

UNIVERSIDAD DE GRANADA

TESIS DOCTORAL



**EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS HLA-E Y MICA EN
TUMORES HUMANOS**

M^a del Rosario Marín Iglesias

HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES

GRANADA

EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS HLA-E Y MICA EN TUMORES

HUMANOS

Trabajo presentado por M^a del Rosario Marín Iglesias para optar al grado de Doctor en

Medicina y Cirugía

Noviembre 2005

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

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado: “EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS HLA-E Y MICA EN TUMORES HUMANOS”, ha sido realizado bajo mi dirección por M^a del Rosario Marín Iglesias, para optar al título de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que conste se firma el presente certificado en Granada, a 30 de Noviembre del 2005.

D. Federico Garrido Torres-Puchol

D. FRANCISCO RUIZ-CABELLO OSUNA, DOCTOR EN FARMACIA Y JEFE DE SECCIÓN DEL SERVICIO DE ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL VIRGEN DE LAS NIEVES DE GRANADA.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado: “EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS HLA-E Y MICA EN TUMORES HUMANOS”, ha sido realizado bajo mi dirección por M^a del Rosario Marín Iglesias, para optar al título de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que conste se firma el presente certificado en Granada, a 30 de Noviembre del 2005.

D. Francisco Ruiz-Cabello Osuna

D. SUSANA PEDRINACI RODRIGUEZ, DOCTOR EN MEDICINA Y FACULTATIVO ESPECIALISTA DE AREA DEL SERVICIO DE ANALISIS CLINICOS DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO VIRGEN DE LAS NIEVES. GRANADA.

CERTIFICA: Que el presente trabajo de investigación titulado: “EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS HLA-E Y MICA EN TUMORES HUMANOS”, ha sido realizado bajo mi dirección por M^a del Rosario Marín Iglesias, para optar al título de Doctor en Medicina y Cirugía.

Y para que conste se firma el presente certificado en Granada, a 30 de Noviembre del 2005.

Dña. Susana Pedrinaci Rodríguez

Fruto de los resultados obtenidos en la realización de esta tesis doctoral son las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos nacionales e internacionales:

Marín, R; Ruiz-Cabello, F; Pedrinaci, S; Méndez, R; Esparza, C; Geraghty, D. E; Garrido, F.

Análisis of the HLA-E expresión in human tumors. Immunogenetics. 2001. 53: 606-610.

Marín, R; Pedrinaci, S; Ruiz-Cabello, F; García Lora, A; Geraghty, D. E; Garrido, F. Análisis of HLA-E class Ib expresión in tumor cell lines. EFI 15th European Histocompatibility Conference. Granada 27-30. Marzo 2001. Eur J Immunogenetics 2001, 28: 325.

Marín, R; Méndez, R; Pedrinaci, S; Ruiz-Cabello, F; Geraghty, D. E; Garrido, F. A HLA-E expression in tumor cell lines. EFI 16th European Histocompatibility Conference. Strasbourg 19-22 Marzo 2002. Eur J Immunogenetics 2002, 28: 97.

Marín, R; Méndez, R; Pedrinaci, S; Ruiz-Cabello, F; Esparza, C; Geraghty, D. E; Garrido, F. El residuo de HLA-E: factor importante para la expresión en superficie de esta molécula en líneas tumorales humanas. XXVIII Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Valladolid 11-14 de Junio 2002. Inmunología 2002, 21: 85-86.

Marín Iglesias, R; Ruiz-Cabello, F; Romero Noguera, J; Rodríguez Ruiz, T; Jiménez Gámiz, P; Méndez, R; Pedrinaci, S; Garrido, F. Análisis cuantitativo de la expresión del gen HLA-E en líneas celulares humanas. XXIX Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Cádiz 27-30 Mayo 2003. Inmunología 2003, 22: 139.

