escape mechanism from immune attack in lung cancer. *Cancer Res* 65:5945-952
- Soong TW, Hui KM. 1992. Locus-specific transcriptional control of HLA genes. *J Immunol* 149:2008-020
- Sotomayor EM, Borrello I, Rattis FM, Cuenca AG, Abrams J, Staveley-O'Carroll K, Levitsky HI. 2001. Cross-presentation of tumor antigens by bone marrow-derived antigen-presenting cells is the dominant mechanism in the induction of T-cell tolerance during B-cell lymphoma progression. *Blood* 98:1070-077
- Speiser DE, Miranda R, Zakarian A, Bachmann MF, McKall-Faienza K, Odermatt B, Hanahan D, Zinkernagel RM, Ohashi PS. 1997. Self antigens expressed by solid tumors Do not efficiently stimulate naive or activated T cells: implications for immunotherapy. *J Exp Med* 186:645-53
- Spellman CW, Daynes RA. 1978. Ultraviolet light induced murine suppressor lymphocytes dictate specificity of anti-ultraviolet tumor immune responses. *Cell Immunol* 38:25-34
- Spilianakis CG, Laloti MD, Town T, Lee GR, Flavell RA. 2005. Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. *Nature* 435:637-45
- Staveley-O'Carroll K, Sotomayor E, Montgomery J, Borrello I, Hwang L, Fein S, Pardoll D, Levitsky H. 1998. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:1178-183
- Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. 2000. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 191:411-16
- Sternlicht MD, Werb Z. 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516
- Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. 1996. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 2:1361-366
- Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rosen-Wolff A, Peters AM, Sneller MC, Hallahan CW, Wang J, Fischer RE, Jackson CM, Lin AY,

- Baumler C, Siegert E, Marx A, Vaishnav AK, Grodzicky T, Fleisher TA, Lenardo MJ. 2001. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 98:194-200
- Street SE, Cretney E, Smyth MJ. 2001. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97:192-97
- Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ. 2002. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *J Exp Med* 196:129-34
- Strieter RM, Kunkel SL, Arenberg DA, Burdick MD, Polverini PJ. 1995. Interferon gamma-inducible protein 10 (IP-10), a member of the C-X-C chemokine family, is an inhibitor of angiogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 210:51-7
- 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* 183:534-36
- 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* 62:353-58
- Suh WK, Cohen-Doyle MF, Fruh K, Wang K, Peterson PA, Williams DB. 1994. Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science* 264:1322-326
- Sutmuller RP, van Duivenvoorde LM, van Elsas A, Schumacher TN, Wildenberg ME, Allison JP, Toes RE, Offringa R, Melief CJ. 2001. Synergism of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade and depletion of CD25(+) regulatory T cells in antitumor therapy reveals alternative pathways for suppression of autoreactive cytotoxic T lymphocyte responses. *J Exp Med* 194:823-32
- Tahara K, Takesako K, Sette A, Celis E, Kitano S, Akiyoshi T. 1999. Identification of a MAGE-2-encoded human leukocyte antigen-A24-binding synthetic peptide that induces specific antitumor cytotoxic T lymphocytes. *Clin. Cancer Res.* 5: 2236-241
- Takahashi K, Shichijo S, Noguchi M, Hirohata M, Itoh K. 1995. Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. *Cancer Res* 55:3478-482
- Takahashi T, Chapman PB, Yang SY, Hara I, Vijayaradhhi S, Houghton AN. 1995. Reactivity of autologous CD4+ T lymphocytes against human melanoma. Evidence for a shared melanoma antigen presented by HLA-DR15. *J Immunol* 154:772-79
