

**UNIVERSIDAD DE GRANADA**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA FRECUENCIA Y MECANISMOS DE  
ALTERACION EN LA EXPRESION DE ANTIGENOS HLA  
EN LINEAS DE MELANOMA PROCEDENTES DEL  
BANCO EUROPEO, ESTDAB.  
FACTORES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A IFN- $\gamma$**

Teresa Rodríguez Ruiz





HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES  
GRANADA

**ESTUDIO DE LA FRECUENCIA Y MECANISMOS DE  
ALTERACION EN LA EXPRESION DE ANTIGENOS HLA  
EN LINEAS DE MELANOMA PROCEDENTES DEL  
BANCO EUROPEO, ESTDAB.  
FACTORES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A IFN- $\gamma$**

Trabajo presentado por Dña. Teresa Rodríguez Ruiz, para optar al grado de  
Doctor en Farmacia.

2008



D. FEDERICO GARRIDO TORRES-PUCHOL, CATEDRÁTICO DE INMUNOLOGÍA DEL DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR III E INMUNOLOGÍA, UNIVERSIDAD DE GRANADA Y JEFE DE SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO DE LAS VIRGEN DE GRANADA.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado: ESTUDIO DE LA FRECUENCIA Y MECANISMOS DE ALTERACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS HLA EN LÍNEAS DE MELANOMA PROCEDENTE DEL BANCO EUROPEO, ESTDAB. FACTORES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A IFN- $\gamma$ , ha sido realizado bajo mi dirección por Teresa Rodríguez Ruiz, para optar al título de Doctor en Farmacia.

Y para que conste se firma el presente certificado en Granada a 24 de Marzo del 2008

Federico Garrido Torres-Puchol.



D. FRANCISCO RUIZ-CABELLO OSUNA, DOCTOR EN FARMACIA, PROFESOR ASOCIADO DE CIENCIAS DE LA SALUD, UNIVERSIDAD DE GRANADA Y JEFE DE SECCION DEL SERVICIO DE ANALISIS CLINICOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado: ESTUDIO DE LA FRECUENCIA Y MECANISMOS DE ALTERACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS HLA EN LÍNEAS DE MELANOMA PROCEDENTE DEL BANCO EUROPEO, ESTDAB. FACTORES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A IFN- $\gamma$ , ha sido realizado bajo mi dirección por Teresa Rodríguez Ruiz, para optar al título de Doctor en Farmacia.

Y para que conste se firma el presente certificado en Granada a 24 de Marzo del 2008

Francisco Ruiz-Cabello Osuna.





Dña. ROSA MENDEZ VALES, DOCTORA EN BIOQUIMICA E INVESTIGADOR CONTRATADO DE LA FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACION BIOSANITARIA ALEJANDRO OTERO (FIBAO) EN EL SERVICIO DE ANALISIS CLINICOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado: ESTUDIO DE LA FRECUENCIA Y MECANISMOS DE ALTERACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS HLA EN LÍNEAS DE MELANOMA PROCEDENTE DEL BANCO EUROPEO, ESTDAB. FACTORES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A IFN- $\gamma$ , ha sido realizado bajo mi dirección por Teresa Rodríguez Ruiz, para optar al título de Doctor en Farmacia.

Y para que conste se firma el presente certificado en Granada a 24 de Marzo del 2008

Rosa Méndez Vales.



Los resultados de este trabajo han sido presentados en congresos nacionales e internacionales y finalmente publicados en revistas internacionales.

### **Publicaciones internacionales**

- Teresa Rodríguez, Rosa Méndez, Chrissy H. Roberts, Francisco Ruiz- Cabello, I. Anthony Dodi, Miguel Angel López-Nevot, Laura Paco, Isabel Maleno, Steven G. E. Marsh, Graham Pawelec, Federico Garrido. **High frequency of homozygosity of the HLA region in melanoma cell lines reveals a pattern compatible with extensive loss of heterozygosity.** Cancer Immunology Immunotherapy. 2005 Feb; 54(2):141-8.
- Teresa Rodríguez, Rosa Méndez, Ana Del Campo, Pilar Jiménez, Natalia Aptsiauri, Federico Garrido and Francisco Ruiz-Cabello. **Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines.** BMC Cancer.2007 Feb 23;7:34.
- Rosa Méndez, Teresa Rodríguez, Ana Del Campo, Eva Monge, Isabel Maleno, Natalia Aptsiauri, Pilar Jiménez, Susana Pedrinaci, Graham Pawelec, Francisco Ruiz-Cabello, Federico Garrido. **Characterization of HLA class I altered phenotypes in a panel of human melanoma cell lines.** Cancer Immunology Immunotherapy. 2007 Oct 13.
- T. Rodríguez, R. Méndez, A. Del Campo, N. Aptsiauri, J. Marín, G. Orozco, G. Pawelec, F. Ruiz-Cabello, F. Garrido. **Patterns of constitutive and IFN- $\gamma$  inducible expression of HLA class II molecules in human melanoma cell lines.** Immunogenetics. 2007 Feb;59(2):123-33.
- T. Rodríguez, N. Aptsiauri, R. Méndez, P. Jiménez, F. Ruiz-Cabello and F. Garrido. **Different mechanisms can lead to the same altered HLA class I phenotype in tumors.** Tissue Antigens. 2007 Apr;69 Suppl 1:259-63.

### Congresos internacionales:

- Teresa Rodríguez, Rosa Méndez, Ana B. Del Campo, Pilar Jiménez, Francisco Ruiz-Cabello, Federico Garrido. **Quantitative analysis of HLA class I and antigen processing machinery (APM) gene expression in melanoma cell lines.** Genes and Immunity. 18<sup>th</sup> European Immunogenetic and Histocompatibility Conference. 8-11 May 2004, Sofia, Bulgaria.
- Teresa Rodríguez, Rosa Méndez, Francisco Ruiz-Cabello, Julia Cantón, Federico Garrido. **IFN- $\gamma$  resistance in one melanoma cell line with HLA class I down regulation.** Genes and Immunity. 19<sup>th</sup> European Immunogenetic and Histocompatibility Conference. 23-26 April 2005, Istanbul- Turkey.
- Rosa Méndez, Teresa Rodríguez, Francisco Ruiz-Cabello, Miguel A. López-Nevot, Laura Paco, José M. Romero, Isabel Maleno, Graham Pawelec and Federico Garrido. **Frequency of different HLA class I alterations in melanoma cell lines.** Genes and Immunity. 19<sup>th</sup> European Immunogenetic and Histocompatibility Conference. 23-26 April 2005, Istanbul- Turkey.
- Ruiz-Cabello Francisco, Rodríguez Teresa, Méndez Rosa, Cantón Julia, Del Campo Ana, Aptsiauri Natalia, Jiménez Pilar, Garrido Federico. **INF-gamma unresponsive in two melanoma cell lines is due to two different defects in JAK-STAT pathway.** Immune- mediated diseases from theory to therapy. 3-8 October 2005, Moscow, Russia.
- R. Méndez, T. Rodríguez, E. Monge, N. Aptsiauri, J. Canton, F. Garrido, F. Ruiz-Cabello. **Different mechanisms of IFN-y resistance in two melanoma cell lines.** Tissue Antigens. 20<sup>th</sup> European Immunogenetics and Histocompatibility (EFI) Conference. Oslo, Norway. 8-11 Jun. 2006 Tissue Antigens Vol. 67, N°6, June 2006
- T. Rodríguez, R. Méndez, A. Del Campo, E. Monge. A. Gallego, P. Jimenez, F. Ruiz Cabello, G. Pawelec, F. Garrido. **Distribution of HLA class I altered phenotypes in 92 melanoma cell lines.** 21<sup>st</sup> EFI Conference Barcelona 5-8 May, 2007 Tissue Antigens Vol.69 (5)
- Rodríguez T, Méndez R, Del Campo A, Monge E, Orozco G, Jiménez P, Martin J, Garrido F, Ruiz-Cabello F. **MHC2TA polymorphism and HLA class II surface expression in melanoma cell lines.** 16<sup>th</sup> European Congress of Immunology, September 6-9, 2006, Paris 2006, PA2134

Este trabajo se lo dedico especialmente a mis padres que siempre han estado a mi lado apoyándome y cuidándome.



A Marcos y a mis hermanos Osorio,  
Juan, Francisco y Guillermo.





## **AGRADECIMIENTOS**



*En primer lugar me gustaría agradecer al Doctor Federico Garrido su confianza y la oportunidad que me ha brindado de trabajar en su equipo.*

*Al Doctor Francisco Ruiz-Cabello, por su paciencia, confianza, apoyo y ayuda infinita y por su ejemplo en el trabajo diario. Ha sido un verdadero placer trabajar a su lado.*

*A la Doctora Rosa Méndez por enseñarme todo lo necesario para realizar este trabajo, ayudarme a realizarlo y hacerlo con paciencia y cariño. También, por su puesto, agradecerle esas inolvidables horas en el cuarto de cultivo. Sin ti todo este trabajo hubiera sido mucho menos divertido. Gracias de corazón.*

*También agradecer a los distintos miembros del Servicio su ayuda en la realización de determinadas técnicas: a la Dra. Isabel Maleno por su colaboración en la realización de los estudios de LOH, al Dr. López-Nevot por su ayuda en la realización de los tipajes genómicos, a la Dra. Cabrera por proporcionarme los anticuerpos monoclonales, al Dr. José María Romero el rey de la PCR a tiempo real y a la Dra Natalia Aptsiauri por su inestimable ayuda en la redacción de los trabajos.*

*A todos mis compañeros de trabajo Natalia, Ana, José María, Gloria, Eva, Pilar y Julia por darme siempre su apoyo y ayuda y en definitiva hacer del lugar de trabajo un sitio agradable. A Pepi, Inma y Victor, unos grandes profesionales y mejores personas, gracias por hacerme reír tanto sois una joya. A Carmen y a Pepi, las hachas de la citometría, por vuestra ayuda y por dejarme colarme de vez en cuando. Y por último a Isabel y Anabel que siempre han estado ahí cuando he necesitado su colaboración en mi trabajo.*

*Por último agradecer el apoyo de la Dra. Ángeles Giménez que siempre me ha facilitado la realización de este trabajo y al resto de compañeros del Hospital Comarcal de Antequera, la Dra. M<sup>a</sup> Luisa Garrido, el Dr. Pedro Molina y la Dra. Purificación Gallardo.*



## **INDICE**



## **INTRODUCCIÓN**

1. Melanoma cutáneo.	3
1.1 Etiología.	3
1.1.1 Antecedentes familiares	4
1.1.2 Predisposición genética	4
1.1.3 Número y tipo de nevus	5
1.1.4 Exposición solar y otras radiaciones ultravioletas	6
1.2 Características clínicas	7
1.3 Patrones de crecimiento	7
1.3.1 Melanoma extensivo superficial	7
1.3.2 Melanoma nodular	8
1.3.3 Melanoma lentigo maligno	8
1.3.4 Melanoma acrolentiginoso	8
2. Reconocimiento inmunológico del cáncer.	9
2.1 Introducción	9
2.2 Interacción del sistema inmune con factores intrínsecos de la progresión tumoral	11
2.3 El sistema inmune como un elemento extrínseco de supresión del desarrollo tumoral.	18
2.3.1 Antígenos tumorales	18
2.3.2 Respuesta inmune natural contra el cáncer	19
2.3.3 Respuesta adaptativa frente al cáncer	20
3. Mecanismos de evasión de la respuesta inmune	21
3.1 Alteración de la expresión de antígenos de histocompatibilidad y de la maquinaria de presentación antigénica en tumores	22
3.2 Pérdida o modulación de los antígenos tumorales	27
3.3 Inducción de inmunosupresión: inmunotolerancia en el microambiente tumoral	28
3.4 Células T reguladoras.	30
3.5 Disfunción de las células T CD8	31
4. Inmunovigilancia en el cáncer	31
5. Interferón gamma	34
5.1 Importancia del interferón gamma en la inmunidad frente al cáncer	34
5.2 Vías de señalización de los interferones tipo I y II	36
<b>OBJETIVOS</b>	<b>41</b>



## **MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS.**

1. High frequency of homozygosity of the HLA region in melanoma cell lines reveals a pattern compatible with extensive loss of heterozygosity 51
2. Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines 63
3. Characterization of HLA class I altered phenotypes in a panel of human melanoma cell lines 79
4. Patterns of constitutive and IFN- $\gamma$  inducible expression of HLA class II molecules in human melanoma cell lines 93
5. Different mechanisms can lead to the same altered HLA class I phenotype in tumors. 107

## **DISCUSION**

1. Distribución de los distintos fenotipos alterados en las líneas celulares de melanoma 116
2. Estudios de la expresión basal y tras tratamiento con IFN- $\gamma$  de las moléculas HLA de clase II. 126

**CONCLUSIONES** 133

**BIBLIOGRAFIA** 137

# **INTRODUCCION**



## **1. MELANOMA CUTANEO**

El melanoma es una neoplasia originada por la transformación maligna de los melanocitos. La mayoría de estos tumores se desarrollan en la piel en la que los melanocitos se asientan, principalmente a nivel epidérmico y ocasionalmente en la dermis. Clark y cols (1984) proponen un esquema teórico para explicar la progresión tumoral del melanoma, dicho esquema define las lesiones que presentan de forma secuencial en la progresión del melanocito normal al melanoma: 1º nevus adquirido común; 2º nevus displásico; 3º melanoma primario (fase de crecimiento superficial); 4º melanoma secundario (fase de crecimiento en profundidad); 5º melanoma metastático. Los nevus adquiridos comunes y los displásicos son lesiones proliferativas comunes y a partir de aquí se podría producir un incremento potencial de la malignidad.

### **1.1 ETIOLOGIA**

La incidencia del melanoma está aumentando de forma alarmante durante las últimas décadas, así esta patología ocupa el quinto y el sexto lugar en la frecuencia de cánceres entre hombres y mujeres respectivamente (Jemal et al. 2002). Su frecuencia dentro de las neoplasias cutáneas está entre un 1,5-7%, pero representa el 65% de las muertes por cáncer de piel, lo que indica su alto potencial de agresividad y capacidad metastásica. Todos estos datos nos dan una idea de la importancia de esta patología y de la necesidad de su estudio.

La incidencia del melanoma aumenta al aumentar la altitud y al disminuir la latitud, es decir cuanto más cerca nos encontremos del Ecuador habrá una mayor probabilidad de padecerlo. En los Estados Unidos la incidencia es mayor entre mujeres jóvenes que entre

hombres jóvenes, pero después de los 45 años es mayor entre los hombres. En Suecia se observó un patrón similar pero el cambio de incidencia respecto a la edad se produce aproximadamente a los 54 años (Mansson-Brahme et al. 2002). Como en el caso de la mayoría de los tipos de cáncer tanto los factores genéticos como los medio ambientales contribuyen en la génesis del melanoma y mediante estudios epidemiológicos se han podido identificar los factores de riesgo más importantes entre los que se encuentran:

**1.1.1 Antecedentes familiares.** En general, los melanomas en miembros de una familia son histológicamente indistinguibles de los melanomas esporádicos y tienen un pronóstico similar, sin embargo, en los melanomas familiares la edad de aparición es más temprana y tienen mayor probabilidad de desarrollar melanomas primarios múltiples (Barnhill et al. 1992;Kopf et al. 1986).

**1.1.2 Predisposición genética.** Los cánceres hereditarios se han utilizado para dar luz sobre las posibles lesiones genéticas que participan en la génesis tanto de los cánceres heredados como de los esporádicos. Los melanomas familiares representan aproximadamente del 8-12% de todos los casos de melanoma (Fountain et al. 1990), por lo que representan un ejemplo excelente.

Los estudios en familias con alta incidencia de melanoma culminaron con la identificación de dos genes de susceptibilidad a padecer la enfermedad como son *CDKN2A* y *CDK4* cuyos productos hoy en día se conocen que participan en potentes vías de supresión de tumores. Más recientemente se asocia la predisposición a varios factores como puede ser la asociación de variantes polimórficas del gen *MC1R* con el pelo pelirrojo, la piel clara, la sensibilidad solar y las pecas (Chin 2003).

*CDKN2A*: Este gen fue identificado como importante en diferentes tipos de cáncer por su frecuente deleciones homocigotas en las líneas celulares de distintos tipos

cánceres (Kamb et al. 1994a; Nobori et al. 1994). Una vez conocido se asoció al melanoma familiar al estudiar sus mutaciones en este tipo de patología (Hussussian et al. 1994; Kamb et al. 1994b). CDKN2A codifica dos proteínas supresoras de tumor distintas denominadas INK4A y ARF. INK4A es un miembro de la familia de proteínas de INK (inhibitor of cyclin-dependent kinase), inhiben a CDK4/6 mediando así la fosforilación e inactivación de RB. Por otra parte, ARF inhibe la degradación de p53 (Kamijo et al. 1998; Zhang et al. 1998). Por lo tanto, podemos decir que los productos de CDKN2A regulan negativamente las vías de RB y p53 por lo que su pérdida predispone al desarrollo del melanoma.

*CDK4*: La importancia de la inactivación por mutaciones del gen INK4A en la patogenia del melanoma se ha reforzado por la identificación de mutaciones en CDK4. Esta mutación parece afectar a la estructura cristalina del heterodímero INK4A-CDK6, impidiendo su unión (Russo et al. 1998) y viéndose afectada la función supresora de INK4A mediada por la regulación de CDK4/6.

A parte del importante papel en la predisposición al melanoma de las mutaciones que afectan a estos dos genes (CDK4A y CDKN2A) existen datos experimentales que avalan la implicación de otra serie de genes y las vías en las que participan en predisposición a desarrollar un melanoma, como son los genes implicados en la cascada de señalización MAPK, la señalización HGF/SF-MET y el supresor de tumor PTEN (Goldstein et al. 2000b).

**1.1.3. Número y tipo de nevus.** En todos los estudios epidemiológicos donde se han evaluado los nevus se han considerado como un factor de riesgo para el melanoma, de forma que a mayor número de nevus se incrementa el riesgo (Bliss et al. 1995). Inicialmente se pensaba que el nevus displásico y el melanoma eran efectos pleotrópicos

de un mismo gen (Bale et al. 1986), sin embargo la aparición de nevus displásico no parece estar relacionado con la mutación en CDKN2A o CDK4 (Goldstein et al. 2002;Goldstein et al. 2000a;Puig et al. 1997) ya que la historia natural de nevus displásico y el melanoma no parece tener diferencias entre familias con mutaciones en estos genes y familias donde estas mutaciones no se han detectado (Tucker et al. 2002). Parece evidente que la etiología de los nevus es compleja, ya que varía con el tipo de nevus, y es debida a la interacción de múltiples genes (Darlington et al. 2002;Harrison et al. 1999;Karlsson et al. 2000;Kelly et al. 1994;Wachsmuth et al. 2001).

**1.1.4. Exposición solar y otras radiaciones ultravioletas (UV).** El sol y las radiaciones UV constituyen el mayor factor de riesgo medioambiental para el melanoma (Armstrong and Kricger 2001;Elwood and Jopson 1997).

Las quemaduras sufridas en algún momento de la vida indiscutiblemente también incrementan el riesgo pudiendo llegar a duplicarlo (Elwood and Jopson 1997) sin existir diferencia en lo que respecta a la edad en que esta se producen (Pfahlberg et al. 2001). También se ha comprobado como los altos niveles de exposición solar es un importante factor de riesgo tanto en adolescentes como en adultos (Whiteman et al. 2001), pero teniendo en cuenta que el número de horas al aire libre durante la adolescencia es mucho mayor que durante la edad adulta. También se ha relacionado el riesgo de la exposición anual a las radiaciones UV con el sexo, comprobándose que es mayor en el caso de los hombres. Además la exposición a las radiaciones UV es un factor de riesgo importante en todas las etapas del melanoma desde el nevus hasta el melanoma invasivo (Fears et al. 2002).

## **1.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS**

Los melanomas pueden aparecer en cualquier parte de la piel, si bien, se presentan más frecuentemente en las extremidades inferiores en las mujeres y en el dorso en los hombres (Sober et al. 1979). Lo habitual es encontrar una mácula o neoformación nodular muy oscura o con distribución irregular del pigmento, de mayor tamaño que los nevus comunes. Estas lesiones cumplen con la llamada regla del ABCDE, la cual indica algunos parámetros que en conjunto pueden ser indicadores de malignidad y son los siguientes: **A**simetría, **B**ordes irregulares, **C**olores cambiantes, **D**íámetro mayor a 0.6 cm y **E**levaciones en la superficie del nevus. Por lo tanto podemos decir que cualquier lesión pigmentada que sufra un cambio de tamaño, conformación o color, podría ser considerado un melanoma potencial y es preceptivo la realización de una biopsia (Mihm et al. 1973).

## **1.3 PATRONES DE CRECIMIENTO**

El melanoma se puede clasificar en cuatro patrones de crecimiento (McGovern et al. 1986), definidos por su espesor y características clínico-dermatológicas, correlacionándolo con su historia natural. Los cuatro patrones predominantes son.

1.3.1 **Melanoma extensivo superficial.** Representa aproximadamente el 70% de los melanomas en personas de piel clara (Mihm et al. 1971). Frecuentemente pueden aparecer sobre nevus preexistentes (Gruber et al. 1989), el cual suele haber presentado cambios en un periodo de 1 a 5 años previos. Aparece ser más frecuente en las piernas en el caso de las mujeres y en el dorso en el caso de los hombres durante la cuarta y quinta década de la vida. La histopatología muestra melanocitos uniformemente atípicos



en todo el espesor epidérmico en la zona maculosa, en forma aislada o en nidos. En las áreas nodulares hay melanocitos invadiendo la dermis.

1.3.2 **Melanoma nodular.** Es la segunda forma más frecuente de melanoma y constituye del 15 al 30% de los mismos. La edad media de aparición son los 53 años. La localización más frecuente es el tronco, la cabeza y el cuello. Tiene una evolución rápida, en un promedio de 6 a 18 meses. Puede aparecer sobre piel normal más frecuentemente que sobre nevus previo, como una pápula o nódulo negro-azulado o rojo-azulado; también puede ser poliploide. (Cutler et al. 1975). Histológicamente, es una masa tumoral que se origina en la unión dermoepidérmica que crece hacia la dermis con escasa tendencia a comprometer la epidermis subyacente o lateral de la lesión. Los melanocitos pueden ser epiteloides, fusiformes, pequeños o una mezcla de ellos.

1.3.3 **Melanoma lentigo maligno.** Es el melanoma invasor menos frecuente (4-15%). Esta ubicado casi exclusivamente en cara y cuello, siendo la nariz y las mejillas las localizaciones más frecuentes. La edad media de aparición es a los 65 años (Meier et al. 2002).

La lesión suele ser maculosa, de 3 a 6 cm de diámetro. Puede tener varios colores, marrón, pardo, negro, azulado y blanco. La histopatología del área maculosa presenta aumento de melanocitos intraepidérmicos a lo largo de la capa basal, con morfología normal o atípica. En el área nodular los melanocitos reemplazan la capa basal y ocupan la interfase dermoepidérmica y son fusiformes. La dermis tiene infiltrados linfocitarios y melanófagos.

1.3.4 **Melanoma acrolentiginoso.** Constituye del 2 al 8% de los melanomas en personas de piel clara, pero representa la forma más común en pieles oscuras (60 a 72% en raza negra y 29 a 46% en asiáticos) (Reintgen et al. 1982). Se localiza en la palma de

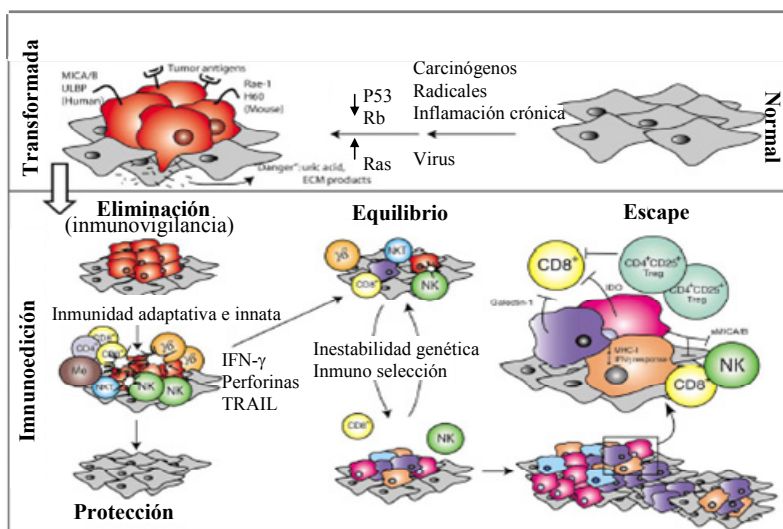
las manos y plantas. La edad media de aparición son 65 años. Clínicamente es una mácula amarronada o negruzca, puede tener áreas blanquecinas de regresión y bordes irregulares. Generalmente tiene pápulas o nódulos. Histopatológicamente, el área maculosa tiene melanocitos dendríticos atípicos con núcleos grandes y en el área pápulo nodular son fusiformes.

## **2. RECONOCIMIENTO INMUNOLOGICO DEL CANCER**

### **2.1 INTRODUCCION**

La idea que el sistema inmunológico regula el desarrollo de cáncer experimenta un nuevo resurgimiento. Durante los últimos 50 años la mayor parte del debate se ha centrado en la validez de la hipótesis de inmunovigilancia propuesta por Burnet (1957) y Thomas (1982). Hubo problemas experimentales a la hora de demostrar si realmente los mecanismos inmunes de defensa natural protegen al anfitrión contra el desarrollo de cánceres. Sin embargo, el proceso de inmunovigilancia ha sido demostrado de forma definitiva gracias a los datos experimentales obtenidos de modelos de ratón junto con importantes datos clínicos de pacientes humanos. El desarrollo de ratones transgénicos, y la capacidad para producir anticuerpos monoclonales (mAb) específicos a determinados componentes inmunes, ha permitido probar la hipótesis de vigilancia inmune en el cáncer en modelos murinos inmunodeficientes definidos molecularmente (Dunn et al. 2002;Dunn et al. 2004a;Dunn et al. 2004b;Smyth et al. 2001;Schreiber et al., 2002). También se ha reconocido que la eliminación de tumor representa sólo una parte en la compleja relación entre el sistema inmunológico y el cáncer (Dunn et al.

2002;Dunn et al. 2004a;Dunn et al. 2004b;Shankaran et al. 2001). Cuando el sistema inmunológico falla en la eliminación de todas las células de tumor, los tumores con baja inmunogenicidad pueden ser capaces de escapar al reconocimiento inmune y la destrucción (Shankaran et al. 2001;Smyth et al. 2000;Svane et al. 1996;Takeda et al. 2002). Este hecho junto la capacidad del tumor de esculpir el sistema inmunológico en el desarrollo de tumor constituye la " inmuoedición del cáncer " (Dunn et al. 2002;Dunn et al. 2004a;Dunn et al. 2004b). La inmuoedición es un proceso dinámico que comprende tres fases: eliminación, equilibrio, y escape. La eliminación abarca el concepto clásico de vigilancia inmune del cáncer, el equilibrio es el período de latencia inmune que se produce después de que la destrucción incompleta del tumor, y en la fase de escape se produce el crecimiento del tumor que ha sobrevivido al ataque inmune de la fase de equilibrio (Fig.1 pg 10).



**Fig 1. Las tres fases del proceso de inmuoedición.** Las células normales sujetas a estímulos oncogénicos se transforman en células tumorales. Desde etapas tempranas de la tumorigénesis, estas células expresan señales de “peligro” y se inicia el procesos de inmuoedición. En la primera fase de eliminación, las células que forman parte de la inmunidad innata y adaptativa, que constituyen la red de inmunovigilancia, pueden eliminar el tumor y proteger frente a su formación. Sin embargo, si el proceso no se desarrolla adecuadamente, las células del tumor pueden entrar en la fase de equilibrio donde las células tumorales se mantienen o son esculpidas inmunológicamente para producir nuevas variantes tumorales. Estas variantes pueden acabar evadiendo al sistema inmunológico por una variedad de mecanismos y hacerse clínicamente detectables en la fase de escape.

## **2.2 INTERACCIÓN DEL SISTEMA INMUNE CON FACTORES**

### **INTRINSECOS DE LA PROGRESIÓN TUMORAL**

Se han descrito varios factores intrínsecos que participan en el desarrollo neoplásico:

**Estimulación autocrina del crecimiento.** Si bien la mayoría de los factores de crecimiento solubles son producidos por un tipo de células para estimular la proliferación de otras, algunas células de cáncer adquieren la habilidad de sintetizar factores de crecimiento que actúan sobre las mismas células que lo producen (estimulación autocrina). Algunos factores de crecimiento autocrinos producidos por las células de cáncer, no sólo actúan como señales estimuladoras del crecimiento si no que también afectan a la respuesta inmune. Por ejemplo la IL-4 y la IL-10 actúan como factores de crecimiento autocrino en el carcinoma tiroideo (Stassi et al. 2003) y ambas citoquinas polarizan la respuesta de las células T de Th1 a Th2, de este modo se produce una inactivación de la respuesta inmune frente al cáncer en la que están implicadas las células Th1. La IL-6 es una de los más potentes factores de crecimiento autocrino en la patogénesis de numerosos cánceres como el renal, de próstata y mielomas.

La activación aberrante de STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción), involucrado en la señalización de la IL-6, produce una inhibición de la respuesta inflamatoria e interferencias entre la respuesta adaptativa e innata en varios cánceres humanos, y de este modo favorece el crecimiento incontrolado del tumor (Wang et al. 2004). STAT3 puede ser activado por otros factores de crecimiento como son las proteínas PAX3 y FKHR (Nabarro et al. 2005), las cuales se asocian con un subtipo de rhabdomyosarcoma. PAX3 y FKHR producen la reducción de la expresión de

las moléculas del MHC y un incremento de la producción de IL-10 por el tumor, lo que provoca la inhibición de la respuesta inflamatoria y el reconocimiento por el sistema inmune (Dunn et al. 2004a). La sobreexpresión de los receptores de los factores de crecimiento también podría incrementar la sensibilidad de las células cancerosas a los factores de crecimiento que normalmente no se produciría. Un ejemplo de esto lo constituyen los receptores EGFR y ERBB2. El primero se encuentra sobreexpresado en los tumores de estómago, cerebro y mama y el segundo está incrementado en tumores de estómago y mama. Ambos son importantes antígenos tumorales implicados en la inducción de la respuesta de las células T, y en los pacientes donde se sobreexpresan se ha detectado un incremento de la respuesta inmune derivada (Pupa et al. 2005).

**Insensibilidad a las señales de antiproliferativas.** En los tejidos normales existen numerosas señales antiproliferativas que mantienen la homeostasis de los tejidos. Estas señales inhibitorias del crecimiento pueden ser solubles o encontrarse ancladas en la matriz extracelular o sobre la superficie de células vecinas.

Una de las más importantes señales antiproliferativas esta mediada por el factor de crecimiento derivado de las células transformadas- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), en algunos tumores se ven alterados algunos de los componentes de su vía de señalización: por ejemplo, por mutación o pérdida de los receptores del TGF- $\beta$ , por mutación del factor transcripcional SMAD4, o por delección de los locus que codifican INK4B y la proteína de retinoblastoma. Además el TGF- $\beta$  favorece la transición epitelial mesenquimal de líneas celulares de cáncer de mama y por tanto podría actuar de forma autocrina y paracrina permitiendo la movilidad, invasividad y metástasis (Muraoka-Cook et al. 2005). También es uno de los más potentes agentes inmunosupresores actuando a varios

niveles ya que la presentación antigénica por las células dendríticas (DCs), inhibe la actividad del IFN- $\gamma$ , reduce la proliferación de las células T, suprime la actividad citotóxica de las células NK y estimula la proliferación de las células T<sub>reg</sub> (Gorelik and Flavell 2002). En contraste se piensa que el TGF- $\beta$  además puede tener un efecto inmunoestimulador particularmente sobre las células Th (Bettelli et al. 2006).

Todos estos datos sugieren que cuando el tumor ignora la señal inhibitoria de crecimiento del TGF- $\beta$  puede replicarse en un ambiente inmunodeprimido rico en esta citoquina.

**Evasión de la apoptosis.** La apoptosis o muerte celular programada es un proceso celular fundamental y esencial para el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de los tejidos. Su misión es la eliminación de células superfluas, dañadas, infectadas o transformadas y juega un importante papel en el desarrollo, homeostasis y protección contra el cáncer.

El mecanismo celular de la apoptosis ha sido ampliamente estudiado y discutido (Budihardjo et al. 1999; Strasser et al. 2000). De una forma sencilla se podría definir como un conjunto de sensores y reguladores positivos y negativos cuyo balance neto determinará si finalmente se desencadena o no el proceso apoptótico. El mecanismo celular de la apoptosis se divide en dos vías:

a) Una *vía intrínseca* que se encuentra ligada a funciones mitocondriales (Green and Reed 1998).

b) Una *vía extrínseca* en la que participan una serie de receptores situados en la membrana celular denominados receptores de muerte. Esta vía participa en la inmunidad celular, pero también esta implicada en la respuesta de las células cancerosas

a determinadas terapias (Ashkenazi and Dixit 1998; Fulda et al. 2001; Strasser et al. 2000). Se inicia con la unión de determinadas citoquinas como TNF- $\alpha$ , TRAIL or FasL a sus correspondientes receptores de membrana de la célula diana. Esta unión produce la trimerización y activación de los receptores, una vez activados el dominio citoplasmático de los receptores (denominado dominio de muerte) podrá unirse a una serie de proteínas adaptadoras que a su vez reclutan a preformas inactivas de la procaspasa 8 (FLICE). En este complejo multimérico de muerte inducida por señalización (DISC), la caspasa 8 es activada por autoproteólisis desencadenándose la activación de una serie de caspasa efectoras (Ashkenazi and Dixit 1998; Budihardjo et al. 1999). Esta vía puede ser regulada a distintos niveles por proteínas inhibitoras de la apoptosis como el Bcl-2 (Danial 2007) y FLIP (FLICE Inhibitory Protein) (Thome et al. 1997).

Como hemos comentado anteriormente en esta vía extrínseca de apoptosis interviene la molécula de Fas también denominada APO-1 o CD95 que es un antígeno de superficie perteneciente a la familia de receptores TNF/NGF y se expresa de forma bastante general en los distintos tejidos. La proteína ha podido ser detectada en células epiteliales, fibroblastos, osteoblastos y cierto tipo de células endoteliales. El ligando para este antígeno denominado ligando de Fas (FasL) es una glicoproteína de membrana expresada predominantemente en células T y NK activadas y está implicado en la citotoxicidad mediada por CTLs. También es expresado en los tejidos que gozan de “privilegio inmune” y por las células tumorales, que al expresar FasL provocan la muerte programada en linfocitos T Fas positivos que infiltran el tumor (Hahne et al. 1996; O'Connell et al. 1996; Walker et al. 1997) aunque esta posibilidad sea polémica. Se sabe que las líneas celulares de melanoma y en las lesiones de melanoma extirpadas

quirúrgicamente expresan altos niveles de Fas-L (Hahne et al. 1996) . Esto sugiere que podría existir un nuevo mecanismo de escape utilizado por las células tumorales para evadir el reconocimiento de los CTL, sin embargo esta hipótesis parece ser incompatible con las regresiones clínicas observadas en pacientes a los que se les administran linfocitos T infiltrados (TIL) que son activados in vitro (Rosenberg et al. 1994).

**Potencial replicativo ilimitado.** La replicación ilimitada requiere el mantenimiento de los telómeros que se encuentran al final de los cromosomas protegiéndolos de la degradación. En las células normales en cada replicación el telómero se hace cada vez más corto ya que la maquinaria de replicación no es capaz de copiar su secuencia completa. En la mayoría de las células malignas se produce un aumento de expresión de la enzima telomerasa, la cual añade hexanucleótidos en el final del DNA telomérico. Como parte del complejo telomerasa existe una enzima que se denomina transcriptasa reversa telomerasa (TERT) que es un antígeno tumoral presente en enfermedades malignas, como el cáncer de mama (Amarnath et al. 2004) y la leucemia mieloide crónica (Maecker et al. 2005), aumentando la respuesta inmune. Además, el potencial replicativo se ve incrementado con la mutación o pérdida de genes supresores como el p53, el cual también puede actuar como antígeno tumoral. En tumores que no expresan p53 se aumenta la expresión de la ciclina B1 (regulador del ciclo celular) que también es un potente antígeno tumoral (Suzuki et al. 2005).

**Angiogénesis sostenida.** Algunas células tumorales muestran una mayor expresión de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y/o factor de crecimiento de



fibroblastos 1 (FGF1) y FGF2 que los tejidos normales, estos factores son cruciales para la mediación de la angiogénesis. Además de promover la angiogénesis, el VEGF inhibe la respuesta inmune antitumoral inhibiendo la activación del factor nuclear-kB en las DCs, previniendo así su maduración (Della Porta et al. 2005), y la supresión de la activación de las células T (Ohm et al. 2003).

También la sobreexpresión del mediador pro-inflamatorio ciclooxigenasa-2 (COX-2) es común en lesiones malignas y pre-malignas en órganos como el colon, pulmón, mama, próstata, vejiga, estómago y esófago. COX2 produce la sobreproducción de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) la cuál a su vez favorece la angiogénesis induciendo la producción de VEGF (Brown and DuBois 2005). Además COX2 y PGE<sub>2</sub> suprimen la respuesta inmune antitumoral mediada por las células T y los macrófagos, mediando la polarización de la respuesta de las células Th hacia la respuesta de las células Th2 (Brown and DuBois 2005).

**Invasión de tejidos y metástasis.** La localización de las células tumorales en lugares distantes del tumor primario (metástasis) es la causa del 90% de las muertes por cáncer. La presión selectiva probablemente dirige células de cáncer a lugares donde pueden ocultarse de la respuesta inmune. La invasión de sitios distantes al tumor primario requiere alteraciones en las proteínas implicadas en mantener a las células a su alrededor, así como en la secreción de proteasas. El gen supresor TSLC1, el cual se encuentra inactivado en el cáncer de pulmón, codifica a la proteína NECL2. Esta proteína media la unión de las células epiteliales con nectinas y además es reconocida por CRTAM (MHC-class-I-restricted T-cell-associated molecule), la cuál es expresada por las células T CD8<sup>+</sup> y las células NK, y promueve la citotoxicidad mediada por las

células NK y la producción de IFN- $\gamma$  por las células T (Boles et al. 2005). Por lo tanto la inactivación de NECL2 provoca un doble efecto oncogénico: permite la desorganización de la capa de células epiteliales e inhibe el reconocimiento de proteínas por parte de las células T y NK.

La secreción de enzimas proteolíticas, como la cathepsina, está también involucradas en la invasión de tejidos por las células tumorales. En los procesos cancerosos es característica la secreción de proteasas de los lisosomas, proceso que se encuentra asociado a un incremento de la proteína del shock térmico HSP-70 (Kroemer and Jaattela 2005). En teoría esta proteína aumenta la inmunogenicidad de las células tumorales ya que es una de las principales moléculas asociadas al patrón de daño molecular y participa en el cross-priming de los péptidos tumorales a las células T CD8<sup>+</sup> (Binder and Srivastava 2005; Calderwood et al. 2005). Además en carcinomas como el de páncreas y colón la liberación de esta proteína favorece la actividad citolítica de las células NK (Gastpar et al. 2005).

La invasión local puede también estar mediada por matriz metalo-proteinasas (MMPs) que son secretadas por las células tumorales y del estroma. Las MMPs también están relacionadas con la evasión del sistema inmune por parte del tumor a través mediante la activación del TGF- $\beta$ , la liberación de moléculas de adhesión ICAM1 e ICAM2 y el anclaje de CD25 (Stefanidakis and Koivunen 2006).

## **2.3. EL SISTEMA INMUNE COMO UN ELEMENTO EXTRÍNSECO DE SUPRESIÓN DEL DESARROLLO TUMORAL**

### **2.3.1 Antígenos tumorales**

El trabajo realizado durante la pasada década ha comenzado a revelar la base molecular de las diferencias dentro de la respuesta inmune adaptativa. Especialmente, en el reconocimiento de antígenos tumorales por parte de las células T  $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en el contexto de las moléculas MHC de clase II y clase I, respectivamente. Desde que los antígenos tumorales fueran identificados por primera vez en 1991 (van der Bruggen et al. 1991), algunos antígenos tumorales han sido clonados y pueden ser divididos en cinco categorías: 1) antígenos de diferenciación, por ejemplo antígenos de diferenciación de melanocitos, Melan-A/MART-1, tirosinasas, y gp-100. 2) antígenos mutacionales, por ejemplo formas anormales de la proteína p53. 3) antígenos sobreexpresados o amplificados, como HER-2/neu. 4) antígenos de células germinales, como MAGE y NY-ESO-1 y 5) antígenos virales, como por ejemplo EBV y HPV (Boon and van der Bruggen 1996; Old 2003; Rosenberg 1999). La definición molecular de antígenos tumorales revolucionó el campo de la inmunología tumoral al proporcionar una base firme para entender como el sistema inmune adaptativo discriminaba entre las células normales y las células neoplásicas.

Además de los antígenos presentados por las moléculas MHC, las células transformadas pueden sobreexpresar otras moléculas que sirven de diana para su reconocimiento en los procesos de inmunovigilancia. Varios estudios han señalado a los receptores NKG2D, que se expresan en las células NK, células T  $\gamma\delta$  y células T  $\alpha\beta$  CD8 (Raulet 2003),

(Bauer et al. 1999a) como un componente importante usado por las células del sistema inmune adaptativo e innato para distinguir las células tumorales de las células normales.

### **2.3.2 Respuesta inmune natural contra el cáncer**

El inicio de la respuesta inmune del hospedador se produce cuando las células del sistema inmunológico innato detectan el crecimiento de un tumor debido a cualquier alteración del tejido local que ocurre como consecuencia de angiogénesis (Carmeliet and Jain 2000; Hanahan and Folkman 1996) o invasión tisular (Hanahan and Weinberg 2000; Sternlicht and Werb 2001). Los cambios estructurales en el estroma inducidos durante este proceso pueden producir moléculas proinflamatorias que junto con quimiocinas, que a menudo son producidas por las células tumorales (Vicari and Caux 2002), atraen a las células de la inmunidad innata a esta nueva fuente "de peligro" local (Matzinger 1994). Las células dendríticas (DC) actúan como los detectores de estrés tisular, daño, y/o la transformación, y las señales de peligro pueden ser proteínas de shock térmico (HSPs) y/o factores proinflamatorios. Algunas de estas citoquinas (p.ej., interleuquina-1 (IL-1), IL-15, factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferón (IFN) tipo I, y factor estimulador de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)) también puede promover la diferenciación de las DCs y la actividad por aumento de la coestimulación entre las DCs y las células NK y las DCs y las células de T posteriormente. El microambiente de peligro permite el reclutamiento de células NK, macrófagos, células T y/o células de T natural killer (NKT). Además, las células T y células TNK pueden reconocer tumores que se desarrollan mediante la interacción de los receptores de las células T (TCR) con el complejo MHC/antígeno tumoral o por los complejos glicolipídicos-CD1 expresados sobre células de tumor, respectivamente

(Smyth et al. 2001). Estas células efectoras pueden entonces liberar moléculas citotóxicas para eliminar a las células transformadas y secretar IFNs que pueden tanto controlar directamente el crecimiento de tumor como indirectamente ampliar la respuesta inmune mediante una gran variedad de mecanismos (Dunn et al. 2004b).

### 2.3.3. Respuestas adaptativas frente al cáncer

La respuesta inmune adaptativa frente al tumor se produce cuando los antígenos tumorales son liberados por una variedad de vías en el contexto de señales inmunes innatas. Las DCs inmaduras que han sido reclutadas en el lugar del tumor comienzan a activarse bien por la exposición a las citoquinas del microambiente tumoral producidas durante el ataque inmune innato o por la interacción con las células NK infiltradas en el tumor (Gerosa et al. 2002). Las DCs activadas entonces pueden adquirir antígenos tumorales bien directamente por la ingestión de célula de tumor mediante cuerpos apoptóticos o mediante mecanismos indirectos que implican la transferencia de los complejos de células tumorales derivadas de HSPs y/o antígenos tumorales a las DCs (Li et al. 2002; Srivastava 2002). Las DCs adquiere un fenotipo maduro altamente activado y, en respuesta a las distintas quimiocinas y/o citoquinas, migran a los nódulos linfáticos (Sallusto et al. 2000), donde provocan la activación de de las células T CD4<sup>+</sup> naive a células Th1. Las células Th1 permiten el desarrollo de linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTL) específicos del tumor mediante la presentación sobre las DCs del complejo formado por los péptidos tumorales y las moléculas HLA de clase I (Huang et al. 1994). Los péptidos tumorales son presentados a las células T CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> en el contexto de clase MHC II o la clase I moléculas, respectivamente, y en ocasiones también puede se puede producir la activación de células de B. En la etapa final, el

desarrollo de inmunidad adaptativa específica frente al tumor puede hacer que el hospedador consiga eliminar completamente el tumor que se desarrolla. Las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> tumor específicas vuelven al lugar del tumor donde destruyen a las células tumorales que presentan el antígeno tumoral. Las células T CD4 producen IL-2 que, junto con la producción de IL-15 por las células hospedadoras, ayuda a mantener la función y la viabilidad de las células CD8<sup>+</sup> tumor específicas. Las células CD8 tumor específicas reconocen de forma eficiente el tumor e inducen la muerte de las células tumorales tanto por mecanismos directos como indirectos. Es probable que las células T CD8<sup>+</sup> directamente destruyan muchas células tumorales en vivo, sin embargo, también producirán grandes cantidades de IFN- $\gamma$  de este modo destruyen al tumor por inhibición del ciclo celular dependiente de IFN- $\gamma$ , apoptosis, angiostasis, o inducción de macrófagos. Estos dos mecanismos básicos de muerte y la producción citoquinas probablemente ocurren simultáneamente; sin embargo, sus contribuciones relativas pueden ser dependientes del tumor. De ahí, la fase de eliminación es un proceso continuo que debe ser repetido cada vez surgen células neoplásicas con distintos antígenos.

### **3. MECANISMOS DE EVASION DE LA RESPUESTA INMUNE EN EL CÁNCER**

- 1) Alteración de la expresión de antígenos de histocompatibilidad y de la maquinaria de presentación antigénica en tumores.
- 2) Pérdida o modulación de antígenos tumorales.

- 3) Inducción de inmunosupresión : inmunotolerancia dentro del microambiente tumoral
- 4) Células T supresoras: Treg.
- 5) Alteración funcional de células T CD8.

### **3.1 ALTERACION DE LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y DE LA MAQUINARIA DE PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA EN TUMORES**

Uno de los primeros mecanismos reconocidos y estudiados relacionados con la evasión inmune del tumor es la inhibición de la presentación antigénica. La baja regulación de la maquinaria de procesamiento antigénica, en particular en el caso de las moléculas HLA de clase I, ha sido demostrada en una gran variedad de tumores. En humanos, la baja regulación de las moléculas clase MHC I han sido observadas en distintos tipos de tumores (Cabrera et al. 1996;Cabrera et al. 1998;Esteban et al. 1990;Ferrone and Marincola 1995;Marincola et al. 2000;Ruiz-Cabello et al. 1989;Ruiz-Cabello et al. 1991;van den Ingh et al. 1987). En muchos casos, se produce una pérdida selectiva de un alelo HLA lo que parece producir una disminución en presentación de un antígeno inmunodominante del tumor; sin embargo, esta teoría nunca ha sido probada de una forma directa. El mecanismo más común para la pérdida total de las moléculas MHC de clase I son las mutaciones en el gen de la  $\beta$ 2-microglobulina (Benitez et al. 1998;D'Urso et al. 1991;Wang et al. 1993). Frecuentemente se produce la pérdida de heterocigosidad en el locus de la  $\beta$ 2-microglobulina junto con mutaciones de este gen. La baja regulación de los genes MHC de clase I pueden ser resultado de múltiples mecanismos que afectan la transcripción (Blanchet et al. 1992;Doyle et al.

1985). La baja regulación de los genes TAP así como de los componentes del proteosoma, como son el LMP-2 Y LMP-7, de la misma manera han sido demostrados en una gran variedad de tumores (Alpan et al. 1996;Hilders et al. 1994;Rowe et al. 1995;Sanda et al. 1995;Seliger et al. 1996). En la mayoría de casos donde se produce una baja regulación de la maquinaria de procesamiento antigénica de las moléculas HLA de clase I, la expresión se recupera tras el tratamiento con IFN- $\gamma$ , lo que sugiere que esta disminución de la expresión se debe a un fenómeno epigenético reversible. No raras veces, los tumores expresan niveles más altos de moléculas MHC de clase I y de componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico que su tejido normal de origen. Por ejemplo, prácticamente todos los cánceres renales expresan considerables niveles de MHC de clase I, mientras que el epitelio normal renal expresa los niveles apenas perceptibles de MHC la clase I en superficie y muy bajo los niveles de TAP hasta después de ser tratados con IFN- $\gamma$ .