Marín, R; Ruiz-Cabello, F; Romero, J.M; Jiménez, P; Méndez, R; Pedrinaci, S; Garrido, F. Variaciones en el nivel de transcripción de HLA-E y la disponibilidad de β 2m pueden determinar las diferencias en la expresión de HLA-E en la superficie tumoral de FM55/R22.2. XXIX Congreso de la Sociedad Española de Inmunología. Cádiz 27-30 Mayo 2003. Inmunología 2003, 22: 138.

“A mis seres queridos,
con los que es un placer caminar por la vida.
os quiero.
Especialmente a Javichu,
que me ha enseñado a valorar cada minuto”.

Agradecimientos

En primer lugar agradecer al Dr. Federico Garrido la oportunidad que me brindó de poder incorporarme a su equipo de investigación y poner a mi alcance todos los medios y recursos para la realización de esta tesis doctoral.

Quisiera agradecer a la Dra. Pedrinaci el que me iniciase en este trabajo. Al Dr. D. E. Gerarghty (Seattle, USA) así como a la Dra. Caillat Zucman (Paris) por haberme ofrecido la oportunidad de poder trabajar con sus anticuerpos monoclonales.

Gracias de todo corazón y en especial al Dr. Francisco Ruiz-Cabello, me considero afortunada de poder haber trabajado bajo su dirección. Con su ayuda y dedicación he podido no sólo obtener los resultados de esta Tesis Doctoral sino lograr terminarla de escribir, poniendo al límite a veces su paciencia. Muchas gracias.

A la Dra. Teresa Cabrera por su apoyo y ánimo constate, aún recuerdo las lecciones rápidas de “Power Point”. Gracias por ser siempre tan cariñosa conmigo.

He tenido la suerte, durante la realización de este trabajo, de compartir el tiempo, alegrías y risas en los desayunos o en los Congresos, también penurias, con mis compañeros Internos Residentes: Chema, M^a Sol, Acal, Carmen, Teresa, Rosa y Cristina. Especialmente a Jose M^a (Chema) mi compi y a Pili. Gracias a Rosa, Julia y Pilar por su ayuda y cooperación.

Recordar a los Médicos Adjuntos del Servicio de Análisis Clínicos por todos los buenos momentos que hemos compartido así como por haberme facilitado y apoyado en la realización de este trabajo de investigación.

Gracias por la colaboración prestada por el personal técnico de las Secciones de Genética Molecular y Biopatología tumoral: A Pepi Gil, Carmen Amezcua, Inmaculada Delgado y a Carmen González.

Antes de terminar no puedo dejar de mencionar a mi familia que me han estado apoyando continuamente y a pesar de estar lejos durante la realización de este trabajo los he sentido siempre cerca. A mi novio, hoy mi marido Javier, gracias por haber estado siempre ahí, por ofrecerme lo que me hacía falta en cada momento y por empujarme a seguir al final del camino. Os quiero.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.- CÉLULAS NK Y LOS RECEPTORES DE LOS LIGANDOS HLA-E Y MICA.	3
1.1.- Receptores inhibidores de las células NK: CD94/NKG2A.	4
1.1.1.-Receptores NK de la superfamilia de las inmunoglobulinas.	5
1.1.2.- Receptores tipo lectina para moléculas del MHC: CD94/NKG2A.	7
1.1.3.- Otros receptores inhibidores NK.	9
1.1.4.- Mecanismo de inhibición de las células NK.	9
1.2.- Receptores activadores de las células NK: NKG2D.	10
1.2.1- Vía de estimulación de la célula NK a través de NKG2D.	12
1.2.2- NKG2D y cáncer.	
2.- MOLÉCULAS DEL MHC NO CLÁSICAS (MHC IB): GENERALIDADES.	14
3.- LA MOLÉCULA HLA-E.	16
3.1.- Estructura de la molécula HLA-E.	17
3.2.- Expresión en superficie de la molécula HLA-E: Factores condicionantes.	19
3.3.- Función de la molécula HLA-E.	21
4.- LA MOLÉCULA RELACIONADA CON EL MHC: MICA.	25
4.1.- Expresión de la molécula MICA.	26
4.2.- Papel de MICA en la respuesta inmune.	27
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	31
III. MATERIAL Y MÉTODOS	33
1.- Líneas celulares y cultivo celular.	33
2.- Análisis de la expresión de antígenos HLA-E y MICA mediante citometría de flujo.	34
3.- Análisis de los transcritos de HLA-E y MICA mediante RT-PCR: obtención de RNA, RT-PCR y amplificación.	35
3. 1.- Extracción de ARN total de líneas celulares tumorales.	36
3. 2.- Síntesis de ADNc.	37
3. 3.- Amplificación del cADN de la β -actina.	38
3. 4.- Amplificación de la molécula HLA-E.	38
3.5.- Electroforesis de los productos de la PCR en gel de agarosa.	40
4.- PCR cuantitativa.	40
4.1.-Condiciones de la PCR para amplificar cuantitativamente β 2-m, GPDH, H.C y HLA-E.	41
4. 2.- Realización de las Curvas estándares.	43