- Takeda K, Hayakawa Y, Atsuta M, Hong S, Van Kaer L, Kobayashi K, Ito M, Yagita H, Okumura K. 2000. Relative contribution of NK and NKT cells to the anti-metastatic activities of IL-12. *Int Immunol* 12:909-14
- Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Yamaguchi N, Yagita H,

- 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
- Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K. 2002. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 195:161-69
- Tanaka F, Fujie T, Tahara K, Mori M, Takesako K, Sette A, Celis E, Akiyoshi T. 1997. Induction of antitumor cytotoxic T lymphocytes with a MAGE-3-encoded synthetic peptide presented by human leukocytes antigen-A24. *Cancer Res.* 57: 4465-468
- Tanzarella S, Russo V, Lionello I, Dalerba P, Rigatti D, Bordignon C, Traversari C. 1999. Identification of a promiscuous T cell epitope encoded by multiple members of the MAGE family. *Cancer Res.* 59: 2668-674
- Ten Bosch G, Joosten A, Kessler J, Melief C, Leeksa O. 1996. Recognition of BCR-ABL positive leukemic blasts by human CD4+ T cells elicited by primary *in vitro* immunization with a BCR-ABL breakpoint peptide. *Blood* 88: 3522-527
- Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. 2002. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med* 196:447-57
- Thomas L. 1959. *Discussion in Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States*, ed. HS Lawrence, pp. 529-32. New York: Hoeber-Harper
- Turner B, Haendle I, Roder C, Dieckmann D, Keikavoussi P, Jonuleit H, Bender A, Maczek C, Schreiner D, von den Driesch P, Brocker EB, Steinman RM, Enk A, Kampgen E, Schuler G. 1999. Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* 190:1669-678
- Tilkin-Mariame AF, Cormary C, Ferro N, Sarrabayrouse G, Lajoie-Mazenc I, Faye JC, Favre G. 2005. Geranylgeranyl transferase inhibition stimulates anti-melanoma immune response through MHC Class I and costimulatory molecule expression. *FASEB J* 19:1513-515
- Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, Laplace C, Zwinderman A, Dick TP, Muller J, Schonfisch B, Schmid C, Fehling HJ, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H. 2001. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med* 194:1-12
- Toi M, Taniguchi T, Yamamoto Y, Kurisaki T, Suzuki H, Tominaga T. 1996. Clinical significance of the determination of angiogenic factors. *Eur J Cancer* 32A:2513-519
- Topalian S, Gonzales M, Parkhurst M, II Y, Southwood S, Sette A, Rosenberg

- S, Robbins P. 1996. Melanoma-specific CD4+ T cells recognize nonmutated HLADR-restricted tyrosinase epitopes. *J. Exp. Med.* 183: 1965-971
- Torres MJ, Ruiz-Cabello F, Skoudy A, Berrozpe G, Jimenez P, Serrano A, Real FX, Garrido F. 1996. Loss of an HLA haplotype in pancreas cancer tissue and its corresponding tumor derived cell line. *Tissue Antigens* 47:372-81
- Townsend A, Elliott T, Cerundolo V, Foster L, Barber B, Tse A. 1990. Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro. *Cell* 62:285-95
- Traversari C, van der Bruggen I, Luescher C, Lurquin P, Chomez A, van Pel E, De Plaen A, Amar-Costesec, Boon T. 1992. A nonapeptide encoded by human gene MAGE-1 is recognized on HLA-A1 by cytolytic T lymphocytes directed against tumor antigen MZ2-E. *J.Exp.Med* 176: 1453-457
- Traversari C, van der Bruggen P, Van den Eynde B, Hainaut P, Lemoine C, Ohta N, Old L, Boon T. 1992. Transfection and expression of a gene coding for a human melanoma antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes. *Immunogenetics* 35:145-52
- Trinchieri G, Aden DP, Knowles BB. 1976. Cell-mediated cytotoxicity to SV40-specific tumour-associated antigens. *Nature* 261:312-14