Los mecanismos responsables de las alteraciones HLA en tumores han sido estudiados en profundidad en la expresión de las moléculas HLA se han dividido en varios grupos:

*Mutaciones en los genes que codifican la  $\beta$ -2m, cadena pesada de las moléculas HLA de clase I y proteínas de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM).*

Las mutaciones en los genes de la  $\beta$ 2m pueden ser debidas a deleciones de uno o varios nucleótidos y estas mutaciones se distribuyen de forma aleatoria en estos genes (Benitez et al. 1998;Feenstra et al. 1999b;Paschen et al. 2003;Restifo et al. 1996). Se han detectado un punto caliente de mutación en la región de repetición CT localizada en



el exón 1 en el gen de la  $\beta 2m$  (Perez et al. 1999), reflejando un incremento de la inestabilidad genética de esta región en células malignas (Garrido and Algarra 2001; Seliger et al. 2002).

Las mutaciones en los genes HLA de clase I incluyen recombinaciones somáticas en la región de los genes HLA de clase I (Browning et al. 1996), mutaciones nonsense (Koopman et al. 2000), mutaciones missense, deleciones e inserciones (Jimenez et al. 2001; Lehmann et al. 1995; Serrano et al. 2000).

También se han descrito mutaciones en los TAPs asociados con la pérdida de las moléculas de HLA de clase I en cáncer de pulmón (Chen et al. 1996) y en melanoma (Seliger et al. 2001).

#### *Pérdida de un haplotipo HLA (LOH)*

Esta alteración se debe a la pérdida de una copia del cromosoma 6 o a la pérdida de un fragmento de DNA que contiene los genes HLA-A, -B y -C (Koene et al. 2004; Ramal et al. 2000a; Torres et al. 1996). Este tipo de alteración ha sido descrita en diversos tipos de tumores, como son, tumor de laringe (Maleno et al. 2002), tumor colorectal (Maleno et al. 2004), linfoma no Hodgkin (Drenou et al. 2004) y cáncer de páncreas (Ryschich et al. 2004; Torres et al. 1996). Se han descrito varios mecanismos capaces de producir LOH, incluyendo la no disyunción cromosómica, recombinación mitótica y la deleción o conversión génica (Browning et al. 1993; de Nooij-van Dalen et al. 1998a).

*Defectos en la regulación transcripcional de los genes HLA de clase I y componentes de APM.*

La baja regulación de los genes TAP1/2 y LMP2/7 han sido demostradas en diferentes líneas celulares y tumores (Cabrera et al. 2003; Garrido et al. 1993; Meissner et al. 2005). La baja regulación de LMP7 se ha correlacionado con los niveles de expresión en varias líneas celulares de tumores humanos (Yoon et al. 2000). Se ha encontrado una alta frecuencia de pérdida o de baja regulación de LMP2, LMP7 y TAP1 en lesiones tumorales y líneas celulares procedentes de pacientes con cáncer de cabeza y cuello, que en el caso de las bajas regulaciones podrían ser revertidas tras tratamiento con IFN- $\gamma$  (Meissner et al. 2005). Baja expresión de subunidades del inmunoproteosoma (Cabrera et al. 2003; Miyagi et al. 2003) y tapasina (Cabrera et al. 2005) están involucradas en las pérdidas de las moléculas HLA de clase I en cáncer colorectal humano.

*Alteraciones epigenéticas.*

Los cambios en el patrón de metilación del DNA son uno de los errores epigenéticos más comunes en el cáncer y se producen por la adición enzimática de un grupo metilo en el carbono de la posición 5' de la citosina (Doerfler 1983). La mayoría de las 5'-metilcitosinas en el DNA de mamíferos esta presente en 5'-CpG-3' dinucleótidos (Riggs and Jones 1983).

Se ha demostrado como los fenómenos de metilación están involucrados en la inactivación de determinados genes involucrados en procesos cancerosos (Costello and Plass 2001) acabando así con la idea de que las bases moleculares de esta enfermedad son únicamente genéticas.

Varios estudios han puesto de manifiesto el papel de la metilación en la regulación transcripcional, así se ha comprobado que la hipermetilación del DNA es uno de los mecanismos capaces de provocar la inactivación transcripcional de los genes de HLA de clase I lo que lleva a la pérdida de expresión en superficie de estas moléculas favoreciéndose así el escape del tumor al reconocimiento del sistema inmune (Nie et al. 2001). Teniendo en cuenta estos datos se ha comprobado como tras el tratamiento con el agente desmetilante 5'-aza-2'-desoxicitidina es posible la recuperación de la expresión de las moléculas HLA de clase I. (Jones and Taylor 1980; Mohandas et al. 1981; Serrano et al. 2001).

En suma existen numerosos mecanismos que conducen a alteraciones totales o parciales en la expresión de antígenos HLA. Esto ha llevado a clasificar estas alteraciones atendiendo al fenotipo observado en la superficie de la célula tumoral (Garrido et al. 1997) (fig 2 pg. 27).

Fenotipo Ia producido por la pérdida total de las moléculas HLA de clase I, fenotipo Ib en el cual se produce la baja regulación total de las moléculas HLA de clase I.

Fenotipo II en el que se produce la pérdida de un haplotipo HLA.

Fenotipo III caracterizado por la pérdida o baja regulación de un locus HLA.

Fenotipo IV provocado por una pérdida alélica,

Fenotipo V o fenotipo compuesto resultado de la combinación de dos o más fenotipos anteriormente mencionados.

Fenotipo VII caracterizado por la resistencia a la acción del IFN- $\gamma$ .

Fenotipo VII que se produce por la reducción de la expresión de las moléculas HLA de clase I y expresión de las moléculas HLA de clase I no clásicas

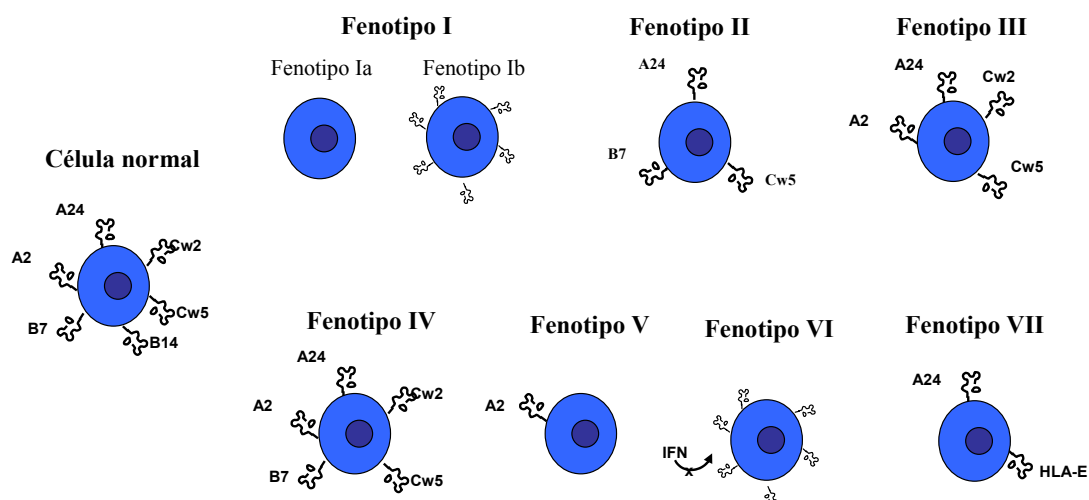


Fig. 2 Diferentes fenotipos alterados de las moléculas HLA de clase I.

### 3.2 PÉRDIDA O MODULACIÓN DE LOS ANTÍGENOS TUMORALES

La pérdida de expresión en superficie de antígenos tumorales es uno de los mecanismos utilizados por el tumor para evadir la respuesta inmune mediada por los CTLs y puede ocurrir de forma independiente a las alteraciones en la expresión de las moléculas HLA de clase I. La disminución de la expresión de antígenos de diferenciación melanoma-melanocito (MDAs) tales como el gp-100, antígenos reconocidos por células T como MART1 y tirosinas están asociados con la progresión de la enfermedad (de Vries et al. 1997). Se ha observado como el 100% de las células en estadio I eran MART1<sup>+</sup> pero en el estadio IV de la lesión sólo eran positivas un 75% (Hofbauer et al. 1998). Así como la disminución de la expresión de antígenos en tumores residuales después de la vacunación con péptidos (Jager et al. 1996; Lee et al. 1998). La vacunación con el péptido gp-100 provocó la disminución de la expresión del péptido gp-100 en el tumor, mientras que en la expresión del péptido MART1 no se observó ningún cambio (Riker et al. 1999). El mecanismo responsable de la disminución de la expresión de los antígenos tumorales es en la mayoría de los casos

desconocido, sin embargo parece que podría ser facilitada por la presencia de antígenos inmunodominantes (Schreiber et al. 2002). El fenómeno de inmunodominancia podría deberse a la inmunodetección de determinados epítomos frente a otros que también se expresa la superficie de la célula diana. Esta teoría postula que las variantes tumorales con la pérdida antigénica son capaces de evadir la respuesta inmune porque las células tumorales parentales que poseen el antígeno inmunodominante sirven como diana para el ataque inmune, consiguiendo así desviar la atención de las variantes tumorales.

### **3.3 INDUCCIÓN DE INMUNUNOSUPRESIÓN: INMUNOTOLERANCIA**

#### **DENTRO DEL MICROAMBINETE TUMORAL**

A pesar de las consecuencias inflamatorias e inmunogénicas de la invasión tisular por el tumor, el sistema inmunológico es generalmente tolerante a cánceres establecidos. Cada vez más estudios apoyan la idea que los tumores inhiben la liberación y la detección de las señales de peligro para invadir tejidos y producir metástasis evitando así la respuesta inmune tumoral que inhibirían su crecimiento. Los estudios de hecho han demostrado que las vías de señalización oncogénicas no sólo promueven el crecimiento de tumor y la supervivencia sino que también modulan su microambiente inmunológico. La vía de señalización oncogénica mejor estudiada en relación a la capacidad de disminuir la respuesta inmune antitumoral es la vía del STAT3. El STAT3 normalmente es activado en diversos cánceres tanto de origen hematológico como epitelial y su activación aumenta la proliferación de las células tumorales y previene apoptosis. De hecho la activación de STAT3 provoca una regulación negativa de la actividad de las DCs y de las células T. Además su activación provoca un aumento del ciclo celular del tumor, de fenómenos proangiogénicos y de

genes antiapoptóticos los cuales, son factores críticos en el proceso de transformación del tumor. (Bowman et al. 2001; Bromberg et al. 1999; Niu et al. 2002; Turkson et al. 1998)

Otro factor que produce la inactivación de las células T en tumores es la producción de indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO) (Munn et al. 2002). IDO parece ser producido por las DCs dentro de los tumores. La producción de IDO por las DCs es debida a la unión del ligando B7-1/2 con CTL-4 (Baban et al. 2005; Mellor et al. 2004). La mayor parte de la producción de IDO es realizada por un subtipo de DCs, bien por las células dendríticas plasmocitoides (PDC) o por una célula relacionada con las PDC que es la B220<sup>+</sup> (Munn et al. 2004). Las células T activadas son sumamente dependientes de triptófano y parece ser que es induciendo el catabolismo del triptófano como IDO provoca la inhibición de la respuesta inmune de las células T. Así, Munn y Mellor han propuesto un mecanismo, por el cual se agota el triptófano de las DCs, mediante un aumento de la vía IDO, induciendo así la apoptosis metabólica en células de T en la zona donde se activa esta vía. Otra molécula inhibidora producida por muchos tipos de células que han sido implicada en la disminución de la respuesta inmune antitumoral es factor de crecimiento tumoral- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), que es producido por una gran variedad de células, incluyendo las células tumorales, y que tiene efectos pleiotrópico. Para la mayoría de las células epiteliales normales, TGF- $\beta$  es un inhibidor potente de proliferación celular, causando la detención del ciclo celular en la etapa G1 (Blobe et al. 2000). En muchas células cancerosas, sin embargo, las mutaciones en los genes TGF- $\beta$  confieren la resistencia a la inhibición del ciclo celular, permitiendo la proliferación incontrolada. Además, en las células de cáncer, la producción de TGF- $\beta$  se ve aumentada, y puede contribuir a la invasión promoviendo la actividad de las metaloproteinasas. En vivo, TGF- $\beta$

directamente estimula angiogénesis; este estímulo puede ser bloqueado por anticuerpos anti-TGF- $\beta$  (Pepper 1997). Un papel bimodal de TGF- $\beta$  en el cáncer ha sido verificado en modelos animales transgénico que usa una sobreexpresión de los keratinocitos diana (Cui et al. 1996). Inicialmente, estos animales son resistentes al desarrollo de tumores benignos de piel.

### **3.4 CELULAS T REGULADORAS**

Aparte de las familias de moléculas coinhibitorias y coestimuladoras las células T reguladoras (Treg) están adquiriendo gran interés tanto en la inmunidad tumoral como infecciosa (von Boehmer 2005). Este interés se remonta a las investigaciones de Sakaguchi et al., quien demostró que las células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> podían prevenir el desarrollo de una respuesta autoinmune en timectomías neonatales (Sakaguchi et al. 1995). Posteriormente confirmaron el potencial regulador de las células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> en un conjunto de enfermedades autoinmunes, infecciosa, y modelos tumorales (Shevach 2004). Quizás los datos más convincentes acerca de un papel de las células Treg en el cáncer humano proceden del trabajo reciente de Curiel et al., quien demostró que la presencia de estas células en el líquido ascítico de mujeres con cáncer avanzado de ovárico fue asociada con una disminución de la supervivencia (Curiel et al. 2004). Además, la función reguladora de estas células también se ha reproducido en ensayo ex vivo. Posteriormente, el papel de las células Treg han sido identificados en cánceres de pulmón, páncreas, ovario, y mama (Liyanage et al. 2002).

### **3.5. DISFUNCIÓN DE LAS CÉLULAS T CD8**

Como los tumores probablemente han estado presentes durante años antes de ser detectados clínicamente, las células T CD8<sup>+</sup> específicas de tumores endógenos han estado en contacto con antígenos tumorales durante períodos de tiempo prolongados. Esta situación de contacto prolongado con el antígeno ha sido investigada usando modelos virales crónicos (Zajac et al. 1998). Los datos de estos sistemas coinciden en señalar que la función de las células T CD8<sup>+</sup> bajo estas condiciones se ve debilitada. De forma interesante, las células T CD8<sup>+</sup> específicas parece que no son expresamente suprimidas sino que más bien entran en un estado donde no pueden pasar del fenotipo de memoria efectora (CD62L<sup>low</sup>) a memoria central (CD62L<sup>high</sup>). Este fenómeno ha sido denominado "de agotamiento" y puede desempeñar un papel en el deterioro de la respuesta de las células T CD8 frente al contacto continuado con antígenos tumorales.

## **4. INMUNOVIGILANCIA EN EL CANCER**

La teoría de la inmunovigilancia postula que el sistema inmune es capaz de reconocer precursores del cáncer y, en la mayoría de los casos, destruirlos antes de que aparezcan síntomas clínicos. Este concepto se demostró en ratones, al comprobar como al perder componentes fundamentales de la respuesta inmune tanto innata como adaptativa eran más susceptibles al desarrollo de tumores espontáneos o inducidos por agentes químicos. Este es el caso de los animales que perdían los siguientes componentes: gen RAG2, lo que provocaba la ausencia de células T, células B y células natural killer (NKT); la cadena  $\gamma$  del receptor de las células T (TCR $\gamma$ ), que provocaba la



ausencia de células  $T\gamma\delta$ TCR,  $\beta$  y  $TCR\gamma$ , que producía la ausencia de las células  $T\alpha\beta$  y  $\gamma\delta$ ; receptores del interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) (Billiau et al. 1988); señal transductora y activador de la transcripción 1 (STAT1), necesario en la vía de señalización de IFN- $\gamma$ ; perforinas; o factor de necrosis celular (TNF) relacionado con la apoptosis inducida por ligando (TRAIL) (Dunn et al. 2004b). Estos experimentos son confirmados con estudios en los cuales los anticuerpos se usaron para la depleción de células TNK o para neutralizar a TRAIL o la activación del receptor NKG2D (Raulet 2003). Por el contrario cuando los tratamientos inmunoestimulatorios se incrementaba el número de células T NK y se reducía el desarrollo de enfermedades malignas en modelos murinos (Smyth et al. 2005).

Si la inmunovigilancia tiene un papel importante en la supresión del tumor, se podría pensar que pacientes con patologías pre-malignas o con estadios tempranos de cáncer tendrían aumentada su la respuesta inmune. De hecho existen varias evidencias de que ocurre de este modo. Por ejemplo pacientes con gammapatías monoclonales tienen un aumento de la respuesta de las células T a células B pre-malignas, mientras que esta respuesta no se observa en individuos con mieloma múltiple, al tratarse de procesos malignos (Dhodapkar et al. 2003). También se ha observado como la médula ósea de pacientes con cáncer de pecho operable poseen células T  $CD8^+$  específicas de péptidos derivados de proteínas asociadas a dicho cáncer como son MUC1 y ERBB2 y éstas células eran capaces de mediar la regresión de tumores autólogos transplantados en ratones inmunodeficientes (Beckhove et al. 2004).

Todos estos ejemplos ponen de manifiesto que los tumores inducen al menos de forma transitoria respuesta inmune, pero sin embargo el cáncer se desarrolla. La respuesta inmune podría ser tan ineficiente para la prevención del desarrollo del cáncer

bien, por que las células tumorales que escapan a la respuesta inmune son seleccionadas (inmunoselección) o por que los antígenos tumorales específicos inducen tolerancia. (Willimsky and Blankenstein 2005).

En numerosos cánceres, la presencia en el mismo de linfocitos infiltrantes del tumor (TILs) se usa como marcador pronóstico como en el caso del melanoma, carcinoma de ovario y carcinoma de colón (Wang et al. 2005). En pacientes con carcinoma de ovario o melanoma, la presencia de células T reguladoras CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (T<sub>reg</sub>) es un marcador de disminución de supervivencia (Curiel et al. 2004;Viguier et al. 2004). Ex vivo, la depleción de las células T<sub>reg</sub> de la población de TIL recobra en las células de carcinoma renal o melanoma el incremento de la lisis de las células tumorales por las células NK (Ghiringhelli et al. 2005). De la misma forma, la respuesta de los TIL en las células del cáncer de próstata puede recuperarse ex vivo mediante la inhibición de dos enzimas producidas por el tumor: arginasa-1 y óxido nítrico sintasa (NOS2). Estos experimentos ponen de manifiesto que aunque las células tumorales sean infiltradas por TILs, la actividad antitumoral de las células T puede ser inhibida (Bronte et al. 2005).

Otra evidencia del papel de la inmunovigilancia en la supresión del cáncer es el hecho de que pacientes inmunodeprimidos tengan mayor predisposición a desarrollar esta enfermedad. Así los pacientes inmunodeprimidos tras recibir un trasplante tienen un mayor riesgo a desarrollar ciertos cánceres sin etiología viral conocida como el melanoma (Hollenbeak et al. 2005;Penn 2000) y sin embargo no se incrementa el riesgo de desarrollar otros cánceres como el gastrointestinal, urogenital o respiratorios (Penn 2000), demostrando que no se deben a la mera supresión por glucocorticoides o ciclosporina A. Pacientes con el síndrome de Chediak-Higashi, que es una enfermedad

ausonómica recesiva donde se ve comprometida la actividad citotóxica de las células NK, aumenta 200 veces el riesgo a padecer enfermedades malignas que los individuos sin esta patología (Kobayashi 1985). Ciertos alelos NKG2D que afectan a la citotoxicidad de los linfocitos en sangre periférica, están asociados al riesgo de desarrollar cáncer (Imai et al. 2000; Nakachi et al. 2004).

Todos estos datos ponen de manifiesto la participación en el sistema de inmunovigilancia del cáncer de las células T CD8<sup>+</sup>, células TH1 y células NK y su supresión local por las células T<sub>reg</sub> y productos de las células tumorales. Además varios estudios sustentan el concepto de que existen dos procesos que facilitan el desarrollo del cáncer: el primero cambios oncogénicos intrínsecos de las células, y el segundo deficiencia en el reconocimiento o en la función efectora del sistema inmune innato o adaptativo contra las células tumorales.

## **5. INTERFERON GAMMA**

### **5.1. IMPORTANCIA DEL INTERFERON GAMMA EN LA INMUNIDAD CONTRA EL CANCER**

Aunque el papel del IFN- $\gamma$  es bien conocido en la respuesta inmune del hospedador frente a microorganismos, el descubrimiento de que el IFN- $\gamma$  también promueve la respuesta inmune antitumoral ha hecho resurgir el interés en los procesos de inmunovigilancia en el cáncer. Los datos originales que pusieron de manifiesto el importante papel de la producción endógena de IFN- $\gamma$  para promover la eliminación del tumor vinieron de los experimentos que procuraron identificar las citoquinas requeridas

por los lipopolisacáridos (LPS) para el rechazo de células de fibrosarcoma inducidas por 3-metilcolantreno en ratones BALB/C (Dighe et al. 1994). La neutralización del IFN- $\gamma$  con un anticuerpo monoclonal específico, sin la neutralización de factor de necrosis de tumor (TNF) con un anticuerpo monoclonal específico, revocó el rechazo dependiente de LPS de las células Meth A. Además, otros sarcomas inducidos por el cancerígeno MCA crecieron más agresivamente cuando eran trasplantado en ratones naive que habían sido tratados con un antígeno monoclonal específico frente al IFN- $\gamma$ .

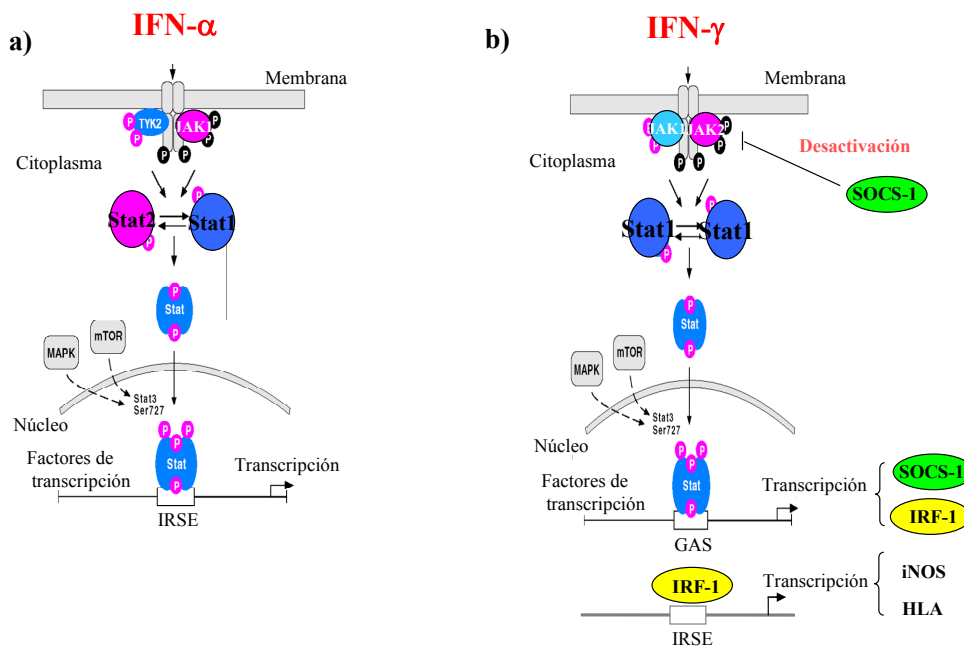
La actividad antitumoral del IFN- $\gamma$  observada en estos estudios fue posteriormente confirmada en modelos tumorigénicos primarios. El informe inicial mostró que los ratones 129/Sv insensibles a IFN- $\gamma$ , que carecían de la subunidad IFNGR1 del receptor del IFN- $\gamma$  o del factor de transcripción STAT1 (el transductor de señal y el activador de transcripción 1), desarrollaban sarcomas inducidos por MCA más rápidamente y con más frecuencia que los ratones wild-type (Kaplan et al. 1998). Experimentos similares se realizaron usando los ratones C57BL/6 que carecían del gene que codifica el IFN- $\gamma$  (Street et al. 2001). Los ratones insensibles al IFN- $\gamma$  eran también más susceptibles a la formación de tumores espontáneos. En los ratones que carecen tanto de la proteína supresora de tumor p53 como de sensibilidad frente a IFN- $\gamma$  (como consecuencia de la deficiencia en IFNGR1 o en STAT1) los tumores se formaban considerablemente más rápidamente que en los ratones sensibles a IFN- $\gamma$  y deficientes en p53, y en estos ratones también se desarrollaron una mayor variedad de tipos de tumores (Kaplan et al. 1998). En otro estudio, con ratones C57BL/6 deficientes en IFN- $\gamma$  estos desarrollaron linfomas diseminados con más frecuencia que en ratones wild-type. En contraste, una pequeña proporción de ratones BALB/c deficientes en IFN- $\gamma$  desarrollarán adenocarcinomas de pulmón, pero no linfomas diseminados, mientras que los ratones BALB/c wild-type

crecieron libres de tumores (Street et al. 2002). Otro estudio mostró que el IFN- $\gamma$  coopera con otras citoquinas para prevenir la formación de tumor. Los ratones deficientes tanto en el factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) como en IFN- $\gamma$ , así como ratones deficientes en estas citoquinas e interleuquina-3 (IL-3), desarrollado linfomas y cánceres sólidos no linfáticos en una mayor proporción que los ratones deficientes sólo en GM-CSF, en GM-CSF e IL-3, o sólo en IFN- $\gamma$  (Enzler et al. 2003). Comparado con otros modelos experimentales, la interpretación de este estudio es complicada por la dependencia de la neoplasia sobre la infección; por lo tanto, es necesario realizar más estudios para comprender las relaciones entre la infección crónica, el cáncer y la inmunovigilancia. Sin embargo, en conjunto, las conclusiones de los distintos experimentos muestran que el IFN- $\gamma$  participa en la eliminación del cáncer (inmunovigilancia) protegiendo a los ratones de los tumores inducidos por agentes químicos, los tumores espontáneos y los tumores transplantados

Todos estos datos avalan que el IFN- $\gamma$  es una molécula clave en la inmunovigilancia contra el cáncer.

## **5.2 VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LOS IFNS TIPO I Y II.**

El IFN- $\alpha/\beta$  se une a su receptor específico de membrana y como resultado se produce la activación de las enzimas tirosin-quinazas Jak1 y Tyk2 y que a su vez fosforilan las proteínas STAT1 y STAT2. El heterodímero STAT1/STAT2 se trasloca al núcleo, donde es un componente del factor transcripcional ISGF-3 (Fu et al. 1990;Fu et al. 1992;Levy et al. 1990).El complejo ISGF-3 ejerce su acción de activador transcripcional sobre la secuencia activadora IRSE. (fig. 3a pg 37).



**Fig 3. Vías de señalización de los IFNs tipo I y II.** La unión del IFN- $\alpha$  a su receptor de membrana provoca la fosforilación de las tirosin-quininas Jak-1 y Tyk2 mientras que en el caso del IFN- $\gamma$  se activan Jak-1 y Jak-2. La fosforilación de estas tirosin-quininas permite la unión de las moléculas transductoras de señal y activadoras de la transcripción (STAT). En el caso del IFN- $\alpha$  se forma el heterodímero STAT-1/STAT-2 y en el caso del IFN- $\gamma$  se forma el homodímero STAT-1. Ambos se traslocan al núcleo desencadenando la transcripción de diferentes genes como SOCS e IRF-1.

El IFN- $\gamma$  actúa uniéndose a su receptor de membrana heterodimérico (IFN- $\gamma$ R1 IFN- $\gamma$ R2), asociado intracelularmente con las tirosin-quininas Jak1 y Jak2, respectivamente (Darnell et al. 1994;Hibino et al. 1992). Esta unión produce la fosforilación de los residuos de tirosina de Jak-1 y Jak-2 lo que permite la unión de un miembro de la familia de transductores de señal y activadores de transcripción (Stat), STAT1. STAT-1 es fosforilado por las enzimas Jaks y se forma un homodímero conocido como factor de activación gamma (GAF) (Darnell et al. 1994;Ihle et al. 1995;. 1995;Schindler and Darnell 1995). GAF migra al núcleo donde se une a la secuencia de activación del IFN- $\gamma$  (GAS) presente en los promotores de los genes inducibles por IFN- $\gamma$ . Miembros de la familia de factores de regulación del IFN (IRF), y en concreto IRF-1, se induce por esta vía (Bluyssen et al. 1995;Darnell et al. 1994). IRSE (interferon-

stimulated response element) es un sitio de unión para los factores de la familia IRF y media la inducción de la transcripción de las moléculas HLA de clase I por los IFNs, de los cuales el IFN- $\gamma$  es el más potente (Girdlestone et al. 1993; Johnson and Pober 1994; Le Bouteiller 1994). (Fig. 3b pg. 37)

Esta bien establecido el hecho de que las vías de señalización de las citoquinas pueden ser reguladas negativamente tanto en duración como en intensidad. Pero ha sido en los últimos años cuando se han conocido tres clases diferentes de reguladores negativos que contribuyen a la inhibición de citoquinas: SHP-1 ( SH2-containing protein tyrosine phosphatase 1), PIAS (the protein inhibitors of activated STATs) y SOCS ( the suppressors of cytokine signalling)(Hilton 1999). SOCS-1 actúa como un regulador fisiológico de de la respuesta a citoquinas, y actúa inhibiendo la señal de transducción mediante a supresión de la actividad de la tirosinquinasa JAK (Sakamoto et al. 1998b; Yasukawa et al. 1999). Algunos estudios sugieren que SOCS-1 actúa concretamente inhibiendo la actividad catalítica de las quinasas Jak1, Jak2, Jak3 y Tyk2 (Endo et al. 1997; Naka et al. 1997; Nicholson et al. 1999; Yasukawa et al. 1999). Estudios en ratones Knockout indican que SOCS-1 es indispensable para a regulación negativa de IFN- $\gamma$  (Alexander et al. 1999; Marine et al. 1999).

## **OBJETIVOS**





## Objetivos

### Objetivo general:

Caracterización fenotípica de la expresión de las moléculas HLA de clase I y II, así como de la respuesta a IFN- $\gamma$  en un banco de líneas celulares de melanoma.

### Objetivos específicos:

- Estudio de la frecuencia y patrones de alteración de expresión de moléculas HLA de clase I
- Estudio genético-molecular de los mecanismos implicados en las alteraciones de antígenos HLA de clase I en líneas de melanoma.
- Estudio de los patrones de expresión de antígenos HLA de clase II en líneas de melanoma humano (constitutiva e inducible).
- Factores relacionados con la respuesta a IFN en genes de clase I y II.



## **MATERIAL, METODOS Y RESULTADOS**



La descripción de los materiales y métodos empleados, así como de los resultados obtenidos, se encuentra reflejada en los artículos originales publicados en relación con cada uno de los objetivos planteados. Las publicaciones científicas realizadas fruto de este trabajo incluyen:

A) Publicaciones relacionadas con la expresión constitutiva y tras inducción con IFN- $\gamma$  de las moléculas HLA de clase I, así como los mecanismos moleculares responsables de los distintos fenotipos alterados.

- 1) High frequency of homozygosity of the HLA region in melanoma cell lines reveals a pattern compatible with extensive loss of heterozygosity (Cancer Immunology Immunotherapy. 2005 Feb; 54(2):141-8).
- 2) Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines (BMC Cancer.2007 Feb 23;7:34).
- 3) Characterization of HLA class I altered phenotypes in a panel of human melanoma cell lines (Cancer Immunology Immunotherapy. 2007 Oct 13).

B) Publicación relacionada con la expresión constitutiva y tras inducción con IFN- $\gamma$  de las moléculas HLA de clase II, así como los mecanismos moleculares responsables de los distintos niveles de expresión de estas moléculas:

- 4) Patterns of constitutive and IFN- $\gamma$  inducible expression of HLA class II molecules in human melanoma cell lines (Immunogenetics.2007 Feb;59(2):123-33).

C) Contribución de los resultados obtenidos en la revisión general de los mecanismos implicados en la pérdida total y baja regulación total de las moléculas HLA de clase I:

5) Different mechanisms can lead to the same altered HLA class I phenotype in tumors (Tissue Antigens.2007 Apr;69 Suppl 1:259-63)

## LA ALTA FRECUENCIA DE HOMOCIGOSIDAD DE LA REGIÓN HLA EN LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA REVELA UN PATRÓN COMPATIBLE CON UNA PÉRDIDA EXTENSA DE HETEROCIGOSIDAD.

**Introducción:** La baja regulación o la pérdida de expresión de las moléculas HLA de clase I son frecuentemente asociadas a las transformaciones malignas. Esta alteración de la expresión de las moléculas HLA puede afectar a la respuesta inmune antitumoral proporcionando a las células tumorales un mecanismo de escape a la inmunovigilancia. La pérdida de un haplotipo HLA puede proporcionar al tumor una ventaja selectiva porque puede suponer un mecanismo simultáneo de escape a las células T y NK. Así se ha demostrado que la pérdida del cromosoma 6p21, en la cual está localizada la región HLA, es un fenómeno común en tumores de diferente origen. Este fenómeno podría originarse como consecuencia de una pérdida parcial o total del DNA genómico como consecuencia de varios mecanismos como pueden ser una no disyunción cromosómica o a una recombinación mitótica en el brazo corto del cromosoma 6. Para nuestro estudio realizamos el tipaje HLA de clase I y II de 91 líneas celulares de melanoma. Además a 61 de las 91 líneas celulares también se realizó el estudio de la expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I y II y para investigar posibles deleciones se utilizaron marcadores de microsatélites altamente polimórficos que cubren la región HLA del brazo corto del cromosoma 6.

**Material y método:** Las líneas celulares de melanoma fueron cultivadas en medio RMPI (Biochrom KG, Berlin, Alemania) con un 10% de FCS ( Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Alemania) y un 1% de penicilina/estreptomina ( Biochrom KG, Berlín, Alemania) a 37 °C y en atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>.



El tipaje de las líneas celulares se realizó de dos formas a nivel proteico mediante inmunofluorescencia indirecta usando un panel de anticuerpos monoclonales y a nivel genómico mediante técnicas de hibridación con sondas (SSO) y en algunos casos mediante secuenciación de alta resolución. La fluorescencia se determinó utilizando un citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson). Para el tipaje genómico, el DNA se obtuvo utilizando el método de extracción estándar de fenol-cloroformo. Las muestras de DNA fueron amplificadas por PCR usando oligonucleótidos locus específicos. Las muestras fueron secuenciadas en el secuenciador automático ABI 377 DNA (Applied Biosystem, Warrinton, UK). Los datos obtenidos por secuenciación fueron analizados usando el software Match Tools v1.0 (Applied Biosystems). Para el análisis de microsatélites se utilizaron ocho STRs (D6S311, D6S291, D6S273, D6S265, D6S105, D6S276, C.1.2.c, C.1.2.5) que mapean el cromosoma 6. Los microsatélites fueron amplificados por PCR usando los primers apropiados. Un oligonucleótido de cada par de primers fueron marcados fluorescentemente con FAM o TAMRA. Alícuotas de la PCR fueron después mezcladas con estándares de peso molecular y formamida, desnaturalizadas y sometidas a electroforesis en el 377 DNA sequencer (ABI, Foster City, CA).

**Resultados:** El análisis de la distribución genotípica reveló una homocigosidad significativa en las células de melanoma para los genes HLA de clase I y II. Así encontramos que el 10,98 % (10/91) de las líneas de melanoma analizadas fueron homocigotas para clase I mientras que retienen la heterocigosidad para clase II. Mientras que la incidencia de homocigosidad para las moléculas HLA de clase I en la población control que fue de un 1,3 %. Un 8,79 % (8/91) de las líneas de melanoma fueron homocigotas tanto para clase I como para clase II, mientras que en la población

control era de un 1,6 %. Muy pocas células fueron heterocigotas para clase I y homocigotos para clase II, un 4,40 % (4/91), mientras que el porcentaje de homocigosidad para clase II en los donantes sanos fue de un 8,6 %. También se realizó el análisis de marcadores de microsatélites a nueve de las líneas celulares homocigotas. Para la mayoría de los marcadores se observó la amplificación de un sólo alelo. Analizando conjuntamente los datos obtenidos de tipaje HLA y el análisis de microsatélites se observa un patrón de homocigosidad que sugiere la eliminación de parte o del brazo corto del cromosoma 6 completa. Desafortunadamente, nosotros no pudimos comparar los resultados de las células de melanoma con el DNA autólogo normal de los pacientes ni de tumores autólogos. También detectamos otros fenotipos HLA de clase I alterados en las 61 líneas de melanoma analizadas por citometría de flujo. Estos se corresponden con la pérdida total de HLA de clase I (3%), baja regulación de HLA-ABC (3%), baja regulación del locus HLA-B (26%), probable LOH (8,79%) y un 53% sin ninguna alteración demostrada para HLA de clase I. De las líneas celulares estudiadas 56 (54%) expresaron HLA-DR.



Cancer Immunol Immunother (2005) 54: 141–148  
DOI 10.1007/s00262-004-0561-5

**ORIGINAL ARTICLE**

Teresa Rodríguez · Rosa Méndez · Chrissy H. Roberts  
Francisco Ruiz-Cabello · I. Anthony Dodi  
Miguel Angel López Nevot · Laura Paco  
Isabel Maleno · Steven G. E. Marsh  
Graham Pawelec · Federico Garrido

## High frequency of homozygosity of the HLA region in melanoma cell lines reveals a pattern compatible with extensive loss of heterozygosity

Received: 9 January 2004 / Accepted: 17 April 2004 / Published online: 1 October 2004  
© Springer-Verlag 2004

**Abstract** Malignant transformation of cells is frequently associated with abnormalities in human leukocyte antigen (HLA) expression. MHC class I loss or down-regulation in cancer cells is a major immune escape route used by a large variety of human tumours to evade antitumour immune responses mediated by cytotoxic T lymphocytes. The goal of our study was to explore HLA genotyping and phenotyping in a variety of melanoma tumour cell lines. A total of 91 melanoma cell lines were characterised for HLA class I and II genotype. In addition, 61 out of the 91 cell lines were also analysed for HLA class I and II cell surface molecule expression by flow cytometry. Unexpectedly, we found that 19.7% of the melanoma cell lines were homozygous for HLA class I genotypes, sometimes associated with HLA class II homozygosity (8.79%) and sometimes not (10.98%). The frequency of homozygosity was significantly higher compared with the control groups (1.6%). To identify the reasons underlying the high frequency of HLA homozygosity

we searched for genomic deletions using eight pairs of highly polymorphic microsatellite markers covering the entire extended HLA complex on the short arm of chromosome 6. Our results were compatible with hemizygous deletions and suggest that loss of heterozygosity on chromosome arm 6p is a common feature in melanoma cell lines. In fact, although autologous normal DNA from the patients was not available and could not be tested, the retention in some cases of heterozygosity for a number of microsatellite markers would indicate a hemizygous deletion. In the rest of the cases, markers at 6p and 6q showed a single allele pattern indicating the probable loss of part or the whole of chromosome 6. These results led us to conclude that loss of heterozygosity in chromosome 6 is nonrandom and is possibly an immunologically relevant event in human malignant melanoma. Other well-established altered HLA class I phenotypes were also detected by flow cytometry that correspond to HLA class I total loss and HLA-ABC and/or specific HLA-B locus down-regulation.

T. Rodríguez · R. Méndez · F. Ruiz-Cabello · M. A. L. Nevot  
L. Paco · I. Maleno · F. Garrido (✉)  
Departamento de Análisis Clínicos,  
Hospital Universitario Virgen de las Nieves,  
Universidad de Granada,  
Avd. Fuerzas Armadas 2,  
18014 Granada, Spain  
E-mail: federico.garrido.sspa@juntadeandalucia.es  
Tel: +34-958-020319  
Fax: +34-958-283147

G. Pawelec  
Section for Transplantation Immunology  
and Immunohaematology,  
Zentrum für Medizinische Forschung,  
Waldhörnlestr. 22, 72072 Tübingen, Germany

C. H. Roberts · I. A. Dodi · S. G. E. Marsh  
Anthony Nolan Research Institute,  
The Royal Free Hospital,  
Pond Street, Hampstead,  
London, NW3 2QG, UK

**Keywords** HLA · Immune escape · LOH ·  
Melanoma · RSCA · STRs · Tumour

### Introduction

Loss of heterozygosity (LOH) is a major mechanism for inactivation of tumour-suppressor genes, being observed in a variety of human tumours. This phenomenon may originate from one of various mutational events such as mitotic recombination, localised gene conversion or point mutation [4]. The human leukocyte antigen (HLA) region is located at chromosome band 6p21.3, and loss of an entire HLA region has been observed as the major mechanism of HLA loss in human tumours [7, 13, 17]. The frequency of losses in this region may provide

tumour cells with a mechanism to escape from immune attack. The presence of these altered MHC phenotypes may be a consequence of T-cell immunoselection of MHC class I-deficient tumour variants [6]. Loss of one HLA haplotype, which has been associated with LOH in chromosome 6p21, has been described in different tumours and cell lines of different origin (cervix, laryngeal, colon, and pancreatic carcinoma) [14, 25]. This phenotype can be caused by the loss of variable portions of genomic DNA as a consequence of a combination of mechanisms such as chromosomal segregation, nondisjunction or mitotic recombination in the short arm of chromosome 6 [4]. Our findings to date have made it possible to define LOH in chromosome 6p21 with a selected panel of microsatellite markers (STRs) located in chromosome 6 in or near the HLA region in a variety of samples from different tumours [13, 23]. The results show that LOH is a widespread mechanism used by many tumour cells to produce HLA class I-deficient tumour variants [7].

Here we report the HLA genotyping for HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1, HLA-DQB1 and HLA-DPB1 in 91 melanoma cell lines. We also went on to study a subset of 61 of these lines for homo/heterozygosity of a group of specific STRs spanning the HLA region and for HLA class I and II cell surface expression. A large proportion of these melanoma cell lines were homozygous for these loci. Unfortunately, in neither case could we compare the results with normal tissues from the patients; however, it is known that while definable, homozygosity is infrequent in the HLA region of the genome due to the highly polymorphic nature of the HLA genes. Interestingly, in some cases the gain of 6p and loss of 6q have often been seen in skin melanomas [12]. Our results, in contrast, strongly suggest that melanoma cell lines exhibit a common genetic aberration on chromosome 6 that involves large hemizygous deletions of the entire HLA region. This deletion may represent an important mechanism of HLA haplotype loss in melanoma cell lines.

## Material and methods

### Melanoma cell lines

Ninety-one melanoma cell lines were obtained from the European Searchable Tumour Cell Line Data Base (ESTDAB project, contract no. QLRI-CT-2001-01325). For details see <http://www.ebi.ac.uk/ipd/estdab>. Samples were snap-frozen in FCS cooled with DMSO and stored in liquid nitrogen until sectioned for study. ESTDAB human melanoma cell lines were grown in RPMI medium (Biochrom KG, Berlin, Germany) with 10% foetal calf serum (FCS; Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Germany), 2% glutamine (Biochrom KG, Berlin, Germany) and 1% penicillin/streptomycin (Biochrom KG, Berlin, Germany) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>.

### HLA cell surface expression

Surface expression of HLA class I and II antigens was determined by indirect immunofluorescence using a panel of monoclonal antibodies, W6/32 (HLA-ABC), L-362 (b2m), 1082C5 (HLA-A), Q6/64 (HLA-B), 126.39 (HLA-Bw6), 116-5-28 (HLA-Bw4), GRB-1 (HLA-DR), with the use of a fluorescence-activated cell analyser (FACScan; Becton Dickinson). The intensity of the fluorescence was measured by taking the mean of the average channel of fluorescence.

### HLA genotyping

Control samples were recruited from the Spanish Bone Marrow Donor Registry. High-molecular-weight genomic DNA was prepared from the cells with a standard phenol-chloroform method. DNA samples were amplified by PCR using specific primer pairs for HLA-B and HLA-A locus-specific amplifications. Samples were sequenced on an automated 373 DNA sequencer (Applied Biosystems, Warrington, UK). Data obtained by sequencing were analysed using Match Tools v1.0 Sequencing Analysis software (Applied Biosystems).

High-resolution HLA genotyping by reference strand-mediated conformation analysis (RSCA) was performed at the Anthony Nolan Research Institute (London, UK). Genomic DNA was extracted from the ESTDAB samples using in-house 'salting out' protocols, and HLA gene-specific PCR amplicons were produced using exonic primers. Primary amplicons were then hybridised to fluorescently labeled reference strands (FLRs). RSCA separates HLA alleles according to conformational differences brought about by sequence mismatches in the resultant heteroduplex molecules which manifest as altered electrophoretic mobilities across a non-denaturing polyacrylamide gel [1] on an Automated Laser Fluorescence (ALF) Detection System (Amersham Biosciences, Amersham, UK).

HLA types are assigned by comparison to a database of known mobilities for the HLA alleles, and quality control is maintained by the use of hidden duplication, confirmation of types by sequence-based typing (SBT) and by the use of both internal and external controls. Sequencing was performed on an ABI 377 DNA sequencer (Applied Biosystems). Data obtained by sequencing were analysed using Match Tools v1.0 Sequencing Analysis software (Applied Biosystems).

### Microsatellite analysis

DNA was studied with eight STRs that mapped chromosome 6. The markers (D6S311, D6S291, D6S273, D6S265, D6S105, D6S276, C.1.2.c and C.1.2.5) were previously described by Ramal et al. [23]. The microsatellites were amplified by PCR using the primers listed in Table 1, which were retrieved from the Genome

Table 1 Description of microsatellites (STRs) and primers used

STRs	Location	Size	Alleles	Probability het	Labelling	Sequencing
D6S311	6q21	230–276	18	0.91	FAM	CA: 5'ATGTCCTCATTGGTGTGTG3' GT: 5'GATTTCAGAGCCCAAGGAGAT3'
D6S291	6p21.3 Class II region	198–210	7	0.70	FAM	CA: 5'CTCAGAGGATGCCATGTCTAAAATA3' GT: 5'GGGATGACGAATTATTCACAACT3'
D6S273	6p21.3 Class III region	120–140	8	0.76	TET	CA: 5'GCAACTTTCTGTCAATCCA3' GT: 5'ACCAAACCTCAAATTTTCGG3'
C.1.2.C	Region A tel MICB (62 Kb)	260–234	14	0.84	FAM	AC: 5'GGATCCTAGGAACCTCCCTCG3' GT: 5'GAGCAGAAGGGAGATGAAATGG3'
C.1.2.5	Region A tel HLA-B(62 Kb)	178–220	20	0.89	FAM	CA: 5'CAGTAGTAAGCCAGAAGCTATTAC3' TG: 5'AAGTCAAGCATATCTGCCATTGG3'
D6S265	Centr: HLA-A (70–100 Kb)	118–140	12	0.78	FAM	CA: 5'ACGTTTCGTACCCATTAACCT3' GT: 5'ATCGAGGTAAACAGCAGAAA3'
D6S105	Tel.HLA-A (1,500–2,500 Kb)	116–138	12	0.82	FAM	CA: 5'GCCCTATAAAATCCTAATTAAC GT: 5'GAAGGAGAATTGTAATTCG3'
D6S276	Tel HLA-A (6,000 Kb)	198–230	14	0.83	TET	CA: 5'TCAATCAAATCATCCCCAGAAG3' GT: 5'GGGTGCAACTTGTTCCTCT3'

Database (GDB). One oligonucleotide of each primer pair was labeled with fluorescent dye phosphoramidites FAM or TET. Oligonucleotides were amplified with AmpliTaq Gold enzyme (Applied Biosystems) in multiplex PCR reactions using 50 ng of genomic DNA as a template, under conditions specified by GDB. Thirty cycles of amplification were performed in a PE-9600 thermal cycler (Applied Biosystems) in a total volume of 20  $\mu$ l. Aliquots of the PCR reactions were then mixed with size standards and formamide, denatured, and subjected to electrophoresis on a 377 DNA Sequencer (ABI, Foster City, CA, USA). To size the alleles precisely, a portion of the PCR products was divided into aliquots and combined with dextran blue dye, formamide and GeneScan TAMRA internal size marker (Applied Biosystems). Samples were denatured at 94°C for 3 min, snap-cooled on ice and loaded on an ABI 310 automated capillary sequencer. GeneScan and Genotyper software (Applied Biosystems) were used to size, quantify and compare normal and tumour amplicon patterns for each marker.