4. 2. 1.- Amplificación de la cadena pesada de las moléculas clásicas, β 2-microglobulina, HLA-E, MICA y GPDH.	43
4. 2. 2.- Clonación del inserto.	43
4. 2. 3.- Aislamiento del plásmido.	44
4. 2. 4.- Preparación de las diluciones seriadas.	46
5.- Secuenciación de la molécula HLA-E.	46
5. 1.- Secuenciación mediante el método Didesoxi: Fundamento.	46
5. 1. 1.- Purificación de las muestras amplificadas.	47
5.1. 2.- Reacción de secuenciación.	47
5. 1. 3.- Purificación de las reacciones de secuenciación.	48
6.- Ensayos de estabilidad de la molécula HLA-E	49
IV. RESULTADOS	50
1.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE HLA-E EN TUMORES HUMANOS.	50
1.1- Expresión de moléculas HLA-E en la superficie de líneas celulares humanas.....	50
1.2.- Expresión génica de HLA-E en líneas tumorales.	55
1. 3.- Expresión de HLA-E en líneas con alteración en HLA-ABC/ β 2-m.	61
1.4.- La adición de β 2-m exógena al cultivo incrementa la expresión de HLA-E.	67
1. 6.- Influencia del genotipo de HLA-E en la expresión en superficie.	69
2.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA RELACIONADA CON HLA-ABC MICA EN TUMORES HUMANOS.	74
2. 1.- Expresión de MICA en líneas celulares tumorales.	74
2. 2.- Relación de la expresión de entre MICA y HLA-E.	77
V. DISCUSIÓN	80
VI. CONCLUSIONES	92
VII. BIBLIOGRAFÍA	94

I. INTRODUCCIÓN

La alteración de la expresión de las moléculas HLA es un fenómeno frecuente en tumores, al igual que ocurre en células infectadas por virus. Esta alteración puede afectar al curso clínico del cáncer, proporcionando a las células tumorales un mecanismo de escape al reconocimiento inmunológico (Hicklin y col., 1999; Ploegh y col., 1998). Las causas de los defectos en la expresión de estas moléculas pueden ser mutaciones en los genes de clase I, anomalías en su regulación o defectos en la maquinaria de procesamiento antigénico (York y col., 1996).

Las moléculas HLA de clase I (HLA clásicas, HLA-Ia o HLA-ABC) unen péptidos antigénicos, en su mayoría derivados de las proteínas endógenas, mediante la maquinaria de procesamiento antigénico, y esos péptidos son presentados en la superficie celular a los receptores de las células T (TCRs). A estos péptidos, en caso de ser provenientes de tumores, se les denomina antígenos asociados a tumores (TAAs) (Hicklin y col., 1999). El reconocimiento específico de esos péptidos por los linfocitos T CD8+ (LT CD8+ o CTLs) depende, por tanto, de la interacción entre el complejo HLA de clase I unido a TAAs y el TCR. Esta interacción estimula una cascada de acontecimientos en los CTLs, que culminan en la proliferación de los mismos, en la producción de citoquinas, y por último en la destrucción celular (Bentley y col., 1996).