- Trowsdale J, Young JA, Kelly AP, Austin PJ, Carson S, Meunier H, So A, Erlich HA, Spielman RS, Bodmer J, et al. 1985. Structure, sequence and polymorphism in the HLA-D region. *Immunol Rev* 85:5-43
- Trowsdale J, Hanson I, Mockridge I, Beck S, Townsend A, Kelly A. 1990. Sequences encoded in the class II region of the MHC related to the 'ABC' superfamily of transporters. *Nature* 348:741-44
- Tsai V, Southwood S, Sidney J, Skaguchi K, Kawakami Y, Appella E, Sette A, Celis E. 1997. Identification of subdominant CTL epitopes of the GP100 melanoma-associated tumor antigen by primary *in vitro* immunization with peptide-pulsed dendritic cells. *J. Immunol.* 158: 1796-802
- Tsang KY, Zaremba S, Nieroda CA, Zhu MZ, Hamilton JM, Schlom J. 1995. Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia-CEA vaccine. *J Natl Cancer Inst* 87:982-90
- Tsory S, Kellman-Pressman S, Fishman D, Segal S. 2006. Reconstitution of expression of H-2K region-encoded murine MHC class I glycoproteins in MHC class I-deficient B16BL6 melanoma cells affects the expression and function of antigen-processing machinery. *Immunol Lett* 102:237-40
- Tureci O, Sahin U, Schobert I, Koslowski M, Scmitt H, Schild HJ, Stenner F, Seitz G, Rammensee HG, Pfreundschuh M. 1996. The SSX-2 gene, which is involved in the t(X;18) translocation of synovial sarcomas, codes for the human tumor antigen HOM-MEL-40. *Cancer Res* 56:4766-772
- Vaage J. 1968. Nonvirus-associated antigens in virus-induced mouse

- mammary tumors. *Cancer Res* 28:2477-483
- Van den Broek ME, Kagi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM, Hengartner H. 1996. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* 184:1781-790
- Van den Eynde B, Lethe B, Van Pel A, De Plaen E, Boon T. 1991. The gene coding for a major tumor rejection antigen of tumor P815 is identical to the normal gene of syngeneic DBA/2 mice. *J Exp Med* 173:1373-384
- Van den Eynde B, Peeters O, De Backer O, Gaugler B, Lucas S, Boon T. 1995. A new family of genes coding for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *J Exp Med* 182:689-98
- Van den Eynde B, Morel S. 2001. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin Immunol* 13:147-53
- Van den Eynde B. 2003. [A new mechanism of tumor resistance to the immune system, based on tryptophan breakdown by indoleamine 2,3-dioxygenase]. *Bull Mem Acad R Med Belg* 158:356-63; discussion 364-65
- Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, Knuth A, Boon T. 1991. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254:1643-647
- Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Ploegh HL, Tonegawa S. 1992. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules, and CD4-8+ T cells. *Cell* 71:1205-214
- Van Kaer L. 2001. Accessory proteins that control the assembly of MHC molecules with peptides. *Immunol Res* 23:205-14
- Van Waes C, Urban JL, Rothstein JL, Ward PL, Schreiber H. 1986. Highly malignant tumor variants retain tumor-specific antigens recognized by T helper cells. *J Exp Med* 164:1547-565
- Veltman JA, van Weert I, Aubele M, Bot FJ, Ramaekers FC, Manni JJ, Hopman AH. 2001. Specific steps in aneuploidization correlate with loss of heterozygosity of 9p21, 17p13 and 18q21 in the progression of pre-malignant laryngeal lesions. *Int J Cancer* 91:193-99
- Vicari AP, Caux C, Trinchieri G. 2002. Tumour escape from immune surveillance through dendritic cell inactivation. *Semin Cancer Biol* 12:33-42
- Vierboom MP, Nijman HW, Offringa R, van der Voort EI, van Hall T, van den Broek L, Fleuren GJ, Kenemans P, Kast WM, Melief CJ. 1997. Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 186:695-04