## Results

A total of 91 melanoma cell lines and 922 control samples of normal peripheral blood lymphocytes were genotyped. The genotype distribution analysis disclosed significant homozygosity in the melanoma cells for both HLA class I and II genes. We discovered that 10.98% (10/91) of the ESTDAB cells included in the study were homozygous for HLA class I while retaining heterozygosity for HLA class II (Table 2). This was compared to an incidence of HLA class I homozygosity of 1.3% in the control population. A further 8.79% (8/91) of the ESTDAB cells were homozygous for both class I and class II, compared to only 1.6% in the healthy control panel. Very few cells meanwhile were both heterozygous for class I and homozygous for class II, a mere 4.40% (4/91), while this pattern of homozygosity in class II

occurred in 8.6% of the healthy donors. To further investigate this homozygosity we examined additional polymorphic markers in the HLA region of nine HLA homozygous cells using eight STRs covering the entire HLA region (Table 3). The results confirmed the findings obtained for HLA class I and II genes. Amplification of a single allele was observed in the majority of markers. Taken together, the results of HLA genotyping and microsatellite analysis suggest a pattern of homozygosity indicating the deletion of part or all of the short arm of chromosome 6. Unfortunately, we could not compare the results in the melanoma cells with normal autologous DNA from the patients or from the autologous tumours; however, the residual amplifications of some markers are compatible with the presence of a heterogeneous population and a hemizygous deletion (Fig. 1). Furthermore, the extent of the deletion was variable as revealed by the retention of STR heterozygosity in the HLA class II region in E-133 (Table 3, Fig. 1, markers D6S291, D6S105 and D6S276). The signal obtained for the polymorphic marker at 6q (D6SS311) also revealed a single allele pattern, indicating the possible loss of part or the whole of chromosome 6.

We also detected other altered HLA class I phenotypes among the 61 melanoma cells analysed by flow cytometry. These corresponded to HLA class I total loss (3%), HLA class I ABC down-regulation (3%), HLA-B locus down-regulation (26%), probably LOH (8.79%) and with no detectable HLA class I alterations (53%). HLA-DR was expressed in 56 cell lines corresponding to 54%. For details see Fig. 2.

## Discussion

Chromosome aberrations have been reported to occur at high frequency in a number of common forms of human cancer. Most of the alterations are deletions thought to indicate the presence of a tumour suppressor gene. Loss

Table 2 Distribution of HLA genotypes. ND Not determined

Cell line						
<b>Homozygous for</b>						
<b>HLA class I and II</b>						
ESTDAB-064	A*0201	B*0702	Cw*0702/	DRB1*1501	DQB1*0602	DPB1*0501
ESTDAB-065	A*2402	B*4002	Cw*0304/	DRB1*1501	DQB1*0601	DPB1*0901
ESTDAB-004	A*0101	B*4002	Cw*0304/	DRB1I01	DQB1*030101	DPB1*020102
ESTDAB-058	A*2301	B*15010101	Cw*0102/	DRB1*1101	DQB1*030101	DPB1*0402
ESTDAB-081	A*2402	B*0702	Cw*ND*/	DRB1*1301	DQB1*0604	DPB1*0601
ESTDAB-071	A*3201	B*1401	Cw*0802/	DRB1*ND,*ND	DQB1*0201	DPB1*020102
ESTDAB-070	A*3201	B*4101	Cw*1701/	DRB1*030102	DQB1*0201	DPB1*0301
ESTDAB-005	A*0101	B*4002	Cw*0304/	DRB1*1101	DQB1*030101	DPB1*020102
<b>HLA class I</b>						
<b>homozygous and</b>						
<b>HLA class II</b>						
<b>heterozygous</b>						
ESTDAB-040	A*0101	B*0801	Cw*070101/	DRB1*1101,110301	DQB1*030101	DPB1*0401
ESTDAB-062	A*2402	B*4002	Cw*0304/	DRB1*1501,0101	DQB1*0602,0501	DPB1*0401,0601
ESTDAB-057	A*2301	B*15010101	Cw*0102/	DRB1*0401,1101	DQB1*0604,030101	DPB1*0402
ESTDAB-036	A*2402	B*520101	Cw*1202/	DRB1*1501	DQB1*0602,060101	DPB1*0901
ESTDAB-041	A*290201	B*4901	Cw*070101/	DRB1*040501,040701	DQB1*0302,030101	DPB1*020102,030101
ESTDAB-037	A*ND,ND	B*390101	Cw*0702/	DRB1*1602	DQB1*0602	DPB1*3101,0901
ESTDAB-055	A*2601	B*1801	Cw*070101/	DRB1*1101,1501	DQB1*0602,030101	DPB1*0401
ESTDAB-041b	A*2902	B*4901	Cw*070101/	DRB1*0401,ND	DQB1*0302,030101	DPB1*0301,020102
ESTDAB-124	A*0302	B*510101	Cw*010201/	DRB1*ND,*ND	DQB1*030101,0501	DPB1*0401,0402
ESTDAB-133	A*2902	B*4901	Cw*070101/	DRB1*0401,ND	DQB1*0302,060101	DPB1*020102,0301
<b>HLA class I</b>						
<b>heterozygous and</b>						
<b>HLA class II homozygous</b>						
ESTDAB-066	A*2902,0201	B*440301,1302	Cw*1601,0602/	DRB1*0701	DQB1*0201	DPB1*020102
ESTDAB-083	A*0101,2901	B*3501,5701	Cw*040101,0602/	DRB1*110301,ND	DQB1*030101	DPB1*0401
ESTDAB-067	A*0101,2901	B*3501,5701	Cw*0602,040101/	DRB1*110301,ND	DQB1*030101	DPB1*0401
ESTDAB-076	A*0201,2902	B*1302,440301	Cw*0602,1601/	DRB1*0701	DQB1*0201	DPB1*020102
<b>Heterozygous for</b>						
<b>HLA class I and II</b>						
ESTDAB-013	A*0101,0201	B*0801,15010101	Cw*070101,0304/	DRB1*1101,0401	DQB1*0302,030101	DPB1*0401,1301
ESTDAB-042	A*0301,0201	B*0702	Cw*0702/	DRB1*1101,1501	DQB1*0602,030101	DPB1*0401
ESTDAB-043	A*0201,680101	B*400101,4002	Cw*0304,020202/	DRB1*040101,1602	DQB1*030101,0502	DPB1*0401
ESTDAB-044	A*0201,0101	B*0801,15010101	Cw*070101,0304/	DRB1*1101,0401	DQB1*0302,030101	DPB1*0401
ESTDAB-046	A*0201,2402	B*15010101,5501	Cw*0302/	DRB1*1501,0401	DQB1*0602,030101	DPB1*0402,0601
ESTDAB-047	A*0101	B*0801,4001	Cw*070101,0304/	DRB1*030101,040101	DQB1*030101,0201	DPB1*0401,010101
ESTDAB-052	A*0201	B*2704,1801	Cw*040101,070101/	DRB1*110301,040101	DQB1*030101	DPB1*0401
ESTDAB-056	A*3201,2601	B*0702,5702	Cw*0702,0602/	DRB1*1501,0101	DQB1*0602,0501	DPB1*0401,0402
ESTDAB-075	A*3201,680102	B*1401	Cw*0801/	DRB1*0701	DQB1*0201	DPB1*0402,020102
ESTDAB-077	A*0201,2601	B*1302,3801	Cw*0602,1203/	DRB1*1301,0701	DQB1*0603,0201	DPB1*020102,010102
ESTDAB-079	A*0301,2402	B*0702	Cw*0702/	DRB1*040101,1501	DQB1*0602,030101	DPB1*0401
ESTDAB-080	A*0201,0205	B*0702,1503	Cw*0702,1505/	DRB1*0101,0701	DQB1*0501,0201	DPB1*0402,020102
ESTDAB-082	A*0201,2902	B*440301	Cw*1601/	DRB1*040501,010101	DQB1*0302,0201	DPB1*0401,030101
ESTDAB-085	A*0101,2901	B*0702,0801	Cw*070101,1505/	DRB1*0801,1101	DQB1*030101,0402	DPB1*0401,020102
ESTDAB-084	A*0301,0201	B*15010101,0702	Cw*0304,0702/	DRB1*0401,1501	DQB1*0602,0302	DPB1*0401
ESTDAB-001	A*0201,2902	B*4402,440301	Cw*0501,1601/	DRB1*1201,0701	DQB1*030101,0201	DPB1*0401,1701
ESTDAB-003	A*0201,2902	B*4402,440301	Cw*0501,1601/	DRB1*1201,0701	DQB1*030101,0201	DPB1*0401,1701
ESTDAB-050	A*0201,2601	B*1402,3801	Cw*0802,1203/	DRB1*1101,0102	DQB1*030101,0501	DPB1*0401,0402
ESTDAB-038	A*0101,2902	B*3501,440301	Cw*040101/	DRB1*110301,0701	DQB1*0603,0201	DPB1*0402,020102
ESTDAB-019	A*0101,0201	B*0702,0801	Cw*070101,0702/	DRB1*030101,1501	DQB1*0602,0201	DPB1*0401,010101
ESTDAB-006	A*0101,0201	B*0801,15010101	Cw*070101,0702/	DRB1*040101,030101	DQB1*0302,0201	DPB1*0401,010101
ESTDAB-011	A*2402,6802	B*5301,5701	Cw*040101,0602/	DRB1*0701,1302	DQB1*0604,030302	DPB1*0401
ESTDAB-014	A*0101,0201	B*0801,15010101	Cw*0304,070101/	DRB1*0402,040101	DQB1*0302,030101	DPB1*0401
ESTDAB-018	A*0201	B*0702,15010101	Cw*0304,0702/	DRB1*1001,040101	DQB1*0302,0501	DPB1*020102,0401
ESTDAB-007	A*0201	B*0702,4402	Cw*0501/	DRB1*040101,1501	DQB1*0602,030101	DPB1*0401
ESTDAB-021	A*0201	B*0702,1801	Cw*0501,0702/	DRB1*030101	DQB1*0602,0201	DPB1*0401,0301
ESTDAB-045	A*0101,2301	B*0702,4901	Cw*070101,0702/	DRB1*0101,1501	DQB1*0602	DPB1*0401,0301
ESTDAB-033	A*0201,2601	B*4001,4402	Cw*0304,0501/	DRB1*140101,040101	DQB1*030101,0501	DPB1*0402,030101
ESTDAB-023	A*310102,0301	B*15010101,2704	Cw*020202,0303/	DRB1*010101,040101	DQB1*030101,050101	DPB1*0401
ESTDAB-024	A*3201,2501	B*1801,4402	Cw*1203,0501/	DRB1*1501,1201	DQB1*0602,030101	DPB1*0402,020102
ESTDAB-029	A*0201,0205	B*2704,4901	Cw*0102,070101/	DRB1*0101,040101	DQB1*030201,050101	DPB1*0401
ESTDAB-002	A*0201,2902	B*4402,440301	Cw*0501,1601/	DRB1*1201,070101	DQB1*030102,0201	DPB1*0401,1701
ESTDAB-012	A*0201,0101	B*0801,15010101	Cw*0304,070101/	DRB1*040101,110301	DQB1*0302,030101	DPB1*0401

Table 2 (Contd.)

Cell line						
ESTDAB-059	A*3001,2501	B*1801,440301	Cw*1203,1601/	DRB1*110301,0701	DQB1*030101,0201	DPB1*ND,ND
ESTDAB-060	A*3001,2501	B*1801,440301	Cw*1601,1203/	DRB1*110301,0701	DQB1*030101,0201	DPB1*0301,1601
ESTDAB-061	A*1101,2402	B*3501,15010101	Cw*0303,040101/	DRB1*1301,ND	DQB1*0603,0302	DPB1*1301,1901
ESTDAB-094	A*680101,310102	B*2709	Cw*020202/	DRB1*0403,030102	DQB1*030101,0201	DPB1*0401,0301
ESTDAB-063	A*0201,2301	B*4402,440301	Cw*040101,0501/	DRB1*1101,0701	DQB1*030101,0201	DPB1*0401
ESTDAB-073	A*0301,0201	B*1302,0702	Cw*0702,0602/	DRB1*1501,ND	DQB1*0602,0201	DPB1*0401,0402
ESTDAB-074	A*0201	B*0702,4402	Cw*0702,0501/	DRB1*1501,ND	DQB1*0602,030101	DPB1*0601,1901
ESTDAB-025	A*0101,0201	B*0801,15010101	Cw*0304,070101/	DRB1*1101	DQB1*0301,030101	DPB1*0401
ESTDAB-017	A*0201	B*0702,510101	Cw*0702,1502/	DRB1*0401,1501	DQB1*0602,030101	DPB1*0401
ESTDAB-022	A*310102,2402	B*15010101,3501	Cw*0303,040101/	DRB1*0101,040101	DQB1*0302,0501	DPB1*0401
ESTDAB-028	A*0201	B*15010101,4402	Cw*0304,0501/	DRB1*ND,ND	DQB1*0302,030101	DPB1*0401
ESTDAB-034	A*0301,3301	B*0702,510101	Cw*0702,140201/	DRB1*1201,1401	DQB1*030101,050301	DPB1*0401,1001
ESTDAB-107	A*0201,1101	B*15010101,5601	Cw*0102,0303/	DRB1*0101,1501	DQB1*0602,0501	DPB1*0401
ESTDAB-112	A*0101,3201	B*0801,4402	Cw*0501,070101/	DRB1*040101,1501	DQB1*030101,030302	DPB1*0201002,0401
ESTDAB-026	A*0201,680102	B*15010101,4402	Cw*0303,0704/	DRB1*0101,1201	DQB1*0501,030101	DPB1*0402
ESTDAB-027	A*0101,0201	B*0801,15010101	Cw*0304,0704/	DRB1*0401	DQB1*0302,030101	DPB1*0401,0301
ESTDAB-102	A*0201,0301	B*1801,4001	Cw*0304,070101/	DRB1*0401,1302	DQB1*0604,0302	DPB1*0401,0301
ESTDAB-049	A*0201,0301	B*0702,1401	Cw*0702,0802/	DRB1*0401,0701	DQB1*030101,0201	DPB1*1501,2001
ESTDAB-095	A*1101,0101	B*3501,150101	Cw*040101,1203/	DRB1*0101,1101	DQB1*030101,0501	DPB1*0402,1001
ESTDAB-111	A*0201,0101	B*15010101,4001	Cw*0304,0303/	DRB1*0401,1302	DQB1*0604,0302	DPB1*0401,0301
ESTDAB-107	A*0201,1101	B*15010101,55	Cw* ND,ND	DRB1*0101,1501	DQB1*0602,0501	DPB1*0401
ESTDAB-101	A*ND,0301	B*440301,270502	Cw*ND,ND/	DRB1*1101,0701	DQB1*030101,0201	DPB1*0401,1701
ESTDAB-016	A*310102,680102	B*270502,4402	Cw*070101/	DRB1*0401	DQB1*0302,030101	DPB1*0401
ESTDAB-104	A*0201,2612	B*5701	Cw*0602/	DRB1*0701	DQB1*030302	DPB1*0401,0301
ESTDAB-122	A*0201,0101	B*520101,1801	Cw*ND,ND/	DRB1*030101,0701	DQB1*030302,0201	DPB1*0301,1301
ESTDAB-120	A*0101,0201	B*0702,0801	Cw*0701,0702/	DRB1*110101,040101	DQB1*0603,0501	DPB1*0401,020102
ESTDAB-114	A*1101,0301	B*4001,1401	Cw*ND/	DRB1*0101,1001	DQB1*0501	DPB1*1001,1301
ESTDAB-121	A*1101,0301	B*0702,1402	Cw*0802/	DRB1*040101,0701	DQB1*030101,0201	DPB1*2001,1501
ESTDAB-113	A*0301,0302	B*1401,0702	Cw*ND,ND/	DRB1*0401,0701	DQB1*030101,0201	DPB1*2001,1501
ESTDAB-115	A*0101,0301	B*3501,5701	Cw*ND,ND/	DRB1*0101,110101	DQB1*030101,0501	DPB1*0401
ESTDAB-109	A*0101,2501	B*0801,1801	Cw*070101,120402/	DRB1*1501,0701	DQB1*0602,0201	DPB1*020102,1501
ESTDAB-147	A*0101,0301	B*15010101,570101	Cw*0602,0304/	DRB1*0401,030101	DQB1*0302,0201	DPB1*0401
ESTDAB-100	A*0201,0301	B*1402,44020101	Cw*0501,0802/	DRB1*1303,0801	DQB1*030101,0402	DPB1*020102,0401
ESTDAB-117	A*0201,680102	B*44020101,4902	Cw*0602,0704/	DRB1*110101,030101	DQB1*030101,0201	DPB1*0402,0401
ESTDAB-119	A*680102,2402	B*ND,ND	Cw*0602,020202/	DRB1*1301,030101	DQB1*0603,0201	DPB1*0301,1301
ESTDAB-009	A*0201,0301	B*0702,4402	Cw*0702,0501/	DRB1*0401,1501	DQB1*0602,030101	DPB1*0401,1301

Table 3 Microsatellite analysis in HLA class I homozygous melanoma cell lines. / One allele, 2 two alleles

Cell line	DNA typing			D6S311	D6S291	D6S273	C.1.2.C	C.1.2.5	D6S265	D6S105	D6S276
Control	A*3201,2501	B*1801,4402	Cw*1203,0501	2	2	2	2	2	2	2	2
E-064	A*0201	B*0702	Cw*0702	1	1	1	1	1	1	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>
E-062	A*2402	B*4002	Cw*0304	1	1	1	1	1	1	1	1
E-040	A*0101	B*0801	Cw*070101	1	1	1	1	1	1	1	1
E-036	A*2402	B*520101	Cw*1202	1	1	1	1	1	1	1	1
E-005	A*0101	B*4002	Cw*0304	1	1	1	1	1	1	1	1
E-124	A*0302	B*510101	Cw*010201	2	1	1	1	1	1	1	1
E-065	A*2402	B*4002	Cw*0304	1	1	1	1	1	1	1	1
E-133	A*2902	B*4901	Cw*070101	1	2	1	1	1	1	2	2
E-058	A*2301	B*15010101	Cw*0102	1	1	1	1	1	1	1	1

<sup>a</sup>Partial LOH

of heterozygosity brought about by a 6p deletion has been found in a variety of other human malignancies, including colon [13, 14], laryngeal [17] and cervical carcinomas [15, 18]. In the present study, DNA typing for HLA revealed a surprisingly high frequency of melanomas that were homozygous for class I and II antigens. PCR studies using STRs for 6p and 6q confirmed this homozygous/hemizygous status.

Loss of heterozygosity is one of the most important mechanisms of inactivation of tumour suppressor genes. In our study the high frequency of hemizygous phenotypes in melanoma cell lines can only be explained by LOH at 6p. The frequency of homozygosity in 922 normal samples analysed in our laboratory was about 1.6% (unpublished data). In contrast, HLA homozygosity occurred in 8.79% of the melanoma cell lines



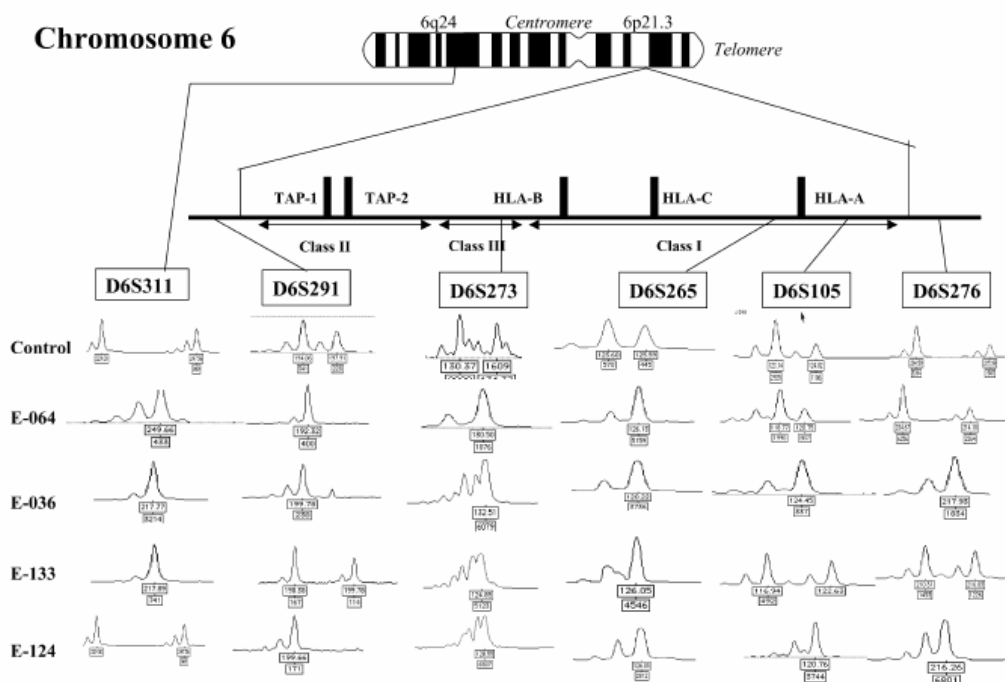


Fig. 1 Schematic representation of the HLA region on chromosome 6p21.3. All satellite markers used for LOH analysis and their location are indicated. These examples illustrate melanoma cell lines that show retention of heterozygosity at markers D6S291 and D6S276, and homo/hemizyosity at markers D6S265 and D6S273. A control heterozygous cell line for STR markers is included

reported here. From the HLA genotyping data alone, we propose that HLA deletion events are occurring in the ESTDAB melanoma cell lines, further that these events occur more frequently at the telomeric end of 6p. The majority of deletion events that seem to have taken place have led to the loss of the HLA class I region, encompassing HLA-A, HLA-B and HLA-C. To a lesser extent, deletion events have occurred in more centromeric regions, bringing about the deletion of the entire HLA region including HLA class I and II.

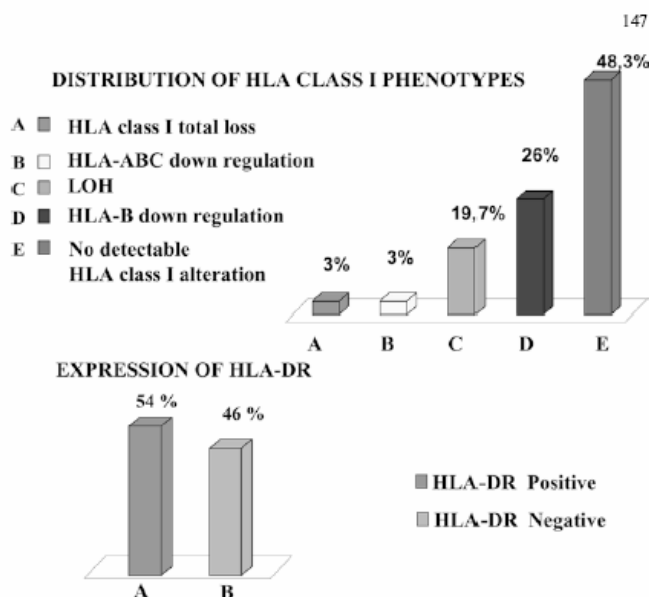
We may infer from the reduced number of instances of HLA class II homozygosity that a proportion of the expected class II identical/class I nonidentical cells have also undergone HLA class I LOH and now appear to be fully homozygous while actually retaining two, albeit identical, HLA class II haplotypes. This in itself implies that a smaller proportion than 8.79% of the ESTDAB cells have in fact undergone loss of heterozygosity in both class I and class II and that more than 10.98% of cells had undergone LOH at HLA class I alone. This evidence is in keeping with previously published data

[20] which suggest that loss of heterozygosity in melanoma cells is concentrated around the HLA class I region and that while complete loss of HLA haplotypes does occur, this is a rarer event.

Human leukocyte antigen loss appears to have occurred mainly by large hemizygous deletions, as revealed by the microsatellite analysis. Retention of STR heterozygosity (ROH) at 6q (D6S311) was seen only in line E-124 suggesting that in the rest of the patients, deletion of a part or all of the long arm of chromosome 6 may have occurred.

Little is known about genetic evolution during melanoma progression. The high frequency of hemizygous phenotypes in melanoma cell lines can be explained by two nonexclusive mechanisms. Firstly, melanoma suppressor genes on chromosome 6 may contribute to hemizygosity. Chromosomal gains and losses in melanoma have been detected by comparative genomic hybridization [26], and genotyping of melanomas has defined a complex mutational profile with highly complex karyotypes and nonrandom recurrent chromosomal imbalances [12]. Loss of chromosome 3 or the short arm of chromosome 1, and gain of 8q have been suggested to be associated with ocular melanomas, whereas gain of 6p and loss of 6q have been seen more often in skin melanomas. Loss of genetic material on chromosome 6 has been associated with progression of human melanomas [8], and deletion of 6q is one of the most frequent

Fig. 2 Percentage of the 66 ESTDAB melanoma cell lines analysed by flow cytometry with defined altered HLA class I phenotypes: HLA class I total loss, HLA class I down-regulation, HLA-B locus down-regulation, LOH, and no detectable HLA alteration. The percentage of HLA-DR positive and negative cell lines is also included



chromosomal alterations observed in these tumours [11]. In sporadic malignant melanoma, different chromosomal regions with nonrandom aberrations have been discovered in other chromosomes, including 1p36, 9p and 10q. However, studies to date have failed to identify a tumour suppressor gene of importance in all malignant melanomas of the skin, or a gene that clearly defines the transition from the radial growth phase to the vertical growth phase [22].

Secondly, the loss of HLA expression on melanoma cells might help them to escape killing by cytotoxic T cells, and may favour tumour progression [19, 21]. In fact, in melanoma patients, the detection of preexisting T-cell responses to tumour-associated differentiation antigens has been used in research on several vaccination strategies. HLA class I molecules serve the essential immunological function of presenting antigen to CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. Hemizyosity at these loci would limit the repertoire of tumour antigenic peptides and their possible interactions between HLA molecules and cytotoxic T lymphocytes. As a consequence, loss of expression of both HLA class I and II may result in impaired activation of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells, and may facilitate the growth of tumour cells. The hypothesis of 'heterozygote advantage' predicts more effective immune responses in infectious diseases as compared to those of homozygous individuals. This has been reported recently in HIV-infected individuals where a rapid progression to AIDS was observed in HLA homozygous patients [5]. Furthermore, the loss of a particular HLA haplotype also implies the elimination of MICA and MICB alleles. It was recently established that these molecules are the ligands of activating NK receptors [2],

which are also present in CD8<sup>+</sup> lymphocytes [10] and gamma-delta intraepithelial-positive T cells [9]. In experimental murine tumours, the ectopic expression of the RAE-1 protein (the mouse homolog of the MIC family) activates NK cells to kill HLA class I-positive tumour cells [3, 16]. Therefore, in HLA haplotype-deficient tumour cells the capacity to activate immune cells under stressful situations is impaired by the absence of MIC-A and MIC-B genes. This characteristic may result from a process of immunoselection that eliminates cells that express the immunodominant HLA haplotype for tumour peptide presentation. As a result the tumour clone that has lost this haplotype may escape immune system control [19]. The retained HLA haplotype would be an inefficient presenter of tumour antigens and would thus not be eliminated [24]. These assumptions derive from the hypothesis that these genetic changes are associated with tumour progression and not with artefacts known to occur during culture. In this context, we have reported a clear correlation between the genetic lesion in tumour cell lines and the corresponding autologous tumour tissues in pancreas carcinomas [25], colorectal tumours [13] and melanomas [19, 21]. Evidence presented here favours this mechanism in our melanoma cell lines, although confirmation from studies with autologous tumour tissues is desirable.

**Acknowledgements** We would like to thank Ms Carmen Amezcua, Ms Toñi and Ms Carmen Gonzalez for technical assistance, and K. Shashok for improving the use of English in the manuscript. This work was partially supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Consejería de Salud, Junta de Andalucía, by the Plan Andaluz de Investigación (PAI), Spain, and by ESTDAB, project contract no. QLRI-CT-2001-01325.

## References

- Arguello JR, Little AM, Pay AL, Gallardo D, Rojas I, Marsh SGE, Goldman JM, Madrigal JA (1998) Mutation detection and typing of polymorphic loci through double-strand conformation analysis. *Nat Genet* 18:192-194
- 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* 285:727-729
- 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 tumour in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:11521-11526
- de Nooij-van Dalen AG, van Buuren-van Seggelen VH, Lohman PH, Giphart-Gassler M (1998) Chromosome loss with concomitant duplication and recombination both contribute most to loss of heterozygosity in vitro. *Genes Chromosomes Cancer* 21:30-38
- Dean M, Carrington M, O'Brien SJ (2002) Balanced polymorphism selected by genetic versus infectious human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3:263-292
- García-Lora A, Algarra I, Gaforio JJ, Ruiz-Cabello F, Garrido F (2001) Immunoselection by T lymphocytes generates repeated MHC class I-deficient metastatic tumour variants. *Int J Cancer* 91:109-119
- 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
- Goldberg SF, Miele ME, Hatta N, Takata M, Paquette-Straub C, Freedman LP, Welch DR (2003) Melanoma metastasis suppression by chromosome 6: evidence for a pathway regulated by CRSP3 and TXNIP. *Cancer Res* 63:432-440
- Groh V, Steinle A, Bauer S, Spies T (1998) Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gamma-delta T cells. *Science* 279:1737-1740
- Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T (2001) Costimulation of CD8alpha-beta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol* 2:255-260
- Guan XY, Zhang HE, Zhou H, Sham JS, Fung JM, Trent JM (2002) Characterization of a complex chromosome rearrangement involving 6q in a melanoma cell line by chromosome microdissection. *Cancer Genet Cytogenet* 134:65-70
- Hoglund M, Gisselsson D, Hansen GB, White VA, Sall T, Mitelman F, Horsman D (2004) Dissecting karyotypic patterns in malignant melanomas: temporal clustering of losses and gains in melanoma karyotypic evolution. *Int J Cancer* 108:57-65
- 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 tumours. *Int J Cancer* 83:91-97
- Jimenez P, Canton J, Concha A, Cabrera T, Fernandez M, Real LM, Garcia A, Serrano A, Garrido F, Ruiz-Cabello F (2000) Microsatellite instability analysis in tumours with different mechanisms for total loss of HLA expression. *Cancer Immunol Immunother* 48:684-690
- 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* 191:961-976
- Lanier LL (2001) A renaissance for the tumour immunosurveillance hypothesis. *Nat Med* 7:1178-1180
- 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* 51:389-396
- Mazurenko NN, Belikov IS, Bliev AIU, Guo Z, Hu X, Vinokurova SV, Bidzhieva BA, Pavlova LS, Ponten J, Kiselev FL (2003) Cervical carcinoma progression-associated genetic alterations on chromosome 6. *Mol Biol (Mosk)* 37:472-481
- 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* 57:508-519
- Metzelaar-Blok JA, Jager MJ, Moghaddam PH, Van der Slik AR, Giphart MJ (1999) Frequent loss of heterozygosity on chromosome 6p in uveal melanoma. *Hum Immunol* 60:962-969
- 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* 103:759-767
- Poetsch M, Dittberner T, Woenckhaus C (2003) Can different genetic changes characterize histogenetic subtypes and biologic behavior in sporadic malignant melanoma of the skin? *Cell Mol Life Sci* 60:1923-1932
- Ramal LM, Feenstra M, van der Zwan AW, Collado A, Lopez-Nevot MA, Tilanus M, Garrido F (2000) Criteria to define HLA haplotype loss in human solid tumours. *Tissue Antigens* 55:443-448
- Schreiber H, Wu, TH, Nachman J, Kast WM (2002) Immunodominance and tumour escape. *Semin Cancer Biol* 12:25-31
- 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 tumour derived cell line. *Tissue Antigens* 47:372-381
- Vajdic CM, Hutchins AM, Krickler A, Aitken JF, Armstrong BK, Hayward NK, Armes JE (2003) Chromosomal gains and losses in ocular melanoma detected by comparative genomic hybridization in an Australian population-based study. *Cancer Genet Cytogenet* 144:12-17

## **DISTINTOS MECANISMOS DE PÉRDIDA DE INDUCIBILIDAD POR IFN-GAMMA DE LAS MOLÉCULAS HLA DE CLASE I EN DOS LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA**

**Introducción:** Para que exista una respuesta inmune específica frente al tumor es necesario que las células tumorales expresen en su superficie las moléculas HLA de clase I, las cuales presentan los péptidos tumorales a las células T citotóxicas (CTLs). Tanto el interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) como el IFN- $\alpha$  inducen la expresión de las moléculas HLA en la superficie de las células tumorales. Sin embargo existen evidencias de que alteraciones en la vía de señalización de las citoquinas interfieren en la inducibilidad de dichas moléculas pudiendo constituir un mecanismo de escape tumoral a la respuesta inmune. El IFN- $\gamma$  ejerce su efecto biológico uniéndose a sus receptores de membrana (IFN- $\gamma$  R1 e IFN- $\gamma$  R2), esta unión desencadena la activación de las tirosin-quinazas jak-1 y jak-2 que a su vez provocan la fosforilación de la proteína STAT-1 y la formación del homodímero de STAT-1 el cual, se trasloca al núcleo desencadenando la transcripción de diferentes genes como SOCS-1 e IRF-1. A su vez la proteína SOCS-1 participa en la regulación negativa de la vía de señalización Jak-STAT bloqueando la activación de Jak-2. El IFN- $\alpha$  actúa uniéndose a sus receptores específicos de membrana y provocando la activación de las enzimas Jak-1 y Tyk2 produciéndose así la fosforilación de STAT-1 y STAT-2.

El objetivo de nuestro estudio fue evaluar la expresión de los antígenos HLA de clase I en respuesta al IFN- $\gamma$  en 57 líneas de melanoma.

**Material y métodos:** El estudio de la expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I se realizó tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con IFN- $\gamma$  (800 U/ml) e IFN- $\alpha$  (800 U/ml) mediante inmunofluorescencia indirecta por citometría de

flujo. Para los estudios de desmetilación las células fueron cultivadas con 5-aza-2'-desoxicitidina. La técnica de RT-PCR fue utilizada para conocer la expresión del RNAm a diferentes tiempos tras tratamiento con IFN- $\gamma$  de los genes iNOS, IRF-1, EGFR y HLA-B en la línea celular ESTDAB-159. Los productos de la RT-PCR fueron analizados mediante PCR cuantitativa a tiempo real (Taqman Gene Expression Assay) para diferentes genes diana: cadena pesada HLA de clase I, HLA-A, HLA-B y GUSB (como control endógeno). Para conocer la presencia y correcta fosforilación de la proteína STAT-1 se realizó un Western Blot. Para ello las líneas celulares fueron tratadas con IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$  durante distintos periodos de tiempo. Las proteínas procedentes del lisado celular fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacríamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa donde se incubaron con anticuerpos monoclonales frente a STAT-1 y STAT-1 fosforilado. El ensayo de movilidad electroforética (EMSA) se utilizó para conocer si la proteína IRF-1 era funcional. Para ello las proteínas nucleares fueron incubadas con una sonda marcada con  $^{32}\text{P}$  que contiene la secuencia consenso de IRF-1.

**Resultados:** De las 57 líneas celulares estudiadas tan sólo en dos no se observaba aumento de la expresión de las moléculas HLA en superficie tras tratamiento con IFN- $\gamma$  pero sí tras el tratamiento con IFN- $\alpha$ . En ambas líneas celulares se estudio la presencia y correcta fosforilación de la proteína STAT-1 tras tratamiento con IFN- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ . En ambos casos la proteína STAT-1 se expresaba tras el tratamiento con ambas citoquinas sin embargo, en el caso de la línea ESTDAB-004 la fosforilación de STAT-1 no se producía tras el tratamiento con IFN- $\gamma$  pero sí tras el tratamiento con IFN- $\alpha$ . Por lo tanto la falta de fosforilación de STAT-1 parece ser la causa de la falta de respuesta a IFN- $\gamma$  de las moléculas HLA de clase I. En el caso de la línea ESTDAB-159 en la expresión y

la fosforilación de STAT-1 era normal. Observamos que el nivel de RNAm de IRF-1 aumentaba tras el tratamiento con IFN- $\gamma$  y como la proteína IRF-1 era funcional. También comprobamos como la inducibilidad con IFN- $\gamma$  de las moléculas HLA de clase I se recuperaba tras el ensayo de desmetilación. Todos estos datos nos hicieron pensar que la ausencia de respuesta a IFN- $\gamma$  de la línea ESTDAB-159 era debida a un bloqueo epigenético de la transactivación de IRF-1.



Research article

**Open Access****Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines**

Teresa Rodríguez, Rosa Méndez, Ana Del Campo, Pilar Jiménez, Natalia Aptsiauri, Federico Garrido and Francisco Ruiz-Cabello\*

Address: Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain

Email: Teresa Rodríguez - [teresa1rr@hotmail.com](mailto:teresa1rr@hotmail.com); Rosa Méndez - [rosaidi\\_ven@yahoo.com](mailto:rosaidi_ven@yahoo.com); Ana Del Campo - [anadc@yahoo.com](mailto:anadc@yahoo.com);Pilar Jiménez - [pjimenez@telefonica.es](mailto:pjimenez@telefonica.es); Natalia Aptsiauri - [napsiauri@hotmail.com](mailto:napsiauri@hotmail.com);Federico Garrido - [fedecio.garrido.sspa@juntadeandalucia.es](mailto:fedecio.garrido.sspa@juntadeandalucia.es); Francisco Ruiz-Cabello\* - [fruizc@ugr.es](mailto:fruizc@ugr.es)

\* Corresponding author

Published: 23 February 2007

Received: 19 October 2006

BMC Cancer 2007, 7:34 doi:10.1186/1471-2407-7-34

Accepted: 23 February 2007

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/7/34>

© 2007 Rodríguez et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.**Abstract**

**Background:** The inability of cancer cells to present antigen on the cell surface via MHC class I molecules is one of the mechanisms by which tumor cells evade anti-tumor immunity. Alterations of Jak-STAT components of interferon (IFN)-mediated signaling can contribute to the mechanism of cell resistance to IFN, leading to lack of MHC class I inducibility. Hence, the identification of IFN- $\gamma$ -resistant tumors may have prognostic and/or therapeutic relevance. In the present study, we investigated a mechanism of MHC class I inducibility in response to IFN- $\gamma$  treatment in human melanoma cell lines.

**Methods:** Basal and IFN-induced expression of HLA class I antigens was analyzed by means of indirect immunofluorescence flow cytometry, Western Blot, RT-PCR, and quantitative real-time RT-PCR (TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays). In demethylation studies cells were cultured with 5-aza-2'-deoxycytidine. Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) was used to assay whether IRF-1 promoter binding activity is induced in IFN- $\gamma$ -treated cells.

**Results:** Altered IFN- $\gamma$  mediated HLA-class I induction was observed in two melanoma cell lines (ESTDAB-004 and ESTDAB-159) out of 57 studied, while treatment of these two cell lines with IFN- $\alpha$  led to normal induction of HLA class I antigen expression. Examination of STAT-1 in ESTDAB-004 after IFN- $\gamma$  treatment demonstrated that the STAT-1 protein was expressed but not phosphorylated. Interestingly, IFN- $\alpha$  treatment induced normal STAT-1 phosphorylation and HLA class I expression. In contrast, the absence of response to IFN- $\gamma$  in ESTDAB-159 was found to be associated with alterations in downstream components of the IFN- $\gamma$  signaling pathway.

**Conclusion:** We observed two distinct mechanisms of loss of IFN- $\gamma$  inducibility of HLA class I antigens in two melanoma cell lines. Our findings suggest that loss of HLA class I induction in ESTDAB-004 cells results from a defect in the earliest steps of the IFN- $\gamma$  signaling pathway due to absence of STAT-1 tyrosine-phosphorylation, while absence of IFN- $\gamma$ -mediated HLA class I expression in ESTDAB-159 cells is due to epigenetic blocking of IFN-regulatory factor 1 (IRF-1) transactivation.



## Background

Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) is a pro-inflammatory pleiotropic cytokine that plays a central role in promoting innate and adaptive mechanisms of host defense [1,2]. Interferon IFN- $\gamma$  secreted by T and natural killer (NK) cells is important in driving T helper cell type 1 (Th1) responses. In addition, IFN- $\gamma$  plays a key role in providing an immunocompetent host with a mechanism of tumor surveillance [3]. Specific antitumor immune responses require expression of MHC class I on tumor cells, and MHC antigen down-regulation is a presumed tumor growth promoting mechanism [4]. However, there is experimental evidence of tumors showing dysregulation of multiple signaling pathways that interfere with cytokine signals [5,6]. Certain tumors may lose IFN- $\gamma$  sensitivity as a mechanism to evade immune detection [7]. IFNs exert their effects by binding cell surface receptors, triggering an intracellular signaling cascade of Janus kinases (Jak) and signal transducers and activators of transcription (STAT) proteins, which results in the transcription of IFN-inducible genes. IFN- $\gamma$  exerts its effects after binding to a receptor composed of two heterodimeric receptor subunits, IFN- $\gamma$  R1 and IFN- $\gamma$  R2, which are intracellularly associated with Janus kinases (Jaks) Jak-1 and Jak-2, respectively [8,1]. The binding initiates receptor oligomerization and phosphorylation of tyrosine residues in Jak1, Jak2, and the cytoplasmic tail of IFN- $\gamma$  R1. Each phosphorylated IFN- $\gamma$  R1 chain becomes a docking site for STAT-1. After docking at the receptor, STAT-1 phosphorylated on tyrosine 701 undergoes dimerization and translocates to the nucleus, where it binds the IFN- $\gamma$  activation sequence (GAS) elements present in the promoters of IFN- $\gamma$ -inducible genes. IFN- $\gamma$  is one of the strongest inducers of IRF-1 via activation of STAT-1 and binding to the GAS sequence within the IRF-1 promoter. In addition, IFN- $\gamma$  upregulated HLA class I expression via a STAT-1/IRF1-dependent pathway. HLA class I promoter contains the IFN- $\gamma$ -responsive element (IRSE) [9], which is a binding site for factors of the IRF family and mediates the induction of MHC class I transcription by IFNs. IFN- $\gamma$  has an additional route, distinct from that of IFN- $\alpha$ , for upregulation of HLA class I via class II transactivator (CIITA) that binds the  $\alpha$ -site of HLA class I promoter [9]. Type-I-IFN induced Jak-STAT signaling is propagated similarly to IFN- $\gamma$ -induced Jak-STAT signaling. Activated TYK2 and JAK1 phosphorylate STAT1 and STAT2. Type-I-IFN-mediated signaling then induces homodimerization of STAT1 and heterodimerization of STAT1 and STAT2 (in case of IFN- $\gamma$  only dimerization of Stat1 takes place) which subsequently associate with the cytosolic transcription factor IFN-regulatory factor 9 (IRF9), forming a trimeric complex known as IFN-stimulated gene factor 3 (ISGF3). On entering the nucleus, ISGF3 binds IFN-stimulated response elements (ISREs) [10]. IFN- $\alpha$ -mediated MHC class I induction involves two protein families, the STATs and

IRFs, which form the interferon-stimulated transcription factor-3 (ISGF3) complex that also binds the IRSE sequence.

Because immunotherapy is an important approach to melanoma treatment, it is important to understand the mechanisms by which these tumors circumvent IFN signaling, thereby representing a potential mechanism of melanoma cytokine-resistance to therapy. The aim of this study was to evaluate the expression of HLA class I antigens in response to IFN- $\gamma$  in 57 human melanoma cell lines. Defects in the inducibility of HLA class I antigens in response to IFN- $\gamma$  and normal response to IFN- $\alpha$  induction were observed in two of the tested melanoma cell lines (ESTDAB-004 and ESTDAB-159).

## Methods

### Cell culture and reagents

Fifty seven melanoma cell lines were obtained from the European Searchable Tumor Cell Line Data Base (ESTDAB project, contract no. QLRI-CT-2001-01325) [11]. Melanoma cell lines were grown in RPMI medium (Biochrom KG, Berlin, Germany) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS; Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Germany), 2% glutamine (Biochrom KG, Berlin, Germany), and 1% penicillin/streptomycin (Biochrom KG, Berlin, Germany) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Cell lines were treated with IFN- $\gamma$  or IFN- $\alpha$  for 48 h. Recombinant IFN- $\gamma$  and IFN- $\alpha$  were purchased from R&D Systems (Minneapolis, USA). For demethylation studies, cells were resuspended in fresh complete medium ( $5 \times 10^6$  cells/ml) and cultured with 3  $\mu$ M of 5-aza-2'-deoxycytidine (Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) for 7 days.

Responsiveness of human tumor cells to IFN was assessed after incubation of the cells in the presence of IFN- $\gamma$  (800 IU/ml) or IFN- $\alpha$  (800 IU/ml) for 48 h followed by FACS analysis of MHC class I antigen expression. PBS was used as a control. Anti-IRF-1, and consensus IRF-1 gel shift oligonucleotides were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Monoclonal antibodies against IRF-1 and STAT-1 were obtained from Transduction Laboratories (Lexington, KY, USA). Polyclonal antibody against phospho-STAT-1 at residue Tyr-701 was obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA). Rabbit anti-SOCS-1 polyclonal antibody (AnaSpec, Inc, San Jose, CA, USA) and an anti-Phospho-Jak2 (Tyr1007/1008) antibody (Cell Signaling Technology, USA) were also used.

### HLA cell surface expression

Surface expression of HLA class I antigens was determined by indirect immunofluorescence using a panel of monoclonal antibodies, W6/32 (HLA-ABC), L-362 ( $\beta$ 2 m),

BMC Cancer 2007, 7:34

<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/7/34>

1082C5 (HLA-A), Q6/64 (HLA-B), 126.39 (HLA-Bw6), and 116-5-28 (HLA-Bw4).  $10^5$  cells were treated with IFN at 800 IU/ml for 48 h. Cells were harvested using buffered EDTA solution, then washed with RPMI medium containing 10% v/v FCS and 0.1% w/v sodium azide (medium/FCS/azide) prior to incubation with primary antibody (diluted in medium/FCS/azide) for 60 min at 4°C in the dark. After incubation with unlabeled primary antibody, the cells were washed, incubated with FITC-labeled secondary antibody for 45 min at 4°C, and then washed again. Flow cytometry was performed using BD FACSort (Becton Dickinson, Oxford, UK). Ten thousand events were captured and analyzed using CellQuest software (Becton Dickinson).

#### Western Blot Analysis

The melanoma cell lines were treated with IFN- $\alpha$  and IFN- $\gamma$  for different periods of time and cultured in medium containing 0.5% FCS for 2 h before lysing with 1X SDS sample buffer (62.5 mM Tris-HCl, 2% w/v SDS, 10% glycerol, 50 mM DTT, 0.01% w/v bromophenol blue). Proteins from the whole cell lysates were separated by polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes, which were then sequentially incubated in primary antibody overnight at 4°C and then with HRP-conjugated secondary antibody (1:2000) in blocking buffer for 1 h at room temperature. Protein extracts from whole-cell lysates were probed for monoclonal antibodies that recognize STAT1 or phospho-Y701 STAT1 (Cell Signaling, Beverly, MA, USA). Before incubating with primary antibodies, membranes were placed in a blocking buffer containing 1X TBS, 0.1% Tween-20 and 5% nonfat dry milk for 1 h at room temperature. The dilution buffer for the primary and secondary antibodies contained 1XTBS, 0.1 Tween-20 and 5% BSA. For detection of immunolabeled proteins, membranes were incubated with 0.5 ml 20X LumiGLO and 0.5 ml 20X peroxide in 9 ml of water with gentle agitation for 1 min at room temperature and then transferred to X-ray film. Anti- $\gamma$ -tubulin antibody was used to normalize the protein content in each well of gel electrophoresis. As a positive control we used the extract from cell line A549 that came as a part of the anti-phospho-STAT1 antibody kit (Cell Signaling, Beverly, MA, USA).

#### RNA isolation and RT-PCR

Total cellular RNA was isolated using a Qiagen RNeasy kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (0.5  $\mu$ g) was subjected to reverse transcription, and one-tenth of the reaction mixture was used for PCR analysis. First strand cDNA was synthesized with 10  $\mu$ l of total RNA, using Sensiscript reverse transcriptase kit (Quiagen) with 40 U/ $\mu$ l of RNasin (Promega, Madison, WI, USA) and random primers (Promega Madison, WI, USA) in a final volume of 20  $\mu$ l.

The reaction was incubated at 42°C for 60 min and stopped at 95°C for 5 min. Time-course effect of IFN- $\gamma$  on the mRNA expression of IRF-1, iNOS, and HLA-B in EST-DAB-159 were measured. The following primer pairs were used: 5- CGG CCT TAA GAA CCA GGC AAC CT-3 (forward) and 5-CCA GCT TCT CTG CAC CAT ATC CA-3 (reverse), for differential expression of IRF-1 mRNAs; 5-GAG CTT CTA CCT CAA GCT ATC-3 (forward) and 5-CCT GAT GTT GCC ATT GTT GGT -3 (reverse) for iNOS mRNA; and 5-GAC AGC GAC GCC GCG AGT CC-3 (forward) and 5- AGT AGC GAC CAC AGC TCC GA-3 (reverse) for HLA-B mRNA. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as an internal control. The primers for GAPDH were 5 -TGA AGC TCG GAG TCA ACG GAT TTTG GT-3 (forward) and 5 -CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3 (reverse).