La lisis de las células tumorales depende de la existencia de un adecuado nivel de expresión de antígenos HLA y de TAAs (Sykulev y col., 1996). Además, el reconocimiento de TAAs depende del repertorio del TCR de los CTLs, el cual se encuentra influenciado por el fenotipo HLA de las células tumorales (Hicklin y col., 1999).

Las moléculas HLA de clase I están involucradas también en la interacción entre las células malignas y las células NK. Estas células NK destruyen selectivamente a aquellas células que no expresan uno o más alelos de las moléculas de clase I, este hecho ocurre con frecuencia en células infectadas por virus y en células tumorales (Garrido y col., 1993). La pérdida completa de la expresión de las moléculas HLA puede hacer al tumor resistente a la acción de los CTLs contra los TAAs, ya que estos, no llegarían a ser expuestos en la superficie celular. Por este motivo, las células aberrantes serían invisibles a los CTLs, no pudiendo ser eliminadas.

La disminución de la expresión de las moléculas HLA en las células tumorales, puede tener las mismas implicaciones funcionales si está asociada también a una disminución de la producción de TAAs (Sykulev y col., 1996). En este caso, las pequeñas cantidades de péptido derivado de TAAs no

pueden competir con otros péptidos para unirse con esas pequeñas cantidades de cadena pesada de HLA, debido a la baja expresión de estas, y por tanto, no alcanzan el mínimo número necesario en la membrana celular para poder ser reconocidos por los CTLs (Sykulev y col., 1996).

Por el contrario, la disminución de la expresión de las moléculas HLA en las células tumorales hace a esas células más susceptibles a la lisis mediada por las células NK (Ljunggren y Karre, 1990), puesto que las células NK se encargan de filtrar y eliminar aquellas células que presentan una baja expresión de HLA, siendo la magnitud de la lisis de las células diana dependiente por una parte del grado de baja regulación de las moléculas de clase I, y por otra del repertorio de KIRs presente en la población de células NK, ya que cada célula NK presenta KIRs con diferente especificidad (Ljunggren y Karre, 1990).

Se ha observado que numerosas líneas celulares tumorales son resistentes a la lisis por parte de las NKs, a pesar de presentar una pérdida total de la expresión de las moléculas HLA. Esa resistencia de los tumores a ser destruidos puede ser debida a una alteración en el mecanismo de señalización para la destrucción celular, o bien, a otro mecanismo propuesto recientemente, es decir, a la inhibición de la acción lítica de la célula NK mediada por una molécula HLA no clásica (HLA-E y HLA-G). Actualmente la expresión en la superficie de estas moléculas en las células tumorales es desconocida. En efecto, se ha observado que el aumento de expresión de determinados HLA favorece que los tumores escapen a la vigilancia inmune NK, así se ha observado que un aumento de la expresión de HLA-G, a través de su unión con el receptor KIR2DL, impediría la lisis tumoral, o bien, un aumento de HLA-C en el trasplante de células haploidenticas se ha visto que puede inducir remisiones largas de la enfermedad (Romanski y col., 2005).

Las moléculas HLA clase I regulan además la actividad lítica de las células NK. En efecto, las células NK presentan unos receptores inhibidores en superficie cuyos ligandos son las moléculas HLA, las cuales poseen diferente especificidad, siendo estos receptores diferentes al TCR de los CTLs. La interacción de las moléculas HLA con estos receptores provoca una inhibición de la lisis celular y de la secreción de citoquinas (Moretta y col., 1997).