- Villegas FR, Coca S, Villarrubia VG, Jimenez R, Chillon MJ. 2002. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 35: 23-8
- Vitale M, Rezzani R, Rodella L, Zauli G, Grigolato P, Cadei M, Hicklin DJ, 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
- Vogelstein B, Kinzler KW. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9:138-41
- Vonderheide R, Hahn W, Schultze J Nadler L. 1999. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytolytic T lymphocytes. *Immunity* 10: 673-79
- Walter EA, Greenberg PD, Gilbert MJ, Finch RJ, Watanabe KS, Thomas ED, and Riddell SR. 1995. Reconstitution of cellular immunity against cytomegalovirus in recipients of allogeneic bone marrow by transfer of T-cell clones from the donor. *N Engl J Med* 333:1038-044
- Wang RF, Appella E, Kawakami Y, Kang X, Rosenberg SA. 1996. Identification of TRP-2 as a human tumor antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 184:2207-216
- Wang RF, Rosenberg SA. 1999. Human tumor antigens for cancer vaccine development. *Immunol Rev* 170:85-100
- Wang WS, Chen PM, Wang HS, Liang WY, Su Y. 2006. Matrix metalloproteinase-7 increases resistance to Fas-mediated apoptosis and is a poor prognostic factor of patients with colorectal carcinoma. *Carcinogenesis*
- Ward PL, Koeppen H, Hurteau T, Schreiber H. 1989. Tumor antigens defined by cloned immunological probes are highly polymorphic and are not detected on autologous normal cells. *J Exp Med* 170:217-32
- Ward PL, Koeppen HK, Hurteau T, Rowley DA, Schreiber H. 1990. Major histocompatibility complex class I and unique antigen expression by murine tumors that escaped from CD8+ T-cell-dependent surveillance. *Cancer Res* 50:3851-858
- Weber J, Sondak VK, Scotland R, Phillip R, Wang F, Rubio V, Stuge TB, Groshen SG, Gee C, Jeffery GG, Sian S, Lee PP. 2003. Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor added to a multi-peptide vaccine for resected Stage II melanoma. *Cancer* 97:186-200
- Weissman JD, Brown JA, Howcroft TK, Hwang J, Chawla A, Roche PA, Schiltz L, Nakatani Y, Singer DS. 1998. HIV-1 tat binds TAFII250 and represses TAFII250-dependent transcription of major histocompatibility class I genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:11601-1616
- Whiteside TL, Miescher S, Hurlimann J, Moretta L, von Fliedner V. 1986. Separation, phenotyping and limiting dilution analysis of T-lymphocytes infiltrating human solid tumors. *Int J Cancer* 37:803-11
- Wick M, Dubey P, Koeppen H, Siegel CT, Fields PE, Chen L, Bluestone JA, Schreiber H. 1997. Antigenic cancer cells grow progressively in immune hosts without evidence for T cell exhaustion or systemic anergy. *J Exp Med* 186:229-38
- Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL. 1996. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell*

84:769-79

- Willimsky G, Blankenstein T. 2005. Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* 437:141-46
- Wolfel T, Schneider J, Meyer Zum Buschenfelde KH, Rammensee HG, Rotzschke O, Falk K. 1994. Isolation of naturally processed peptides recognized by cytolytic T lymphocytes (CTL) on human melanoma cells in association with HLA-A2.1. *Int J Cancer* 57:413-18
- Wolfel T, Van Pel A, Brichard V, Schneider J, Seliger B, Meyer K, Boon T. 1994. Two tyrosinase nonapeptides recognized on HLA-A2 melanomas by autologous cytolytic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 24: 759-64
- Wolfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, De Plaen E, Hankeln T, Meyer zum Buschenfelde KH, Beach D. 1995. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269:1281-284
- Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimäki A. 1998. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 58:4997-001
- Wortzel RD, Philipps C, Schreiber H. 1983. Multiple tumour-specific antigens expressed on a single tumour cell. *Nature* 304:165-67
- Wortzel RD, Urban JL, Schreiber H. 1984. Malignant growth in the normal host after variant selection in vitro with cytolytic T-cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:2186-190
- Wrenshall LE, Stevens RB, Cerra FB, Platt JL. 1999. Modulation of macrophage and B cell function by glycosaminoglycans. *J Leukoc Biol* 66:391-400
- Wright KL, White LC, Kelly A, Beck S, Trowsdale J, Ting JP. 1995. Coordinate regulation of the human TAP-1 and LMP-2 genes from a shared bidirectional promoter. *J Exp Med.* 181: 1459-471
- Wu J, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH. 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285:730-32
- Xu X, Fu XY, Plate J, Chong AS. 1998. IFN-gamma induces cell growth inhibition by Fas-mediated apoptosis: requirement of STAT1 protein for up-regulation of Fas and FasL expression. *Cancer Res* 58:2832-837
- Yamshchikov GV, Mullins DW, Chang CC, Ogino T, Thompson L, Presley J, Galavotti H, Aquila W, Deacon D, Ross W, Patterson JW, Engelhard VH, Ferrone S, Slingluff CL Jr. 2005. Sequential immune escape and shifting of T cell responses in a long-term survivor of melanoma. *J Immunol* 1;174(11):6863-871.
- Yu P, Spiotto MT, Lee Y, Schreiber H, Fu YX. 2003. Complementary role of CD4+ T cells and secondary lymphoid tissues for cross-presentation of tumor antigen to CD8+ T cells. *J Exp Med* 197:985-95
- Yue FY, Geertsens R, Hemmi S, Burg G, Pavlovic J, Laine E, Dummer R. 1999. IL-12 directly up-regulates the expression of HLA class I, HLA class II



- and ICAM-1 on human melanoma cells: a mechanism for its antitumor activity? *Eur J Immunol* 29:1762-773
- Zaks TZ, Chappell DB, Rosenberg SA, Restifo NP. 1999. Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J Immunol* 162:3273-279
- Zeidler R, Eissner G, Meissner P, Uebel S, Tampe R, Lazis S, Hammerschmidt W. 1997. Downregulation of TAP1 in B lymphocytes by cellular and Epstein-Barr virus-encoded interleukin-10. *Blood* 90:2390-397
- Zeng G, Touloukian CE, Wang X, Restifo NP, Rosenberg SA, Wang RF. 2000. Identification of CD4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA-DR molecules. *J Immunol* 165:1153-159
- Zeng G, Touloukian CE, Wang X, Restifo NP, Rosenberg SA, Wang RF. 2000. Identification of CD4+ T cell epitopes from NY-ESO-1 presented by HLA-DR molecules. *J Immunol* 165:1153-159
- Zhang L, Conejo-García J, Katsaros D, Gimotty P, Massobrio M, et al. 2003. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 348: 203-13
- Zhang Q, Jang TL, Yang X, Park I, Meyer RE, Kundu S, Pins M, Javonovic B, Kuzel T, Kim SJ, Van Parijs L, Smith N, Wong L, Greenberg NM, Guo Y, Lee C. 2006. Infiltration of tumor-reactive transforming growth factor-beta insensitive CD8(+) T cells into the tumor parenchyma is associated with apoptosis and rejection of tumor cells. *Prostate* 66:235-47
- Zippelius A, Batard P, Rubio-Godoy V, Bioley G, Lienard D, Lejeune F, Rimoldi D, Guillaume P, Meidenbauer N, Mackensen A, Rufer N, Lubenow N, Speiser D, Cerottini JC, Romero P, Pittet MJ. 2004. Effector function of human tumor-specific CD8 T cells in melanoma lesions: a state of local functional tolerance. *Cancer Res* 64:2865-873
- Zorn E, Hercend T. 1999. A Mage-6-encoded peptide is recognized by expanded lymphocytes infiltrating a spontaneously regressing human primary melanoma lesion. *Eur. J. Immunol.* 29: 602-07