#### Real-Time PCR

RT-PCR products were analyzed by quantitative real-time RT-PCR in TaqMan® Gene Expression Assays of several target genes: HLA-A, HLA-B heavy chain, HLA-A (Hs 00740413-g1), HLA-B (Hs 00818803-g1), and beta glucuronidase (GUSB; as an endogenous control) (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) for variations in the amounts of RNA. All PCR reactions were performed in a real time PCR 7500 system. Gene expression quantitation using TaqMan® Gene Expression Assays was performed as the second step in a two-step RT-PCR. Assays were done in 20- $\mu$ l singleplex reactions containing TaqMan® Universal PCR Master Mix, 20X TaqMan® Gene Expression Assay Mix, and cDNA according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). Reaction conditions consisted of pre-incubation at 50°C for 2 min, 95°C for 10 min, then cycling for 40 cycles of 95°C for 15 sec and 60°C for 1 min.

#### Electrophoretic Mobility Shift Assay

Nuclear extract was prepared as previously described [12,13] in the presence of protease inhibitors. Extracts were aliquoted and stored at -80°C. For each electrophoretic mobility shift assay reaction, 4  $\mu$ g of nuclear proteins were incubated with 30,000 cpm of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP-labeled consensus IRF-1 gel shift oligonucleotide (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) for 30 min on ice. In competition assay unlabeled IRF-1 consensus or anti-IRF-1 monoclonal antibody (2  $\mu$ g) of rabbit polyclonal antisera against IRF-1 (Santa-Cruz Biotechnology, USA) were incubated with nuclear extracts for 10 min on ice prior to the addition of radiolabeled oligonucleotides. Reaction mixtures were then separated on a 5% native polyacrylamide gel. After electrophoresis, the gel was dried and subjected to autoradiography.

## Results

### **Loss of IFN- $\gamma$ -mediated MHC class I inducibility in melanoma cell lines**

Cell surface expression of HLA class I molecules was analysed in a panel of 57 melanoma cell lines by flow cytometry. The response of MHC class I expression to IFN-treatment varied. Almost all of the melanoma cell lines showed increased surface expression of HLA class I antigens after 48 h of culture. Only four melanoma cell lines did not increase MHC class I expression after incubation with IFN- $\gamma$ . Since two of them had  $\beta$ 2 microglobulin mutation [14], they were not included in this study. However, the other two lines (ESTDAB-004 and ESTDAB-159) (Fig. 1) with absence of IFN- $\gamma$  mediated increase in expression of the HLA class I molecules demonstrated HLA class I induction after treatment with IFN- $\alpha$ . Loss of IFN- $\gamma$  mediated inducibility was also observed in MHC class II molecules (not shown). MHC class I expression in these two cell lines was also analysed by quantitative RT-PCR, and no upregulation of MHC class I mRNA was detected (Fig 1A). Treatment of both cell lines with 800 U/ml IFN- $\gamma$  for 48 h produced no significant increase in the expression of MHC class I mRNA in comparison with a control cell line (ESTDAB-052, which responded with HLA-class I induction) (Fig. 1A). This finding was consistent with the protein expression as demonstrated by FACS analysis (Fig. 1B). Loss of IFN- $\gamma$  mediated class I inducibility was not caused by a post-transcriptional defect. Because the IFN- $\gamma$  signal transduction pathway shares two intracellular signalling molecules with the IFN- $\alpha$  pathway, these cells were also tested for their ability to up-regulate MHC class I in response to IFN- $\alpha$ . Both melanoma cell lines responded to IFN- $\alpha$  treatment with an increased MHC class I cell surface expression, indicating the possibility of a specific and selective alteration only in the IFN- $\gamma$  signalling pathway.

### **IFN- $\gamma$ resistant cell lines (ESTDAB-004 and ESTDAB-159) have different patterns of alteration in the IFN- $\gamma$ signaling pathway**

STAT-1 phosphorylation was examined by western blot using anti-STAT-1 or anti-phospho-STAT-1 antibodies that recognize unphosphorylated or phosphorylated STAT-1, respectively. Cells were incubated with 800 U/ml IFN- $\gamma$  or IFN- $\alpha$  before western blot analysis. STAT-1 induction and activation were analyzed in both cell lines to yield further information on the possible mechanism of altered response to IFN- $\gamma$  treatment. As shown in Figure 2, STAT-1 tyrosine phosphorylation occurred only in the ESTDAB-159 cells, whereas phosphorylation was undetectable in ESTDAB-004 cells. STAT-1 phosphorylation was upregulated and rapidly decreased after 60 min of incubation with IFN- $\gamma$ . However, both cell lines responded with STAT-1 phosphorylation to IFN- $\alpha$  treatment (Figure 2). The tyrosine phosphorylation of Jak-2 in

response to IFN- $\gamma$  stimulation was also investigated. Absence of phosphorylation in response to IFN- $\gamma$  was observed in ESTDAB-004 cells, which was correlated with decreased IFN- $\gamma$  signaling (Figure 3). Suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) is a critical negative regulator of IFN- $\gamma$  responses. Its expression is induced in response to stimulation of a variety of cytokines, and over-expression of this protein results in inhibition of cytokine signaling [15]. SOCS1 protein expression was detected in ESTDAB-004 melanoma cells without treatment with IFN- $\gamma$  and did not change after this treatment (Figure 3).

### **IRF-1 is upregulated in ESTDAB-159 cells in response to IFN $\gamma$**

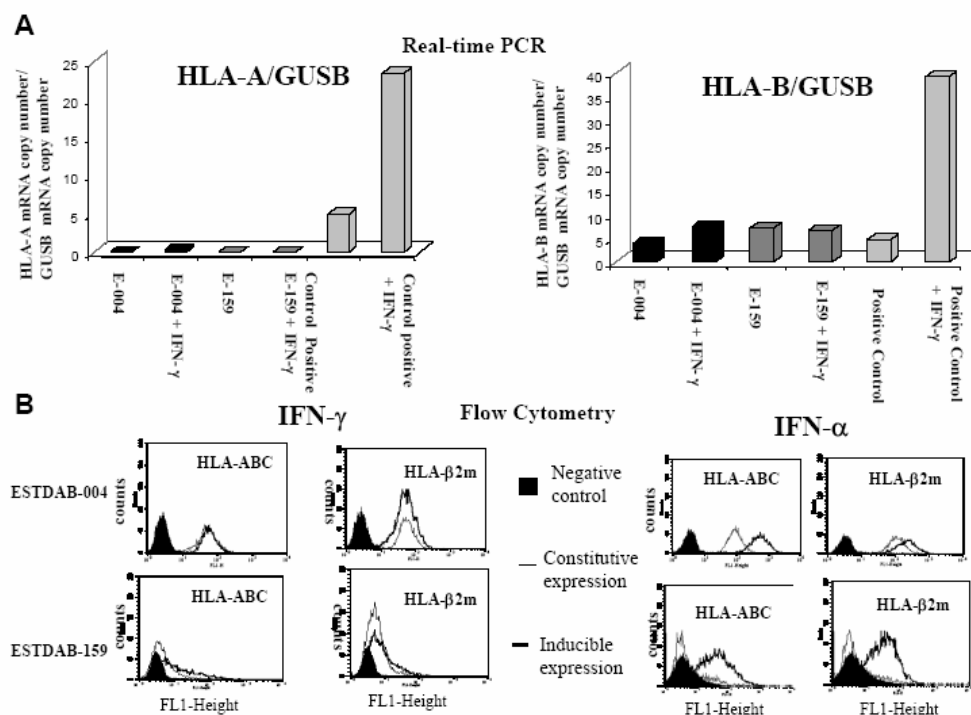
After tyrosine-phosphorylation, STATs form homo- or heterodimers and translocate from the cytoplasm to the nucleus, where they bind specific DNA sequences and activate transcription of many genes. IRF-1 is transactivated by binding of STAT-1 dimers to the GAS sequence of the IRF-1 promoter. IRF-1 is the principal factor mediating the IFN- $\gamma$ -induced expression of MHC class I antigen. In order to analyze the Jak-STAT signalling cascade, we investigated the induction of IRF-1 mRNA expression in response to IFN- $\gamma$  treatment. As shown in Figure 4A, IRF-1 mRNA was upregulated by IFN- $\gamma$  treatment in ESTDAB-159 cells. We also investigated the expression of another IRF-1-regulated gene, iNOS, to determine whether MHC class I gene expression is selectively blocked. We measured iNOS mRNA level in IFN- $\gamma$ -treated ESTDAB-159 cells. As shown in Fig 4B, IFN- $\gamma$  did not induce expression of iNOS mRNA, indicating an inhibition of IRF-1 transactivated genes.

### **IRF-1 binding activity is induced in IFN- $\gamma$ -treated ESTDAB-159 cells**

IFN- $\gamma$ -stimulated IRF-1 induction was assayed using electrophoretic mobility shift assay (EMSA). As shown in Fig. 5, IRF-1 binding to the consensus element was induced after IFN- $\gamma$  stimulation of ESTDAB-159 and of control cell line ESTDAB-056. Protein complex formation between IRF-1 and DNA probes was increased in the nuclear extract of IFN- $\gamma$ -treated melanoma cells (lanes 3, 4, 5 and 6). Formation of detectable complex was competed out with 50-fold excess of unlabeled cold probe (lanes 1, 2). Supershift experiments using an anti-IRF-1 antibody (lanes 7, 8) indicated that the complex was specific. These results strongly suggest that the nuclear protein complex that binds to the putative IRF-1 binding probe contains a functional IRF-1 protein.

### **5-Aza-2-deoxycytidine restores IFN- $\gamma$ -mediated HLA-class I inducibility in ESTDAB-159 cells**

We demonstrated the role of methylation in the loss of the inducibility of HLA class I expression by incubating ESTDAB-159 cells with the demethylating substance 5-Aza-2'

**Figure 1**

Transcription level (A) and cell surface expression (B) of HLA-ABC molecules in ESTDAB-004 and ESTDAB-159 melanoma cell lines [in (B) examined by indirect immunofluorescence using W6/32 and L-362 mAb]. Cells were treated with 800 U/ml of either IFN- $\gamma$  or IFN- $\alpha$  for 48 h or with culture medium alone. The dark histogram corresponds to the isotypic control. Panel A – the results of real-time RT-PCR analysis. On the Y-axis on panel A – mRNA copy number of the gene of interest (HLA-A or HLA-B) normalized against the mRNA copy number of the reference gene GUSB.

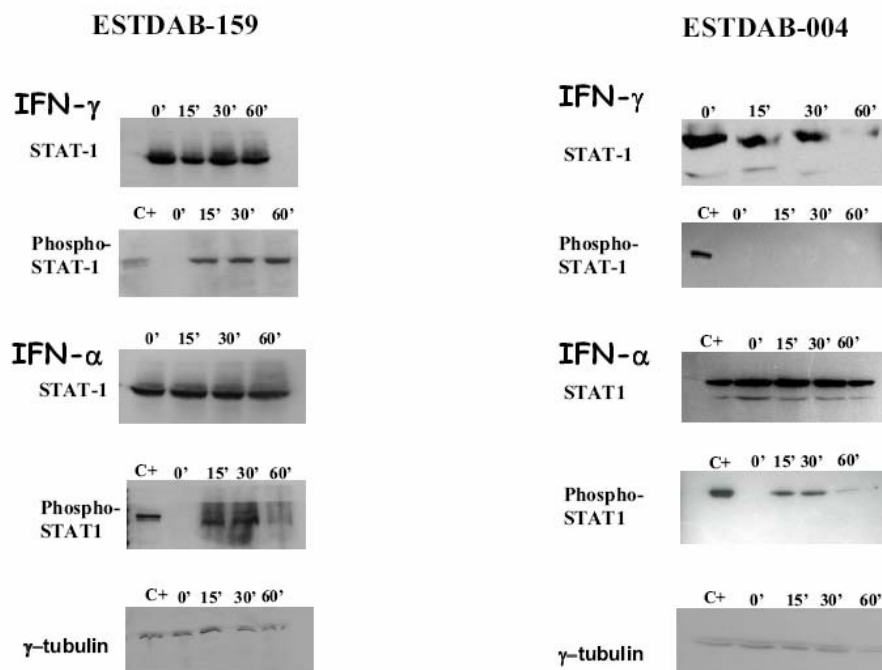
deoxycytidine. After 7 days of culture, 5-dAzaC restored IFN- $\gamma$ -induced HLA-class I expression. Treatment of cells with either 5-dAzaC or IFN- $\gamma$  alone did not lead to increase (or only to a marginal increase) in HLA class I protein or mRNA expression, respectively (Figure 6A). Interestingly, administration of both 5-dAzaC and IFN- $\gamma$  produced an increase in the level of transcripts and led to cell surface expression of HLA class I molecules, as revealed by quantitative RT-PCR and flow cytometry analysis (Figure 6B).

### Discussion

IFNs were the first cytokines to be used in clinical trials for cancer treatment. IFNs have significant effects and play a central role in providing an immunocompetent host with a mechanism of tumor surveillance and in promoting innate and adaptive host defense [3]. Moreover, IFN- $\gamma$

may have an anti-metabolic and inhibitory effect on tumor cell growth in vitro, as has been shown in various cell types, including malignant melanoma [16,17]. Importantly, for tumor rejection to occur, antigens must be presented in a complex with HLA class I molecules on the melanoma cell surface to be recognized by CTLs. In this context, melanoma cells may attempt to escape cell-mediated immunosurveillance in order to develop a permanent and selective IFN- $\gamma$  insensitivity by inhibiting expression of MHC molecules.

Many studies highlight the importance of Jak-STAT pathways in IFN resistance. Interestingly, melanomas differ in their responsiveness to IFNs and can be IFN-sensitive or IFN-resistant. IFN-resistant melanoma cells contain reduced levels of ISGF3a components, particularly of STAT-1, indicating that the non-responsiveness of

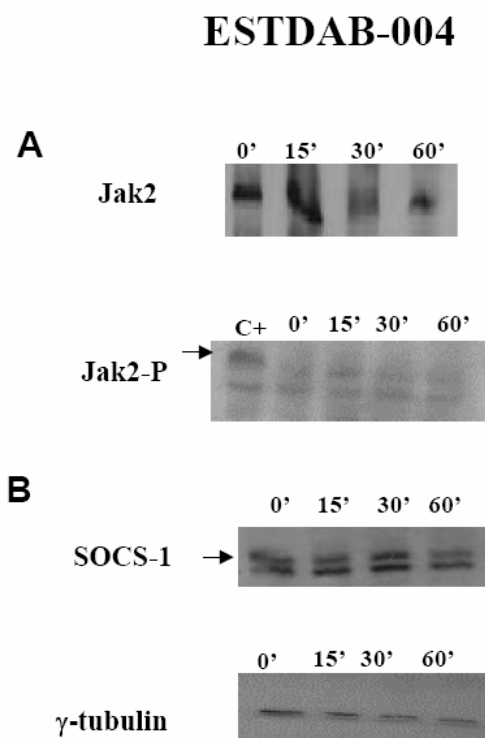
**Figure 2**

The expression and the activation of STAT proteins. Cells were treated with IFN- $\gamma$  or IFN- $\alpha$  at 800 IU/ml. Proteins from cellular protein extracts were separated by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane. Western blotting was performed as described in Materials and Methods. Anti-STAT1 and anti-phospho-STAT1 antibodies were used to assess STAT activation. Anti- $\gamma$ -tubulin antibody was used to normalize the amounts of protein loaded in each well of the gel. Positive control (C+) of phosphorylated proteins from cellular extract A549 was obtained from Cell Signaling Technology.

melanoma cell lines to type I IFN may be due to a deficiency in the expression of ISGF3 components [7]. An absence of response to IFN in lung and prostate adenocarcinoma cell lines has been attributed to lack of Jak-1 gene expression [18]. We also previously reported a deficiency in STAT-1 component as a probable cause of resistance to IFNs detected in a gastric carcinoma cell line [12,13]. In the present report, our results suggest heterogeneity in the mechanisms underlying IFN resistance in melanomas. We analyzed MHC class I antigen inducibility after IFN- $\gamma$  treatment in 57 human melanoma cell lines. Only four cell lines showed no responsiveness to IFN by flow cytometry, and two of these were excluded from the study because they presented a mutation in  $\beta$ 2 m gene [19,14] and recovered IFN- $\gamma$  inducibility after reconstitution of

wild type  $\beta$ 2 m gene (not shown). The remaining two cell lines (ESTDAB-004 and ESTDAB-159) exhibited specific resistance to IFN- $\gamma$  but responded normally to IFN- $\alpha$  treatment; the mechanism underlying IFN- $\gamma$  resistance differed between these two cell lines.

In ESTDAB-004 cells, our findings strongly suggest that defective activation of STAT-1 was responsible for this resistance. Thus, immunoblotting analysis of cell proteins with antibodies against STAT-1 and phosphorylated STAT-1 showed that ESTDAB-004 was not deficient in STAT-1 proteins but that IFN- $\gamma$  did not induce STAT1 tyrosine phosphorylation (Fig. 2). IFN- $\gamma$  signaling pathway is initiated upon binding of IFN- $\gamma$  receptor. IFN- $\gamma$  binds to extracellular heterodimeric receptor subunits IFN- $\gamma$  R1



**Figure 3**  
Western blot analysis of the expression level and phosphorylation status of Jak-2 (A), and of the expression of SOCS-1 (B) in ESTDAB-004 cell line. We observed that Jak-2 was present but its phosphorylation was very low and was accompanied by a high SOCS-1 expression (negative regulator of IFN- $\gamma$  response). Arrows indicate the specific proteins. Nuclear extracts as a positive control (C+) for Jak-2 were obtained from Cell Signaling.

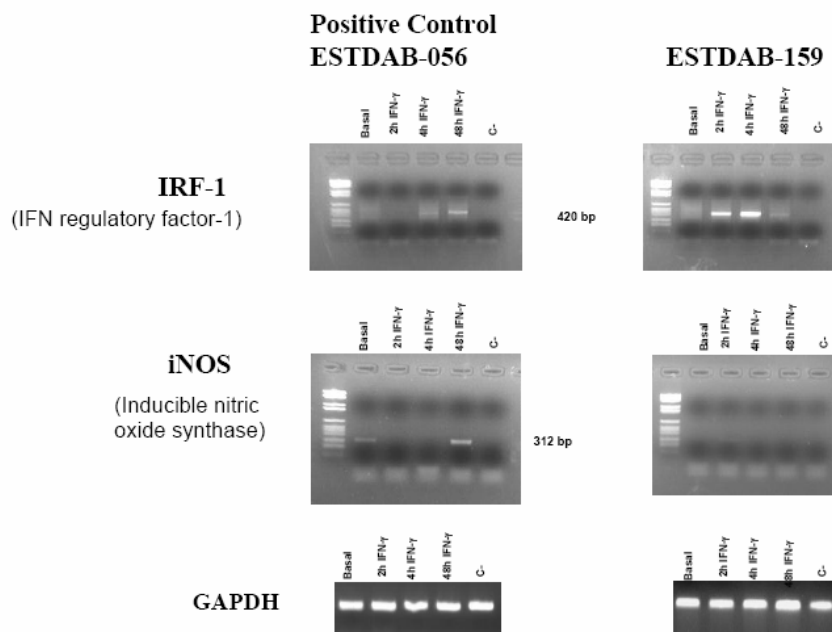
and IFN- $\gamma$  R2, which are intracellularly associated with Jak-1 and Jak-2, respectively [1,8]. This binding initiates phosphorylation of tyrosine residues in Jak-1, Jak-2, and the cytoplasmic tail of IFN- $\gamma$  R1. Analysis of the IFN- $\gamma$  receptors revealed a similar expression in both of the unresponsive cell lines (not shown). Importantly, whereas IFN- $\alpha$  activates Jak-1 and Tyk2, IFN- $\gamma$  activates Jak-1 and Jak-2. Therefore, we only investigated the phosphorylation of Jak-2, because this kinase is not shared by the IFN- $\alpha$  Jak-STAT pathway. ESTDAB-004 cells expressed Jak-2 protein, but it was only marginally phosphorylated in response to IFN- $\gamma$ . SOCS1 induction by IFN- $\gamma$  and negative regulation of IFN- $\gamma$  signaling have been well docu-

mented [20,21]. Moreover, SOCS1 is aberrantly expressed in melanoma cells [22]. Our findings confirm the constitutive expression of SOCS1 protein in ESTDAB-004 cells (Figure 3). We hypothesize that absence of STAT-1 phosphorylation in ESTDAB-004 cells may be mediated by kinase inhibition of Jak-2 by the action of SOCS1 phosphatase.

In contrast, IFN- $\gamma$  treatment increased tyrosine phosphorylation (activation) levels of STAT-1 in ESTDAB-159, the other IFN- $\gamma$  resistant responsive cell line. IRF-1 was also increased, indicating that homodimeric phosphorylated STAT-1 complex is translocated to the nucleus and bound to the GAS sequences in the IRF-1 promoter (Fig 4A). Notably, treatment with IFN- $\gamma$  produced higher IRF-1 mRNA levels with respect to ESTDAB-056, a melanoma cell line with normal inducibility of MHC class I antigen used as a control. However, none of the IRF-1 associated target genes tested (MHC-class I and iNOS) were induced by IFN- $\gamma$  in ESTDAB-159 cells.

Pretreatment with all-trans-retinoic acid (atRA) was reported to affect the transcriptional functions of IFN- $\gamma$  induced IRF-1, inducing its nuclear translocation and enhancing DNA binding activity and transcript levels of IRF-1 target genes [23]. Treatment of ESTDAB-159 cells with atRA did not recover MHC class I inducibility (data not shown). Importantly, point mutation of IRF-1 can abolish IRF-1 DNA binding activity [24]. In acute myeloid leukemia, point mutations or deletions of the IRF-1 gene have frequently been detected [25]. Furthermore, loss of heterozygosity in IRF-1 appears to be critical for the development of human gastric cancers [26,27]. However, this possibility of IRF-1 mutation or transcriptional factor defects was ruled out in the ESTDAB-159 cells. Thus, IFN- $\gamma$ -induced nuclear translocation and DNA-binding activity of IRF-1 was similar between ESTDAB-159 and control cell line (ESTDAB-056) in an EMSA assay (Fig 5). In addition, sequencing of the complete IRF-1 cDNA revealed no mutation (data not shown).

Available evidence suggests that IRF-1 may function as a tumor-suppressor gene and might induce apoptosis mediated via up-regulation of caspase 8 [28], a key mediator frequently inactivated by epigenetic silencing in many tumors by gene hypermethylation [29,30]. Here, we report that treatment with 5-dAzaC helped to restore IFN- $\gamma$ -mediated HLA class I inducibility in ESTDAB-159 cells (Fig. 6). We previously reported an epigenetic down-regulation of HLA class I antigens in a melanoma cell line MSR-3, which has hypermethylation of HLA class I genes [31]. However, the MSR-3 cell line did not respond to either IFN- $\alpha$  or - $\gamma$  and exhibited a complete absence of HLA class I expression. The molecular basis of 5-dAzaC activity is different in ESTDAB-159 for several possible

**Figure 4**

Time course effect of IFN- $\gamma$  on the expression of IRF-1 and iNOS (A). Total RNAs were isolated from ESTDAB-159 cell line and from the control cell line ESTDAB-056 grown in the presence or absence of 800 U/ml IFN- $\gamma$  for the indicated periods of time and analyzed for the relative levels of mRNA by RT-PCR.

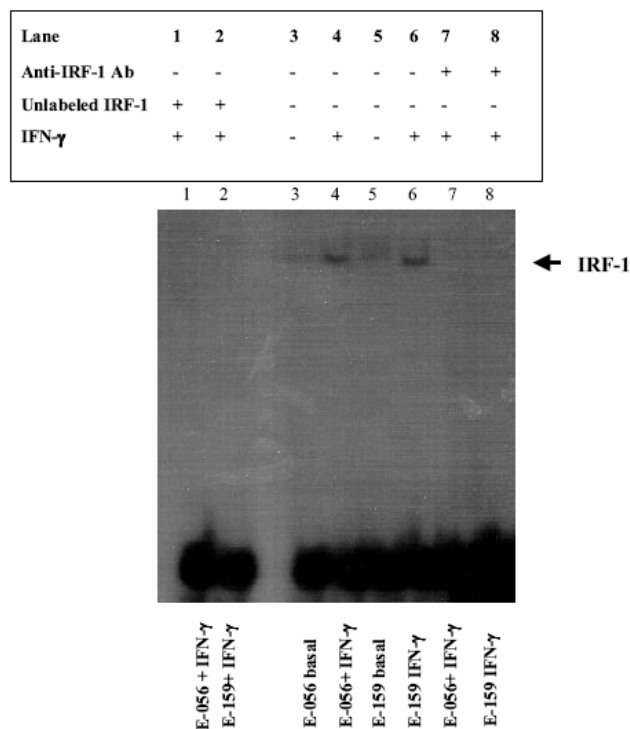
reasons. Since ESTDAB-159 cells responded to IFN- $\alpha$  but not to IFN- $\gamma$ , it is possible that methylation affects the binding of IRF-1 to the ISRE consensus motif in a higher degree than the binding of ISFGF3 induced by IFN- $\alpha$ . Another possibility is that the transactivation of IRF-1 is inhibited by a dominant negative action of several factors [32], which must be regulated by methylation. However these possibilities need to be further investigated.

In summary, IFN- $\gamma$  exposure in the cancer microenvironment can create conditions for cancer cells to develop alteration in IFN signaling and thereby provide these cells with an adaptive mechanism to survive in hosts with competent immune systems [18]. While IFN- $\alpha$  is used in treatment of cancer with measurable efficacy [33], IFN- $\gamma$  demonstrated limited success in cancer immunotherapy in humans. It might be explained by tumour-cell insensitivity to IFN- $\gamma$  [34], or an inability to therapeutically re-

pitulate the natural periodicity of IFN- $\gamma$  production. An understanding of the mechanisms by which tumors circumvent cytokine signaling would greatly aid prediction of the immune response in patients treated with IFNs.

### Conclusion

We observed IFN-gamma mediated MHC class I induction in the majority of the melanoma cell lines studied. However, in two cell lines we found different alterations in the IFN- $\gamma$  signalling pathway. In ESTDAB-004 cells the absence to IFN- $\gamma$  response was found to be associated with a defect in the earliest steps of the IFN- $\gamma$  signaling pathway due to absence of STAT-1 tyrosine-phosphorylation. Constitutive SOCS-1 expression may be partially responsible for that. In another cell line, ESTDAB-159, the absence of IFN- $\gamma$  mediated HLA class I expression might be due to epigenetic blocking of IRF-1 transactivation.

**Figure 5**

EMSA showing the binding of IRF-1 to a  $^{32}\text{P}$  labeled probe containing the IRF-1 consensus sequence. EMSA was performed with nuclear extracts obtained from untreated ESTDAB-056 (3) and ESTDAB-159 (5) melanoma cells or treated with 800 U/ml IFN- $\gamma$  for 4 h (lanes 1, 4 and 7 corresponding to ESTDAB-056; and lanes 2, 6 and 8 corresponding to ESTDAB-159). A 50-fold molar excess of unlabeled IRF-1 probe was added to the binding reaction (lane 1, 2) to compete out the formation of a detectable complex. Anti-IRF-1 antibody was used to block IRF-1 binding to test the specificity of the interaction (lanes 7 and 8). Results shown are representative of at least three independent experiments.

**Competing interests**

The author(s) declare that they have no competing interests.

**Authors' contributions**

TR carried out the cell culture experiments, flow cytometry analysis of the HLA class I expression and western blots to analyse protein phosphorylation. RM made substantial contributions to conception and design of the study, interpretation of the data. In addition, RM did the mobility shift experiments. ADC carried out culture experiments and the study of HLA class I expression after 5-dAzaC treatments. PJ did the quantitative real-time RT-PCR assays. NA participated in running western blot analysis and contributed to the detailed analysis and interpretation of data. NA also drafted the last versions of the man-

uscript. FG made substantial contributions to interpretation of data. In addition he critically revised the manuscript. FRC conceived the study and critically reviewed the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

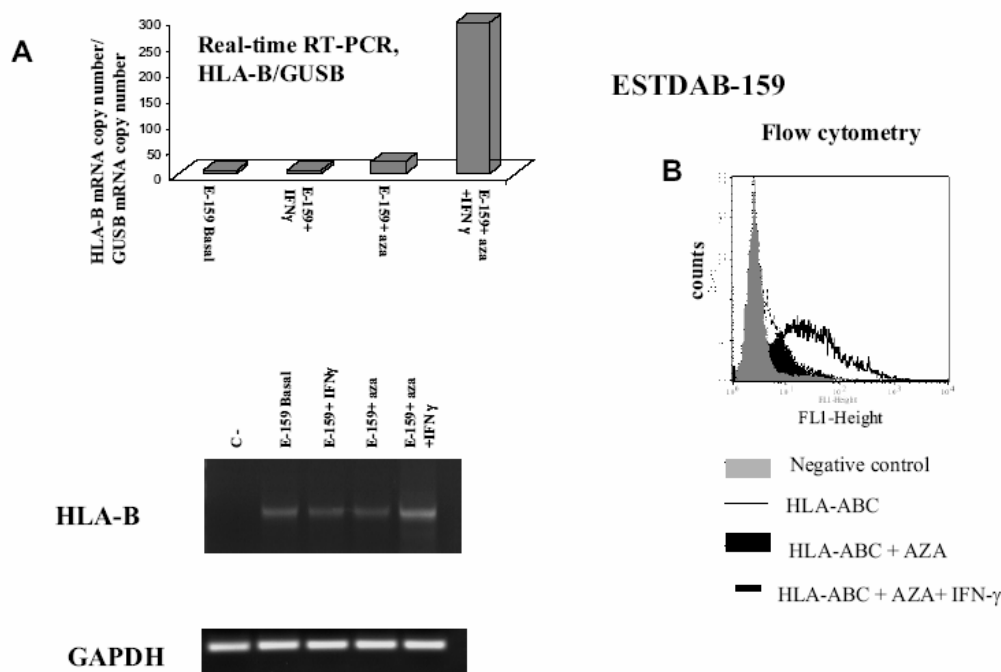
**Acknowledgements**

This work was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Red Genómica del Cáncer (C03/10), Plan Andaluz de Investigación, Servicio Andaluz de Salud (SAS) in Spain, from the ESTDAB project (contract no. QLRI-CT-2001-01325), from the European Network for the identification and validation of Antigens and biomarkers in Cancer and their application in clinical Tumor immunology (ENACT, contract No. 503306), and from the European Cancer Immunotherapy project (OJ2004/C158, 518234).



BMC Cancer 2007, 7:34

http://www.biomedcentral.com/1471-2407/7/34

**Figure 6**

5-Aza-2-deoxycytidine (5-dAzaC) recovers IFN- $\gamma$  mediated HLA-class I inducibility in ESTDAB-159 melanoma cells. Cells were untreated or pretreated for 7 days with 3  $\mu$ M 5-dAzaC and then untreated or incubated with 800 U/ml IFN- $\gamma$  for 48 hrs. HLA class I expression before and after treatment with 5-dAzaC was determined by flow cytometry analyzes of HLA-ABC surface expression using W6/32 monoclonal antibody (B), and by quantitative RT-PCR (A). Results of HLA-B expression are normalized against GUSB expression (HLAB/GUSB).

## References

- Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR: **Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.** *Science* 1994, **264**:1415-1421.
- Hibino Y, Kumar CS, Mariano TM, Lai DH, Pestka S: **Chimeric interferon-gamma receptors demonstrate that an accessory factor required for activity interacts with the extracellular domain.** *J Biol Chem* 1992, **267**:3741-9.
- Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD: **Demonstration of an interferon gamma-dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1998, **95**:7556-7561.
- Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL: **Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours.** *Immunol Today* 1997, **18**:89-95.
- Baillat G, Garrouste F, Remacle-Bonnet M, Marvaldi J, Pommier G: **Bcl-xL/Bax ratio is altered by IFN $\gamma$  in TNF $\alpha$ - but not in TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cell line.** *Biochim Biophys Acta* 2005, **1745**:101-110.
- Siegel PM, Massague J: **Cytostatic and apoptotic actions of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer.** *Nat Rev Cancer* 2003, **3**:807-821.
- Wong LH, Krauer KG, Hatzinisiiriou I, Estcourt MJ, Hersey P, Tam ND, Edmondson S, Devenish RJ, Ralph SJ: **Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3 $\gamma$ .** *J Biol Chem* 1997, **272**:28779-28785.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD: **How cells respond to interferons.** *Annu Rev Biochem* 1998, **67**:227-264.
- Gobin SJ, van Zutphen M, Woltman AM, van den Elsen PJ: **Transactivation of classical and nonclassical HLA class I genes through the IFN-stimulated response element.** *J Immunol* 1999, **163**:1428-1434.
- Dunn GP, Koebel CM, Schreiber RD: **Interferons, immunity and cancer immunoeediting.** *Nature Reviews Immunology* 2006, **6**:836-848.
- Pawelec G, Marsh SG: **ESTDAB: a collection of immunologically characterised melanoma cell lines and searchable databank.** *Cancer Immunol Immunother* 2006, **55**:623-627.
- Abril E, Real LM, Serrano A, Jimenez P, Garcia A, Canton J, Trigo I, Garrido F, Ruiz-Cabello F: **Unresponsiveness to interferon associated with STAT1 protein deficiency in a gastric adenocarcinoma cell line.** *Cancer Immunol Immunother* 1998, **47**:113-120.
- Abril E, Mendez RE, Garcia A, Serrano A, Cabrera T, Garrido F, Ruiz-Cabello F: **Characterization of a gastric tumor cell line defective in MHC class I inducibility by both alpha- and gamma-interferon.** *Tissue Antigens* 1996, **47**:391-398.

BMC Cancer 2007, 7:34

<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/7/34>

14. 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: **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* 1998, **52**:520-529.
15. Krebs DL, Hilton DJ: **SOCS: physiological suppressors of cytokine signaling.** *J Cell Sci* 2000, **113**(Pt 16):2813-2819.
16. Reintgen D, Balch CM, Kirkwood J, Ross M: **Recent advances in the care of the patient with malignant melanoma.** *Ann Surg* 1997, **225**:1-14.
17. Takaku F: **Clinical application of cytokines for cancer treatment.** *Oncology* 1994, **51**:123-128.
18. Dunn GP, Sheehan KC, Old LJ, Schreiber RD: **IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expression.** *Cancer Res* 2005, **65**:3447-3453.
19. Paschen A, Mendez RM, Jimenez P, Sucker A, Ruiz-Cabello F, Song M, Garrido F, Schadendorf D: **Complete loss of HLA class I antigen expression on melanoma cells: a result of successive mutational events.** *Int J Cancer* 2003, **103**:759-767.
20. Sakamoto H, Yasukawa H, Masuhara M, Tanimura S, Sasaki A, Yuge K, Ohtsubo M, Ohtsuka A, Fujita T, Ohta T, Furukawa Y, Iwase S, Yamada H, Yoshimura A: **A Janus kinase inhibitor, JAB, is an interferon-gamma-inducible gene and confers resistance to interferons.** *Blood* 1998, **92**:1668-1676.
21. Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ: **A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling.** *Nature* 1997, **387**:917-921.
22. Li Z, Metzke D, Nashan D, Muller-Tidow C, Serve HL, Poremba C, Luger TA, Bohm M: **Expression of SOCS-1, suppressor of cytokine signalling-1, in human melanoma.** *J Invest Dermatol* 2004, **123**:737-745.
23. Luo XM, Ross AC: **Retinoic acid exerts dual regulatory actions on the expression and nuclear localization of interferon regulatory factor-1.** *Exp Biol Med (Maywood)* 2006, **231**:619-631.
24. Eason DD, Shepherd AT, Blanck G: **Interferon regulatory factor 1 tryptophan 11 to arginine point mutation abolishes DNA binding.** *Biochim Biophys Acta* 1999, **1446**:140-144.
25. Harada H, Kondo T, Ogawa S, Tamura T, Kitagawa M, Tanaka N, Lamphier MS, Hirai H, Taniguchi T: **Accelerated exon skipping of IRF-1 mRNA in human myelodysplasia/leukemia; a possible mechanism of tumor suppressor inactivation.** *Oncogene* 1994, **9**:3313-3320.
26. Nozawa H, Oda E, Ueda S, Tamura G, Maesawa C, Muto T, Taniguchi T, Tanaka N: **Functionally inactivating point mutation in the tumor-suppressor IRF-1 gene identified in human gastric cancer.** *Int J Cancer* 1998, **77**:522-527.
27. Tamura G, Ogasawara S, Nishizuka S, Sakata K, Maesawa C, Suzuki Y, Terashima M, Saito K, Satodate R: **Two distinct regions of deletion on the long arm of chromosome 5 in differentiated adenocarcinomas of the stomach.** *Cancer Res* 1996, **56**:612-615.
28. Ruiz-Ruiz C, Ruiz de Almodovar C, Rodriguez A, Ortiz-Ferron G, Redondo JM, Lopez-Rivas A: **The up-regulation of human caspase-8 by interferon-gamma in breast tumor cells requires the induction and action of the transcription factor interferon regulatory factor-1.** *J Biol Chem* 2004, **279**:19712-19720.
29. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ: **Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN.** *Nat Med* 2000, **6**:529-535.
30. Hopkins-Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, Bigosch C, Kandoler D, Ludwig C, Zangemeister-Wittke U, Stahl R: **Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation.** *Cell Death Differ* 2003, **10**:356-364.
31. Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, Mendez R, Traversari C, Ruiz-Cabello F, Garrido F: **Reexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment.** *Int J Cancer* 2001, **94**:243-251.
32. Yoshida K, Yamamoto K, Kohno T, Hironaka N, Yasui K, Kojima C, Mukae H, Kadota J, Suzuki S, Honma K, Kohno S, Matsuyama T: **Active repression of IFN regulatory factor-1-mediated transactivation by IFN regulatory factor-4.** *Int Immunol* 2005, **17**:1463-1471.
33. Belardelli F, Ferrantini M, Proietti E, Kirkwood JM: **Interferon-a in tumor immunity and immunotherapy.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2002, **13**:119-134.
34. Wong LH, Krauer KG, Hatzinisiriou I, Estcourt MJ, Hersey P, Tam ND, Edmondson S, Devenish RJ, Ralph SJ: **Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma.** *J Biol Chem* 1997, **272**:28779-28785.

#### Pre-publication history

The pre-publication history for this paper can be accessed here:

<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/7/34/prepub>

Publish with **Bio Med Central** and every scientist can read your work free of charge

*"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."*

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:

[http://www.biomedcentral.com/info/publishing\\_adv.asp](http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp)



Page 11 of 11

(page number not for citation purposes)



## **CARACTERIZACIÓN DE LOS FENOTIPOS HLA DE CLASE I ALTERADOS EN UN PANEL DE LINEAS CELULARES HUMANAS DE MELANOMA.**

**Introducción:** Las células tumorales desarrollan múltiples mecanismos para evitar el ataque inmunológico y entre estas estrategias se encuentran la alteración de la expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I. Para que los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> (CTLs) eliminen las células tumorales requieren de la presentación de péptidos derivados de antígenos tumorales por las moléculas HLA de clase I. Las células T efectoras reconocen estos péptidos antigénicos asociados a las moléculas HLA de clase I ejerciendo así su efecto citotóxico. La alteración de la expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I es uno de los principales mecanismos de evasión por parte de las células tumorales de los linfocitos T. Entre los fenotipos alterados descritos en los diferentes tumores, incluidos los de melanoma, se encuentra la pérdida total de las moléculas HLA de clase I, la pérdida de un haplotipo HLA, pérdida o baja regulación de un locus HLA, pérdida de un alelo o resistencia de las moléculas HLA a la acción del interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ). También se pueden observar la combinación de varios de estos fenotipos en un mismo tumor.

**Material y métodos:** El estudio de la expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I en condiciones basales y tras tratamiento con interferón de las 91 líneas celulares de melanoma se realizó mediante citometría de flujo utilizando un panel de anticuerpos monoclonales tal y como se describen en los trabajos anteriores y los resultados obtenidos se expresaron en intensidad media de fluorescencia (MFI). El tipaje genómico de las líneas celulares se realizó al igual que en los trabajos anteriores mediante técnicas de hibridación con sondas (SSO) y en algunos casos mediante secuenciación de alta resolución. Para el análisis de microsatélites los DNAs fueron estudiados con ocho

marcadores de microsatélites que mapean el cromosoma 6 (D6S311, D6S291, D6S273, D6S265, D6S105, D6S276, C.1.2.c y C.1.2.5). Los productos de la RT-PCR de las líneas de melanoma fueron utilizados para estudiar la expresión de la cadena pesada de las moléculas HLA de clase I y componentes de la maquinaria de procesamiento antigénica como LMP2, LMP7, TP-1 y TAP-2 mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Todas las reacciones de PCR se realizaron en un Light Cycler usando LC-FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche diagnostics and Search LC, Heidelberg, germany). La hibridación in situ se realizó utilizando la sonda CEP (D6Z1) y una sonda centromérica específica del cromosoma, las cuales fueron hibridadas según un protocolo estandar (Vysis, Downers Grove, IL).

**Resultados:** El estudio de la expresión en superficie de de las moléculas HLA de clase I mediante citometría de flujo puso de manifiesto una marcada diferencia entre los niveles de expresión de estas moléculas pudiéndose dividir en diferentes grupos en función de la intensidad media de fluorescencia (MFI) después del marcaje con el anticuerpo monoclonal W6/32. La mayoría de las líneas de melanoma (72) presentaron una MFI entre 100 y 499, 13 líneas celulares presentaban una MFI inferior a 100 y tan sólo 6 líneas celulares presentaban una MFI superior a 500, destacando dos líneas celulares con una MFI mayor a 1000.

El 33% (30/91) de las líneas estudiadas mostraron una expresión normal de las moléculas HLA de clase I mientras que el resto de las líneas celulares estudiadas presentaron algún tipo de alteración en la expresión de las moléculas HLA de clase I. El tipaje genómico de las moléculas HLA puso de manifiesto un alto grado de homocigosidad de los genes HLA de clase I (13%) mayor al de la población normal (1.8%), este dato junto al hecho de que el análisis de microsatélites mostrara patrones de

homo/hemicigosidad sugiere la existencia de una pérdida de heterocigosidad (LOH) en el brazo corto del cromosoma 6. El estudio FISH reveló la presencia de al menos dos señales de hibridación en las líneas celulares estudiadas, lo que demuestra una posible duplicación del cromosoma 6. Un 35% (32/91) de las líneas celulares presentaron una baja regulación del locus HLA-B (HLA-B MFI < 50). Esta baja regulación del locus HLA-B es revertida tras el tratamiento con IFN- $\gamma$  lo que sugiere un mecanismo regulador que controla la expresión de locus-específica a nivel transcripcional. Un 11% (10/91) de las líneas celulares presentaron un fenotipo I (pérdida total o baja regulación total de las moléculas HLA de clase I). De estas 10 líneas celulares, dos presentaron pérdida total de las moléculas HLA de clase I (fenotipo Ia) debido a mutaciones en el gen de la  $\beta 2m$ , mientras que las 8 líneas restantes presentaron una baja regulación de las moléculas HLA de clase I (MFI < 100), fenotipo Ib, que a diferencia de las dos líneas anteriores con fenotipo Ia era revertida tras el tratamiento con IFN- $\gamma$ . Mediante PCR cuantitativa a tiempo real se puso de manifiesto como estas 8 líneas celulares presentaron menor expresión de los genes LMP-7 y TAP-2 en comparación con líneas celulares con alta expresión de las moléculas HLA de clase I. Un 6% de las líneas celulares (6/91) presentaron un fenotipo compuesto o fenotipo V en el que se combinan al menos dos alteraciones HLA de clase I de forma conjunta. Por último 4 de las 57 líneas celulares tratadas con IFN- $\gamma$  presentaron resistencia a esta citoquina. En dos de las cuatro líneas esta resistencia a IFN- $\gamma$  es debida a una mutación en el gen de la  $\beta 2m$ . Sin embargo las otras dos líneas celulares (ESTDAB-004 y ESTDAB-159) no presentaron ninguna alteración en el gen de la  $\beta 2m$  y presentaban resistencia a IFN- $\gamma$  pero respondían al tratamiento con IFN- $\alpha$ .



Cancer Immunol Immunother  
DOI 10.1007/s00262-007-0411-3

ORIGINAL ARTICLE

## Characterization of HLA class I altered phenotypes in a panel of human melanoma cell lines

Rosa Méndez · Teresa Rodríguez · Ana Del Campo · Eva Monge · Isabel Maleno · Natalia Aptsiauri · Pilar Jiménez · Susana Pedrinaci · Graham Pawelec · Francisco Ruiz-Cabello · Federico Garrido

Received: 17 May 2007 / Accepted: 26 September 2007  
© Springer-Verlag 2007

### Abstract

**Background** Altered HLA class I cell surface expression is one of the major mechanisms by which tumor cells escape from T lymphocytes. Immunohistochemistry-defined phenotypes of lost HLA class I expression have been described in human solid tumors, but less information is available on melanoma cell lines.

**Objectives** To describe the frequency and distribution of different types of HLA class I antigen alterations in 91 melanoma cell lines from the European Searchable Tumour Cell and Databank (ESTDAB).

**Methods** The HLA class I expression was assessed by flow cytometry and HLA genotyping.

**Results** We found various types of HLA class I cell surface alterations in about 67% of the melanoma cell lines. These alterations range from total to selective HLA class I loss due to loss of heterozygosity (LOH), haplotype loss,  $\beta$ 2-microglobulin gene mutation, and/or total or selective down-regulation of HLA class I molecules. The most frequently observed phenotype is down-regulation of HLA-B locus that was reversible after treatment with IFN- $\gamma$ .

**Conclusions** In general, HLA class I alterations in the majority of the cells analyzed were of regulatory nature and could be restored by IFN- $\gamma$ . Analysis of the frequency of distinct HLA class I altered phenotypes in these melanoma cell lines revealed specific differences compared to other types of tumors.

**Keywords** HLA class I · Altered phenotypes · Melanoma

### Introduction

Cytotoxic CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (CTLs) provide major defenses against cancer. CTLs recognize malignant cells via surface expression of HLA class I molecules with peptides derived from tumor specific antigens. This immune recognition of malignant cells leads to their elimination by activated CTLs. Tumor cells have developed strategies to inhibit the expression and/or function of HLA class I antigens in order to escape CD8<sup>+</sup> T-cell recognition and destruction [8, 14, 44]. The lack of HLA class I molecule expression on the cell surface has been found in many types of malignancies, including melanoma [5, 11, 12, 20, 24]. This abnormality renders cancer cells resistant to tumor antigen-specific CTLs and may have a negative impact on the elimination of tumor cells by host CTLs. Importantly, down-regulated HLA class I expression on tumor cells may diminish the clinical outcome of peptide-based cancer immunotherapy aimed at increasing specific CTL responses against malignant cells.

Research data obtained over the past 15 years have allowed us to classify altered HLA class I tumor phenotypes into several major groups depending on the type of HLA loss or down-regulation [1, 14]. The different phenotypes of HLA class I antigen surface expression are:

Rosa Méndez and Teresa Rodríguez have equally contributed to this work and both should be considered as first authors.

R. Méndez · T. Rodríguez · A. Del Campo · E. Monge · I. Maleno · N. Aptsiauri · P. Jiménez · S. Pedrinaci · F. Ruiz-Cabello · F. Garrido (✉)  
Departamento de Análisis Clínicos,  
Hospital Universitario Virgen de las Nieves,  
Universidad de Granada, Avd. Fuerzas Armadas 2,  
18014 Granada, Spain  
e-mail: federico.garrido.sspa@juntadeandalucia.es

G. Pawelec  
Center for Medical Research,  
University of Tübingen Clinical School,  
Tübingen, Germany

 Springer



phenotype I: (Ia) HLA class I total loss (structural defects); or (Ib) HLA class I total down-regulation (regulatory defects, reversible with cytokines); phenotype II—HLA haplotype loss; phenotype III—HLA-A or -B locus loss; phenotype IV—HLA allelic losses; phenotype V—compound phenotype; phenotype VI—unresponsiveness to interferons; phenotype VII—expression of HLA-E in HLA class I deficient tumors.

The distribution of MHC class I antigens in human melanoma lesions has been studied by various groups [18, 24, 28] using immunohistochemistry on frozen tissue sections. In this study, we have employed flow cytometry, molecular assays, and loss of heterozygosity (LOH) analysis to investigate HLA class I antigen expression analysis in melanoma cell lines. Here we report the distribution frequency of different HLA altered phenotypes in 91 human melanoma cell lines from the European Searchable Tumor Cell and Databank (ESTDAB, <http://www.ebi.ac.uk/ipd/estdab/>) [34]. It provides the world's largest collection of melanoma cell lines available to investigators for research purposes, and is the only cell bank to offer the researcher the ability to seek cells with combinations of immunologically relevant characteristics, including HLA class I and II high-resolution typing, HLA expression patterns, tumor antigen expression, cytokine secretion, adhesion molecule expression, apoptosis resistance, surface glycosylation patterns, and other parameters. More than half of the studied melanoma cell lines showed alterations in HLA class I gene expression but in the majority of the cells analyzed were of regulatory nature and could be restored by IFN- $\gamma$ .