Según los trabajos llevados a cabo por Romanski y col. (2005) en líneas y blastos de leucemias linfoblásticas, la unión de las células NK a las células diana mediante las moléculas de adhesión (ICAMs) son un prerrequisito para la muerte de las mismas, siendo la pareja ligando-receptor LFA-1/ICAM-1 la vía de adhesión dominante para las células NK. Estas interacciones se han descrito tanto en tumores sólidos como en linfomas y leucemias. Además, la presencia o densidad de ICAMs en la célula diana se correlaciona con la sensibilidad a la lisis mediada por la célula NK. Estos investigadores

observaron que al bloquear con anticuerpos monoclonales específicos ICAM-1 se producía una disminución de la lisis en algunas de las líneas celulares leucémicas que originalmente eran sensibles a la lisis por parte de la célula NK (K562, MOLT-3, MOLT-4 y SD-1). Por otra parte, el bloqueo LFA-1 en la línea NK efectora, llevada a cabo en la línea NK92, la cual es una línea de células NK que ha perdido todos los receptores inhibidores salvo KIR2DL4 específico para HLA-G, resultó en una inhibición completa de la lisis en dos de las líneas (K562 y MOLT-4), pero no ocurrió lo mismo en las líneas MOLT-3 ni en SD-1. Además observaron expresión de la molécula MICA en las líneas sensibles pero no en las resistentes.

Después de la unión de la célula NK a la célula diana, la activación de la NK es regulada por el balance originado por una gran variedad de receptores activadores e inhibidores. Las células NK de un individuo expresan al menos un receptor para uno u otro alelo de HLA clase I. Este fenotipo de distribución de los receptores inhibidores permite a las células NK detectar incluso pérdidas de un solo alelo (López-Botet y col., 1996).

1.- CÉLULAS NK Y LOS RECEPTORES DE LOS LIGANDOS HLA-E Y MICA.

Las células NK son un tipo de linfocito que median la inmunidad innata contra patógenos y tumores. Inicialmente fueron descritas como aquellas células linfoides capaces de destruir líneas celulares tumorales, “in vivo” o “in vitro”, en ausencia de estimulación previa. Comprenden alrededor del 15% de los linfocitos sanguíneos y son encontradas en tejidos periféricos, incluyendo el hígado, la cavidad peritoneal y la placenta (Cerwenka y col., 2001). Abundan en la decidua durante la primera etapa de la gestación, por lo que se les atribuye un papel en la interacción del sistema inmunitario con el citotrofoblasto (Moffet-King y col., 2002).

Estas células derivan de un precursor CD34+ CD7+ común a las células T, y expresan fenotipo CD34+ CD7+ (Moretta y col., 2003).

Las células NK participan en la primera línea defensiva frente a infecciones por virus, parásitos y bacterias, promueven la activación del Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF) y favorecen el desarrollo de una respuesta Th1. Estas células son capaces de liberar cito y quimoquinas, lo que induce o modula respuestas inflamatorias y hematopoyéticas, además del control del crecimiento y función de monocitos y granulocitos. Se ha visto que intervienen en la respuesta contra determinados tumores e injertos (Trinchiri G y col., 1989).

A diferencia de los linfocitos T y B, las células NK no poseen expresión en su superficie celular de receptores para antígenos, sino que poseen diferentes moléculas en superficie que pueden contribuir a desencadenar la actividad citolítica y la producción de citocinas (Moretta y cols, 1994). Su función está regulada por el equilibrio de señales contrapuestas, activadoras e inhibidoras.

El mecanismo molecular que permite a las células NK distinguir entre células normales y células tumorales, se produce a través del reconocimiento de las moléculas HLA, concretamente mediante la unión con sus receptores inhibidores. Es conocido que las NK destruyen aquellas células que han perdido la expresión de las moléculas HLA (o bien cuando esta expresión es muy baja). Esta situación es muy frecuente en tumores y en células infectadas por ciertos virus, como los pertenecientes al grupo de los herpesvirus (Moffet-King, 2002).

Las células NK humanas presentan un amplio abanico de receptores inhibidores específicos para las moléculas HLA de clase I. Los receptores inhibidores regulan tanto la función citotóxica como la producción de citocinas por parte de las células NK. Además, estos receptores se expresan también en subpoblaciones de CTLs. Los receptores se dividen en dos grupos. Uno pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (KIRs), los cuales reconocen a grupos de alelos HLA-A, HLA-B y HLA-C, en forma de cadena pesada junto con la $\beta 2$ -microglobulina y con el péptido. El otro se caracteriza por un dominio lectina tipo C, y se expresa como heterodímeros constituidos por una glicoproteína unida a una subunidad NKG2, (Moretta y col., 1997). La molécula HLA-E, objeto de esta tesis doctoral, es el ligando de un receptor perteneciente a esta familia.

1.1.- Receptores inhibidores de las células NK.

Estos receptores poseen un motivo inhibidor basado en la tirosina (ITIM) en su dominio citoplasmático, el cual recluta tirosín-fosfatasas para mediar la inhibición (Cerwenka y col., 2001).

Según las observaciones descritas por Kärre y col. (1986), estas moléculas inhibidoras reconocen de forma específica las moléculas HLA de clase I, de modo que la pérdida patológica de las mismas confiere susceptibilidad a la actividad NK (Moretta y col., 1992).

Cada receptor inhibidor es expresado por un subtipo pero no por todas las células NK. Además todas las células NK maduras, expresan al menos un receptor específico para las células HLA de clase I propias. La existencia de coexpresión de dos o más receptores contra moléculas propias es menos frecuente. Como consecuencia de esto, todo el conjunto de células NK hace posible que se pueda detectar incluso la pérdida de un solo alelo en las células autólogas (Moretta y col., 1997). La existencia

de estos receptores protege a las células autólogas normales (HLA-ABC +) de la acción lítica NK, prevaleciendo la acción inhibidora, para moléculas HLA propias, sobre la de los receptores activadores.

Los receptores inhibidores podemos dividirlos en tres grupos:

- 1.- Receptores NK de la superfamilia de las inmunoglobulinas
- 2.- Receptores tipo lectina: CD94/NKG2A.
- 3.- Otros receptores inhibidores.

1. 1. 1. - Receptores NK de la superfamilia de las inmunoglobulinas.

Los receptores pertenecientes a esta familia (Immunoglobulin-like receptor) son proteínas de membrana tipo inmunoglobulinas, que interaccionan con moléculas HLA de clase I regulando la función de las células NK. Los genes que los codifican se localizan en el cromosoma 19q13.4, y como se ha comentado con anterioridad, se expresan en células NK y en una subpoblación de linfocitos T.

En función del número de dominios tipo Inmunoglobulina, podemos diferenciar dos grupos, según posean dos o tres dominios, KIR2D y KIR3D. Estos receptores inhibidores pueden poseer una región citoplásmica larga con dos motivos ITIM, responsables de la función inhibidora (p58 y p70) (se le añade L a la nomenclatura, KIR2DL y KIR3DL). O bien, un tallo citoplásmico corto (se le añade la letra S), que carecen de motivo ITIM (p50) y tiene un aminoácido cargado (lisina) en su región transmembrana, a través del cual se une a la proteína DAP12 que traduce la señal activadora implicando a las tirosín-cinasas (ZAP70 y syk) (Moretta y col., 1997).

Se incluyen, por tanto, dentro de este grupo los receptores p58.1 y p58.2, así como sus correspondientes formas activadoras p50.1, p50.2 y p50.3. Este último ha sido descrito recientemente y aún no se dispone de mucha información (Moretta y col., 1997).

Los KIRs se expresan en la superficie celular como monómeros, salvo KIR3DL (NKAT4) que lo hace como homodímero.