## Materials and methods

### Cell culture

Ninety-one human melanoma cell lines were obtained from European Searchable Tumor Cell Line Data Base (ESTDAB project, contract no. QLRI-CT-2001-01325, <http://www.ebi.ac.uk/ipd/estdab/>). Samples were snap frozen in fetal calf serum (FCS; Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Germany) with DMSO and stored in liquid nitrogen until used in experiments. Melanoma cell lines were grown in RPMI-1640 medium (Biochrom KG, Berlin, Germany) complemented with 10% FCS, 2% glutamine (Biochrom KG), and 1% penicillin/streptomycin (Biochrom KG) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Responsiveness of the tumor cells to IFN- $\gamma$  was assessed by cytofluorimetric analysis of HLA class I antigen expression after incubation of cells in presence of IFN- $\gamma$  (800 IU/ml) or IFN- $\alpha$  (800 IU/ml) (R&D, Minneapolis, MN, USA) [used only for two cell lines that did not respond to IFN- $\gamma$  (ESTDAB-004 and ESTDAB-159)] for 48 h.

### HLA class I cell surface expression

Surface expression of HLA class I antigens was determined by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies against HLA class I molecules [4], including: anti-HLA-ABC/ $\beta$ 2m complex (W6/32, from Dr. Bodmer, Tissue Antigen Laboratory, Imperial Cancer Research Fund Laboratories, London, UK), anti- $\beta$ 2m (L-368, from Dr. Bodmer, UK), anti-locus A (A131, from Dr. Kornbluth, Department of Medicine, University of Arkansas, Little Rock, AR, USA; and 1082C5, from Dr. Vilella Puig, Hospital Clinico y Provincial, Barcelona, Spain), anti-locus B (Q6/64, from Dr. Ferrone, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY, USA), anti-HLA-Bw6 (126.39, from Dr. Gelsthorpe, Trent Blood Transfusion Center, Sheffield, UK), anti-HLA-Bw4 (116-5-28, from Dr. Gelsthorpe, UK), and, in some cases, anti-HLA-A23.24 (HA41, One Lambda, Canoga Park, CA, USA). All the antibodies have been recommended for HLA class I analysis at the 12th International Histocompatibility Workshop [15]. Cells ( $10^5$ ) were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) and then incubated with the monoclonal antibodies for 30 min at 4°C. Excess antibody was removed by washing of the cells with ice-cold PBS. Cells were stained with fluorescein-isothiocyanate-labeled rabbit anti-mouse-(F(ab')<sub>2</sub>) immunoglobulins (Cappel, West Chester, PA, USA), washed again in PBS, and analyzed on a FACSort flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI). Each experiment has been preformed at least three times.

### HLA genotyping

High-molecular-weight genomic DNA was prepared from cells with a standard phenol-chloroform method. DNA samples were amplified by PCR using specific primer pairs for HLA-A, HLA-B, and HLA-C locus-specific amplifications. HLA genotyping was performed by sequence-specific oligonucleotide-polymerase chain reaction (SSPO-PCR) techniques using the DYNAL Reli SSO kit (DYNAL Biotech, Bromborough, UK). Ambiguous results were resolved by sequence-based typing (SBT). Samples were sequenced on an automated 373 DNA sequencer (Applied Biosystems, Warrington, UK). Data obtained by sequencing were analyzed using the Match Tools v1.0 Sequencing Analysis software (Applied Biosystems).

### Microsatellite analysis

DNA was studied with six short tandem repeats (STRs) that mapped chromosome 6. Markers D6S311, D6S291, D6S273, D6S265, D6S105, D6S276, C.1.2.c; C.1.2.5 and the microsatellite analysis technique were described previously by Ramal et al. [36].

## RNA isolation and RT-PCR

Total cellular RNA was isolated using a Qiagen RNeasy kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions, and has been previously described [41]. RT-PCR products from melanoma cell lines were analyzed for the expression of various genes, including HLA class I heavy chain, TAP-1, TAP-2, LMP-2, and LMP-7 by quantitative real time PCR. The primer sequences, amplicon size and annealing temperatures used in this study have been previously published [39].

## In situ hybridization

FISH assay was performed with a CEP 6 (D6Z1) SpectrumOrange Probe and an alpha satellite DNA chromosome 6 centromere-specific probe, which were hybridized according to standard protocols (Vysis, Downers Grove, IL, USA). Cells were prepared from subconfluent cell line cultures. At the time of harvesting cells were trypsinized, incubated in hypotonic KCl (75 mM), fixed in Carnoy's solution (3:1 methanol : acetic acid), and placed on methanol-cleaned slides. One or two drops of cell suspension were added on slides and allowed to air-dry. Slides were wrapped in foil paper and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until further use. After thawing, slides were hybridized according to the manufacturer's recommendation. Nuclei were counterstained with DAPI and analyzed by fluorescence microscopy (Eclipse 400 fluorescence microscope; Nikon, Tokyo, Japan). A total of 25 interphases were analyzed, measuring the proportion and number of cell fluorescent signals.

## Results

## Variation in surface expression of HLA class I antigens on human melanoma cells

HLA class I surface expression on human melanoma cell lines from the ESTDAB bank was studied by flow cytometry using specific monoclonal antibodies [4]. These cell lines were classified according to the MFI value after labeling with monoclonal antibody W6/32 (Table 1). Marked differences in HLA class I surface expression were observed among different cell lines, and we assigned the cell lines to several groups according to the MFI level. The first group (group A) consisted of 17 cell lines with a mean MFI of 57; group B comprised 67 cell lines with a mean MFI of 246; group C included five cell lines with high MFI of 500–999, and group D comprised two cell lines with very high expression of HLA class I molecules, with MFI of >1,000.

**Table 1** Melanoma cell lines grouped according to the level of mean fluorescence intensity (MFI)

	N° melanoma cell lines	Mean MFI (MFI range)	Phenotypes
A	17	57 (MFI < 100)	Ia, Ib, V, VI
B	67	246 (MFI 100–499)	II, III, and with no alterations
C	5	673 (MFI 500–999)	No alterations
D	2	1933 (MFI > 1000)	No alterations

## Distribution of various patterns of HLA class I altered phenotypes on melanoma cell lines

To characterize the distribution of HLA class I surface expression on the studied melanoma cell lines, flow cytometry with different monoclonal antibodies was used in combination with HLA genotyping and microsatellite analysis (Tables 1, 2; Fig. 1). Total HLA class I loss or marked down-regulation of HLA class I expression (phenotype Ia and Ib) was found in 10/91 (11%) cell lines. Two cell lines (ESTDAB-038 and ESTDAB-109) showed a total HLA class I loss (phenotype Ia) due to  $\beta 2\text{-m}$  gene mutations.  $\beta 2\text{-m}$  gene mutations in these cell lines have previously been reported [2, 32]. Eight of these cell lines (9% of cases) presented HLA class I down-regulation (HLA-ABC MFI < 100) with no structural defects in  $\beta 2\text{-m}$  gene. In these cell lines, HLA class I expression was recovered after IFN- $\gamma$  treatment (not shown). Real-time PCR showed lower expression of LMP-7 and TAP-2 genes in these eight cell lines compared to cell lines with higher HLA class I expression. These differences are statistically significant (Fig. 2). Although, it is important to keep in mind that lower mRNA expression does not always reflect similar variations in protein expression. HLA genotyping showed homozygosity for HLA class I and class II genes in 11/91 (13%) cell lines. The frequency of homozygosity in the studied cell lines was higher than in the normal population (1.8%) [38]. Unfortunately, we did not have DNA samples from autologous PBLs corresponding to the patients from whom the investigated melanoma cell lines had been obtained. However, since the frequency of homozygosity was very high with respect to the normal population and the microsatellite analysis showed a pattern of homo/hemizyosity, the results obtained suggest the existence of LOH at chromosome 6p (Fig. 3a). A pattern of hemi/homozygosity for HLA class I and HLA class II was observed in 11/91 (13%) cell lines (listed in Table 2, Phenotype II) and 9 of these 11 cell lines were also homozygous for one of the SNP markers on chromosome 6q, while the remaining two (ESTDAB-070 and ESTDAB-167) were heterozygous for these markers [38]. These results are compatible with total loss of chromosome 6. Interestingly, the FISH study revealed the presence of at least two hybridization

**Table 2** Distribution of HLA class I phenotypes in 91 human melanoma cell lines based on the FASC analysis of HLA class I antigen cell surface expression using anti-HLA class I antibodies

				HLA- ABC (MFI)	b2m (MFI)	HLA- A* (MFI)	HLA- B (MFI)	Bw4 (MFI)	Bw6 (MFI)
Phenotype Ia: HLA class I total loss									
ESTDAB-038	A*0101,2902	B*3501,4403	Cw*040101	0	0	0	0	0	0
ESTDAB-109	A*0101,2501	B*0801,1801	Cw*070101,120402	0	0	0	0	0	0
Phenotype Ib: HLA class I total down regulation									
ESTDAB-127	A*0201,0301	B*4402,5101	Cw*0501,1402	51	42	33	5	4	1
ESTDAB-042	A*0301,0201	B*0702	Cw*0702	56	25	63	14	1	14
ESTDAB-102	A*0201,0301	B*1801,4001	Cw*0304,070101	66	62	31	36	4	27
ESTDAB-094	A*310102,680101	B*2709	Cw*020202	67	67	73	45	20	0
ESTDAB-140	A*0101,2402	B*2704,5701	Cw*0602,020204	88	65	3*	23	25	0
ESTDAB-196	A*0101,0201	B*0801,1801	Cw*ND	68	65	23	2	1	3
ESTDAB-073	A*0201,0301	B*0702,1302	Cw*0602,0702	73	36	60	11	0	2
ESTDAB-020	A*0201,0301	B*2703,3901	Cw*0202,1203	52	41	45	7	0	0
Phenotype II: HLA haplotype loss									
ESTDAB-041	A*290201	B*4901	Cw*070101	125	80	60	140	NT	1
ESTDAB-064	A*0201	B*0702	Cw*0702	211	113	159	60	2	51
ESTDAB-062	A*2402	B*4002	Cw*0304	279	103	87	131	3	143
ESTDAB-058**	A*2301	B*15010101	Cw*0102	189	47	123**	365	1	211
ESTDAB-070	A*3201	B*4101	Cw*1701	208	178	10*	77	1	41
ESTDAB-071	A*3201	B*1401	Cw*0802	162	74	14*	55	1	35
ESTDAB-039	A*0201	B*2709	Cw*020202	215	103	127	98	94	1
ESTDAB-041b	A*2902	B*4901	Cw*070101	321	167	156	297	162	27
ESTDAB-167	A*0101	B*15010101	Cw*0303	364	130	22*	55	1	167
ESTDAB-179	A*0201	B*4001	Cw*0304	365	118	201	50	0	56
ESTDAB-130	A*1101	B*4001	Cw*030401	473	337	45*	80	2	70
Phenotype III: HLA-B down regulation									
ESTDAB-009	A*0201,0301	B*0702,4402	Cw*0702,0501	117	43	131	12	1	7
ESTDAB-080	A*0201,0205	B*0702,1503	Cw*0702,1505	190	19	131	18	1	0
ESTDAB-030	A*0101,0301	B*0801,3501	Cw*0401,0702	195	226	NT	30	1	27
ESTDAB-021	A*0201	B*0702,1801	Cw*0501,0702	177	110	93	47	2	42
ESTDAB-043	A*0201,6801	B*4001,4002	Cw*0304,0202	137	41	79	27	1	26
ESTDAB-095	A*1101,0101	B*3501,510101	Cw*0401,1203	336	229	36*	30	12	5
ESTDAB-006	A*0101,0201	B*0801,15010101	Cw*0701,0702	147	207	63	31	10	0
ESTDAB-027	A*0101,0201	B*0801,15010101	Cw*0704,0304	407	224	151	21	1	32
ESTDAB-107	A*0201,1101	B*15010101,55	Cw*ND,ND	359	209	218	6	2	5
ESTDAB-121	A*1101,0301	B*0702,1401	Cw*0802	183	169	143	10	0	2
ESTDAB-120	A*0101,0201	B*0702,0801	Cw*ND,ND	276	129	161	2	1	4
ESTDAB-029	A*0201,0205	B*2704,4901	Cw*0102,070101	244	135	73	21	7	0
ESTDAB-022	A*3101,2402	B*1501,3501	Cw*0303,040101	210	153	16*	45	0	43
ESTDAB-108	A*1101,6802	B*0801,1402	Cw*0701,0802	263	243	23*	28	6	41
ESTDAB-128	A*0101,0301	B*3801,520101	Cw*120201,120301	185	158	95	3	0	6
ESTDAB-017	A*0201	B*0702,5101	Cw*0702,1502	109	94	91	45	9	31
ESTDAB-194	A*0201	B*4001/4402,	Cw*0304/0501	139	130	101	3	0	15
ESTDAB-135	A*0201,0301	B*1302,4002	Cw*0202,0602	128	85	74	15	4	42
ESTDAB-152	A*2601,0201	B*5501,510101	Cw*0303,1402	228	162	138	45	46	6
ESTDAB-206	A*0201,3101	B*1517,3901	Cw*0701,0702	135	92	117	30	20	1
ESTDAB-007	A*0201	B*0702,4402	Cw*0501	182	208	139	28	0	25

Cancer Immunol Immunother

Table 2 continued

				HLA- ABC (MFI)	b2m (MFI)	HLA- A* (MFI)	HLA- B (MFI)	Bw4 (MFI)	Bw6 (MFI)
ESTDAB-176	A*0201,6801	B*4901,5101	Cw*0501,0701	300	102	80	17	28	1
ESTDAB-100	A*0201,0301	B*1402,44020101	Cw*0501,0802	194	96	158	1	0	0
ESTDAB-114	A*0301,1101	B*1401,4001	Cw*ND,ND	270	156	155	12	1	11
ESTDAB-200	A*0201,2601	B*4001,4901	Cw*0304,0701	142	57	50	35	NT	0
ESTDAB-084	A*0301,0201	B*1501,0702	Cw*0304,0702	267	229	179	5	1	0
ESTDAB-183	A*0201,2402	B*5001	Cw*0602,0702	128	114	45	6	11	3
ESTDAB-048	A*0201,0301	B*0801,4403	Cw*0701,0809	147	112	92	13	15	11
ESTDAB-199	A*0201	B*0701,3501	Cw*0401,0702	174	133	149	12	0	3
ESTDAB-074	A*0201	B*0702,4402	Cw*0501,0702	202	146	165	8	1	3
ESTDAB-163	A*0301,0201	B*1402,4402	Cw*ND,ND	210	137	206	31	28	48
ESTDAB-125	A*0201,0301	B*0702,5101	Cw*0702,1502	163	109	63	49	23	0
Phenotype V: Compound phenotype				HLA- ABC	b2m	HLA- A	HLA- B	Bw4	Bw6
ESTDAB-036	A*2402	B*5201	Cw*1202	95	89	10*	71	63	3
ESTDAB-081	A*2402	B*0702	Cw*0702	13	16	0*	0	0	1
ESTDAB-162	A*0201/09	B*0801	Cw* 0701/06	85	63	73	0	0	5
ESTDAB-137	A*0101	B*1501	Cw*0602	56	58	42*	42	0	1
ESTDAB-195	A*0101	B*0801	Cw*0701	60	53	1*	0	1	6
ESTDAB-037	A*ND	B*390101	Cw*0702	355	194	32	37	4	32
Phenotype VI: Unresponsive to IFN-γ				HLA- ABC	b2m	HLA- A	HLA- B	Bw4	Bw6
ESTDAB-004	A*0101	B*4002	Cw*0304	93	81	18	14	0	6
ESTDAB-159	A*1101,3101	B*1801,4001	Cw*0304,0501	46	3	0	0	2	4
No alterations detected				HLA- ABC	b2m	HLA- A	HLA- B	Bw4	Bw6
ESTDAB-110	A*0201,2402	B*0801,1501	Cw*0304,0401	121	68	95	80	25	58
ESTDAB-050	A*0201,2601	B*1402,3801	Cw*0802,1203	135	154	51	68	0	10
ESTDAB-045	A*0101,2301	B*0702,4901	Cw*070101,0702	157	87	18*	197	NT	NT
ESTDAB-046	A*0201,2402	B*15010101,5501	Cw*0302	190	78	168	240	0	236
ESTDAB-112	A*0101,3201	B*0801,4402	Cw*0501,070101	201	125	26*	100	49	64
ESTDAB-184	A*2301,3301	B*1402,4901	Cw*0701,0802	216	94	40	58	19	0
ESTDAB-085	A*0101,2901	B*0801,07020101	Cw*0701,1505	219	139	31	59	0	24
ESTDAB-105	A*2402,2501	B*1402,3503	Cw*0802,1203	225	142	80	50	22	120
ESTDAB-079	A*0301,2402	B*0702	Cw*0702	232	162	68	72	3	65
ESTDAB-075	A*3201,6801	B*1401	Cw*0801	248	136	92	127	38	56
ESTDAB-018	A*0201	B*0702,1501	Cw*0304,0702	273	162	90	128	7	120
ESTDAB-142	A*0301,6801	B*4002,5101	Cw*0202,1502	294	135	171	98	56	19
ESTDAB-016	A*3101,6801	B*2705,4402	Cw*070101	298	232	236	85	70	12
ESTDAB-011	A*2402,6802	B*5301,5701	Cw*0401,0602	302	165	89	97	38	5
ESTDAB-066	A*2902,0201	B*4403,1302	Cw*1601,0602	309	198	176	119	34	0
ESTDAB-136	A*0101,0301	B*1501,4402	Cw*0303,0501	316	164	146	77	27	6
ESTDAB-153	A*0101,3201	B*0801,5201	Cw*0701,1202	343	138	20*	108	44	6
ESTDAB-146	A*0201,2601	B*2703,3801	Cw*0303,1203	409	156	242	143	63	1
ESTDAB-044	A*0101,0201	B*0801/15010101	Cw*070101,0304	397	145	280	55	2	75
ESTDAB-033	A*0201,2601	B*4001,4402	Cw*0304,0501	430	279	299	320	NT	NT
ESTDAB-067	A*0101,2901	B*5701,3501	Cw*0602,0401	451	108	217	295	240	129
ESTDAB-024	A*3201,2501	B*1801,4402	Cw*1203,0501	475	349	19*	198	18	57
ESTDAB-023	A*0301,310102	B*1501,2704	Cw*0202,0303	479	243	297	184	82	199
ESTDAB-077	A*0201,2601	B*1302,3801	Cw*0602,1203	650	162	182	199	83	0
ESTDAB-019	A*0101,0201	B*0801,0702	Cw*0701,0702	653	241	346	252	0	31

Table 2 continued

	HLA- ABC (MFI)	b2m (MFI)	HLA- A* (MFI)	HLA- B (MFI)	Bw4 (MFI)	Bw6 (MFI)			
ESTDAB-082	A*0201,2902	B*4403	Cw*1601	670	321	107	305	362	23
ESTDAB-026	A*0201,6802	B*1501,4402	Cw*0303,0704	686	326	565	100	8	182
ESTDAB-001	A*0201,2902	B*4402,4403	Cw*0501,1601	707	530	424	205	105	5
ESTDAB-052	A*0201	B*2704,1801	Cw*0401,0701	1,333	370	583	472	167	183
ESTDAB-056	A*3201,2601	B*0702,5702	Cw*0702,0602	2,533	2,228	57*	3,120	502	318

HLA-A\*: the analysis was done using 1082C5 antibody which does not recognize the following specificities: A1, A11, A23, A32, A25, A26

\*\* ESTDAB-058: specific A23 labeling

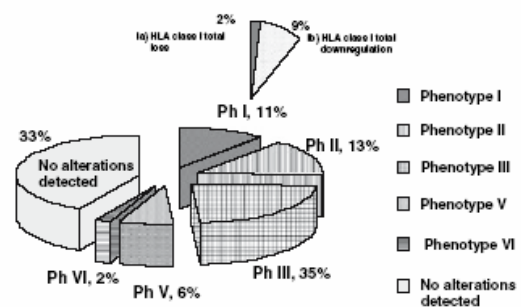


Fig. 1 Distribution of HLA class I phenotypes in melanoma cell lines: HLA class I total loss or down-regulation (phenotype I), HLA class I haplotype loss (phenotype II), HLA-B down-regulation (phenotype III), combination of HLA class I haplotype loss and HLA-B down-regulation (phenotype V), and IFN- $\gamma$  resistance (phenotype VI). Surface expression of HLA class I antigens was determined by indirect immunofluorescence using anti-HLA-ABC/ $\beta$ 2m (W6/32) monoclonal antibodies. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI)

signals in the studied cell lines (Fig. 3b), suggesting a possible duplication of chromosome 6.

Phenotype III, a down-regulation of HLA-B locus (HLA-B MFI <50) was observed in 32/91 (35%) cell lines (Table 2, Fig. 1). Locus down-regulation could be due to mutations, such as reported in cervical cancer [23]; or often happens at a transcriptional level since it can be reversed by IFN- $\gamma$  treatment [16, 17].

HLA-B locus down-regulation was the most frequent alteration in the studied melanoma cell lines and also in comparison to other types of human tumors (Table 3).

Six cell lines (6%) (Table 2, Fig. 1) presented a compound phenotype (phenotype V), which requires a combination of at least two types of alterations. For instance, cell lines ESTDAB-162 and ESTDAB-137 presented LOH in chromosome 6 and HLA-B down-regulation, leaving only HLA-A and -C being expressed on the cell surface. In ESTDAB-036 in addition to LOH in chromosome 6 we found HLA-A down-regulation. As a result, this cell line retains only HLA-B and -C expression. Other cell lines, ESTDAB-

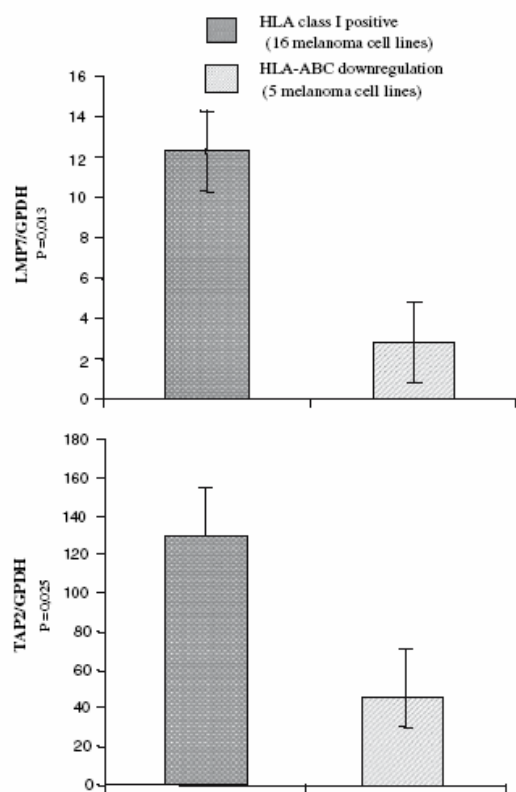
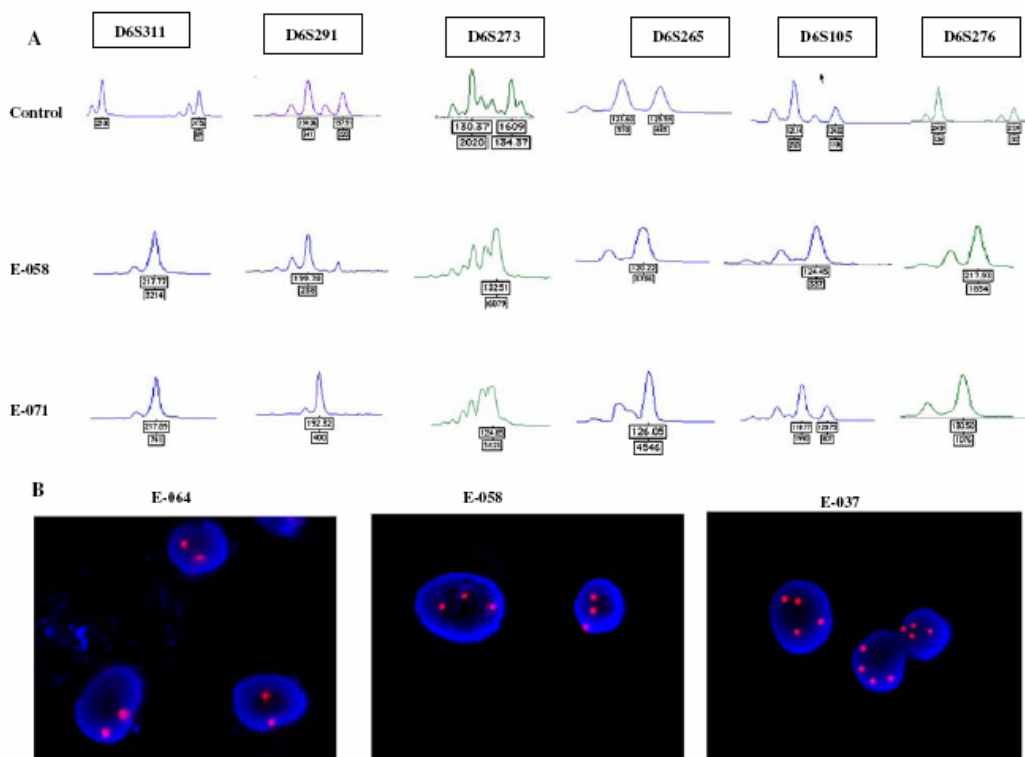


Fig. 2 Real-time PCR showed lower (statistically significant) expression of LMP-7 and TAP-2 genes in cell lines with HLA class I down-regulation as compared to cell lines with normal HLA class I expression. Total cellular RNA was isolated from melanoma cell lines and was subjected to reverse transcription. Quantitative real time PCR was used to analyze the reverse-transcribed products from melanoma cell lines for the expression of various genes, including HLA class I heavy chain, TAP-1, TAP-2, LMP-2, and LMP-7. To control for variations in amounts of RNA, G6PDH, and  $\beta$ 2-m were also tested as housekeeping genes

081, and ESTDAB-195, besides LOH at chromosome 6 showed HLA-ABC down-regulation, which led to a total HLA class I loss on these cell lines.



Cancer Immunol Immunother



**Fig. 3** a Patterns of polymorphic markers on chromosome 6. Microsatellite analysis was performed on DNA from melanoma cell lines using six short tandem repeats (STRs) that map chromosome 6. Microsatellite analysis plot using DNA isolated from a healthy donor demonstrates an example of retention of heterozygosity (two peaks at each marker). Examples of homo/hemizygous patterns are shown for cell lines E-058 and E-071 (single peak for majority of the markers and

strongly reduced peaks at other markers) suggesting LOH at chromosome 6. b Representative images of FISH assay of cells counterstained with DAPI and hybridized with a centromeric probe showing examples of diploidy (E-064), triploidy (E-058), and tetraploidy (E-037) in cell lines. LOH at chromosome 6 along with triploidy according to FISH assay indicates triplication of a single chromosome 6 in cell line E-058

**Table 3** Frequency of HLA class I altered phenotypes found in different human tumors and melanoma cell lines

HLA altered Phenotype	Colorectal cancer (%) [14]	Laryngeal cancer (%) [25]	Bladder cancer (%) [39]	Cervical cancer (%) [23]	Prostate cancer***	Melanoma [19]	Melanoma cell lines (%)
Phenotype I	18	11	25	10	50%	18%	11*
Phenotype II	28	36	17	33	ND	ND	13
Phenotype III	8.5	20	7	8.5	18%	18%	35
Phenotype IV	15	10	14	17	14%	33%	0**
Phenotype V	8.5	0	13	17	ND	ND	6
No alterations detected	26	23	23	10	18%	23%	33

ND not done

\* In this study we were able to distinguish cell lines with total loss of HLA class I antigens

(2%, Phenotype Ia) from cells lines with a strong HLA class I downregulation (MFI < 100) (9%, Phenotype Ib)

\*\* Absence of the Phenotype IV could be due to the limited number of available allele specific antibodies

\*\*\* Unpublished observations

HLA class I antigen inducibility after IFN- $\gamma$  treatment was analyzed in 57 human melanoma cell lines. Only four cell lines showed resistance to IFN- $\gamma$  as measured by flow cytometry. In two of them (ESTDAB-038 and ESTDAB-109), this was due to the presence of a mutation in  $\beta$ 2-m gene. The remaining two cell lines (ESTDAB-004 and ESTDAB-159) exhibited resistance to IFN- $\gamma$  mediated increase in HLA class I expression, but responded to IFN- $\alpha$  treatment [37].

Finally, 33% (30/91) melanoma cell lines showed normal surface expression of HLA class I antigens (Table 2, Fig. 1). On the other hand, due to the lack of many specific anti-allelic antibodies suitable for flow cytometry analysis, some allelic losses might have been missed in some of the studied cell lines.

## Discussion

A successful escape from immune surveillance is considered to be one of the hallmarks of cancer [10, 11, 21, 33]. Down-regulation of HLA class I antigens and of the components of antigen processing machinery (APM) have been extensively documented in a large variety tumors, including melanoma. These defects are believed to contribute to the immune evasion via the resistance of tumor cells to killing by activated immune cells [8, 13]. A critical issue relevant for outcome of cancer immunotherapy is the identification of HLA class I alterations and a possibility to repair them. We have characterized the frequency of different types of HLA class I alterations in the studied melanoma cell lines and changes in HLA class I expression in response to IFN- $\gamma$  treatment. Immunohistochemical staining has been widely utilized to analyze HLA class I antigen expression in surgically removed melanoma lesions [24]. To the best of our knowledge, this is the first study to characterize alterations in HLA class I expression mechanisms in a large panel of 91 human melanoma cell lines established from metastatic lesions (ESTDAB) [34].

Tumor cells frequently exhibit a complete loss of HLA class I antigens in a variable range. Our previous studies revealed that 63% of melanoma, 88% of breast carcinoma, 77% of laryngeal, 74% of colorectal, 82% of prostate, and 77% of bladder tumors have various types of abnormal HLA class I expression [reviewed in 1]. Phenotype I is characterized by total loss or down-regulation of HLA class I antigen surface expression. This alteration was originally described with the use of mAbs directed against HLA class I monomorphic determinants (W6/32) on various tumor tissues, including melanoma lesions. In this study, W6/32 mAb was used in flow cytometry analysis of melanoma cell lines. The frequency of phenotype I in the studied cell lines was 11%, which is comparable with the percentage of this

phenotype reported in melanoma tumor tissue (18% of the cases) (Table 3). The frequency of total loss (Phenotype Ia) in the studied cell lines was only 2%, while the down-regulation of HLA class I molecules (MFI < 100) (Phenotype Ib) was observed in 9% of investigated cell lines. Since immunohistochemistry technique commonly used in the analysis of solid tumors, is rather qualitative than quantitative, frequently it is difficult to distinguish total loss from a down-regulation on tissues sections. Flow cytometry overcomes this limitation and gives an opportunity to discriminate between total loss and just a down-regulation of class I molecules.

The molecular mechanisms underlying HLA class I total loss are only partially understood. The mechanism leading to total or partial HLA class I alterations can occur at any step required for HLA synthesis, assembly, transport or expression on cell surface. The defects can represent a structural defect or a regulatory defect on transcriptional level, which can be corrected with cytokine treatment. Two or more mechanisms responsible for HLA class I alteration can frequently be observed within the same phenotype. Normally, two structural defects are necessary to produce the total loss of HLA class I on malignant cells, mutation in one copy of  $\beta$ 2m gene and loss of heterozygosity (LOH) in the second allele [32]. Mutations in  $\beta$ 2-m gene are known to be involved in generating this phenotype in melanoma [2, 32, 35] and in some cases of colorectal carcinomas but not in laryngeal [25] or bladder carcinomas [26]. A number of apparently redundant mutations have been described in the  $\beta$ 2-m gene in colon carcinomas [20] and have been identified in tumors from individuals with defect in the mismatch repair system (MMR). Mutations in the  $\beta$ 2-m gene along with LOH are frequently observed in melanoma and are associated with increased somatic losses, genomic instability and aneuploidy/polyploidy [31].

The coordinated down-regulation of several APM components can also produce this phenotype. Coordinated transcriptional down-regulation of HLA-ABC,  $\beta$ 2-m, and APM genes was observed in microdissected tumor tissue derived from bladder carcinomas [39]. Similar findings were described in HLA class I negative colon cancer without  $\beta$ 2-m mutation [3]. It has been reported that mice with a targeted deletion of the gene encoding LMP7 have reduced levels of MHC class I cell-surface expression and present antigen inefficiently [9]. Other reports describe loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer due to functionally defective allele of TAP1 [6]. In our study, the group of melanoma cell lines with strong HLA class I down-regulation showed a decreased level of APM component, what may affect the clinical course of the melanoma. A positive correlation was found between the down-regulation of LMP7 and TAP2 mRNA (Fig. 2) and the level of HLA class I surface expression (Fig. 1).

Phenotype II, or loss of HLA class I haplotype, is associated with LOH due to loss of one copy of chromosome 6 or loss of a DNA fragment containing HLA-A, -B, and -C genes. In this study the percentage of homozygosity for HLA classes I and II genes and data obtained from the microsatellite analysis suggests a high frequency of HLA haplotype loss. An extensive microsatellite study of these cell lines has been previously published [38]. Phenotype II is produced by LOH within chromosome 6 and may affect a large portion of this chromosome, including the area corresponding to 6q polymorphic markers. This phenotype has been found in tumors derived from various tissue types, and loss of chromosome 6 or large hemizygous deletions of chromosome 6 involving the entire HLA class I region have been observed. Chromosomal non-disjunction or mitotic recombination contribute to the HLA class I haplotype loss in some cases [7, 18]. However, microsatellite LOH analysis does not always represent the gene copy number. For example, it has been reported that in some cases the loss of one chromosome 15 is accompanied by duplication of the other according to the results obtained from comparative genomic hybridization (CGH) studies [22]. In our study, the FISH analysis with a centromeric probe revealed different hybridization patterns, showing diploidy, triploidy, and tetraploidy in the studied cells. Interestingly, no monosomy was detected in any melanoma cell with LOH according to the microsatellite analysis (Fig. 3b). Taken together, these findings imply that these melanoma cell lines may have a loss of one chromosome 6 and a duplication of the other. In fact, in microsatellite analyses, losses of an entire chromosome are usually accompanied by duplication of the remaining chromosome [7, 18]. Similar results have also been observed in acute lymphoblastic leukemia [27] suggesting that this mechanism might be a more general feature of malignant cells.

Phenotype III is found when either HLA-A, B, or C loci are coordinately down-regulated [40, 43]. This phenotype is observed more frequently in melanoma than in other tumors (Table 3). The mechanism of locus down-regulation is often transcriptional, since mRNA levels found in these tumor cell lines can be up-regulated with cytokines and there is low expression of transcription factors that bind to locus-specific DNA motifs and induce HLA-B locus down-regulation [42]. The presence of locus-specific residues throughout the entire promoter region strongly suggests that the various HLA class I loci are differentially regulated [16]. However, specific methylation of HLA class I promoters also induces HLA locus down-regulation. HLA-B locus gene is the most frequently methylated HLA gene (38%) in human esophageal squamous cell carcinomas [29]. Our group previously described hypermethylation of the HLA genes as a mechanism of total HLA class I expression loss in a melanoma patient [41]. This may also be the

case for other immunoactive genes, especially cytokine genes [30].

Selective allelic defects in HLA class I expression are sometimes difficult to define due to the limited number of available allele-specific antibodies. For instance, absence of allelic losses in the studied melanoma cell lines (Table 3) could be actually due to the lack of allele-specific antibodies for FACS analysis. Molecular studies often help to detect this phenotype, which can be a result of point mutation in HLA genes, partial deletions of these genes, chromosomal breakage, or somatic recombination.

Finally, the majority of the cell lines responded to IFN- $\gamma$  treatment with an increase in HLA class I antigen expression. In this panel of melanoma cell lines we identified two cell lines with a specific defect in the IFN- $\gamma$  signaling pathway that responded to IFN- $\alpha$  treatment [37]. We identified two possible mechanisms of IFN- $\gamma$  resistance. In ESTDAB-159, it could be due to blocking of IRF-1 transactivation. Another mechanism representing an absence of STAT-1 phosphorylation in response to IFN- $\gamma$  treatment was found in cell line ESTDAB-004.

Melanoma cells in the present study showed various HLA class I alterations that may represent a stable phenotypic hallmark in tumorigenesis. Quantitative variations in the surface expression of these molecules on melanoma cells were found to be due to both regulatory and structural mechanisms. Precise knowledge of the mechanisms involved in HLA class I loss is important for the development of rational T-cell based immunotherapy for melanoma patients. For instance, cancer patients with total loss of HLA class I expression due to irreversible defects in HLA genes most likely will not benefit from peptide-based immunotherapy [2, 41].

**Acknowledgments** This work was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Red Genómica del Cáncer (C03/10), Consejería de Salud, Plan Andaluz de Investigación, Servicio Andaluz de Salud (SAS) in Spain, from the ESTDAB project (contract no. QLRI-CT-2001-01325), and from the European Network for the identification and validation of Antigens and biomarkers in Cancer and their application in clinical Tumor immunology (ENACT, contract No. 503306).

## References

1. Aptsiauri N, Cabrera T, García-Lora A, López-Nevot MA, Ruiz-Cabello F, Garrido F (2007) MHC class I antigens and immune surveillance in transformed cells. *Int Rev Cytol* 256:139
2. Benitez R, Godelaine D, López-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
3. 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
4. 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
  5. 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
  6. Chen HL, Gabrilovich D, Tampe R, Girgis KR, Nadaf S, Carbone DP (1996a) A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat Genet* 13:210
  7. de Nooij-van Dalen AG, van Buuren-van Seggelen VH, Lohman PH, Giphart-Gassler M (1998) Chromosome loss with concomitant duplication and recombination both contribute most to loss of heterozygosity in vitro. *Genes Chromosomes Cancer* 21:30
  8. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoeediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 11:991–998
  9. Fehling HJ, Swat W, Laplace C, Kuhn R, Rajewsky K, Muller U, von Boehmer H (1994) MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7. *Science* 265(5176):1234
  10. Garcia-Loza A, Algarra I, Collado A, Garrido F (2003) Tumour immunology, vaccination and escape strategies. *Eur J Immunogenet* 30(3):177–183
  11. Garrido F, Algarra I (2001) MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 83:117
  12. 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
  13. Garrido F, Cabrera T, Lopez-Nevot MA, Ruiz-Cabello F (1995) HLA class I antigens in human tumors. *Adv Cancer Res* 67:155
  14. 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
  15. Garrido F, Cabrera T, Acolla RS, Bensa JC, Bodmer W, Dohr G, Drouet M, Fauchet R, Ferrara GB, Ferrone S, Giacomini P, Kageshita T, Koopman L, Maio M, Marincola F, Mazzilli C, Morel PA, Murray A, Papasteriades Crh, Salvaneschi L, Stern PL, Ziegler A (1997) HLA and cancer: 12th international histocompatibility workshop study. In: Charron D (ed) HLA, genetic diversity of HLA. Functional and medical implications, vol 1. EDK, Paris, p 445
  16. Gasparollo A, Coral S, Ciullo M, Prisco A, Cattarossi I, Sigalotti L, Altomonte M, Guardiola J, Maio M (2001) Unbalanced expression of HLA-A and -B antigens: a specific feature of cutaneous melanoma and other non-hematopoietic malignancies reverted by IFN-gamma. *Int J Cancer* 91(4):500
  17. Griffioen M, Ouwerkerk IJ, Harten V, Schrier PI (2000) HLA-B locus-specific downregulation in human melanoma requires enhancer A as well as a sequence element located downstream of the transcription initiation site. *Immunogenetics* 52:121
  18. 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
  19. Kageshita T, Ishihara T, Campoli M, Ferrone S (2005) Selective monomorphic and polymorphic HLA class I antigenic determinant loss in surgically removed melanoma lesions. *Tissue Antigens* 65:419
  20. Kalamanis L, Gatter KC, Hill AB, Mortensen N, Harris AL, Krausa P, McMichael A, Bodmer JG, Bodmer WF (1992) Loss of HLA class-I alleles, heavy chains and beta 2-microglobulin in colorectal cancer. *Int J Cancer* 51:379
  21. Khong HT, Restifo NP (2002) Natural selection of tumor variants in the generation of “tumor escape” phenotypes. *Nat Immunol* 3(11):999–1005
  22. Koene G, Arts-Hilkes Y, van der Ven K, Rozemuller E, Slootweg P, de Weger R, Tilanus M (2004) High level of chromosome 15 aneuploidy in head and neck squamous cell carcinoma lesions identified by FISH analysis: limited value of beta 2-microglobulin LOH analysis. *Tissue Antigens* 64:452
  23. 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(6):961
  24. Lopez Nevot MA, Garcia E, Pareja E, Bonal FJ, Martin J, Ruiz-Cabello F, Serrano S, Garrido F (1986) Differential expression of HLA class I and II antigens in primary and metastatic melanomas. *J Immunogenet* 13:219
  25. 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
  26. Maleno I, Romero JM, Cabrera T, Peco L, Aptsiauri N, Cozar JM, Tallada M, Lopez-Nevot MA, Garrido F (2006) LOH at 6p21.3 region and HLA class I altered phenotypes in bladder carcinomas. *Immunogenetics* 58:503
  27. McEvoy CR, Morley AA, Firgaira FA (2003) Evidence for whole chromosome 6 loss and duplication of the remaining chromosome in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 37:321
  28. Natali PG, Aguzzi A, Veglia F, Imai K, Burlage RS, Giacomini P, Ferrone S (1983) The impact of monoclonal antibodies on the study of human malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 10:514
  29. 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
  30. Nikolova P, Pawelec GP, Mihailova SM, Ivanova MI, Myhailova AP, Baltadjieva DN, Marinova DI, Ivanova SS, Naumova EJ (2007) Association of cytokine gene polymorphisms with malignant melanoma in Caucasian population. *Cancer Immunol Immunother* 56:371
  31. Paschen A, Arens N, Sucker A, Greulich-Bode KM, Fonsatti E, Gloghini A, Striegel S, Schwinn N, Carbone A, Hildenbrand R, Cerwenka A, Maio M, Schadendorf D (2006) The coincidence of chromosome 15 aberrations and beta2-microglobulin gene mutations is causative for the total loss of human leukocyte antigen class I expression in melanoma. *Clin Cancer Res* 12:3297
  32. 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
  33. Pawelec G, Koch S, Griesemann H, Rehbein A, Hahnel K, Gouttefangeas C (2006) Immunosenescence, suppression and tumour progression. *Cancer Immunol Immunother* 55:981
  34. Pawelec G, Marsh S (2006) ESTDAB: a collection of immunologically characterised melanoma cell lines and searchable databank. *Cancer Immunol Immunother* 55:623
  35. 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
  36. Ramal LM, Maleno I, Cabrera T, Collado A, Ferron A, Lopez-Nevot MA, Garrido F (2000) Molecular strategies to define HLA haplotype loss in microdissected tumor cells. *Hum Immunol* 61:1001

## Cancer Immunol Immunother

37. Rodríguez T, Mendez R, Del Campo A, Jimenez P, Aptsiauri N, Garrido F, Ruiz-Cabello F (2007) Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. *BMC Cancer* 7:34
38. Rodríguez 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
39. 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
40. Schrier PI, Versteeg R, Peltenburg LT, Plomp AC, van 't Veer LJ, Kruse-Wolters KM (1991) Sensitivity of melanoma cell lines to natural killer cells: a role for oncogene-modulated HLA class I expression? *Semin Cancer Biol* 2:73
41. Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, Mendez R, Traversari C, Ruiz-Cabello F, Garrido F (2001) Reexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer* 94:243
42. Soong TW, Hui KM (1992) Locus-specific transcriptional control of HLA genes. *J Immunol* 149:2008
43. Versteeg R, Kruse-Wolters KM, Plomp AC, van Leeuwen A, Stam NJ, Ploegh HL, Ruiters DJ, Schrier PI (1989) Suppression of class I human histocompatibility leukocyte antigen by c-myc is locus specific. *J Exp Med* 170:621
44. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G (2006) Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol* 6:715



## **PATRONES DE EXPRESIÓN CONSTITUTIVA E INDUCIDA POR IFN- $\gamma$ DE LAS MOLÉCULAS HLA DE CLASE II EN LÍNEAS CELULARES HUMANAS DE MELANOMA.**

**Introducción:** Las moléculas HLA de clase II juegan un importante papel en las respuesta inmune presentando péptidos antigénicos a las células T CD4<sup>+</sup> y participando en la maduración de las células B. Las células de melanoma pueden expresar moléculas HLA de clase II aunque, dicha expresión constitutiva suele estar restringida a las células presentadoras de antígenos. Su expresión puede ser inducida por varias citoquinas, de las cuales la más potente es el interferón-gamma. El mayor regulador de la expresión constitutiva e inducible de las moléculas HLA de clase II es la proteína transactivadora de clase II (CIITA). El gen CIITA es controlado por cuatro promotores. El promotor IV controla la transcripción inducida por el IFN- $\gamma$  de CIITA mientras que los promotores I y III conducen, respectivamente, la expresión constitutiva de CIITA en las células dendríticas y en los linfocitos B. En humanos el polimorfismo -168A-G del promotor III de CIITA ha sido asociado con diferentes niveles de expresión de las moléculas HLA de clase II. La respuesta a IFN- $\gamma$  del gen CIITA esta mediada por la fosforilación de STAT-1, el cual induce la transcripción del factor-1 de regulación del IFN (IRF-1) y la unión de ambos junto a USF-1 sobre el promotor IV.

**Material y método:** El cultivo celular de las 42 líneas celulares estudiadas se realizo en condiciones idénticas a las descritas en los trabajos anteriores. El estudio de la expresión constitutiva e inducible con IFN- $\gamma$  (800U/ml, durante 48h) de las moléculas HLA de clase II se realizó mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando anticuerpos monoclonales frente HLA-DR, HLA-DP y HLA-DQ. Genotipado del polimorfismo -1668A-G del promotor III de CIITA mediante PCR. La expresión transcripcional de

CIITA fue estudiada en un TaqMan Gene Expresión Assay utilizando una sonda CIITA. Los resultados fueron analizados en el sistema de PCR a tiempo real ABI PRISM 7500 utilizando el 7500 Fast System Software1.3.1.

**Resultados:** Más de la mitad de las líneas de melanoma estudiadas (24 líneas celulares) no presentaron expresión constitutiva de HLA-DP, HLA-DQ y HLA-DR. En las restantes líneas celulares la expresión constitutiva de HLA-DR y HLA-DP era mayor que la de HLA-DQ. De las líneas sin expresión constitutiva de moléculas HLA de clase II la mitad no recuperaron la expresión tras el tratamiento con IFN- $\gamma$ , mientras que el resto recuperaron mayoritariamente la expresión de HLA-DR y HLA-DP, mientras que tan sólo una de estas líneas celulares recuperó la expresión de HLA-DQ. Todas las líneas celulares con expresión constitutiva de HLA-DP, HLA-DR y HLA-DQ vieron aumentada su expresión tras el tratamiento con IFN- $\gamma$  y tan sólo dos de las líneas de melanoma sin expresión constitutiva de HLA-DQ recuperaron la expresión tras el tratamiento con IFN- $\gamma$ . Encontramos una correlación significativa entre el nivel transcripcional de CIITA y la media de fluorescencia de HLA-DR, de modo que a mayor expresión transcripcional de CIITA existía una mayor expresión en superficie de HLA-DR. Además constatamos como la sustitución A  $\rightarrow$  G en el extremo 5' del promotor III de CIITA estaba asociada a una mayor expresión constitutiva de HLA-DR.

Immunogenetics (2007) 59:123–133  
DOI 10.1007/s00251-006-0171-9

ORIGINAL PAPER

## Patterns of constitutive and IFN- $\gamma$ inducible expression of HLA class II molecules in human melanoma cell lines

T. Rodríguez · R. Méndez · A. Del Campo ·  
N. Aptsiauri · J. Martín · G. Orozco · G. Pawelec ·  
D. Schadendorf · F. Ruiz-Cabello · F. Garrido

Received: 21 July 2006 / Accepted: 19 October 2006 / Published online: 20 December 2006  
© Springer-Verlag 2006

**Abstract** Major histocompatibility complex (MHC) class II proteins (HLA-DR, HLA-DP and HLA-DQ) play a fundamental role in the regulation of the immune response. The level of expression of human leukocyte antigen (HLA) class II antigens is regulated by interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) and depends on the status of class II trans-activator protein (CIITA), a co-activator of the MHC class II gene promoter. In this study, we measured levels of constitutive and IFN- $\gamma$ -induced expression of MHC class II molecules, analysed the expression of CIITA and investigated the association between MHC class II transactivator polymorphism and expression of different MHC class II molecules in a large panel of melanoma cell lines obtained from the European

Searchable Tumour Cell Line Database. Many cell lines showed no constitutive expression of HLA-DP, HLA-DQ and HLA-DR and no IFN- $\gamma$ -induced increase in HLA class II surface expression. However, in some cases, IFN- $\gamma$  treatment led to enhanced surface expression of HLA-DP and HLA-DR. HLA-DQ was less frequently expressed under basal conditions and was less frequently induced by IFN- $\gamma$ . In these melanoma cell lines, constitutive surface expression of HLA-DR and HLA-DP was higher than that of HLA-DQ. In addition, high constitutive level of cell surface expression of HLA-DR was correlated with lower inducibility of this expression by IFN- $\gamma$ . Finally, substitution A→G in the 5' flanking region of CIITA promoter type III was associated with higher expression of constitutive HLA-DR ( $p < 0.005$ ). This study yielded a panel of melanoma cell lines with different patterns of constitutive and IFN- $\gamma$ -induced expression of HLA class II that can be used in future studies of the mechanisms of regulation of HLA class II expression.