Aún no se han identificado receptores NK para todos los alelos HLA-A y HLA-B (Moretta y col., 1997). En cuanto a su especificidad, los KIR2D son los mejor caracterizados, ya que reconocen a HLA-C. Se ha demostrado que los receptores p58.1 y p50.1 reconocen a un grupo de alelos HLA-C, mientras que p58.2 y p50.2 reconocen al resto. P70 (NKB1) reconoce alelos específicos de HLA-Bw4.

Por otra parte, Pende y col. (2002) identificaron la molécula p140 (NKAT4), la cual funciona como receptor para HLA-A3 Y HLA-A11, pero no reconoce a HLA-A1, -A2 o -A24. Posee dos formas de presentación, como monómero (70kDa) o como homodímero (140 kDa). La forma monomérica solo reacciona con los alelos HLA-Bw4 y las diméricas con HLA-A3 (Moretta y col., 1997).

Se sabe que los péptidos unidos a las moléculas HLA de clase I influyen en la interacción con los receptores KIR2D y KIR3D, siendo particularmente importantes las posiciones 7 y 8 del nonúmero, aunque se desconoce su importancia biológica.

Además de estos receptores existen otros denominados ILT (Immunoglobulin-like transcripts) o LIR (Leukocyte Ig-like receptors), que también reconocen a las moléculas HLA de clase I. Se localizan en la misma región del cromosoma 19q13.4 y se incluyen dentro de este grupo los siguientes: ILT2, ILT3, ILT4, ILT5 y ILT8. Poseen motivos ITIMs (Moretta y col., 1997). A diferencia de los KIRs, no son específicos de células NK y linfocitos T, sino que se expresan en otros linajes hematopoyéticos, predominantemente en células del SMF. En cambio, ILT1, -2 y -5 sí se expresan en células NK y/o linfocitos T. Además ILT2 se expresa en los linfocitos B de sangre periférica y los otros dos (ILT1 y ILT5) en granulocitos (Navarro y col., 2001).

ILT2 y ILT4 interaccionan con diferentes moléculas HLA de clase I, así como con la molécula no clásica HLA-G1. ILT2 reconoce también, con alta afinidad, al homólogo de clase I UL18 del CMV.

Otros receptores NK pertenecientes a la familia de las Inmunoglobulinas son los denominados NCR (Natural Cytotoxicity Receptor): NKp46, NKp30 y NKp44. Son marcadores altamente específicos de las células NK.

Los receptores NKp46 y NKp30 son expresados en todas las células NK, mientras que NKp44 sólo aparece tras la estimulación de las mismas. Mediante el uso de anticuerpos monoclonales bloqueadores de estos receptores, se ha observado en líneas celulares, que su principal papel está en la destrucción de la mayoría de las líneas tumorales. Además se ha visto que existe una correlación entre la densidad de éstos en superficie y la intensidad de la citotoxicidad mediada por NK. El ligado de los NCR no ha sido descrito aún (Moretta y col., 2003).

1.1.2.- Receptores tipo lectina: CD94/NKG2A.

Son glicoproteínas de membrana tipo II, pertenecientes a la superfamilia de las lectinas tipo C y se expresan en la membrana en forma de dímeros unidos por puentes disulfuro. Los genes que codifican para estas proteínas se localizan en el complejo génico NK situado en el cromosoma 12 (12p12-p13) humano. CD94 y NKG2 presentan cierta homología con los receptores Ly49 del ratón (Navarro y col., 2001).