T. Rodríguez · R. Méndez · A. Del Campo · N. Aptsiauri ·  
F. Ruiz-Cabello · F. Garrido (✉)  
Departamento de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Virgen  
de las Nieves, Universidad de Granada,  
Avda. Fuerzas Armadas 2,  
18014 Granada, Spain  
e-mail: federico.garrido.sspa@juntadeandalucia.es

J. Martín · G. Orozco  
Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra",  
Granada, Spain

G. Pawelec  
Section for Transplantation Immunology  
and Immunohaematology, Zentrum für Medizinische Forschung,  
Waldhörnlestr.22,  
72072 Tübingen, Germany

D. Schadendorf  
Skin Cancer Unit of the German Cancer Research Center,  
University Hospital Mannheim,  
Mannheim, Germany

**Keywords** HLA class II · Melanoma · CIITA ·  
Polymorphism

### Introduction

Major histocompatibility complex (MHC) class I and II products play a central role in immune system function by restricting T cell recognition of foreign antigens (Ags) processed as small peptides. In many cases, the aim of cancer immunotherapy is to stimulate T cell responses against tumour-specific proteins. In the past, CD8<sup>+</sup> cytolytic T lymphocytes (CTLs) were implicated as the main

 Springer

effector cells in anti-tumour T cell responses. Numerous MHC class I-binding peptides derived from tumour-specific Ags have now been identified, and many have been used in clinical trials. Although CTLs can act alone in the effector phase of the immune response, it has become clear that priming of naive CD8+ T cells by antigen-presenting cells (APCs), including dendritic cells (DCs) (Bennett et al. 1998) and especially their ability to differentiate into long-lived memory cells, is dependent on “help” from CD4+ T cells. CD4+ T cells that recognize MHC class II-restricted epitopes encoded by cancer Ags, such as NY-ESO-1 (Jager et al. 2000; Zeng et al. 2001), MAGE (Tatsumi et al. 2002), TRP2 (Paschen et al. 2005) and CAMEL (Slager et al. 2003), have been detected in the peripheral blood of cancer patients, strongly suggesting that these tumour Ags are processed and presented in the MHC class II pathway *in vivo*. In cancer patients, however, tumour Ag-specific CD4+ T cells are frequently of the Th2 subtype, producing cytokines such as IL-4, IL-5 and IL-13, whereas IL-2- and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-producing Th1 cells are believed to be required for proper activation of CD8+ effector T cells (Slager et al. 2003; Tatsumi et al. 2002). Therefore, induction of tumour-specific CD4+ Th1 cells should be also addressed in the development of immunotherapy for cancer. Mature DCs that express high levels of MHC and costimulatory molecules are required for the induction of Th1 immunity and potent CD8+ T cell-mediated anti-tumour responses.

MHC class II molecules are transmembrane glycoproteins found primarily at the surface of specialized cells of the immune system. They are heterodimeric molecules composed of  $\alpha$  and  $\beta$  chains encoded by separate A and B genes. In humans, there are three types of MHC-II dimers called HLA-DR, HLA-DP and HLA-DQ. All MHC-II genes are clustered together in the class II region of the MHC locus on the short arm of chromosome 6 (Krawczyk and Reith 2006). Their expression is largely restricted to thymic epithelial cells (TECs) and to cells specialized in the capture and presentation of extracellular antigens (APCs) such as B cells, cells of monocyte-macrophage lineage and DCs (Reith et al. 2005). There are two general cell-type-specific modes of MHC-II expression: constitutive and inducible. Constitutive expression is mainly restricted to TECs and APCs. Other types of cells do not usually express MHC-II molecules, although they can often be induced to express MHC-II molecules after exposure to IFN- $\gamma$  and other cytokines. Both constitutive and inducible MHC-II expression can be modulated in a cell-type-specific manner by various secondary stimuli.

The major regulator of MHC class II expression is class II trans-activator protein (CIITA). CIITA creates the scaffold required for a correct conformation of the MHC class II gene promoters and their transcriptional activation (Zhu et al. 2000) and activates both constitutive and

inducible transcription of human leukocyte antigen (HLA) class II genes (Harton and Ting 2000; Steimle et al. 1993). CIITA is normally driven by four different cell-type-specific and inducible promoters: pI, pII, pIII and pIV (Muhlethaler-Mottet et al. 1997). pI is constitutively active in conventional DCs but can also be activated by IFN- $\gamma$  in monocytes, macrophages and microglial cells. pIII is used preferentially by B cells, activated human T cells and plasmacytoid DCs. pIV is activated in TECs and responds to stimulation by IFN- $\gamma$  in various cell types (Krawczyk and Reith 2006). In humans, a -168A-G polymorphism in the type III promoter of MHC class II transactivator (MHC2TA) has been associated with differential MHC class II expression (Swanberg et al. 2005).

There is considerable information on the distribution of MHC class I antigens in human tissues (Garrido et al. 1993, 1997; Garcia-Lora et al. 2001; Piskurich et al. 1999) but much less on the distribution of MHC class II antigens. The objectives of the present study were to investigate the patterns of constitutive and inducible expression of HLA class II and to explore the association of the transcription level of CIITA and polymorphism of CIITA promoter III with the expression of different MHC class II molecules in a panel of melanoma cell lines.

## Materials and methods

### Cell lines and cell culture

Cell lines were obtained from the European Searchable Tumour Cell Line Database (ESTDAB project, contract no. QLRI-CT-2001-01325, <http://www.ebi.ac.uk/ipd/estdab>; Pawelec and Marsh 2006). Samples were frozen in fetal calf serum (FCS) with dimethyl sulfoxide and stored in liquid nitrogen until used in experiments. Melanoma cell lines were grown in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium (Biochrom KG, Berlin, Germany) supplemented with 10% FCS (Gibco BRL, Life Technologies, Karlsruhe, Germany), 2% glutamine (Biochrom KG) and 1% penicillin/streptomycin (Biochrom KG) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. To analyse IFN- $\gamma$ -mediated inducibility of HLA class II expression in some experiments, cells were treated with IFN- $\gamma$  (800 U/ml) for 48 h.

Cell surface expression of HLA-DR/DP/DQ was analysed on 42 cell lines. In addition, another group of 78 cell lines was analysed for CIITA-pIII polymorphism. Among them, 40 cell lines with positive constitutive HLA-DR expression were used to study an association of the level of HLA-DR expression and CIITA genotype. Out of the large panel of received melanoma cell lines, we selected an additional group of HLA-DR-positive and -negative mel-



noma cell lines ( $n=40$ ) for analysis of mRNA expression levels of CIITA.

#### HLA II cell surface expression

Surface expression of HLA class II antigens was determined by indirect immunofluorescence using monoclonal antibodies GRB-1 (HLA-DR), B7-21 (HLA-DP) and SPVL3 (HLA-DQ; all from Immunotech, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA) on 42 melanoma cell lines. Cells ( $10^5$ ) were washed three times in phosphate-buffered saline (PBS) then incubated with the monoclonal antibodies for 30 min at 4°C. Excess antibody was removed by washing cells with ice-cold PBS. Cells were stained with 1 µg of fluorescein-isothiocyanate-labelled rabbit anti-mouse-(F(ab')<sub>2</sub>) immunoglobulins (Cappel, West Chester, PA, USA), washed again in PBS and analysed on a FACSort flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA, USA). The results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI).

#### Allelic discrimination PCR

DNA from the melanoma cell lines and 676 healthy controls were isolated using FlexiGene DNA Kit (Qiagen). Single nucleotide polymorphisms (SNPs) of MHC2TA/CIITA (A>G) (rs3087456) isoform III were typed. Genotyping of SNTPs was carried out using a Custom TaqMan SNP Genotyping Assays method (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Minor groove-binding (MGB) probes were labelled with the fluorescent dyes VIC and FAM, respectively. Allelic discrimination using TaqMan® was performed using 10 ng of sample DNA in a 25-µl reaction containing 12.5 µl TaqMan® Universal PCR Mix (Applied Biosystems; PCR, polymerase chain reaction), 300 nM primers and 200 nM TaqMan® MGB probes (Applied Biosystems). Reaction conditions consisted of pre-incubation at 50°C for 2 min, 95°C for 10 min and then cycling for 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 1 min. Amplifications were performed in an ABI Prism 7750 machine (Applied Biosystems) for continuous fluorescence monitoring.

#### Statistical analysis

Data analysis was done using Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 12.0 software. Analysis of the correlation between the MFI of the constitutive expression of HLA-DR and of the transcription level of CIITA was performed using Student's *t*-test. For evaluation of the correlation between HLA-DR expression and CIITA genotype, we employed the analysis of variance and  $T_3$  of Dunnett tests. Genotype frequencies were compared between melanoma cell lines and controls using the Yates corrected Pearson's  $\chi^2$  test for the 2×2 tables of the

Fisher's exact test when appropriate. Odds ratios and corresponding 95% confidence intervals were calculated.

#### RT-PCR analysis

Total cellular RNA was isolated using a Qiagen RNeasy kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. Total RNA (0.5 µg) was subjected to reverse transcription, and one tenth of the reaction mixture was used for PCR analysis. First-strand cDNA was synthesized with 2 µg of total RNA using Sensiscript reverse transcriptase (RT) kit (Qiagen) with 40 U/µl of RNasin (Promega, Madison, WI, USA) and random primers (Promega) in a final volume of 20 µl. The reaction was incubated at 42°C for 60 min and stopped at 95°C for 5 min. Transcriptional expression of CIITA was studied in a TaqMan® Gene Expression Assay using a CIITA probe (Hs001172106\_m1; 5'-ATGCCAA TATCGCGGAACCTGGACCA-3') and beta glucuronidase (GUSB) endogenous controls (Applied Biosystems). Results were analysed in an ABI PRISM 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) with a two-step PCR protocol (95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 92°C for 15 s and 60°C for 1 min) using 7500 Fast System Software 1.3.1. Expression levels of the CIITA gene were presented relative to GUSB levels.

## Results

### Constitutive expression of HLA class II in melanoma cell lines

Analysis of the distribution of different patterns of constitutive HLA class II expression (DR/DP/DQ isotypes) in 42 melanoma cell lines revealed that a large number of the cell lines ( $n=24$ ) were negative for HLA-DP, HLA-DQ and HLA-DR (Table 1), whereas eight cell lines were positive for all three isotypes (Table 1). In addition, other eight cell lines were positive only for HLA-DR and HLA-DP but negative for HLA-DQ (Table 1). Finally, two cell lines were positive only for HLA-DP (ESTDAB-133 and ESTDAB-070; Table 1).

### IFN- $\gamma$ -induced expression of HLA class II in melanoma cell lines

Out of 24 melanoma cell lines with no constitutive expression of all of the three HLA class II isoforms, 9 cell lines showed induced expression of only DR and DP isoforms, whereas in 12 cell lines, IFN- $\gamma$  treatment failed to induce any of class-II isoforms. In two melanoma cell lines, ESTDAB-140 and ESTDAB-073, only HLA-DR expression was increased in



**Table 1** Patterns of constitutive and IFN- $\gamma$  inducible expression in ESTDAB melanoma cell lines

Basal cell lines	HLA-DR	HLA-DP	HLA-DQ	IFN- $\gamma$ treatment			
				HLA-DR	HLA-DP	HLA-DQ	
<b>A (n=24)</b>							
ESTDAB-004	-	-	-	-	-	-	
ESTDAB-159	-	-	-	-	-	-	
ESTDAB-038	-	-	-	-	-	-	
ESTDAB-109	-	-	-	-	-	-	
ESTDAB-049	-	-	-	-	-	-	
ESTDAB-081	-	-	-	-	-	-	n=12
ESTDAB-094	-	-	-	-	-	-	
ESTDAB-127	-	-	-	-	-	-	
ESTDAB-195	-	-	-	-	-	-	
ESTDAB-179	-	-	-	-	-	-	
ESTDAB-048	-	-	-	-	-	-	
ESTDAB-102	-	-	-	-	-	-	
ESTDAB-199	-	-	-	+	+	-	
ESTDAB-084	-	-	-	+	+	-	
ESTDAB-110	-	-	-	+	+	-	
ESTDAB-112	-	-	-	+	+	-	
ESTDAB-196	-	-	-	+	+	-	n=9
ESTDAB-200	-	-	-	+	+	-	
ESTDAB-146	-	-	-	+	+	-	
ESTDAB-020	-	-	-	+	+	-	
ESTDAB-069	-	-	-	+	+	-	
ESTDAB-162	-	-	-	+	+	+	n=1
ESTDAB-140	-	-	-	+	-	-	n=2
ESTDAB-073	-	-	-	+	-	-	
<b>B (n=8)</b>							
ESTDAB-152	+	+	+	++	++	++	n=8
ESTDAB-136	+	+	+	++	++	++	
ESTDAB-137	+	+	+	+	++	++	
ESTDAB-183	+	+	+	++	++	++	
ESTDAB-108	+	+	+	++	++	++	
ESTDAB-016	+	+	+	++	++	++	
ESTDAB-130	+	+	+	++	++	++	
ESTDAB-167	+	+	+	++	++	++	
<b>C (n=8)</b>							
ESTDAB-071	+	+	-	++	++	-	n=7
ESTDAB-206	+	+	-	++	++	-	
ESTDAB-058	+	+	-	++	++	-	
ESTDAB-153	+	+	-	++	++	-	
ESTDAB-184	+	+	-	++	++	-	
ESTDAB-041	+	+	-	++	++	-	
ESTDAB-074	+	+	-	++	++	-	
ESTDAB-129	+	+	-	++	++	++	n=1
<b>D (n=2)</b>							
ESTDAB-070	-	+	-	+	++	-	n=1
ESTDAB-133	-	+	-	+	++	+	n=1

response to IFN- $\gamma$ . Finally, in just one melanoma cell line, ESTDAB-162, IFN- $\gamma$  induced the expression of all three HLA class II isotypes (Table 1; Fig. 1).

All melanoma cell lines constitutively expressing HLA-DP, HLA-DQ and HLA-DR (n=8) were found to respond

to IFN- $\gamma$  treatment by increasing the level of expression of all three isoforms (Table 1).

Among cell lines with constitutive HLA-DP and HLA-DR expression and negative HLA-DQ expression (n=8), seven cell lines showed a further increase in HLA-DP and

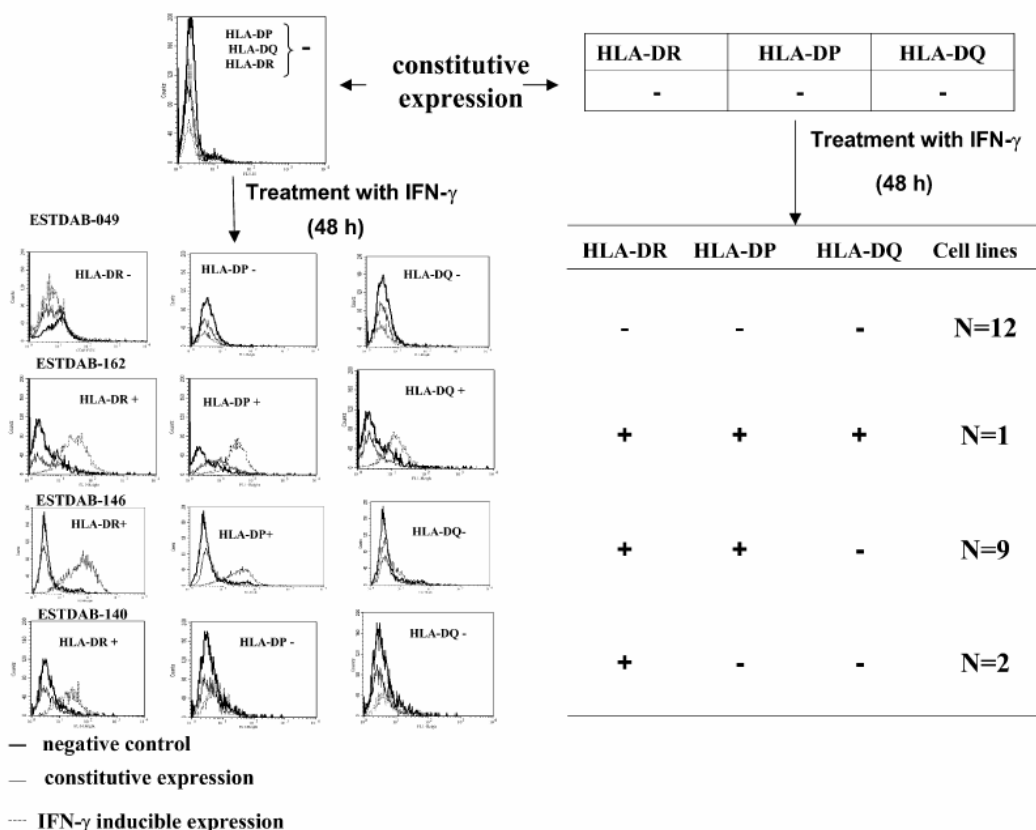


Fig. 1 Effect of IFN- $\gamma$  (48-h treatment) on the HLA class II expression on cell surface of melanoma cells with negative constitutive expression of HLA-DR/DP/DQ. Half of these cell lines (12 out of 24) did not respond to IFN- $\gamma$  treatment, nine cell lines showed IFN- $\gamma$ -

induced expression of HLA-DP and HLA-DR, two cell lines showed induction only of HLA-DR and only one cell line responded to IFN- $\gamma$  treatment by increased expression of all three HLA class II isotypes

HLA-DR after IFN- $\gamma$  treatment, although only one, ESTDAB-129, responded to IFN- $\gamma$  with augmented expression of all of these isotypes (Table 1; Fig. 2).

Two cell lines, ESTDAB-133 and ESTDAB-070, which constitutively expressed only HLA-DP, showed different patterns of IFN- $\gamma$ -induced MHC class II expression. Treatment of ESTDAB-133 with IFN- $\gamma$  led to upregulation of HLA-DP, HLA-DR and HLA-DQ class-II subsets, whereas in ESTDAB-070, only HLA-DP and HLA-DR were upregulated by IFN- $\gamma$  (Table 1; Fig. 3).

In summary, increased expression of different HLA class II isotypes in response to IFN- $\gamma$  treatment showed the following hierarchy: HLA-DR > HLA-DP > HLA-DQ. The increased level of HLA class II molecules after IFN- $\gamma$  treatment was lower in melanoma cell lines with a high level

of HLA class II basal expression and higher in the melanoma cell lines with a low basal level of these molecules.

#### Correlation between HLA-DR surface expression and CIITA transcription level

We compared CIITA mRNA expression and HLA-DR cell surface expression in 40 melanoma cell lines. The MFI value was used to calculate the level of HLA-DR cell surface expression. A real-time quantitative RT-PCR was used to calculate CIITA expression. Melanoma cell lines were divided between those with low HLA-DR MFI (MFI<100, 28 cell lines) and those with high HLA-DR MFI (MFI>100, 12 cell lines). HLA-DR cell surface expression was found to be significantly

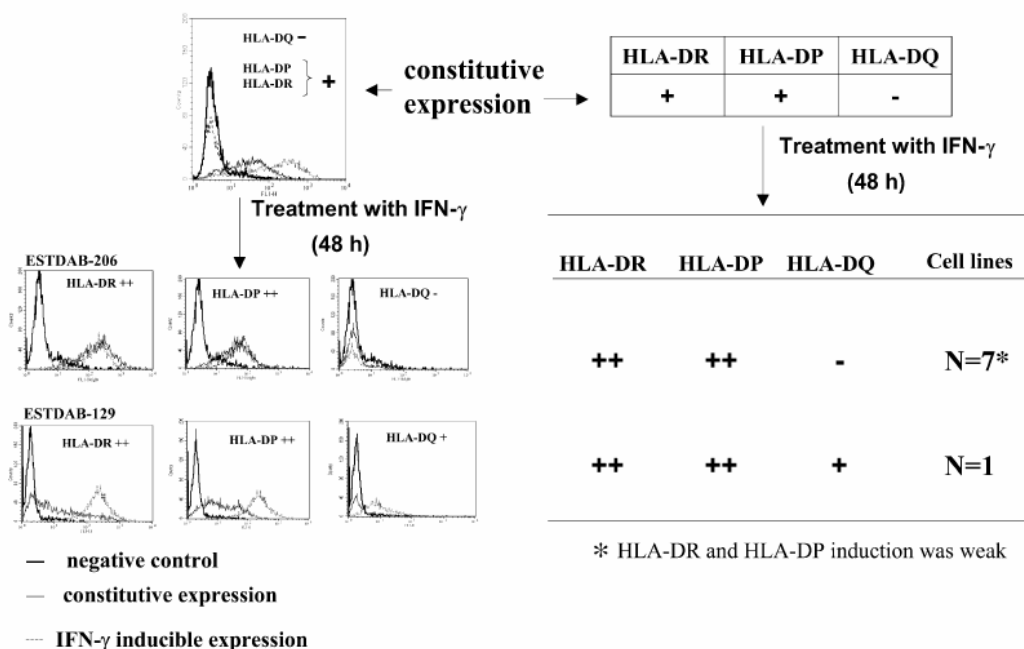


Fig. 2 Effect of IFN- $\gamma$  (48-h treatment) on cell surface expression of HLA class II on melanoma cell lines with constitutive expression of HLA-DR and -DP ( $n=8$ ). Seven cell lines responded to IFN- $\gamma$  with an

increase only in HLA-DR and HLA-DP expression, whereas one cell line showed an IFN- $\gamma$ -induced increase in the expression of all three isotypes

correlated with CIITA transcription level ( $p=0.042$ ; Fig. 4).

Association between HLA-DR expression and CIITA-pIII polymorphism

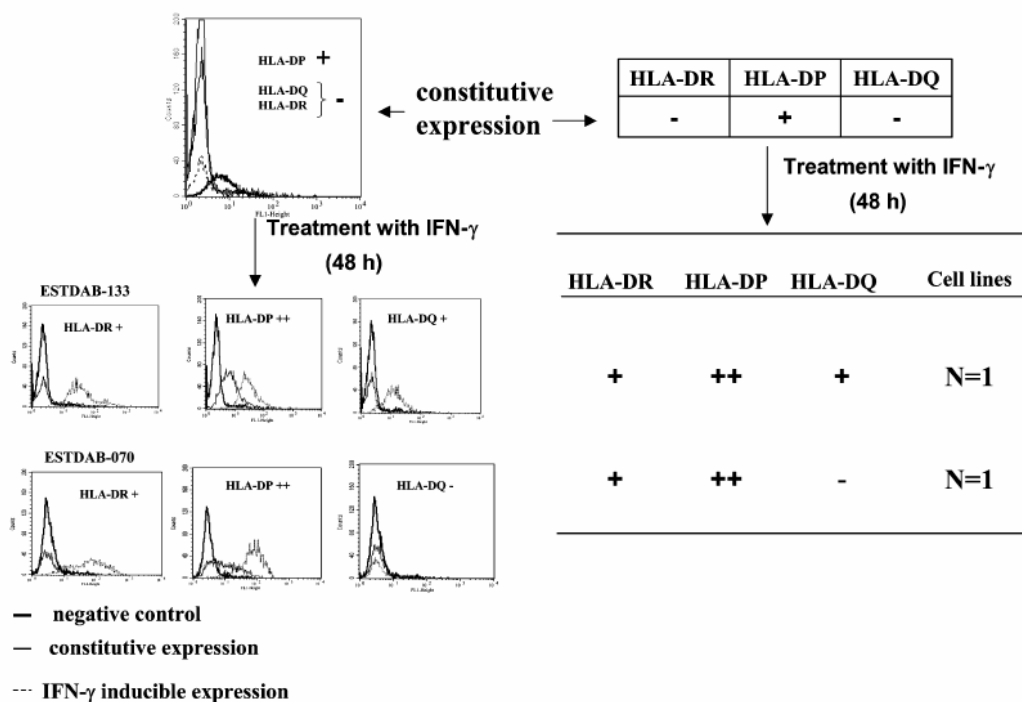
The polymorphism at position 5' flanking region of the type III promoter of CIITA was studied in 40 melanoma cell lines and found to be associated with the level of HLA-DR surface expression in these cell lines. We found that 6 melanoma cell lines with the GG genotype have similar mean value of HLA-DR MFI to 17 melanoma cell lines with the AG genotype, and it is significantly higher than the values found in the remaining 17 cell lines with AA genotype (Fig. 5). A significant difference ( $p=0.020$ ) was found between the HLA-DR MFI of AA genotype (lowest HLA-DR MFI) and AG genotype. However, there was no significant difference ( $p=0.186$ ) between HLA-DR MFI of GG and AA CIITA genotypes (possibly because there were only six melanoma cell lines with GG CIITA genotype). When cases with AG and GG CIITA genotypes (the two genotypes with highest HLA-DR MFI) were considered as one group, the HLA-DR MFI was significantly different from that of the AA CIITA genotype ( $p=0.005$ ). These data

suggest that the presence of G at position -168 of the 5' flanking region of type III CIITA promoter is associated with higher surface-constitutive expression of HLA-DR.

Allele frequencies for SNPs of the type III CIITA promoter were compared between melanoma cell lines and controls ( $n=676$ ), and no significant differences were found (Table 2). Therefore, this polymorphism does not play an important role in melanoma.

Discussion

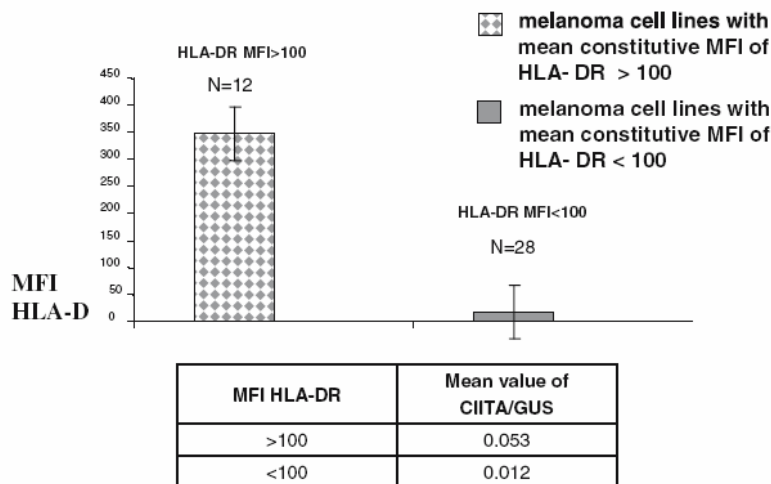
Expression of MHC class II was first reported on human melanoma cell lines by Wilson et al. (1979). Normal melanocytes, unlike Langerhans cells, did not express HLA class II antigens when studied by immunohistochemistry with either light or electron microscopy (van Duinen et al. 1984). Dysplastic nevi may show local expression of HLA class II antigens but only in about 20% of lesions (Bergman et al. 1988; Elder et al. 1989; Holzmann et al. 1987; Ruitter et al. 1982, 1984). HLA class II expression has been reported in 40–70% of primary cutaneous melanomas (Brocker et al. 1985; D'Alessandro et al. 1987; Elder et al. 1989; Holzmann et al. 1987; Ruitter et al. 1984; Thompson et al. 1982;



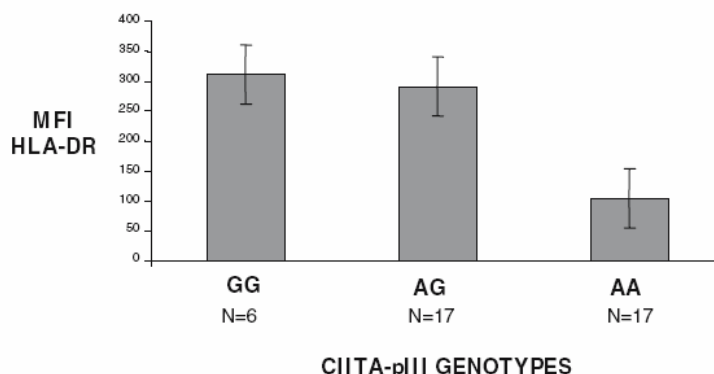
**Fig. 3** Effect of IFN- $\gamma$  (48-h treatment) on cell surface expression of HLA class II on melanoma cell lines with constitutive expression of HLA-DP ( $n=2$ ). One cell line responded to IFN- $\gamma$  with an increase (Zaloudik et al. 1988). The frequency of HLA class II expression in melanoma metastases depends on the stage of the lesion, being observed in around 80% of loco-regional metastases but only 10% of distant cutaneous metastases. In

only in HLA-DR and HLA-DP expression, whereas the remaining one showed IFN- $\gamma$ -induced increase in the expression of all three isotypes the present study, the type of lesions from which the melanoma cell lines had been established was not known. It was observed that constitutive expression of HLA-DR prevails over that of HLA-DP and HLA-DQ, as previously

**Fig. 4** High expression of HLA-DR (MFI>100) correlates with high levels of CIITA transcription (0.053) and vice versa. Total mRNA was isolated from 40 melanoma cell lines to study CIITA transcription level by RT-PCR analysis. In the same melanoma cell lines, HLA-DR constitutive expression was determined by flow cytometry (MFI). MFI Mean fluorescence intensity, CIITA/GUSB mean value of CIITA transcript copy numbers normalized against that of GUSB



**Fig. 5** Association between constitutive HLA-DR expression and CIITA-pIII polymorphism. **a** The mean fluorescence intensity (MFI) for the different CIITA-pIII genotypes. **b** Comparison of HLA-DR MFI between cell lines with CIITA-AA genotype and those with CIITA GG or GA genotypes considered together



CIITA-pIII Genotypes	MFI (±SD) of DR (GG and AG) / DR(AA)	p-value
GG/AG versus AA	296(±48) / 104 (±30)	0.005**

MFI: Mean fluorescence intensity.  
 \* \* Significant difference (p<0.05)  
 N - number of cell lines.

reported (D'Alessandro et al. 1987; van Vreeswijk et al. 1988). An association between HLA-DR expression and favourable prognosis has been observed in breast (Brunner et al. 1991), gastric (Hilton and West 1990) and colorectal carcinomas (Andersen et al. 1993) and squamous cell carcinoma of the larynx (Esteban et al. 1990). In melanoma, however, HLA-DR expression has been correlated with a more aggressive phenotype and high risk of metastasis (Brocker et al. 1985; Concha et al. 1991; Cabrera et al. 1995; Lopez-Nevot et al. 1988).

In our study, all melanoma cell lines that were positive for constitutive expression of HLA-DR were also positive for HLA-DP but not for HLA-DQ. Only two melanoma cell lines with constitutive expression of HLA-DP did not have constitutive expression of HLA-DR. The low frequency of HLA-DQ expression and low frequency of its induction by IFN-γ may be explained by a CIITA-independent pathway

of expression of this isoform (Douhan et al. 1997; Ono et al. 1991).

IFN-γ induction of the CIITA gene is mediated by phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1), which promotes transcription of IFN regulatory factor-1 (IRF-1) and binding of both IRF-1 and STAT1 in association with upstream transcription factor 1 on proximal promoter IV (Muhlethaler-Mottet et al. 1998; Piskurich et al. 1999). We observed that 50% of melanoma cell lines (12 out of 24 cell lines) without constitutive HLA class II expression did not increase class II surface expression after IFN-γ treatment. This finding may be explained by a loss of CIITA expression resulting from DNA methylation (Holling et al. 2004; Morimoto et al. 2004; Nie et al. 2001; Satoh et al. 2004; van den Elsen et al. 2000; van der Stoep et al. 2002). CIITA is directly controlled by an IFN-γ-mediated signalling pathway involving JAK/STAT proteins. Therefore, defects in STAT1 activation might affect CIITA expression. Loss of STAT1 may prevent IFN-γ-induced HLA class II upregulation in these melanoma cell lines, similar to previous findings from our laboratory in a gastric adenocarcinoma cell line (Abril et al. 1998).

CIITA was originally identified by cloning a gene with a null mutation in hereditary MHC class II deficient (bare lymphocyte) syndrome (Steimle et al. 1993). It is a global regulator of the expression of proteins involved in antigen presentation and processing including MHC class II, CD74, HLA-DM and MHC class I molecules (Chang and Flavell

**Table 2** Allele frequencies for SNPs of the type III CIITA promoter between melanoma cell lines and controls

MHC2TA	Patients, n=78 (%)	Healthy controls, n=676 (%)	P	OR
AA	35 (44.9)	356 (52.7)	0.19	0.73
AG	35 (44.9)	274 (40.5)	0.46	1.19
GG	8 (10.2)	46 (6.8)	0.26	1.57
A	105 (67)	986 (72.9)	0.13	0.76
G	51 (33)	366 (27.1)	0.13	1.13



1995; Chang et al. 1996; Kern et al. 1995; Nagarajan et al. 2002). We found a significant relationship between CIITA transcription level and HLA-DR constitutive surface expression on melanoma cell lines. Thus, melanoma cell lines with higher CIITA transcription had higher HLA-DR constitutive surface expression and vice versa. Earlier studies had reported that MHC class II expression in melanoma cells can be related to constitutive expression of CIITA, which mediates both constitutive and IFN- $\gamma$ -inducible MHC class II expression in all other cell types (Goodwin et al. 2001). Furthermore, transgenic CIITA-deficient mice are totally devoid of cells expressing MHC class II molecules except for a subset of TECs (Chang et al. 1996).

The presence of distinct CIITA haplotypes across inbred strains of mice that differ in degree of MHC class II expression is consistent with the hypothesis that these differences in expression are produced by valuable functional polymorphisms in the 5' flanking region of CIITA (Swanberg et al. 2005). In the present study, CIITA promoter-III polymorphism was related to differential expression of HLA-DR. Thus, the presence of G (GG/AG genotypes) at position -168 of 5' flanking region of type III of CIITA promoter was significantly associated with a high level of HLA-DR constitutive expression. In addition, we observed that melanoma cell lines with the highest expression of HLA-DR demonstrate the lowest response after IFN- $\gamma$  treatment. All this taken together suggests that, possibly, a substitution of -168A to G in the studied CIITA promoter SNP could be associated with low inducibility of HLA II to IFN- $\gamma$ . These results are in agreement with the observations of other groups done in peripheral blood cells, where A→G substitution in 5' flanking region of type III promoter of CIITA was associated with a lower induction of class II genes (Swanberg et al. 2005).

Finally, this study yielded a panel of melanoma cell lines with different patterns of constitutive and IFN- $\gamma$ -induced expression of HLA class II that can be used in future investigations of the mechanisms of regulation of HLA class II expression.

**Acknowledgment** We would like to thank Mrs. Carmen Amezcua and Mrs. Josefa Rivas for technical assistance and R. Davies for improving the use of English in the manuscript.

This work was supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Red Genómica del Cáncer (C03/10), Plan Andaluz de Investigación, Servicio Andaluz de Salud (SAS) in Spain and from the European Searchable Tumour Cell Line Database (ESTDAB project, contract no. QLRI-CT-2001-01325; <http://www.ebi.ac.uk/ipd/estdab>).

## References

Abril E, Real LM, Serrano A, Jimenez P, García A, Canton J, Trigo I, Garrido F, Ruiz-Cabello F (1998) Unresponsiveness to interferon

associated with STAT1 protein deficiency in a gastric adenocarcinoma cell line. *Cancer Immunol Immunother* 47:113–120

Andersen SN, Rognum TO, Lund E, Meling GI, Hauge S (1993) Strong HLA-DR expression in large bowel carcinomas is associated with good prognosis. *Br J Cancer* 68:80–85

Bennett SR, Carbone FR, Karamalis F, Flavell RA, Miller JF, Heath WR (1998) Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature* 393:478–480

Bergman W, Ruiters DJ, Scheffer E, van Vloten WA (1988) Melanocytic atypia in dysplastic nevi. Immunohistochemical and cytophotometrical analysis. *Cancer* 61:1660–1666

Brocker EB, Suter L, Bruggen J, Ruiters DJ, Macher E, Sorg C (1985) Phenotypic dynamics of tumor progression in human malignant melanoma. *Int J Cancer* 36:29–35

Brunner CA, Gokel JM, Riethmuller, Johnson JP (1991) Expression of HLA-D subloci DR and DQ by breast carcinomas is correlated with distinct parameters of favourable prognosis. *Eur J Cancer* 27:411–416

Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F (1995) Biological implications of HLA-DR expression in tumors. *Scand J Immunol* 41:398–406

Chang CH, Flavell RA (1995) Class II transactivator regulates the expression of multiple genes involved in antigen presentation. *J Exp Med* 181:765–767

Chang CH, Guelder S, Hong SC, van Ewijk W, Flavell RA (1996) Mice lacking the MHC class II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression. *Immunity* 4:167–178

Concha A, Esteban F, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F (1991) Tumor aggressiveness and MHC class I and II antigens in laryngeal and breast cancer. *Semin Cancer Biol* 2:47–54

D'Alessandro G, Zardawi I, Grace J, McCarthy WH, Hersey P (1987) Immunohistological evaluation of MHC class I and II antigen expression on nevi and melanoma: relation to biology of melanoma. *Pathology* 19:339–346

Douhan J, Lieberman R, Knoll JH, Zhou H, Glimcher LH (1997) An isotype-specific activator of major histocompatibility complex (MHC) class II genes that is independent of class II transactivator. *J Exp Med* 185:1885–1895

Elder DE, Rodeck U, Thurin J, Cardillo F, Clark WH, Stewart R, Herlyn M (1989) Antigenic profile of tumor progression stages in human melanocytic nevi and melanomas. *Cancer Res* 49:5091–5096

Esteban F, Ruiz-Cabello F, Concha A, Perez-Ayala M, Sanchez-Rozas JA, Garrido F (1990) HLA-DR expression is associated with excellent prognosis in squamous cell carcinoma of the larynx. *Clin Exp Metastasis* 8:319–328

García-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* 91:109–119

Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern PL (1993) Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* 14:491–499

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

Goodwin BL, Xi H, Tejiram R, Eason DD, Ghosh N, Wright KL, Nagarajan U, Boss JM, Blanck G (2001) Varying functions of specific major histocompatibility class II transactivator promoter III and IV elements in melanoma cell lines. *Cell Growth Differ* 12:327–335

Harton JA, Ting JP (2000) Class II transactivator: mastering the art of major histocompatibility complex expression. *Mol Cell Biol* 20:6185–6194

- Hilton DA, West KP (1990) An evaluation of the prognostic significance of HLA-DR expression in gastric carcinoma. *Cancer* 66:1154–1157
- Holling TM, Schooten E, Langerak AW, van den Elsen PJ (2004) Regulation of MHC class II expression in human T-cell malignancies. *Blood* 103:1438–1444
- Holzmann B, Brocker EB, Lehmann JM, Ruiter DJ, Sorg C, Riethmuller G, Johnson JP (1987) Tumor progression in human malignant melanoma: five stages defined by their antigenic phenotypes. *Int J Cancer* 39:466–471
- Jager E, Gnjatic S, Nagata Y, Stockert E, Jager D, Karbach J, Neumann A, Rieckenberg J, Chen YT, Ritter G, Hoffman E, Arand M, Old LJ, Knuth A (2000) Induction of primary NY-ESO-1 immunity: CD8+ T lymphocyte and antibody responses in peptide-vaccinated patients with NY-ESO-1+ cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:12198–12203
- Kern I, Steimle V, Siegrist CA, Mach B (1995) The two novel MHC class II transactivators RFX5 and CIITA both control expression of HLA-DM genes. *Int Immunol* 7:1295–1299
- Krawczyk M, Reith W (2006) Regulation of MHC class II expression, a unique regulatory system identified by the study of a primary immunodeficiency disease. *Tissue Antigens* 67:183–197
- Lopez-Nevot MA, Garcia E, Romero C, Oliva MR, Serrano S, Garrido F (1988) Phenotypic and genetic analysis of HLA class I and HLA-DR antigen expression on human melanomas. *Exp Clin Immunogenet* 5:203–212
- Morimoto Y, Toyota M, Satoh A, Murai M, Mita H, Suzuki H, Takamura Y, Ikeda H, Ishida T, Sato N, Tokino T, Imai K (2004) Inactivation of class II transactivator by DNA methylation and histone deacetylation associated with absence of HLA-DR induction by interferon-gamma in haematopoietic tumour cells. *Br J Cancer* 90:844–852
- Muhlethaler-Mottet A, Otten LA, Steimle V, Mach B (1997) Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *EMBO J* 16:2851–2860
- Muhlethaler-Mottet A, Di Berardino W, Otten LA, Mach B (1998) Activation of the MHC class II transactivator CIITA by interferon-gamma requires cooperative interaction between Stat1 and USF-1. *Immunity* 8:157–166
- Nagarajan UM, Bushey A, Boss JM (2002) Modulation of gene expression by the MHC class II transactivator. *J Immunol* 169:5078–5088
- 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* 22:1615–1623
- Ono SJ, Bazil V, Sugawara M, Strominger JL (1991) An isotype-specific trans-acting factor is defective in a mutant B cell line that expresses HLA-DQ, but not -DR or -DP. *J Exp Med* 173:629–637
- Paschen A, Song M, Osen W, Nguyen XD, Mueller-Berghaus J, Fink D, Daniel N, Donzeau M, Nagel W, Kropshofer H, Schadendorf D (2005) Detection of spontaneous CD4+ T-cell responses in melanoma patients against a tyrosinase-related protein-2-derived epitope identified in HLA-DRB1\*0301 transgenic mice. *Clin Cancer Res* 11:5241–5247
- Pawelec G, Marsh SG (2006) ESTDAB: a collection of immunologically characterised melanoma cell lines and searchable databank. *Cancer Immunol Immunother* 55:623–627
- Piskurich JF, Linhoff MW, Wang Y, Ting JP (1999) Two distinct gamma interferon-inducible promoters of the major histocompatibility complex class II transactivator gene are differentially regulated by STAT1, interferon regulatory factor 1, and transforming growth factor beta. *Mol Cell Biol* 19:431–440
- Reith W, LeibundGut-Landmann S, Waldburger JM (2005) Regulation of MHC class II gene expression by the class II transactivator. *Nat Rev Immunol* 5:793–806
- Ruiter DJ, Bhan AK, Harnist TJ, Sober AJ, Mihm MC Jr (1982) Major histocompatibility antigens and mononuclear inflammatory infiltrate in benign nevocellular proliferations and malignant melanoma. *J Immunol* 129:2808–2815
- Ruiter DJ, Bergman W, Welvaart K, Scheffer E, van Vloten WA, Russo C, Ferrone S (1984) Immunohistochemical analysis of malignant melanomas and nevocellular nevi with monoclonal antibodies to distinct monomorphic determinants of HLA antigens. *Cancer Res* 44:3930–3935
- Satoh A, Toyota M, Ikeda H, Morimoto Y, Akino K, Mita H, Suzuki H, Sasaki Y, Kanaseki T, Takamura Y, Soejima H, Urano T, Yanagihara K, Endo T, Hinoda Y, Fujita M, Hosokawa M, Sato N, Tokino T, Imai K (2004) Epigenetic inactivation of class II transactivator (CIITA) is associated with the absence of interferon-gamma-induced HLA-DR expression in colorectal and gastric cancer cells. *Oncogene* 23:8876–8886
- Slager EH, Borghi M, van der Minne CE, Aamoudse CA, Havenga MJ, Schrier PI, Osanto S, Griffioen M (2003) CD4+ Th2 cell recognition of HLA-DR-restricted epitopes derived from CAM-EL: a tumor antigen translated in an alternative open reading frame. *J Immunol* 170:1490–1497
- Steimle V, Otten LA, Zufferey M, Mach B (1993) Complementation cloning of an MHC class II transactivator mutated in hereditary MHC class II deficiency (or bare lymphocyte syndrome). *Cell* 75:135–146
- Swanberg M, Lidman O, Padyukov L, Eriksson P, Akesson E, Jagodic M, Lobell A, Khademi M, Borjesson O, Lindgren CM, Lundman P, Brookes AJ, Kere J, Luthman H, Alfredsson L, Hillert J, Klareskog L, Hamsten A, Piehl F, Olsson T (2005) MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. *Nat Genet* 37:486–494
- Tatsumi T, Kierstead LS, Ranieri E, Gesualdo L, Schena FP, Finke JH, Bukowski RM, Mueller-Berghaus J, Kirkwood JM, Kwok WW, Storkus WJ (2002) Disease-associated bias in T helper type 1 (Th1)/Th2 CD4(+) T cell responses against MAGE-6 in HLA-DRB10401(+) patients with renal cell carcinoma or melanoma. *J Exp Med* 196:619–628
- Thompson JJ, Herlyn MF, Elder DE, Clark WH, Steplewski Z, Koprowski H (1982) Use of monoclonal antibodies in detection of melanoma-associated antigens in intact human tumors. *Am J Pathol* 107:357–361
- van den Elsen PJ, van der Stoep N, Vietor HE, Wilson L, van Zutphen M, Gobin SJ (2000) Lack of CIITA expression is central to the absence of antigen presentation functions of trophoblast cells and is caused by methylation of the IFN-gamma inducible promoter (PIV) of CIITA. *Hum Immunol* 61:850–862
- van der Stoep N, Biesta P, Quinten E, van den Elsen PJ (2002) Lack of IFN-gamma-mediated induction of the class II transactivator (CIITA) through promoter methylation is predominantly found in developmental tumor cell lines. *Int J Cancer* 97:501–507
- van Duinen SG, Mauw BJ, de Graaff-Reitsma CB, Ruiter DJ (1984) Methods in laboratory investigation. Immunoelectron microscopic methods for demonstration of antigens on normal human melanocytes and other epidermal cells. *Lab Invest* 50:733–741
- van Vreeswijk H, Ruiter DJ, Brocker EB, Welvaart K, Ferrone S (1988) Differential expression of HLA-DR, DQ, and DP antigens in primary and metastatic melanoma. *J Invest Dermatol* 90:755–760
- Wilson BS, Indiveri F, Pellegrino MA, Ferrone S (1979) DR (Ia-like) antigens on human melanoma cells. Serological detection and immunochemical characterization. *J Exp Med* 149:658–668

- Zaloudik J, Moore M, Ghosh AK, Mechl Z, Rejthar A (1988) DNA content and MHC class II antigen expression in malignant melanoma: clinical course. *J Clin Pathol* 41:1078–1084
- Zeng G, Wang X, Robbins PF, Rosenberg SA, Wang RF (2001) CD4 (+) T cell recognition of MHC class II-restricted epitopes from NY-ESO-1 presented by a prevalent HLA DP4 allele: association with NY-ESO-1 antibody production. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:3964–3969
- Zhu XS, Linhoff MW, Li G, Chin KC, Maity SN, Ting JP (2000) Transcriptional scaffold: CIITA interacts with NF- $\kappa$ B, RFX, and CREB to cause stereospecific regulation of the class II major histocompatibility complex promoter. *Mol Cell Biol* 20:6051–6061





## **DIFERENTES MECANISMOS QUE PUEDEN CONDUCIR AL MISMO FENOTIPO HLA DE CLASE I ALTERADO EN TUMORES.**

**Introducción:** La eliminación por parte de los linfocitos T citotóxicos CD8<sup>+</sup> de las células tumorales requiere de la presentación de los antígenos tumorales por las moléculas MHC de clase I. Las células T efectoras especializadas reconocen estos péptidos asociados con las MHC-I y ejercen su efecto citotóxico mediante la inducción de apoptosis en la célula tumoral. Por lo tanto las moléculas HLA de clase I juegan un papel crucial en la interacción de las células tumorales con el sistema inmune. Las células tumorales han desarrollado numerosos mecanismos para evadir la respuesta inmune entre los que se encuentran la alteración de la expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I, que puede ir desde la pérdida o la baja regulación total de estas moléculas a la pérdida selectiva de un alelo o haplotipo HLA. Todos estos datos ponen de manifiesto la importancia de conocer los diferentes mecanismos moleculares responsables de estas alteraciones con el objeto de intentar revertirlas.

**Material y métodos:** La aproximación experimental de esta revisión esta basada en técnicas ampliamente utilizadas en nuestro laboratorio algunas de las cuales ya han sido descritas en los trabajos anteriores. Se ha utilizado técnicas para explicar la pérdida total de expresión de las moléculas HLA de clase I como son la secuenciación del ADNc de la  $\beta 2m$ , estudio de marcadores de microsatélites del cromosoma 15, amplificación del DNAc de los genes TAP1 y TAP2 y estudios de metilación génica así como técnicas para explicar la baja regulación total de las moléculas HLA de clase I mediante el estudio de los niveles de expresión transcripcional de la maquinaria de procedimiento antigénico (APM).

**Resultados:** En esta revisión mostramos los diferentes mecanismos moleculares que causan la pérdida o baja regulación total de las moléculas HLA de clase I (fenotipo Ia y Ib). La pérdida total de las moléculas HLA de clase I (fenotipo Ia) puede deberse a mutaciones en ambas copias del gen de la  $\beta 2m$ , a la mutación en una de las copias del gen de la  $\beta 2m$  y la pérdida de la otra copia asociada con la pérdida de heterocigosidad (LOH) en el cromosoma 15, a la mutación del transportador asociado con el procesamiento antigénico (TAP), a la hipermetilación de los genes MHC de clase I o a defectos en el transporte de la cadena pesada de las moléculas de HLA a la superficie. Por su parte la baja regulación total de las moléculas HLA de clase I (fenotipo Ib) puede deberse aun a baja regulación de algunos de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico (LMP-7 y TAP-2 en carcinoma colorectal), a una baja regulación coordinada de la cadena pesada,  $\beta 2m$  y los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM) o puede ser una baja regulación total asociada a la resistencia a IFN- $\gamma$  como la mostrada por dos líneas celulares de melanoma.

## Different mechanisms can lead to the same altered HLA class I phenotype in tumors

T. Rodríguez<sup>1</sup>, N. Aptsiauri<sup>1</sup>, R. Méndez<sup>1</sup>, P. Jimenez<sup>1</sup>, F. Ruiz-Cabello<sup>1,2</sup> & F. Garrido<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Biología Molecular 3 e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain

### Key words

cancer diagnostics and therapy; human leukocyte antigen class I; immune escape; molecular mechanism; tumor

### Correspondence

Federico Garrido  
Hospital Universitario Virgen de las Nieves  
Dept. de Análisis Clínicos  
Avd. Fuerzas Armadas 2  
18014 Granada  
Spain  
Tel: 34 958 020319  
Fax: 34 958 283147  
e-mail:  
federico.garrido.sspa@juntadeandalucia.es

doi: 10.1111/j.1399-0039.2006.00776.x

### Abstract

Human leukocyte antigen (HLA) class I plays an important role in tumor recognition and rejection. Total or selective losses of HLA class I antigens (classified into seven HLA class I altered phenotypes) represent one of the main routes of tumor escape from immune surveillance. Abnormal expression of HLA class I has been reported in different human tumor samples with distinct underlying mechanisms. Notably, different molecular mechanisms can generate the same altered HLA class I phenotype. Here, we describe various molecular mechanisms that can lead to HLA total loss or downregulation (phenotype I) in melanoma, colorectal carcinoma and bladder cancer.

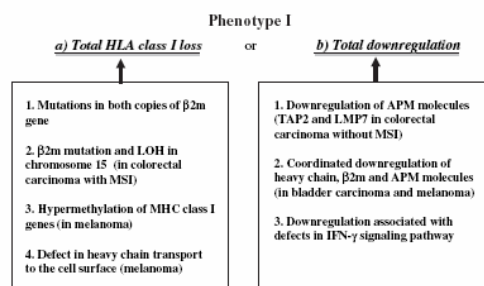
### Introduction

It is known that T lymphocytes and natural killer (NK) cells play a major role in control of tumor growth. Major histocompatibility complex (MHC) class I antigens play a crucial role in the interaction of tumor cells with the host immune system, in particular, in the presentation of peptides as tumor-associated antigens to cytotoxic lymphocytes (CTLs) and in the regulation of cytolytic activity of NK cells (1, 2). CTLs can recognize the non-self peptides by T-cell receptors only in a complex with the self-MHC molecule (3). Several mechanisms might contribute to the failure of the immune control of tumor growth. One of them is abnormal human leukocyte antigen (HLA) class I expression on tumor cell surface, which is frequently observed in cancer. The alteration in HLA class I expression vary from total loss or downregulation of all class I molecules to selective losses of HLA haplotypes or alleles. It is evident that any alteration in the expression of any of the MHC class I subunits can affect normal MHC cell

surface expression and alter both T-cell- and NK-cell-mediated immunity. These alterations may affect the tumorigenic phenotype and metastatic capacity of human and experimental tumors (4–6). The data obtained over the past 15 years have allowed us to classify altered HLA class I tumor phenotypes into seven groups (phenotype I–phenotype VII) depending on the type of HLA loss or downregulation (7). Importantly, the same phenotype of HLA alteration seen in different tumors can be produced by a combination of different mechanisms (Figure 1). Two or more mechanisms responsible for HLA alteration can frequently be observed within the same phenotype (8–10).

HLA class I alterations have been typically evaluated by immunohistological techniques in solid tumors or by flow cytometry in disrupted tumor cell suspensions using monoclonal antibodies directed against HLA class I monomorphic, HLA-A or -B locus-specific or HLA allelic epitopes (7, 11). Antibodies that recognize HLA-class-I-β2m complex (i.e. W6/32) help detect either a total loss of

Different mechanisms lead to altered HLA class I phenotype

T. Rodríguez *et al.*

**Figure 1** Different molecular mechanisms leading to total human leukocyte antigen class I loss or downregulation. APM, antigen presentation machinery; IFN, interferon; LOH, loss of heterozygosity; MHC, major histocompatibility complex; MSI, microsatellite instability.

HLA class I molecules or a decrease in the level of their expression (downregulation), as a first step in characterization of HLA class I abnormalities in cancer. We would like to present few examples when phenotype I is produced by different molecular defects in malignant cells.

It is important to characterize all the cellular molecular defects that lead to a particular altered HLA class I phenotype to determine the therapeutic strategies to repair the HLA class I expression in a given tumor. In addition, this information contributes to our understanding of the molecular mechanisms of tumor immune escape.

### Methods

In our laboratory, we use a large panel of immunological, histochemical and molecular techniques to characterize HLA class I alterations and the underlying molecular mechanisms.

All of them are described in our previous publications (10, 12–18). In addition, a screening strategy that we commonly use in our work is described in this current issue of *Tissue Antigens* by Cabrera *et al.*

### Results

In this report, we illustrate the different molecular mechanisms that cause total HLA class I loss or downregulation (phenotypes Ia and Ib) in different types of cancer.

#### HLA class I total loss (phenotype Ia)

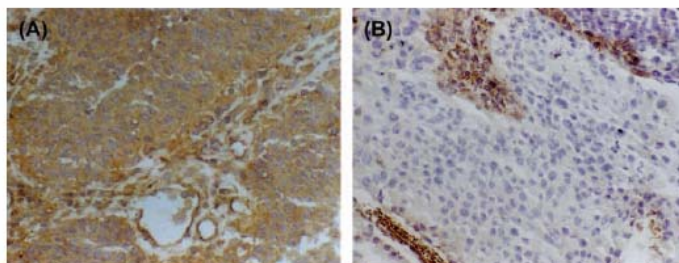
This phenotype shows variable frequency in different types of tumor. It is found in melanomas (15%), head and neck cancers (9%), colorectal tumors (18%) (19–21), bladder carcinomas (25%) (13), laryngeal carcinomas (11%) (14–16) and breast carcinomas (47%) (17, 22). The reason for this tissue-specific variability is still not known. Distinct

molecular mechanisms can produce this phenotype (Figure 1).

- (1) It may be associated with mutations in  $\beta 2m$  genes. We have discovered that HLA class I total loss in colorectal tumors with microsatellite instability (MSI) was caused by two different mutations in both alleles of the  $\beta 2m$  gene. The first was found in  $\beta 2m$  complementary DNA (cDNA) as a frameshift deletion of CA at codon 25. Sequencing of genomic DNA for  $\beta 2m$  showed a second mutation: a frameshift deletion of A in the AAAAAA tract at exon 2. In colon carcinoma CO117, we also found two different mutations: a frameshift deletion of C at codon 91 in the CCCCC tract at  $\beta 2m$  cDNA and a frameshift deletion of CCGTG at the end of exon 2. Structural defects in  $\beta 2m$  genes can range from large deletions to single nucleotide deletions and mutations are distributed randomly among the genes (9, 23–26). A mutation hotspot located in the CT repeat region of exon 1 of the  $\beta 2m$  gene has been proposed (27), reflecting an increased genetic instability in this region in malignant cells.
- (2) In most of the cases, two structural defects are necessary to produce the total loss of HLA class I on malignant cells (9),  $\beta 2m$  mutation in one copy of the  $\beta 2m$  gene and loss of the other copy associated with loss of heterozygosity (LOH) in chromosome 15. Sequencing of  $\beta 2m$  DNA in two MSI-positive colon carcinomas (CO 132 and CO 135) showed that both tumors have the same mutation: a frameshift deletion of CT in the CTCTCTCT tract at the leader sequence. Because  $\beta 2m$  messenger RNA (mRNA) was not detectable and based on the results of the LOH analysis, we concluded that the remaining allele probably was lost (18).
- (3) Transporter associated with antigen processing (TAP) mutation associated with HLA class I loss was described in lung cancer (28) and melanoma (29). All the described structural defects cannot be corrected by cytokine treatment, which would not restore HLA expression. This is important when selecting the appropriate immunotherapy for a given patient with cancer.
- (4) MHC class I gene hypermethylation leading to HLA class I loss has been described in melanoma (30) and esophageal squamous cell carcinoma (31).
- (5) We have recently observed a total loss of HLA class I expression in a melanoma cell line M010, with a possible defect in HLA heavy chain transport to the cell surface (unpublished observation). This cell line has a normal expression level of  $\beta 2m$ , heavy chain and antigen processing machinery (APM) mRNA. No mutations in the  $\beta 2m$  gene were found.

T. Rodríguez *et al.*

Different mechanisms lead to altered HLA class I phenotype



**Figure 2** Immunostaining of bladder tumor with antibodies that recognize human leukocyte antigen (HLA)-class I-β2m complex (W6/32). (A) HLA-class-I-positive tumor. (B) HLA class I total loss - phenotype I. mAb, monoclonal antibody.

Administration of interferon (IFN)-γ did not restore this alteration. In addition, incubation of the cells with HLA-A2-specific exogenous peptides did not induce surface expression of HLA class I. Moreover, we detected positive immunolabeling of free intracellular heavy chain using polyclonal antibodies against heavy chain. Thus, the absence of the surface HLA class I expression might be caused by a defect in heavy chain transport to the cell surface. However, additional studies have to be carried out to confirm this possibility.

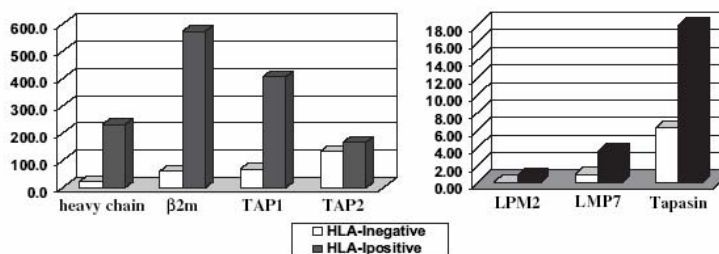
**HLA class I total downregulation (phenotype Ib)**

HLA class I total downregulation is a regulatory defect, which can be corrected with reversible with IFN-γ treatment. This phenotype represents another distinct variant within phenotype I, in which HLA class I molecules are not completely absent but the level of expression is reduced. It may be caused by various mechanisms, including defects in the regulation of transcriptional activity of HLA class I heavy chain genes (32) or dysfunction of the components of the antigen processing and presentation pathway.

(1) We have described an impaired expression of immunoproteasome subunit low molecular mass polypeptide (LMP) 7, and TAP2 is involved in HLA class I total loss in human MSI-negative colorectal cancer (18). LMP7 downregulation was found in correlation with the level of MHC class I expression in various human cancer cell lines (33). A high frequency of

LMP2, LMP7 and TAP1 downregulation or loss was observed in tumor lesions and in cell lines obtained from patients with head and neck cancer and could be reversed by IFN-γ treatment (34).

- (2) Coordinated downregulation of several APM components can produce this phenotype. Defects in the assembly and stability of HLA class I molecules imply interference with peptide transporters (TAP), leading to failure to transport peptides from the cytoplasm to the lumen of ER and the class I processing pathway (35–38). We recently observed that total loss of HLA class I in bladder cancer was not caused by β2m mutation but rather by a coordinated transcription downregulation of APM components (LMP2, LMP7, TAP1, TAP2 and tapasin) and HLA-ABC (16) (Figures 2 and 3). In addition, we recently discovered total HLA class I downregulation in six melanoma cell lines associated with decreased expression of genes coding for heavy chain, β2m, and several APM molecules. Treatment with IFN-γ restored the normal mRNA and protein expression of class I antigens (unpublished observation).
- (3) We have found total downregulation of HLA class I surface expression in two melanoma cell lines, in which IFN-γ did not affect the HLA class I expression at both gene and protein level, suggesting a possibility of structural defects in the components of the IFN-γ-mediated pathway of cell activation (unpublished observation). When the mechanism underlying total HLA class I loss is at a transcriptional level, the expression of surface HLA class I



**Figure 3** Coordinated downregulation human leukocyte antigen (HLA) class I heavy chain, β2m and antigen presentation machinery expression molecules in HLA-class-I-negative bladder tumors compared with HLA-class-I-positive tumors.



Different mechanisms lead to altered HLA class I phenotype

T. Rodríguez et al.

antigens can be reversed by cytokine treatment and T-cell based therapy can be successfully applied.

### Discussion

The examples that we presented clearly demonstrate that different molecular defects can produce the same altered HLA class I phenotype. Knowledge of the different altered HLA phenotypes and the underlying mechanisms in specific tumor systems remains incomplete and the relative prevalence of specific mechanisms of HLA class I antigen loss in different malignancies has yet to be established, especially in some types of cancer, including head and neck, prostate and breast cancer. In addition, other types of tumors remain to be classified. In this respect, the available information and rapidly accumulating new data from the analysis of solid tumors and tumor-derived cell lines, being very important for revealing the molecular bases of HLA class I alterations in particular types of tumors with particular altered HLA phenotype.

### Acknowledgments

This work was partially supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS), Servicio Andaluz de Salud (SAS) and Plan Andaluz de Investigación in Spain and from the European network for the identification and validation of antigens and biomarkers in cancer and their application in clinical tumor immunology (ENACT, contract number 503306).

### Conflict of Interest Statement

All authors have declared no conflicts of interests.

### References

- Dunn GP, Old LJ, Shreiber RD. Three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 2004; **3**: 991–8.
- Lanier LL. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 2005; **23**: 225–74.
- Diefenbach A, Raulet DH. The innate immune response to tumors and its role in the induction of T-cell immunity. *Immunol Rev* 2002; **188**: 9–21.
- Festenstein H, Garrido F. MHC antigens and malignancy. *Nature* 1986; **322**: 502–23.
- Festenstein H. The biological consequences of altered MHC expression on tumours. *Br Med Bull* 1987; **43**: 217–27.
- Garrido F, Algarra I. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 2001; **83**: 117–58.
- Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T et al. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human. *Immunol Today* 1997; **18**: 89–95.
- Real LM, Jimenez P, Kirkin A et al. Multiple mechanisms of immune evasion can coexist in melanoma tumor cell lines derived from the same patient. *Cancer Immunol Immunother* 2001; **49**: 621–8.
- Paschen A, Mendez R, Jimenez P et al. Complete loss of HLA class I antigen expression on melanoma cells: a result of successive mutational events. *Int J Cancer* 2003; **103**: 759–67.
- Maleno I, Cabrera CM, Cabrera T et al. 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* 2004; **56**: 244–53.
- Koopman LA, Corver WE, van der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med* 2000; **191**: 961–76.
- Garrido F, Cabrera T, Accola RS et al. HLA and cancer: 12th International Histocompatibility Workshop Study. In: Charron D, ed. *HLA Genetic Diversity of HLA, Functional and Medical Implications*. Paris, France: EDK Publisher, 1997, 445–53.
- Cabrera T, Pedrajas G, Cozar JM et al. HLA class I expression in bladder carcinomas. *Tissue Antigens* 2003; **62**: 324–7.
- Cabrera T, Salinero J, Fernandez MA, Garrido A, Esquivas J, Garrido F. High frequency of altered HLA class I phenotypes in laryngeal carcinomas. *Hum Immunol* 2000; **61**: 499–506.
- Maleno I, Lopez-Nevot MA, Cabrera T, Salinero J, Garrido F. Multiple mechanisms generate HLA altered phenotypes in laryngeal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Cancer Immunol Immunother* 2002; **51**: 389–96.
- Romero JM, Jimenez P, Cabrera T et al. 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* 2005; **113**: 605–10.
- Cabrera T, Fernandez MA, Sierra A et al. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Hum Immunol* 1996; **50**: 127–34.
- Cabrera CM, Jimenez P, Cabrera T, Esparza C, Ruiz-Cabello F, Garrido F. 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* 2003; **61**: 211–9.
- Vora AR, Rodgers S, Parker AJ, Start R, Rees RC, Murray AK. An immunohistochemical study of altered immunomodulatory molecule expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 1997; **76**: 836–44.
- Cabrera T, Collado A, Fernandez MA et al. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tissue Antigens* 1998; **52**: 114–23.
- Feenstra M, Verdaasdonk M, van der Zwan AW, de Weger R, Slootweg P, Tilanus M. Microsatellite analysis of microdissected tumor cells and 6p high-density microsatellite analysis in head and neck squamous cell carcinomas with down-regulated human leukocyte antigen class I expression. *Lab Invest* 2000; **80**: 405–14.

T. Rodríguez *et al.*

Different mechanisms lead to altered HLA class I phenotype

22. Madjd Z, Spendlove I, Pinder SE, Ellis IO, Durrant LG. Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer. *Int J Cancer* 2005; **117**: 248–55.
23. Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yanelli JR, Rosenberg SA. Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanoma from five patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1996; **88**: 100–8.
24. Benítez R, Godelaine D, Lopez-Nevot MA *et al.* Mutations of the beta-2 microglobulin gene results in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 1998; **52**: 520–9.
25. Feenstra M, Veltkamp M, van Kuik J *et al.* HLA class I expression and chromosomal deletions at 6p and 15q in head and neck squamous cell carcinomas. *Tissue Antigens* 1999; **54**: 235–45.
26. Feenstra M, Rozemuller E, Duran K *et al.* Mutation in the beta 2m gene is not a frequent event in head and neck squamous cell carcinomas. *Hum Immunol* 1999; **60**: 697–706.
27. Perez B, Benítez R, Fernandez MA *et al.* A new beta 2 microglobulin mutation found in a melanoma tumor cell line. *Tissue Antigens* 1999; **53**: 569–72.
28. Chen HL, Gabrilovich D, Tampe R, Girgis KR, Nadaf S, Carbone DP. A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat Genet* 1996; **13**: 210–3.
29. Seliger B, Ritz U, Abele R *et al.* Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res* 2001; **61**: 8647–50.
30. Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, *et al.* Reexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer* 2001; **94**: 243–51.
31. Nie Y, Yang G, Song Y *et al.* DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 2001; **22**: 1615–23.
32. Blanchet O, Bourge JF, Zisner H *et al.* Altered binding of regulatory factors to HLA class I gene enhancer is inactive in tumorigenic cell lines lacking class I antigen expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; **89**: 3488–92.
33. Yoon SJ, Kang JO, Park JS, Kim NK, Heo DS. Reduced expression of MHC class I antigen in human cancer cell lines with defective LMP-7. *Anticancer Res* 2000; **20**: 949–53.
34. Meissner M, Reichert TE, Kunkel M *et al.* Defects in the human leukocyte antigen class I antigen-processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 2552–60.
35. Kaklamani L, Townsend A, Doussis-Anagnostopoulou IA, Mortensen N, Harris AL, Gatter KC. Loss of major histocompatibility complex-encoded transporter associated with antigen presentation (TAP) in colorectal cancer. *Am J Pathol* 1994; **145**: 505–9.
36. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 2000; **21**: 455–64.
37. Bennis JR, Anderson R, Bacik I *et al.* Antigen processing: where tumor-specific T-cell responses begin. *J Immunother* 1993; **14**: 202–8.
38. Vitale M, Pelusi G, Taroni B *et al.* HLA class I antigen down-regulation in primary ovary carcinoma lesions: association with disease stage. *Clin Cancer Res* 2005; **11**: 67–72.





## **DISCUSIÓN**



Se conoce que uno de los mecanismos más relevantes de escape tumoral es la selección de variantes celulares débilmente inmunogénicas que no presentan los antígenos diana a las células T efectoras (Marincola et al. 2000). La pérdida de presentación de antígenos tumorales puede ser debida a la ausencia o baja regulación de las moléculas HLA de clase I en las células de melanoma que se ha demostrado influye negativamente en los resultados clínicos de las inmunoterapia específica con péptidos. Dada la importancia de estas moléculas en el reconocimiento y eliminación de las células tumorales por parte de los linfocitos T y la función reguladora del interferón sobre la expresión de las moléculas del MHC, nos propusimos el estudio de los niveles de expresión así como las alteraciones fenotípicas de dichas moléculas, en un panel de líneas celulares de melanoma.

Para este estudio contamos con 91 líneas celulares de melanoma obtenidas gracias a la colaboración de nuestro laboratorio en el proyecto Europeo: European Searchable Tumour Cell Line Database (ESTDAB) (Pawelec and Marsh 2006). Nuestro principal objetivo ha sido la caracterización inmunofenotípica de estas líneas celulares de melanoma. Otros estudios paralelos han incluido la expresión de antígenos tumorales, moléculas de adhesión, secreción de citoquinas, resistencia a apoptosis etc.. Todos estos datos pueden ser consultados en la página: <http://www.ebi.ac.uk/ipd/estdab/>.

## **1. DISTRIBUCION DE LOS DISTINTOS FENOTIPOS ALTERADOS EN LAS LINEAS CELULARES DE MELANOMA.**

El estudio de la expresión de las moléculas HLA de clase I en células de melanoma maligno ha sido ampliamente estudiado por su importante papel inmunológico en la patogénesis y en el curso clínico de la enfermedad. A diferencia de otros estudios hemos podido contar con un amplio panel de 91 líneas celulares de melanoma en la que hemos cuantificado la expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I mediante citometría de flujo y hemos analizado distintos mecanismos moleculares responsables de las alteraciones encontradas.

Del total de líneas estudiadas un 2% presentaron el fenotipo Ia, en el cual se observa una pérdida total de la expresión de las moléculas HLA de clase I que no puede ser recuperada tras el tratamiento con IFN- $\gamma$ . Este fenotipo ha sido descrito en diferentes tipos de tumores con una frecuencia variable y la razón de esta variabilidad tejido específica no es aun conocida. Se ha descrito en cánceres de laringe (11%) (Cabrera et al. 2000; Maleno et al. 2002), tumores colorectales (18%) (Cabrera et al. 1998) carcinoma de cabeza y cuello (Vora et al. 1997) y carcinomas de vejiga (25%) (Cabrera et al. 2003). La frecuencia de pérdida total que hemos observado en las líneas celulares de melanoma es menor que la encontrada en el resto de tejidos estudiados. Sin embargo un 9% de líneas celulares que presenta una baja regulación en la expresión de las moléculas HLA de clase I (fenotipo Ib) cuya expresión se restaura tras el tratamiento con IFN- $\gamma$ . Por tanto un total del 11% de líneas de melanoma que presentan fenotipo I, un porcentaje que se asemeja más al resto de tejido. Estas diferencias pueden deberse a la utilización de diferentes técnicas. Originalmente estas alteraciones fueron descritas

mediante inmunohistoquímica utilizando anticuerpos frente a determinantes monomórficos de las moléculas HLA de clase I (W6/32) en tejidos tumorales, incluyendo las lesiones de melanoma. Nuestro estudio se ha realizado mediante citometría de flujo utilizando el mismo anticuerpo monoclonal W6/32. Las técnicas inmunohistoquímicas son más cualitativas que cuantitativas mientras que la citometría de flujo posee una mayor sensibilidad a la hora de cuantificar la expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I lo que justificaría las diferencias encontradas con algunos de los estudios histológicos descritos hasta la fecha (Kageshita et al. 2005).

Existen diferentes mecanismos moleculares responsables del fenotipo Ia. Puede estar asociado a mutaciones en los genes de la  $\beta 2m$  como ha sido observado en melanoma (Benitez et al. 1998; Paschen et al. 2003) y en carcinoma colorectal (Browning et al. 1996). Estos resultados contrastan con los obtenidos en carcinoma de laringe (Maleno et al. 2002a) y en carcinoma de vejiga (Maleno et al. 2006). En el caso de tumores colorectales con inestabilidad de microsatélites se ha descrito que el fenotipo Ia es debido a dos mutaciones distintas en ambas copias del gen de la  $\beta 2m$ . En el caso de los melanomas la pérdida total de las moléculas HLA de clase I se deben a distintas mutaciones distribuidas más aleatoriamente a lo largo del gen de la  $\beta 2m$ , y a mutaciones en las zonas de repetición, también se observan mutaciones sin sentido, y pequeñas o grandes deleciones dentro del gen (Benitez et al. 1998; Feenstra et al. 1999a; Feenstra et al. 1999b; Paschen et al. 2003; Restifo et al. 1996). Un punto caliente para las mutaciones se localiza en la región de repetición CT del exón 1 del gen de la  $\beta 2m$  (Perez et al. 1999), reflejando un incremento de la inestabilidad genética en esta región en las células malignas. En todos los casos son necesarios dos defectos estructurales en el gen de la  $\beta 2m$  para que se produzca la pérdida total de las moléculas HLA de clase I (Benitez et

al. 1998;Paschen et al. 2003): una mutación de una de las copias del gen de la  $\beta 2m$  y la pérdida de la otra copia asociada con la pérdida de heterocigosidad (LOH) en el cromosoma 15. Otros mecanismos responsables de este fenotipo Ia, pueden ser mutaciones estructurales del gen que codifica al transportador asociado al procesamiento antigénico TAP que se han descrito en cáncer de pulmón (Chen et al. 1996), carcinoma cervical (Cromme et al. 1994) y melanoma (Seliger et al. 2001) o la hipermetilación de los genes MHC de clase I (Nie et al. 2001;Serrano et al. 2001). En nuestro caso, parece poco probable este mecanismo por cuanto, con excepción de las líneas celulares con mutación en  $\beta 2m$ , el resto de las líneas con baja expresión de las moléculas HLA respondieron con incrementos de expresión después de tratarlas con IFN- $\gamma$ .

El fenotipo presentado por un segundo grupo de líneas de melanoma (9% de los casos) con baja regulación de las moléculas HLA de clase I (fenotipo Ib), ha sido previamente descrito en otros tipos de tumores y los mecanismos responsables están relacionados con una baja regulación de uno o algunos de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM). En algunos casos se ha descrito una baja regulación de algunos de los componentes de la APM como es el caso del LMP7 y TAP2 en el cáncer de colon (Cabrera et al. 2003), una baja regulación de LMP7 en varias líneas celulares de cáncer humano (Yoon et al. 2000) y una baja regulación de LMP2, LMP7 y TAP1 en pacientes con cánceres de cabeza y cuello (Meissner et al. 2005). Este fenotipo también puede ser producido por una baja regulación coordinada de todos los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico (LMP2, LMP7, TAP1, TAP2 y tapasina) en el caso del cáncer de vejiga (Romero et al. 2005).

Conociendo estos datos para el estudio de este fenotipo en nuestro panel de líneas de melanoma, realizamos un estudio del nivel de expresión de los componentes de APM mediante PCR a tiempo real y comprobamos como esta baja regulación a nivel de superficie correlacionaba con una baja regulación a nivel transcripcional de LMP7 y TAP2 al igual que ocurría en el cáncer de colon.

Por otra parte el tipaje genómico de los genes MHC de clase I y II en 61 de las 91 líneas estudiadas puso de manifiesto una alta frecuencia de homocigosidad observada en las moléculas HLA de clase I y II (8.79%) en comparación con la frecuencia de homocigosidad de la población control que era de un 1.3% y más teniendo en cuenta que la homocigosidad es poco frecuente en la región HLA dada la naturaleza altamente polimórfica de estos genes. El análisis mediante marcadores de microsatélites situados tanto en el brazo corto como en el brazo largo del cromosoma 6 mostró, que la mayoría de los marcadores aparecían patrones no informativos. Estos resultados no pudieron ser comparados con los tejidos normales de los pacientes al no contar con dicho material. Aun así, todos estos datos apuntan a una pérdida de heterocigosidad (LOH) en la región 6p. La pérdida de heterocigosidad producida por la delección de 6p ha sido descrita en un gran número de tejidos tumorales como colón (Jimenez et al. 1999; Jimenez et al. 2000), laringe (Maleno et al. 2002), y carcinoma de cervix (Koopman et al. 2000; Mazurenko et al. 2003).

Un 11% de las líneas celulares fueron homocigotas para clase I y heterocigotas para clase II mientras que un 4,4 % eran heterocigotas para clase I y homocigotas para clase II. Este mayor porcentaje de líneas celulares que presentaban homocigosidad para clase I nos hizo pensar que la pérdida heterocigosidad en las líneas de melanoma se producía



principalmente a la región más telomérica del brazo corto del cromosoma 6 que es la región donde se localizan los genes HLA de clase I.

El análisis de microsatélites mostró como tan sólo una línea celular retenía la heterocigosidad (ROH) en el marcador de microsatélites situado en la región 6q, lo que sugiere que en el resto de las líneas celulares se producía una pérdida parcial o completa del brazo largo del cromosoma 6. Cabe reseñar que la delección de 6q constituye una de las alteraciones cromosómicas más frecuentes en melanoma (Guan et al. 2002).

Análisis mediante FISH utilizando una sonda centromérica específica para el cromosoma 6, reveló la existencia de diploidía, triploidía y tetraploidía lo que podría indicar que en las líneas celulares se habría producido la pérdida de un cromosoma 6 y la duplicación concomitante del otro. De hecho, este fenómeno ya había sido observado con anterioridad, tanto en nuestro grupo como por otros, en melanoma (de Nooij-van Dalen et al. 1998b; Jimenez et al. 1999). Resultados similares se han descrito también en leucemias linfoblásticas agudas (McEvoy et al. 2003) lo que sugiere que podría tratarse de un fenómeno frecuente en células malignas.

La pérdida de heterocigosidad sobre el cromosoma 6 puede contribuir a la pérdida de genes supresores del tumor. La pérdida del cromosoma 3 o el brazo corto del cromosoma 1 se ha relacionado con los melanomas oculares mientras que la ganancia de 6p y la pérdida de 6q se han asociado a los melanomas de piel. La pérdida de material genético sobre el cromosoma 6 se ha asociado con la progresión del melanoma humano (Goldberg et al. 2003). En el caso de melanomas malignos esporádicos también se han detectado aberraciones cromosómicas en las regiones 1p36, 9p y 10q. Sin embargo no se han detectado genes supresores del tumor de importancia en los melanomas malignos de piel o un gen que explique de forma clara la transición de la

fase de crecimiento radial a la vertical (Poetsch et al. 2003). Por otra parte la pérdida de heterocigosidad podría provocar una disminución en el repertorio de antígenos tumorales presentados por las moléculas HLA de clase I a los linfocitos T citóxicos favoreciéndose así el crecimiento de las células tumorales. En este sentido se ha evidenciado que individuos VIH+ homocigotos para las moléculas HLA presentaban una progresión más rápida al SIDA. Además la pérdida de un haplotipo HLA también puede provocar la pérdida de los alelos MICA y MICB. Estas moléculas son los ligandos para la activación de los receptores NKG2D presentes en células NK (Bauer et al. 1999), NKT, una subpoblación de linfocitos T CD8+ (Groh et al. 2001) y las células T intraepiteliales gamma-delta positivas (Groh et al. 1998). Se ha demostrado experimentalmente en modelos murinos como la expresión de RAE-1 (homólogo de la familia MIC en ratones) activa las células NK para eliminar a las células tumorales que expresan moléculas HLA de clase I (Cerwenka et al. 2001; Lanier 2001). Por tanto la eliminación de los alelos MICA y MICB mediante LOH favorecería el escape de la respuesta inmune a aquellas células tumorales que expresan en superficie moléculas HLA de clase I.

El fenotipo más frecuente (35%) en nuestro panel de líneas de melanoma fue la baja regulación del locus HLA-B (fenotipo III). Este fenotipo se ha descrito previamente en líneas celulares de melanoma, (Marincola et al. 1994) en melanoma primarios humanos así como en otros tipos de tumores como el cáncer colorectal (Garrido et al. 1997), cáncer de laringe (Maleno et al. 2002) y cáncer de vejiga (Ramal et al. 2000b) aunque en un porcentaje inferior. El mecanismo responsable de esta disminución selectiva de los diferentes locus HLA es transcripcional y no es el resultado de alteraciones genéticas que afecten a los genes estructurales HLA de clase I ya que

esta bajada de expresión en las líneas celulares se recupera tras el tratamiento con IFN- $\gamma$  (Soong and Hui 1991). En nuestro estudio (Mendez et al. 2007), este ha sido el caso y en todas las líneas con baja regulación de locus, se observó un incremento de expresión tras tratamiento con IFN- $\gamma$ . La presencia de residuos locus-específicos en la región promotora sugiere que los locus HLA de clase I se regulan de forma separada. Experimentos realizados con líneas de melanoma han puesto de manifiesto que la baja regulación del locus HLA-B es mediada por un elemento regulador, una región de 20 pb localizada después del sitio de iniciación de la transcripción (Griffioen et al. 2000). En el caso del cáncer de colon, la baja expresión de factores de transcripción que se unen a secuencias específicas del DNA pueden inducir la baja regulación del locus HLA-B (Real et al. 1998). Las metilaciones locus específicas es otro mecanismo relacionado con la baja regulación de las moléculas HLA de clase I en el caso de las líneas celulares de linfomas (Rubocki et al. 1996).

En relación a las pérdidas alélicas o fenotipo IV, no hemos detectado ningún caso aunque este fenotipo ha sido descrito en diferentes tipos de cánceres incluido el melanoma (Maeurer et al. 1996; Wang et al. 1999; Wang et al. 1998). Estas pérdidas alélicas se deben a mutaciones puntuales o deleciones de los genes HLA, roturas cromosómicas o recombinación somática (Brady et al. 2000; Serrano et al. 2000). El hecho de que en nuestro estudio no hayamos detectado ninguna pérdida alélica podría deberse al bajo número de anticuerpos alelo-específicos existentes para el análisis mediante citometría de flujo. En cualquier caso no descartamos que en el grupo de líneas celulares que hemos incluido como “sin alteraciones” pudiera existir alguna pérdida alélica, pero su estudio exigiría estudiar la expresión selectiva de todos y cada

uno de los alelos, y este estudio trasciende los objetivos que inicialmente nos planteamos.

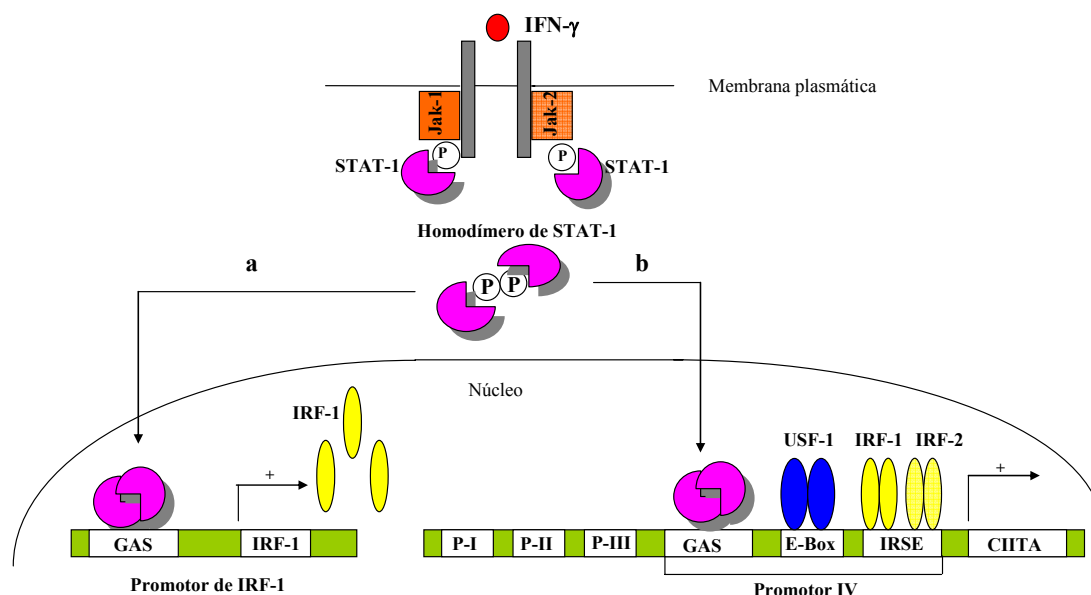
Un 6% de las líneas celulares de melanoma presentaron una combinación de varias de las alteraciones comentadas anteriormente (fenotipo V o fenotipo compuesto). Esta combinación de alteraciones aparecen durante las distintas etapas de la carcinogénesis donde se producen una acumulación de aberraciones debidas a mecanismos moleculares independientes. Esta combinación de alteraciones se han descrito previamente en las líneas celulares de melanoma FM55 y R22.2 donde una LOH en el cromosoma 6 (fenotipoII) y una baja regulación del locus HLA-B (fenotipo III) llevo a generar células tumorales que expresaban una sólo alelo HLA de clase I (HLA-A3 o HLA-A1) (Real et al. 1998).

La expresión en superficie de las moléculas HLA de clase I ha sido estudiada tanto en condiciones basales como tras el tratamiento con INF- $\gamma$ . Comprobamos como tan sólo cuatro líneas presentaron resistencia a esta citoquina. En dos casos esta falta de respuesta a interferón-gamma se justificaba por el hecho de presentar una mutación en el gen de la  $\beta$ 2m. Sin embargo las líneas ESTDAB-159 y ESTDAB-004, sin defecto estructural en el gen de la  $\beta$ 2m, presentaron una disminución en la expresión de las moléculas HLA de clase I inducible sólo tras el tratamiento con IFN- $\alpha$  pero no con IFN- $\gamma$ . Estos resultados podrían deberse a defectos en la vía de señalización Jak-STAT. Así, estudios realizados en líneas celulares de melanoma reflejan que esta resistencia a IFN puede deberse a la reducción de los niveles de los componentes de ISGF3a, particularmente de STAT-1 (Wong et al. 1997). La ausencia de respuesta a IFN también ha sido atribuida a la pérdida de expresión del gen Jak-1, en el caso del cáncer de pulmón y próstata (Dunn et al. 2005) y a la ausencia de STAT-1 en el caso de una línea

celular de carcinoma gástrico estudiada con anterioridad en nuestro laboratorio (Abril et al. 1996; Abril et al. 1998). Conociendo estos datos comprobamos la presencia de la proteína STAT-1 y su correcta fosforilación mediante Western blot utilizando anticuerpos frente a STAT-1 y STAT-1 fosforilado y tratando previamente ambas líneas celulares con INF- $\gamma$  e IFN- $\alpha$ . Observamos como en el caso de la línea ESTDAB-004 presentaba niveles normales de STAT-1, pero sin embargo no se producía su fosforilación cuando se trataba con IFN- $\gamma$  aunque sí con IFN- $\alpha$ . Dado que el IFN- $\alpha$  activa a Jak-1 y Tyk-2 y el IFN- $\gamma$  activa a Jak-1 y Jak-2 y que la quinasa Jak-2 es la única que participa en la vía de señalización del IFN- $\gamma$  y no en la del IFN- $\alpha$ , pensamos que podía verse implicada en la resistencia de esta línea al IFN- $\gamma$ . Observamos como existía un nivel normal de la proteína Jak-2, sin embargo su fosforilación era algo menor que la línea control. También detectamos la expresión en esta línea de la proteína supresora de la señalización de proteínas SOCS-1. Todos estos datos nos hacen a establecer como hipótesis que la ausencia de fosforilación de STAT-1 y por consiguiente la resistencia a IFN- $\gamma$  de la línea ESTDAB-004 fuese debida a la inhibición de la fosforilación de Jak-2 por la proteína SOCS-1 que en la línea ESTDAB-004 se expresaba constitutivamente. De hecho, esta proteína es inducida por el IFN- $\gamma$  y regula negativamente la vía de señalización de esta citoquina (Sakamoto et al. 1998; Starr et al. 1997). Además se ha descrito como SOCS-1 se expresa de forma aberrante en líneas celulares de melanoma siendo un marcador de mal pronóstico y de baja respuesta biológica a la administración terapéutica de citoquinas (Li et al. 2004).

En el caso de la línea ESTDAB-159 se demostró la presencia y correcta fosforilación del resto de tirosina de STAT-1 tras el tratamiento con IFN- $\gamma$ . IRF-1 (Interferon regulatory factor) es codificado por un gen que también es controlado por

STAT-1 y participa en la transcripción de los genes de las moléculas HLA de clase I y de la oxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) (Gobin et al. 1999; Nikcevic et al. 1999; Real et al. 1998) (Fig 4a pg. 125).



**Fig. 4 Inducción de la transcripción de CIITA por el IFN- $\gamma$ .** La unión del IFN- $\gamma$  a su receptor produce la activación de las quinsas Jak-1 y Jak-2. estas quinasas fosforilan al receptor del IFN- $\gamma$ , lo que produce un cambio conformacional de este receptor que proporciona un lugar de unión para los monómeros de STAT-1. Los monómeros de STAT-1 son fosforilados en el citoplasma por Jak, lo que conduce a la dimerización de STAT-1 y su posterior traslocación al núcleo. STAT-1 activa la transcripción de numerosos genes, incluyendo IRF-1, por unión a la secuencia GAS. STAT-1 fosforilado, IRF-1, USF-1 e IRF-2 cooperan en la transcripción de CIITA.

En nuestro estudio se incrementaron los niveles de RNAm de IRF-1 pero no se veían incrementados los niveles de las moléculas HLA de clase I ni de iNOS cuya inducción por IFN- $\gamma$  es mediada por IRF-1. Estos resultados nos hicieron sospechar que al igual que ocurría en algunos casos de leucemias mieloides agudas se habría producido una mutación o delección del gen IRF-1 (Harada et al. 1994). Pero esta posibilidad se descartó al comprobar experimentalmente que el IFN- $\gamma$  inducía la proteína con capacidad de unirse a la secuencia consenso por IRF-1. Además la secuenciación de IRF-1 no reveló ninguna mutación (datos no mostrados).

IRF-1 puede actuar como un gen supresor del tumor induciendo la apoptosis mediante el aumento de la expresión de la caspasa-8 (Ruiz-Ruiz et al. 2004), que se ha visto frecuentemente silenciada en tumores por la hipermetilación del gen (Hopkins-Donaldson et al. 2003;Teitz et al. 2000). En el caso de la línea celular ESTDAB-159 comprobamos como con el tratamiento con 5-dAzaC restauraba la inducción de las moléculas HLA de clase I por el IFN- $\gamma$ , lo que sugiere que la posible causa de la falta de inducción de las moléculas HLA de clase I en este caso se deba un bloqueo epigenético de la transactivación de IRF-1.

## **2. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN BASAL Y TRAS TRATAMIENTO CON IFN- $\gamma$ DE LAS MOLÉCULAS HLA DE CLASE II.**

Los estudios de la expresión de las moléculas HLA de clase II en tumores en comparación con los realizados para HLA de clase I son mucho más escasos, quizá debido a que su papel en el desarrollo y activación de las células T helper CD4<sup>+</sup> en la respuesta inmune frente al cáncer ha sido poco estudiado y a que la identificación de los péptidos antigénicos presentados por estas moléculas ha sido más tardía.

La expresión constitutiva de las moléculas HLA de clase II está normalmente restringida a células presentadoras de antígenos (APC), células B, células dendríticas, monocitos y macrófagos. Pero también se expresan en varios tipos de tumores, particularmente en melanomas (Ruiter et al. 1991). Los estudios realizados ponen de manifiesto que la expresión constitutiva de HLA-DR y HLA-DP es mayor en las metástasis que en los melanomas primarios, mientras que no se han encontrado

diferencias en la expresión de HLA-DQ entre melanomas primarios y metastáticos (van Vreeswijk et al. 1988). En nuestro caso no hemos podido conocer el tipo de lesión a la que correspondían nuestras líneas de melanoma, pero sí hemos comprobado como la mayoría de las líneas celulares no expresaban moléculas HLA de clase II de forma constitutiva y como en aquellas líneas donde existía expresión constitutiva ésta era mayor para HLA-DR que para HLA-DP y ésta, a su vez mayor que la de HLA-DQ. Estos resultados coinciden con los obtenidos anteriormente en melanoma (D'Alessandro et al. 1987) y en otro tipo de tumores como es el caso del adenocarcinoma de páncreas (Scupoli et al. 1996). La expresión de HLA-DR en melanoma se asocia con un peor pronóstico y un mayor riesgo de metástasis (Brocker et al. 1985; Cabrera et al. 1995; Concha et al. 1991; Lopez-Nevot et al. 1988), al contrario que en el caso de carcinomas de hepáticos (Brunner et al. 1991), gástricos (Hilton and West 1990), de colon (Andersen et al. 1993) y de células escamosas de laringe donde se relaciona con un pronóstico favorable.

Además observamos en nuestro estudio como la mayoría de las líneas con expresión constitutiva de HLA-DR también expresaban HLA-DP pero no HLA-DQ. Sólo dos líneas celulares de melanoma expresaban exclusivamente HLA-DP. Esta diferencia de expresión entre los isotipos HLA-DR y HLA-DP frente a HLA-DQ podría ser explicada por el hecho de que HLA-DQ presente una vía de expresión independiente de la proteína trans-activadora de clase II (CIITA) (Douhan et al. 1997; Ono et al. 1991). CIITA es el mayor regulador de la expresión del MHC de clase II y su expresión es regulada principalmente a nivel transcripcional (De Lerma Barbaro et al. 2005; Schnappauf et al. 2003). Su transcripción es conducida por una región reguladora que contiene cuatro promotores denominados pI, pII, pIII y pIV (Muhlethaler-Mottet et



al. 1997a). pI esta activado constitutivamente en las células dendríticas pero también puede ser activado por IFN- $\gamma$  en monocitos y macrófagos. pIII es usado principalmente por las células B, activando las células T y las DCs plasmocitoides. pIV es activado en TECs y responde al estímulo del IFN- $\gamma$  en varios tipos de células (Muhlethaler-Mottet et al. 1997b). Nuestros resultados muestran como existe una correlación significativa entre la expresión en superficie de HLA-DR y el nivel transcripcional de CIITA. Las líneas celulares con mayor expresión constitutiva de HLA-DR presentaron los mayores niveles transcripcionales de CIITA y viceversa. Estos resultados coinciden con estudios anteriores en los que se han puesto de manifiesto que la expresión de las moléculas HLA de clase II en líneas celulares de melanoma pueden estar relacionadas con la expresión de CIITA (Goodwin et al. 2001). Además se ha demostrado como las células en ratones transgénicos deficientes en CIITA, presentaban una ausencia de expresión de moléculas HLA de clase II a excepción de un subtipo de células epiteliales del timo (TECs) (Chang et al. 1996).

Para completar nuestro estudio sobre la expresión de las moléculas HLA de clase II en las líneas celulares de melanoma nos propusimos definir los distintos patrones de expresión tras la estimulación con IFN- $\gamma$ . Observamos como el 50% de las líneas que no presentaban expresión constitutiva de moléculas HLA de clase II no incrementaban su expresión tras el tratamiento con IFN- $\gamma$ , mientras que en el otro 50% se incrementaba la expresión de HLA-DR en todos los casos, la expresión de HLA-DP se incrementaba de forma mayoritaria pero sin embargo en sólo una línea celular se observa un incremento en la expresión de HLA-DQ. Por otra parte todas las líneas con expresión basal de moléculas HLA de clase II vieron incrementada su expresión tras el tratamiento con IFN- $\gamma$ .

El papel clave del promotor IV de CIITA en la inducción de los genes MHC de clase II mediada por IFN- $\gamma$  fue confirmada cuando se demostró que ratones deficientes en p-IV experimentaron una pérdida de inducción de estos genes tras tratamiento con IFN- $\gamma$  (Waldburger et al. 2001) La inducción de la transcripción de los genes CIITA por el IFN- $\gamma$  se produce por la activación del promotor-IV (Morris et al. 2002) (fig. 4b pg. 119).

Por otro lado la ausencia de respuesta a IFN- $\gamma$  puede deberse a la pérdida de expresión de CIITA debida a la metilación de p-IV (Holling et al. 2004; Morimoto et al. 2004; Nie et al. 2001; Satoh et al. 2004; van den Elsen et al. 2000; van der Stoep et al. 2002). Además debido al papel auxiliar de CIITA en la expresión de las moléculas HLA de clase I y  $\beta$ 2m y su papel en la expresión de HLA-DM y Ii, la ausencia de CIITA podría provocar una disminución de la presentación antigénica de estas células y por tanto constituir un mecanismo de evasión de la respuesta inmune.

También hemos estudiado la relación entre el polimorfismo en la posición -168 de la región 5' del promotor III de CIITA con la expresión constitutiva de HLA-DR. Hemos observado como la presencia de G (genotipo GG/AG) se relaciona con una mayor expresión constitutiva de HLA-DR. Por otra parte hemos observado como las líneas celulares con mayor nivel de expresión constitutiva de HLA-DR mostraban un nivel de inducción con IFN- $\gamma$  menor que las que presentaban niveles basales de HLA-DR menores, por lo que podría existir una relación entre la sustitución de -186A a G en el promotor III de CIITA y una menor inducción con IFN- $\gamma$  de las moléculas HLA-DR. Esta hipótesis se ve reforzada por estudios en células de sangre periférica donde la sustitución A-G en la posición 5' de la región del promotor III de CIITA se relacionó con una menor inducción de los genes de clase II (Swanberg et al. 2005).

El conocimiento en mayor profundidad la regulación de la expresión de CIITA podría favorecer el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a la utilización de antígenos tumorales potencialmente presentados por moléculas de clase II. Así, el incremento de la expresión de CIITA podría ser beneficioso para incrementar la inmunogenicidad de los tumores, especialmente en aquellos casos donde se detecte una baja expresión de las moléculas HLA de clase II.

## **CONCLUSIONES**

1. En líneas celulares derivadas del melanoma humano es frecuente encontrar alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I que incluyen pérdidas totales y parciales. La frecuencia total con la que suceden los distintos fenotipos encontrados es del 67% y obedecen a diferentes mecanismos reguladores y estructurales (mutaciones puntuales, deleciones).

2. La pérdida o baja regulación total de moléculas HLA de clase I (11% de los casos) se debe en un porcentaje reducido de casos a la inactivación de las dos copias del gen de  $\beta 2m$  por mutaciones estructurales (2% de los casos) y mayoritariamente a defectos en la regulación transcripcional de los genes TAP-2 y LMP7 (9% de los casos).

3. El fenotipo HLA alterado más ampliamente representado es la baja expresión de las moléculas HLA-B, encontrado en el 35% de las líneas celulares estudiadas. Éste fenotipo es particularmente relevante en el melanoma en comparación con otros tipos de tumores. Esta baja expresión fue reversible en todos los casos tras el tratamiento con IFN- $\gamma$ .

4. La pérdida de heterocigosidad que conduce a la falta de un haplotipo HLA es también un mecanismo frecuente (13% de los casos). Los estudios de marcadores de microsatélites, secuencias cortas repetitivas altamente polimórficas (STRs) y de hibridación fluorescente in situ (FISH) apoyarían la pérdida de un cromosoma, concomitantemente con la duplicación y/o recombinación somática del otro cromosoma. La hemicigosidad disminuye potencialmente la capacidad de presentación



de péptidos antigénicos, por lo que este mecanismo podría interpretarse en el contexto de un proceso de inmunoselección.

5. La ausencia de respuesta a IFN- $\gamma$ , medida ésta por el incremento en la expresión de moléculas HLA de clase I, es infrecuente en el melanoma humano (2% de los casos). La falta de respuesta al IFN- $\gamma$  (excluidos los casos con mutaciones en el gen de la  $\beta 2m$ ) se debe a defectos en distintos niveles de la ruta de señalización de esta citoquina.

6. La mayoría de las líneas celulares de melanoma no expresan de forma constitutiva moléculas HLA de clase II (57% de los casos). La expresión de estas moléculas es generalmente mayor para HLA-DR y HLA-DP y menor para HLA-DQ. Del mismo modo, la respuesta a IFN- $\gamma$  se traduce fundamentalmente en la inducción de HLA-DR y -DP y en menos medida HLA-DQ.

7. La expresión constitutiva de las moléculas HLA-DR se correlaciona con el nivel transcripcional de CIITA. La intensidad en la expresión de HLA-DR se asocia a su vez con la presencia de una G en la posición -168 en el extremo 5' del promotor tipo III de CIITA.

## **BIBLIOGRAFIA**





- 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* 47:391-8
- Abril E, Real LM, Serrano A, Jimenez P, Garcia A, Canton J, Trigo I, Garrido F, Ruiz-Cabello F (1998) Unresponsiveness to interferon associated with STAT1 protein deficiency in a gastric adenocarcinoma cell line. *Cancer Immunol Immunother* 47:113-20
- Alexander WS, Starr R, Fenner JE, Scott CL, Handman E, Sprigg NS, Corbin JE, Cornish AL, Darwiche R, Owczarek CM, Kay TW, Nicola NA, Hertzog PJ, Metcalf D, Hilton DJ (1999) SOCS1 is a critical inhibitor of interferon gamma signaling and prevents the potentially fatal neonatal actions of this cytokine. *Cell* 98:597-608
- Alpan RS, Zhang M, Pardee AB (1996) Cell cycle-dependent expression of TAP1, TAP2, and HLA-B27 messenger RNAs in a human breast cancer cell line. *Cancer Res* 56:4358-61
- Amarnath SM, Dyer CE, Ramesh A, Iwuagwu O, Drew PJ, Greenman J (2004) In vitro quantification of the cytotoxic T lymphocyte response against human telomerase reverse transcriptase in breast cancer. *Int J Oncol* 25:211-7
- Andersen SN, Rognum TO, Lund E, Meling GI, Hauge S (1993) Strong HLA-DR expression in large bowel carcinomas is associated with good prognosis. *Br J Cancer* 68:80-5
- Armstrong BK, Krickler A (2001) The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B* 63:8-18
- Ashkenazi A, Dixit VM (1998) Death receptors: signaling and modulation. *Science* 281:1305-8
- Baban B, Hansen AM, Chandler PR, Manlapat A, Bingaman A, Kahler DJ, Munn DH, Mellor AL (2005) A minor population of splenic dendritic cells expressing CD19 mediates IDO-dependent T cell suppression via type I IFN signaling following B7 ligation. *Int Immunol* 17:909-19
- Bale SJ, Chakravarti A, Greene MH (1986) Cutaneous malignant melanoma and familial dysplastic nevi: evidence for autosomal dominance and pleiotropy. *Am J Hum Genet* 38:188-96
- Barnhill RL, Roush GC, Titus-Ernstoff L, Ernstoff MS, Duray PH, Kirkwood JM (1992) Comparison of nonfamilial and familial melanoma. *Dermatology* 184:2-7
- 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* 285:727-9
- Beckhove P, Feuerer M, Dolenc M, Schuetz F, Choi C, Sommerfeldt N, Schwendemann J, Ehlert K, Altevogt P, Bastert G, Schirmacher V, Umansky V (2004) Specifically activated memory T cell subsets from cancer patients recognize and reject xenotransplanted autologous tumors. *J Clin Invest* 114:67-76
- 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 (1998a) Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 52:520-9
- 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 (1998b) Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 52:520-9
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-8
- Billiau A, Heremans H, Vandekerckhove F, Dijkmans R, Sobis H, Meulepas E, Carton H (1988) Enhancement of experimental allergic encephalomyelitis in mice by antibodies against IFN-gamma. *J Immunol* 140:1506-10
- Binder RJ, Srivastava PK (2005) Peptides chaperoned by heat-shock proteins are a necessary and sufficient source of antigen in the cross-priming of CD8+ T cells. *Nat Immunol* 6:593-9
- 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* 89:3488-92
- Bliss JM, Ford D, Swerdlow AJ, Armstrong BK, Cristofolini M, Elwood JM, Green A, Holly EA, Mack T, MacKie RM, et al (1995) Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies. The International Melanoma Analysis Group (IMAGE). *Int J Cancer* 62:367-76
- Blobe GC, Schiemann WP, Lodish HF (2000) Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342:1350-8
- Bluyssen HA, Muzaffar R, Vlieststra RJ, van der Made AC, Leung S, Stark GR, Kerr IM, Trapman J, Levy DE (1995) Combinatorial association and abundance of components of interferon-stimulated gene factor 3 dictate the selectivity of interferon responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5645-9
- Boles KS, Barchet W, Diacovo T, Cella M, Colonna M (2005) The tumor suppressor TSLC1/NECL-2 triggers NK-cell and CD8+ T-cell responses through the cell-surface receptor CRTAM. *Blood* 106:779-86
- Boon T, van der Bruggen P (1996) Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *J Exp Med* 183:725-9
- Bowman T, Broome MA, Sinibaldi D, Wharton W, Pledger WJ, Sedivy JM, Irby R, Yeatman T, Courtneidge SA, Jove R (2001) Stat3-mediated Myc expression is required for Src transformation and PDGF-induced mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7319-24
- 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
- Brockher EB, Suter L, Bruggen J, Ruiter DJ, Macher E, Sorg C (1985) Phenotypic dynamics of tumor progression in human malignant melanoma. *Int J Cancer* 36:29-35
- Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE Jr (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell* 98:295-303

- Bronte V, Kasic T, Gri G, Gallana K, Borsellino G, Marigo I, Battistini L, Iafrate M, Prayer-Galetti T, Pagano F, Viola A (2005) Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J Exp Med* 201:1257-68
- Brown JR, DuBois RN (2005) COX-2: a molecular target for colorectal cancer prevention. *J Clin Oncol* 23:2840-55
- 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
- Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Bicknell DC, Bodmer JG, Bodmer WF (1993) Tissue typing the HLA-A locus from genomic DNA by sequence-specific PCR: comparison of HLA genotype and surface expression on colorectal tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:2842-5
- Brunner CA, Gokel JM, Riethmuller, Johnson JP (1991) Expression of HLA-D subloci DR and DQ by breast carcinomas is correlated with distinct parameters of favourable prognosis. *Eur J Cancer* 27:411-6
- Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X (1999) Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:269-90
- 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* 61:211-9
- 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* 113:611-8
- 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, Pedrajas G, Cozar JM, Garrido A, Vicente J, Tallada M, Garrido F (2003) HLA class I expression in bladder carcinomas. *Tissue Antigens* 62:324-7
- Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F (1995) Biological implications of HLA-DR expression in tumours. *Scand J Immunol* 41:398-406
- 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
- Calderwood SK, Theriault JR, Gong J (2005) Message in a bottle: role of the 70-kDa heat shock protein family in anti-tumor immunity. *Eur J Immunol* 35:2518-27
- Carmeliet P, Jain RK (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 407:249-57
- Chang CH, Guerder S, Hong SC, van Ewijk W, Flavell RA (1996) Mice lacking the MHC class

II transactivator (CIITA) show tissue-specific impairment of MHC class II expression. *Immunity* 4:167-78

Chen HL, Gabrilovich D, Tampe R, Girgis KR, Nadaf S, Carbone DP (1996) A functionally defective allele of TAP1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer. *Nat Genet* 13:210-3

Chin L (2003) The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man. *Nat Rev Cancer* 3:559-70

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* 98:11521-6

Concha A, Esteban F, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F (1991) Tumor aggressiveness and MHC class I and II antigens in laryngeal and breast cancer. *Semin Cancer Biol* 2:47-54

Costello JF, Plass C (2001) Methylation matters. *J Med Genet* 38:285-303

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

Cui W, Fowles DJ, Bryson S, Duffie E, Ireland H, Balmain A, Akhurst RJ (1996) TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell* 86:531-42

Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W (2004) Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med* 10:942-9

Cutler SJ, Myers MH, Green SB (1975) Trends in survival rates of patients with cancer. *N Engl J Med* 293:122-4

D'Alessandro G, Zardawi I, Grace J, McCarthy WH, Hersey P (1987) Immunohistological evaluation of MHC class I and II antigen expression on nevi and melanoma: relation to biology of melanoma. *Pathology* 19:339-46

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

Daniel NN (2007) BCL-2 Family Proteins: Critical Checkpoints of Apoptotic Cell Death. *Clin Cancer Res* 13:7254-63

Darlington S, Siskind V, Green L, Green A (2002) Longitudinal study of melanocytic nevi in adolescents. *J Am Acad Dermatol* 46:715-22

Darnell JE Jr, Kerr IM, Stark GR (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264:1415-21

- De Lerma Barbaro A, Procopio FA, Mortara L, Tosi G, Accolla RS (2005) The MHC class II transactivator (CIITA) mRNA stability is critical for the HLA class II gene expression in myelomonocytic cells. *Eur J Immunol* 35:603-11
- de Nooij-van Dalen AG, van Buuren-van Seggelen VH, Lohman PH, Giphart-Gassler M (1998) Chromosome loss with concomitant duplication and recombination both contribute most to loss of heterozygosity in vitro. *Genes Chromosomes Cancer* 21:30-8
- de Vries TJ, Fourkour A, Wobbles T, Verkroost G, Ruiter 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* 57:3223-9
- Della Porta M, Danova M, Rigolin GM, Brugnattelli S, Rovati B, Tronconi C, Fraulini C, Russo Rossi A, Riccardi A, Castoldi G (2005) Dendritic cells and vascular endothelial growth factor in colorectal cancer: correlations with clinicobiological findings. *Oncology* 68:276-84
- Dhodapkar MV, Krasovsky J, Osman K, Geller MD (2003) Vigorous premalignancy-specific effector T cell response in the bone marrow of patients with monoclonal gammopathy. *J Exp Med* 198:1753-7
- 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
- Doerfler W (1983) DNA methylation and gene activity. *Annu Rev Biochem* 52:93-124
- Douhan J, Lieberson R, Knoll JH, Zhou H, Glimcher LH (1997) An isotype-specific activator of major histocompatibility complex (MHC) class II genes that is independent of class II transactivator. *J Exp Med* 185:1885-95
- Doyle A, Martin WJ, Funa K, Gazdar A, Carney D, Martin SE, Linnoila I, Cuttitta F, Mulshine J, Bunn P, et al (1985) Markedly decreased expression of class I histocompatibility antigens, protein, and mRNA in human small-cell lung cancer. *J Exp Med* 161:1135-51
- Drenou B, Tilanus M, Semana G, Alizadeh M, Birebent B, Grosset JM, Dias P, van Wichen D, Arts Y, De Santis D, Fauchet R, Amiot L (2004) Loss of heterozygosity, a frequent but a non-exclusive mechanism responsible for HLA dysregulation in non-Hodgkin's lymphomas. *Br J Haematol* 127:40-9
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD (2002) Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3:991-8
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004a) The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22:329-60
- Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004b) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21:137-48
- Dunn GP, Sheehan KC, Old LJ, Schreiber RD (2005) IFN unresponsiveness in LNCaP cells due to the lack of JAK1 gene expression. *Cancer Res* 65:3447-53
- Elwood JM, Jopson J (1997) Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int*

J Cancer 73:198-203

Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiya S, Yoshimura A (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387:921-4

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* 197:1213-9

Esteban F, Concha A, Delgado M, Perez-Ayala M, Ruiz-Cabello F, Garrido F (1990) Lack of MHC class I antigens and tumour aggressiveness of the squamous cell carcinoma of the larynx. *Br J Cancer* 62:1047-51

Fears TR, Bird CC, Guerry D 4th, Sagebiel RW, Gail MH, Elder DE, Halpern A, Holly EA, Hartge P, Tucker MA (2002) Average midrange ultraviolet radiation flux and time outdoors predict melanoma risk. *Cancer Res* 62:3992-6

Feenstra M, Rozemuller E, Duran K, Stuy I, van den Tweel J, Slootweg P, de Weger R, Tilanus M (1999a) Mutation in the beta 2m gene is not a frequent event in head and neck squamous cell carcinomas. *Hum Immunol* 60:697-706

Feenstra M, Veltkamp M, van Kuik J, Wiertsema S, Slootweg P, van den Tweel J, de Weger R, Tilanus M (1999b) HLA class I expression and chromosomal deletions at 6p and 15q in head and neck squamous cell carcinomas. *Tissue Antigens* 54:235-45

Ferrone S, Marincola FM (1995) Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today* 16:487-94

Fountain JW, Bale SJ, Housman DE, Dracopoli NC (1990) Genetics of melanoma. *Cancer Surv* 9:645-71

Fu XY, Kessler DS, Veals SA, Levy DE, Darnell JE Jr (1990) ISGF3, the transcriptional activator induced by interferon alpha, consists of multiple interacting polypeptide chains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:8555-9

Fu XY, Schindler C, Improtta T, Aebersold R, Darnell JE Jr (1992) The proteins of ISGF-3, the interferon alpha-induced transcriptional activator, define a gene family involved in signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:7840-3

Fulda S, Meyer E, Friesen C, Susin SA, Kroemer G, Debatin KM (2001) Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis. *Oncogene* 20:1063-75

Garrido F, Algarra I (2001) MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res* 83:117-58

Garrido F, Cabrera T, Concha A, Glew S, Ruiz-Cabello F, Stern PL (1993) Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunol Today* 14:491-9

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

Gastpar R, Gehrman M, Bausero MA, Asea A, Gross C, Schroeder JA, Multhoff G (2005) Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer Res* 65:5238-47

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

Ghiringhelli F, Menard C, Terme M, Flament C, Taieb J, Chaput N, Puig PE, Novault S, Escudier B, Vivier E, Lecesne A, Robert C, Blay JY, Bernard J, Caillat-Zucman S, Freitas A, Tursz T, Wagner-Ballon O, Capron C, Vainchencker W, Martin F, Zitvogel L (2005) CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med* 202:1075-85

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* 90:11568-72

Gobin SJ, van Zutphen M, Woltman AM, van den Elsen PJ (1999) Transactivation of classical and nonclassical HLA class I genes through the IFN-stimulated response element. *J Immunol* 163:1428-34

Goldberg SF, Miele ME, Hatta N, Takata M, Paquette-Straub C, Freedman LP, Welch DR (2003) Melanoma metastasis suppression by chromosome 6: evidence for a pathway regulated by CRSP3 and TXNIP. *Cancer Res* 63:432-40

Goldstein AM, Chidambaram A, Halpern A, Holly EA, Guerry IV D, Sagebiel R, Elder DE, Tucker MA (2002) Rarity of CDK4 germline mutations in familial melanoma. *Melanoma Res* 12:51-5

Goldstein AM, Martinez M, Tucker MA, Demenais F (2000a) Gene-covariate interaction between dysplastic nevi and the CDKN2A gene in American melanoma-prone families. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:889-94

Goldstein AM, Struewing JP, Chidambaram A, Fraser MC, Tucker MA (2000b) Genotype-phenotype relationships in U.S. melanoma-prone families with CDKN2A and CDK4 mutations. *J Natl Cancer Inst* 92:1006-10

Goodwin BL, Xi H, Tejiram R, Eason DD, Ghosh N, Wright KL, Nagarajan U, Boss JM, Blanck G (2001) Varying functions of specific major histocompatibility class II transactivator promoter III and IV elements in melanoma cell lines. *Cell Growth Differ* 12:327-35

Gorelik L, Flavell RA (2002) Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2:46-53

Green DR, Reed JC (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science* 281:1309-12

Griffioen M, Ouwerkerk IJ, Harten V, Schrier PI (2000) HLA-B locus-specific downregulation in human melanoma requires enhancer A as well as a sequence element located downstream of the transcription initiation site. *Immunogenetics* 52:121-8

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, Steinle A, Bauer S, Spies T (1998) Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial  $\gamma$  T cells. *Science* 279:1737-40

Gruber SB, Barnhill RL, Stenn KS, Roush GC (1989) Nevomelanocytic proliferations in association with cutaneous malignant melanoma: a multivariate analysis. *J Am Acad Dermatol* 21:773-80

Guan XY, Zhang HE, Zhou H, Sham JS, Fung JM, Trent JM (2002) Characterization of a complex chromosome rearrangement involving 6q in a melanoma cell line by chromosome microdissection. *Cancer Genet Cytogenet* 134:65-70

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* 274:1363-6

Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86:353-64

Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70

Harada H, Kondo T, Ogawa S, Tamura T, Kitagawa M, Tanaka N, Lamphier MS, Hirai H, Taniguchi T (1994) Accelerated exon skipping of IRF-1 mRNA in human myelodysplasia/leukemia; a possible mechanism of tumor suppressor inactivation. *Oncogene* 9:3313-20

Harrison SL, Buettner PG, MacLennan R (1999) Body-site distribution of melanocytic nevi in young Australian children. *Arch Dermatol* 135:47-52

Hibino Y, Kumar CS, Mariano TM, Lai DH, Pestka S (1992) Chimeric interferon-gamma receptors demonstrate that an accessory factor required for activity interacts with the extracellular domain. *J Biol Chem* 267:3741-9

Hilders CG, Houbiers JG, Krul EJ, Fleuren GJ (1994) The expression of histocompatibility-related leukocyte antigens in the pathway to cervical carcinoma. *Am J Clin Pathol* 101:5-12

Hilton DA, West KP (1990) An evaluation of the prognostic significance of HLA-DR expression in gastric carcinoma. *Cancer* 66:1154-7

Hilton DJ (1999) Negative regulators of cytokine signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 55:1568-77

Hofbauer GF, Kamarashev J, Geertsen R, Boni R, Dummer R (1998) Melan A/MART-1 immunoreactivity in formalin-fixed paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *Melanoma Res* 8:337-43

Hollenbeak CS, Todd MM, Billingsley EM, Harper G, Dyer AM, Lengerich EJ (2005) Increased incidence of melanoma in renal transplantation recipients. *Cancer* 104:1962-7

Holling TM, Schooten E, Langerak AW, van den Elsen PJ (2004) Regulation of MHC class II expression in human T-cell malignancies. *Blood* 103:1438-44

- Hopkins-Donaldson S, Ziegler A, Kurtz S, Bigosch C, Kandioler D, Ludwig C, Zangemeister-Wittke U, Stahel R (2003) Silencing of death receptor and caspase-8 expression in small cell lung carcinoma cell lines and tumors by DNA methylation. *Cell Death Differ* 10:356-64
- 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* 264:961-5
- Hussussian CJ, Struewing JP, Goldstein AM, Higgins PA, Ally DS, Sheahan MD, Clark WH Jr, Tucker MA, Dracopoli NC (1994) Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nat Genet* 8:15-21
- Ihle JN, Witthuhn BA, Quelle FW, Yamamoto K, Silvennoinen O (1995) Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu Rev Immunol* 13:369-98
- Imai K, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K (2000) Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356:1795-9
- Jager E, Ringhoffer M, Karbach J, Arand M, Oesch F, Knuth A (1996) Inverse relationship of melanocyte differentiation antigen expression in melanoma tissues and CD8+ cytotoxic-T-cell responses: evidence for immunoselection of antigen-loss variants in vivo. *Int J Cancer* 66:470-6
- Jemal A, Thomas A, Murray T, Thun M (2002) Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 52:23-47
- Jimenez P, Cabrera T, Mendez R, Esparza C, Cozar JM, Tallada M, Lopez-Nevot MA, Ruiz-Cabello F, Garrido F (2001) A nucleotide insertion in exon 4 is responsible for the absence of expression of an HLA-A\*0301 allele in a prostate carcinoma cell line. *Immunogenetics* 53:606-10
- 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
- Jimenez P, Canton J, Concha A, Cabrera T, Fernandez M, Real LM, Garcia A, Serrano A, Garrido F, Ruiz-Cabello F (2000) Microsatellite instability analysis in tumors with different mechanisms for total loss of HLA expression. *Cancer Immunol Immunother* 48:684-90
- Johnson DR, Pober JS (1994) HLA class I heavy-chain gene promoter elements mediating synergy between tumor necrosis factor and interferons. *Mol Cell Biol* 14:1322-32
- Jones PA, Taylor SM (1980) Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 20:85-93
- Kageshita T, Ishihara T, Campoli M, Ferrone S (2005) Selective monomorphic and polymorphic HLA class I antigenic determinant loss in surgically removed melanoma lesions. *Tissue Antigens* 65:419-28
- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH (1994a) A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264:436-40
- Kamb A, Shattuck-Eidens D, Eeles R, Liu Q, Gruis NA, Ding W, Hussey C, Tran T, Miki Y,

- Weaver-Feldhaus J, et al (1994b) Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus. *Nat Genet* 8:23-6
- Kamijo T, Weber JD, Zambetti G, Zindy F, Roussel MF, Sherr CJ (1998) Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:8292-7
- 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* 95:7556-61
- Karlsson P, Stenberg B, Rosdahl I (2000) Prevalence of pigmented naevi in a Swedish population living close to the Arctic Circle. *Acta Derm Venereol* 80:335-9
- Kelly JW, Rivers JK, MacLennan R, Harrison S, Lewis AE, Tate BJ (1994) Sunlight: a major factor associated with the development of melanocytic nevi in Australian schoolchildren. *J Am Acad Dermatol* 30:40-8
- Kobayashi N (1985) Malignant neoplasms in registered cases of primary immunodeficiency syndrome. *Jpn J Clin Oncol* 15 Suppl 1:307-12
- Koene GJ, Arts-Hilkes YH, van der Ven KJ, Rozemuller EH, Slootweg PJ, de Weger RA, Tilanus MG (2004) High level of chromosome 15 aneuploidy in head and neck squamous cell carcinoma lesions identified by FISH analysis: limited value of beta2-microglobulin LOH analysis. *Tissue Antigens* 64:452-61
- 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
- Kopf AW, Hellman LJ, Rogers GS, Gross DF, Rigel DS, Friedman RJ, Levenstein M, Brown J, Golomb FM, Roses DF, et al (1986) Familial malignant melanoma. *JAMA* 256:1915-9
- Kroemer G, Jaattela M (2005) Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat Rev Cancer* 5:886-97
- Lanier LL (2001) A renaissance for the tumor immunosurveillance hypothesis. *Nat Med* 7:1178-80
- Le Bouteiller P (1994) HLA class I chromosomal region, genes, and products: facts and questions. *Crit Rev Immunol* 14:89-129
- Lee KH, Panelli MC, Kim CJ, Riker AI, Bettinotti MP, Roden MM, Fetsch P, Abati A, Rosenberg SA, Marincola FM (1998) Functional dissociation between local and systemic immune response during anti-melanoma peptide vaccination. *J Immunol* 161:4183-94
- Lehmann F, Marchand M, Hainaut P, Pouillart P, Sastre X, Ikeda H, Boon T, Coulie PG (1995) Differences in the antigens recognized by cytolytic T cells on two successive metastases of a melanoma patient are consistent with immune selection. *Eur J Immunol* 25:340-7
- Levy DE, Lew DJ, Decker T, Kessler DS, Darnell JE Jr (1990) Synergistic interaction between interferon-alpha and interferon-gamma through induced synthesis of one subunit of the transcription factor ISGF3. *EMBO J* 9:1105-11

- Li Z, Menoret A, Srivastava P (2002) Roles of heat-shock proteins in antigen presentation and cross-presentation. *Curr Opin Immunol* 14:45-51
- Li Z, Metze D, Nashan D, Muller-Tidow C, Serve HL, Poremba C, Luger TA, Bohm M (2004) Expression of SOCS-1, suppressor of cytokine signalling-1, in human melanoma. *J Invest Dermatol* 123:737-45
- Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC (2002) Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* 169:2756-61
- Lopez-Nevot MA, Garcia E, Romero C, Oliva MR, Serrano S, Garrido F (1988) Phenotypic and genetic analysis of HLA class I and HLA-DR antigen expression on human melanomas. *Exp Clin Immunogenet* 5:203-12
- Maecker B, von Bergwelt-Baildon MS, Anderson KS, Vonderheide RH, Anderson KC, Nadler LM, Schultze JL (2005) Rare naturally occurring immune responses to three epitopes from the widely expressed tumour antigens hTERT and CYP1B1 in multiple myeloma patients. *Clin Exp Immunol* 141:558-62
- Maeurer MJ, Gollin SM, Storkus WJ, Swaney W, Karbach J, Martin D, Castelli C, Salter R, Knuth A, Lotze MT (1996) Tumor escape from immune recognition: loss of HLA-A2 melanoma cell surface expression is associated with a complex rearrangement of the short arm of chromosome 6. *Clin Cancer Res* 2:641-52
- 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, 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, Lopez Nevot MA, Seliger B, Garrido F (2004) Low frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21 in clear renal cell carcinomas. *Int J Cancer* 109:636-8
- Maleno I, Romero JM, Cabrera T, Paco L, Aptsiauri N, Cozar JM, Tallada M, Lopez-Nevot MA, Garrido F (2006) LOH at 6p21.3 region and HLA class I altered phenotypes in bladder carcinomas. *Immunogenetics* 58:503-10
- Mansson-Brahme E, Johansson H, Larsson O, Rutqvist LE, Ringborg U (2002) Trends in incidence of cutaneous malignant melanoma in a Swedish population 1976-1994. *Acta Oncol* 41:138-46
- Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S (2000) Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 74:181-273
- Marincola FM, Shamamian P, Alexander RB, Gnarra JR, Turetskaya RL, Nedospasov SA, Simonis TB, Taubenberger JK, Yannelli J, Mixon A, et al (1994) Loss of HLA haplotype and B

locus down-regulation in melanoma cell lines. *J Immunol* 153:1225-37

Marine JC, Topham DJ, McKay C, Wang D, Parganas E, Stravopodis D, Yoshimura A, Ihle JN (1999) SOCS1 deficiency causes a lymphocyte-dependent perinatal lethality. *Cell* 98:609-16

Matzinger P (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 12:991-1045

Mazurenko NN, Beliakov IS, Bliev AI, Guo Z, Hu X, Vinokurova SV, Bidzhieva BA, Pavlova LS, Ponten J, Kiselev FL (2003) [Cervical carcinoma progression-associated genetic alterations on chromosome 6]. *Mol Biol (Mosk)* 37:472-81

McEvoy CR, Morley AA, Firgaira FA (2003) Evidence for whole chromosome 6 loss and duplication of the remaining chromosome in acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 37:321-5

McGovern VJ, Cochran AJ, Van der Esch EP, Little JH, MacLennan R (1986) The classification of malignant melanoma, its histological reporting and registration: a revision of the 1972 Sydney classification. *Pathology* 18:12-21

Meier F, Will S, Ellwanger U, Schlagenhauff B, Schitteck B, Rassner G, Garbe C (2002) Metastatic pathways and time courses in the orderly progression of cutaneous melanoma. *Br J Dermatol* 147:62-70

Meissner M, Reichert TE, Kunkel M, Gooding W, Whiteside TL, Ferrone S, Seliger B (2005) Defects in the human leukocyte antigen class I antigen processing machinery in head and neck squamous cell carcinoma: association with clinical outcome. *Clin Cancer Res* 11:2552-60

Mellor AL, Chandler P, Baban B, Hansen AM, Marshall B, Pihkala J, Waldmann H, Cobbold S, Adams E, Munn DH (2004) Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Int Immunol* 16:1391-401

Mendez R, Rodriguez T, Del Campo A, Monge E, Maleno I, Aptsiauri N, Jimenez P, Pedrinaci S, Pawelec G, Ruiz-Cabello F, Garrido F (2007) Characterization of HLA class I altered phenotypes in a panel of human melanoma cell lines. *Cancer Immunol Immunother*

Mihm MC Jr, Clark WH Jr, From L (1971) The clinical diagnosis, classification and histogenetic concepts of the early stages of cutaneous malignant melanomas. *N Engl J Med* 284:1078-82

Mihm MC Jr, Fitzpatrick TB, Brown MM, Raker JW, Malt RA, Kaiser JS (1973) Early detection of primary cutaneous malignant melanoma. A color atlas. *N Engl J Med* 289:989-96

Miyagi T, Tatsumi T, Takehara T, Kanto T, Kuzushita N, Sugimoto Y, Jinushi M, Kasahara A, Sasaki Y, Hori M, Hayashi N (2003) Impaired expression of proteasome subunits and human leukocyte antigens class I in human colon cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol* 18:32-40

Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ (1981) Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science* 211:393-6

Morimoto Y, Toyota M, Satoh A, Murai M, Mita H, Suzuki H, Takamura Y, Ikeda H, Ishida T, Sato N, Tokino T, Imai K (2004) Inactivation of class II transactivator by DNA methylation and

histone deacetylation associated with absence of HLA-DR induction by interferon-gamma in haematopoietic tumour cells. *Br J Cancer* 90:844-52

Morris AC, Beresford GW, Mooney MR, Boss JM (2002) Kinetics of a gamma interferon response: expression and assembly of CIITA promoter IV and inhibition by methylation. *Mol Cell Biol* 22:4781-91

Muhlethaler-Mottet A, Otten LA, Steimle V, Mach B (1997) Expression of MHC class II molecules in different cellular and functional compartments is controlled by differential usage of multiple promoters of the transactivator CIITA. *EMBO J* 16:2851-60

Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, Messina JL, Chandler P, Koni PA, Mellor AL (2004) Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 114:280-90

Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL Jr, Mellor AL (2002) Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297:1867-70

Muraoka-Cook RS, Dumont N, Arteaga CL (2005) Dual role of transforming growth factor beta in mammary tumorigenesis and metastatic progression. *Clin Cancer Res* 11:937s-43s

Nabarro S, Himoudi N, Papanastasiou A, Gilmour K, Gibson S, Sebire N, Thrasher A, Blundell MP, Hubank M, Canderan G, Anderson J (2005) Coordinated oncogenic transformation and inhibition of host immune responses by the PAX3-FKHR fusion oncoprotein. *J Exp Med* 202:1399-410

Naka T, Narazaki M, Hirata M, Matsumoto T, Minamoto S, Aono A, Nishimoto N, Kajita T, Taga T, Yoshizaki K, Akira S, Kishimoto T (1997) Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387:924-9

Nakachi K, Hayashi T, Imai K, Kusunoki Y (2004) Perspectives on cancer immunoepidemiology. *Cancer Sci* 95:921-9

Nicholson SE, Willson TA, Farley A, Starr R, Zhang JG, Baca M, Alexander WS, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA (1999) Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *EMBO J* 18:375-85

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* 22:1615-23

Nikcevich KM, Piskurich JF, Hellendall RP, Wang Y, Ting JP (1999) Differential selectivity of CIITA promoter activation by IFN-gamma and IRF-1 in astrocytes and macrophages: CIITA promoter activation is not affected by TNF-alpha. *J Neuroimmunol* 99:195-204

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* 21:2000-8

Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA (1994) Deletions of the cyclin-

dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature* 368:753-6

O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F (1996) The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 184:1075-82

Ohm JE, Gabrilovich DI, Sempowski GD, Kisseleva E, Parman KS, Nadaf S, Carbone DP (2003) VEGF inhibits T-cell development and may contribute to tumor-induced immune suppression. *Blood* 101:4878-86

Old LJ (2003) Cancer vaccines 2003: opening address. *Cancer Immun* 3 Suppl 2:1

Ono SJ, Bazil V, Sugawara M, Strominger JL (1991) An isotype-specific trans-acting factor is defective in a mutant B cell line that expresses HLA-DQ, but not -DR or -DP. *J Exp Med* 173:629-37

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

Pawelec G, Marsh SG (2006) ESTDAB: a collection of immunologically characterised melanoma cell lines and searchable databank. *Cancer Immunol Immunother* 55:623-7

Penn I (2000) Post-transplant malignancy: the role of immunosuppression. *Drug Saf* 23:101-13

Pepper MS (1997) Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis, and vessel wall integrity. *Cytokine Growth Factor Rev* 8:21-43

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

Pfahlberg A, Kolmel KF, Gefeller O (2001) Timing of excessive ultraviolet radiation and melanoma: epidemiology does not support the existence of a critical period of high susceptibility to solar ultraviolet radiation-induced melanoma. *Br J Dermatol* 144:471-5  
Notes: CORPORATE NAME: Febim Study Group

Poetsch M, Dittberner T, Woenckhaus C (2003) Can different genetic changes characterize histogenetic subtypes and biologic behavior in sporadic malignant melanoma of the skin? *Cell Mol Life Sci* 60:1923-32

Puig S, Ruiz A, Castel T, Volpini V, Malveyh J, Cardellach F, Lynch M, Mascaro JM, Estivill X (1997) Inherited susceptibility to several cancers but absence of linkage between dysplastic nevus syndrome and CDKN2A in a melanoma family with a mutation in the CDKN2A (P16INK4A) gene. *Hum Genet* 101:359-64

Pupa SM, Tagliabue E, Menard S, Anichini A (2005) HER-2: a biomarker at the crossroads of breast cancer immunotherapy and molecular medicine. *J Cell Physiol* 205:10-8

Ramal LM, Feenstra M, van der Zwan AW, Collado A, Lopez-Nevot MA, Tilanus M, Garrido F (2000a) Criteria to define HLA haplotype loss in human solid tumors. *Tissue Antigens* 55:443-8

Ramal LM, Maleno I, Cabrera T, Collado A, Ferron A, Lopez-Nevot MA, Garrido F (2000b) Molecular strategies to define HLA haplotype loss in microdissected tumor cells. *Hum Immunol*

61:1001-12

Raulet DH (2003) Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 3:781-90

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

Reintgen DS, McCarty KM Jr, Cox E, Seigler HF (1982) Malignant melanoma in black American and white American populations. A comparative review. *JAMA* 248:1856-9

Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli JR, Rosenberg SA (1996) Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst* 88:100-8

Riggs AD, Jones PA (1983) 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Adv Cancer Res* 40:1-30

Riker A, Cormier J, Panelli M, Kammula U, Wang E, Abati A, Fetsch P, Lee KH, Steinberg S, Rosenberg S, Marincola F (1999) Immune selection after antigen-specific immunotherapy of melanoma. *Surgery* 126:112-20

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

Rosenberg SA (1999) A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. *Immunity* 10:281-7

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* 86:1159-66

Rowe M, Khanna R, Jacob CA, Argat V, Kelly A, Powis S, Belich M, Croom-Carter D, Lee S, Burrows SR, et al (1995) Restoration of endogenous antigen processing in Burkitt's lymphoma cells by Epstein-Barr virus latent membrane protein-1: coordinate up-regulation of peptide transporters and HLA-class I antigen expression. *Eur J Immunol* 25:1374-84

Rubocki RJ, Berrigan BE, Speaks SL, Wisecarver JL (1996) Locus-specific de novo methylation down-regulates MHC class I in S49 lymphomas. *Immunogenetics* 43:63-7

Ruiter DJ, Mattijssen V, Broecker EB, Ferrone S (1991) MHC antigens in human melanomas. *Semin Cancer Biol* 2:35-45

Ruiz-Cabello F, Lopez Nevot MA, Gutierrez J, Oliva MR, Romero C, Ferron A, Esteban F, Huelin C, Piris MA, Rivas C, et al (1989) Phenotypic expression of histocompatibility antigens in human primary tumours and metastases. *Clin Exp Metastasis* 7:213-26

Ruiz-Cabello F, Perez-Ayala M, Gomez O, Redondo M, Concha A, Cabrera T, Garrido F (1991) Molecular analysis of MHC-class-I alterations in human tumor cell lines. *Int J Cancer Suppl* 6:123-30



- Ruiz-Ruiz C, Ruiz de Almodovar C, Rodriguez A, Ortiz-Ferron G, Redondo JM, Lopez-Rivas A (2004) The up-regulation of human caspase-8 by interferon-gamma in breast tumor cells requires the induction and action of the transcription factor interferon regulatory factor-1. *J Biol Chem* 279:19712-20
- Russo AA, Tong L, Lee JO, Jeffrey PD, Pavletich NP (1998) Structural basis for inhibition of the cyclin-dependent kinase Cdk6 by the tumour suppressor p16INK4a. *Nature* 395:237-43
- Ryschich E, Cebotari O, Fabian OV, Autschbach F, Kleeff J, Friess H, Bierhaus A, Buchler MW, Schmidt J (2004) Loss of heterozygosity in the HLA class I region in human pancreatic cancer. *Tissue Antigens* 64:696-702
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155:1151-64
- Sakamoto H, Yasukawa H, Masuhara M, Tanimura S, Sasaki A, Yuge K, Ohtsubo M, Ohtsuka A, Fujita T, Ohta T, Furukawa Y, Iwase S, Yamada H, Yoshimura A (1998) A Janus kinase inhibitor, JAB, is an interferon-gamma-inducible gene and confers resistance to interferons. *Blood* 92:1668-76
- 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
- Sanda MG, Restifo NP, Walsh JC, Kawakami Y, Nelson WG, Pardoll DM, Simons JW (1995) Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 87:280-5
- Satoh A, Toyota M, Ikeda H, Morimoto Y, Akino K, Mita H, Suzuki H, Sasaki Y, Kanaseki T, Takamura Y, Soejima H, Urano T, Yanagihara K, Endo T, Hinoda Y, Fujita M, Hosokawa M, Sato N, Tokino T, Imai K (2004) Epigenetic inactivation of class II transactivator (CIITA) is associated with the absence of interferon-gamma-induced HLA-DR expression in colorectal and gastric cancer cells. *Oncogene* 23:8876-86
- Schindler C, Darnell JE Jr (1995) Transcriptional responses to polypeptide ligands: the JAK-STAT pathway. *Annu Rev Biochem* 64:621-51
- Schnappauf F, Hake SB, Camacho Carvajal MM, Bontron S, Lisowska-Grospierre B, Steimle V (2003) N-terminal destruction signals lead to rapid degradation of the major histocompatibility complex class II transactivator CIITA. *Eur J Immunol* 33:2337-47
- Schreiber H, Wu TH, Nachman J, Kast WM (2002) Immunodominance and tumor escape. *Semin Cancer Biol* 12:25-31
- Scupoli MT, Sartoris S, Tosi G, Ennas MG, Nicolis M, Cestari T, Zamboni G, Martignoni G, Lemoine NR, Scarpa A, Accolla RS (1996) Expression of MHC class I and class II antigens in pancreatic adenocarcinomas. *Tissue Antigens* 48:301-11
- 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, Hohne A, Knuth A, Bernhard H, Ehring B, Tampe R, Huber C (1996) Reduced

membrane major histocompatibility complex class I density and stability in a subset of human renal cell carcinomas with low TAP and LMP expression. *Clin Cancer Res* 2:1427-33

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* 61:8647-50

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* 51:1047-52

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

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* 410:1107-11

Shevach EM (2004) Regulatory/suppressor T cells in health and disease. *Arthritis Rheum* 50:2721-4

Smyth MJ, Crowe NY, Godfrey DI (2001) NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol* 13:459-63

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, Wallace ME, Nutt SL, Yagita H, Godfrey DI, Hayakawa Y (2005) Sequential activation of NKT cells and NK cells provides effective innate immunotherapy of cancer. *J Exp Med* 201:1973-85

Sober AJ, Fitzpatrick TB, Mihm MC, Wise TG, Pearson BJ, Clark WH, Kopf AW (1979) Early recognition of cutaneous melanoma. *JAMA* 242:2795-9

Soong TW, Hui KM (1991) Identification of locus-specific DNA-binding factors for the regulation of HLA class-I genes in human colorectal cancer. *Int J Cancer Suppl* 6:131-7

Srivastava P (2002) Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses. *Annu Rev Immunol* 20:395-425

Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387:917-21

Stassi G, Todaro M, Zerilli M, Ricci-Vitiani L, Di Liberto D, Patti M, Florena A, Di Gaudio F, Di Gesu G, De Maria R (2003) Thyroid cancer resistance to chemotherapeutic drugs via autocrine production of interleukin-4 and interleukin-10. *Cancer Res* 63:6784-90

Stefanidakis M, Koivunen E (2006) Cell-surface association between matrix metalloproteinases

and integrins: role of the complexes in leukocyte migration and cancer progression. *Blood* 108:1441-50

Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463-516

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM (2000) Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69:217-45

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

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

Suzuki H, Graziano DF, McKolanis J, Finn OJ (2005) T cell-dependent antibody responses against aberrantly expressed cyclin B1 protein in patients with cancer and premalignant disease. *Clin Cancer Res* 11:1521-6

Svane IM, Engel AM, Nielsen MB, Ljunggren HG, Rygaard J, Werdelin O (1996) Chemically induced sarcomas from nude mice are more immunogenic than similar sarcomas from congenic normal mice. *Eur J Immunol* 26:1844-50

Swanberg M, Lidman O, Padyukov L, Eriksson P, Akesson E, Jagodic M, Lobell A, Khademi M, Borjesson O, Lindgren CM, Lundman P, Brookes AJ, Kere J, Luthman H, Alfredsson L, Hillert J, Klareskog L, Hamsten A, Piehl F, Olsson T (2005) MHC2TA is associated with differential MHC molecule expression and susceptibility to rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and myocardial infarction. *Nat Genet* 37:486-94

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* 195:161-9

Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, Behm FG, Look AT, Lahti JM, Kidd VJ (2000) Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 6:529-35

Thome M, Schneider P, Hofmann K, Fickenscher H, Meinel E, Neipel F, Mattmann C, Burns K, Bodmer JL, Schroter M, Scaffidi C, Krammer PH, Peter ME, Tschopp J (1997) Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature* 386:517-21

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

Tucker MA, Fraser MC, Goldstein AM, Struewing JP, King MA, Crawford JT, Chiazze EA, Zametkin DP, Fontaine LS, Clark WH Jr (2002) A natural history of melanomas and dysplastic nevi: an atlas of lesions in melanoma-prone families. *Cancer* 94:3192-209

Turkson J, Bowman T, Garcia R, Caldenhoven E, De Groot RP, Jove R (1998) Stat3 activation by Src induces specific gene regulation and is required for cell transformation. *Mol Cell Biol* 18:2545-52

van den Elsen PJ, van der Stoep N, Vietor HE, Wilson L, van Zutphen M, Gobin SJ (2000)

Lack of CIITA expression is central to the absence of antigen presentation functions of trophoblast cells and is caused by methylation of the IFN-gamma inducible promoter (PIV) of CIITA. *Hum Immunol* 61:850-62

van den Ingh HF, Ruiter DJ, Griffioen G, van Muijen GN, Ferrone S (1987) HLA antigens in colorectal tumours--low expression of HLA class I antigens in mucinous colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 55:125-30

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* 254:1643-7

van der Stoep N, Biesta P, Quinten E, van den Elsen PJ (2002) Lack of IFN-gamma-mediated induction of the class II transactivator (CIITA) through promoter methylation is predominantly found in developmental tumor cell lines. *Int J Cancer* 97:501-7

van Vreeswijk H, Ruiter DJ, Brocker EB, Welvaart K, Ferrone S (1988) Differential expression of HLA-DR, DQ, and DP antigens in primary and metastatic melanoma. *J Invest Dermatol* 90:755-60

Vicari AP, Caux C (2002) Chemokines in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 13:143-54

Viguiier M, Lemaitre F, Verola O, Cho MS, Gorochov G, Dubertret L, Bachelez H, Kourilsky P, Ferradini L (2004) Foxp3 expressing CD4+CD25(high) regulatory T cells are overrepresented in human metastatic melanoma lymph nodes and inhibit the function of infiltrating T cells. *J Immunol* 173:1444-53

von Boehmer H (2005) Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol* 6:338-44

Vora AR, Rodgers S, Parker AJ, Start R, Rees RC, Murray AK (1997) An immunohistochemical study of altered immunomodulatory molecule expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 76:836-44

Wachsmuth RC, Gaut RM, Barrett JH, Saunders CL, Randerson-Moor JA, Eldridge A, Martin NG, Bishop TD, Newton Bishop JA (2001) Heritability and gene-environment interactions for melanocytic nevus density examined in a U.K. adolescent twin study. *J Invest Dermatol* 117:348-52

Waldburger JM, Suter T, Fontana A, Acha-Orbea H, Reith W (2001) Selective abrogation of major histocompatibility complex class II expression on extrahematopoietic cells in mice lacking promoter IV of the class II transactivator gene. *J Exp Med* 194:393-406

Walker PR, Saas P, Dietrich PY (1997) Role of Fas ligand (CD95L) in immune escape: the tumor cell strikes back. *J Immunol* 158:4521-4

Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D, Yu H (2004) Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med* 10:48-54

Wang X, Yu J, Sreekumar A, Varambally S, Shen R, Giacherio D, Mehra R, Montie JE, Pienta KJ, Sanda MG, Kantoff PW, Rubin MA, Wei JT, Ghosh D, Chinnaiyan AM (2005) Autoantibody signatures in prostate cancer. *N Engl J Med* 353:1224-35

- Wang Z, Cao Y, Albino AP, Zeff RA, Houghton A, Ferrone S (1993) Lack of HLA class I antigen expression by melanoma cells SK-MEL-33 caused by a reading frameshift in beta 2-microglobulin messenger RNA. *J Clin Invest* 91:684-92
- Wang Z, Marincola FM, Rivoltini L, Parmiani G, Ferrone S (1999) Selective histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-A2 loss caused by aberrant pre-mRNA splicing in 624MEL28 melanoma cells. *J Exp Med* 190:205-15
- Wang Z, Seliger B, Mike N, Momburg F, Knuth A, Ferrone S (1998) Molecular analysis of the HLA-A2 antigen loss by melanoma cells SK-MEL-29.1.22 and SK-MEL-29.1.29. *Cancer Res* 58:2149-57
- Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC (2001) Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer Causes Control* 12:69-82
- Willimsky G, Blankenstein T (2005) Sporadic immunogenic tumours avoid destruction by inducing T-cell tolerance. *Nature* 437:141-6
- Wong LH, Krauer KG, Hatzinisiriou I, Estcourt MJ, Hersey P, Tam ND, Edmondson S, Devenish RJ, Ralph SJ (1997) Interferon-resistant human melanoma cells are deficient in ISGF3 components, STAT1, STAT2, and p48-ISGF3gamma. *J Biol Chem* 272:28779-85
- Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle JN, Yoshimura A (1999) The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 18:1309-20
- Yoon SJ, Kang JO, Park JS, Kim NK, Heo DS (2000) Reduced expression of MHC class I antigen in human cancer cell lines with defective LMP-7. *Anticancer Res* 20:949-53
- Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, Ahmed R (1998) Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med* 188:2205-13
- Zhang Y, Xiong Y, Yarbrough WG (1998) ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: ARF-INK4a locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* 92:725-34