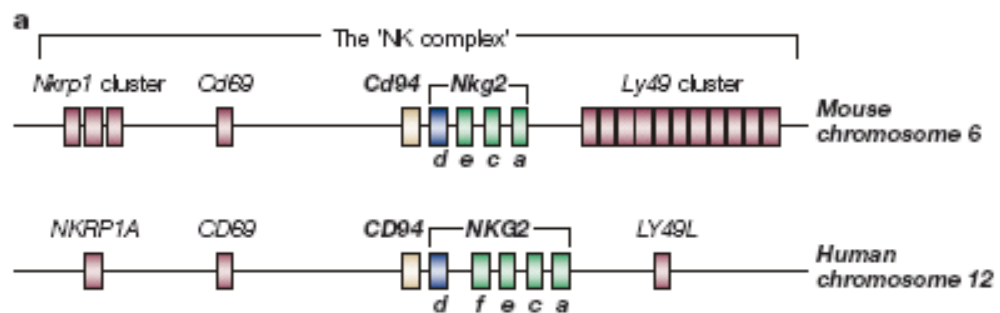


Figura 1.- Esquema del gen de los receptores tipo lectina C en el ratón y en humanos.

Los receptores CD94/NKG2 son heterodímeros compuestos por una cadena común (CD94), unida por un puente disulfuro a otra proteína de la familia NKG2. A diferencia de CD94, que es un gen único, esencialmente monomórfico, la familia NKG2 está constituida por tres genes: NKG2A, NKG2C y NKG2E, los cuales difieren entre sí en la estructura de las regiones extracelular y citoplásmica. El procesamiento alternativo de los genes A y E, da lugar a las proteínas NKG2A o B y NKG2E o H, respectivamente. CD94 posee una región citoplásmica muy corta, carece aparentemente de capacidad para transducir señales y su función parece ser la de permitir el ensamblaje y el transporte de los receptores NKG2 a la superficie celular (Navarro y col., 2001).

CD94/NKG2A es un receptor inhibitorio que se asocia a tirosín-fosfatasas a través de los motivos ITIM de la subunidad NKG2 y regula la activación de Syk y Erk mediada por CD16.

Por el contrario, la asociación de CD94 a NKG2C, carece de motivo ITIM y constituye un receptor activador capaz de unirse a la molécula adaptadora DAP12, que tiene motivos ITAM en su región citoplásmica y transmite la señal activadora implicando a otras tirocinasas (syk y ZAP70) (Navarro y col., 2001).

Los receptores CD94/NKG2 se expresan en las células NK y en una subpoblación de linfocitos T, estando implicados en el reconocimiento de moléculas HLA clase I. Los clones NK expresan CD94/NKG2A o CD94/NKG2C, aunque hay indicios de que una subpoblación de células NK pueden presentar ambos tipos de receptores (Navarro y col., 2001).

Mingari y col. (1997) describieron la existencia de CD94 en los precursores tímicos postnatales CD34+ CD7+ que se encuentran en maduración hacia células NK en presencia de IL-15. Estos autores demuestran la existencia de CD94/NKG2A como el único receptor inhibitorio en esas células. Esto puede ser la consecuencia de la prevención de la destrucción de células autólogas cuando comienza la actividad NK. Este CD94 puede ser inducido por la IL-15, no induciéndose la expresión de ningún otro receptor inhibitorio.

En un principio se implicó indirectamente a CD94/NKG2A en el reconocimiento de una amplia variedad de moléculas HLA de clase Ia y de la molécula HLA-G1. Sin embargo, se ha demostrado, de manera inequívoca, que el ligando para CD94/NKG2A y CD94/NKG2C es la molécula HLA-E (Lee y col., 1998; Braud y col., 1998). Los experimentos de estos autores, consistieron en comparar el resultado de enfrentar células NK, de la línea celular NKL que expresaban el receptor CD94/NKG2A+, contra células que no expresaban HLA-E y contra la línea celular AEH la cual expresaba alta cantidad de esta molécula en superficie. Como consecuencia de esto resultó que HLA-E parecía proteger a las células frente a la lisis por NK. Esa protección fue aparentemente mediada a través de la interacción de HLA-E con el heterodímero CD94/NKG2A, ya que los anticuerpos frente a esas moléculas (anti-HLA-E y anti-CD94/NKG2A) restauraban la lisis celular (Lee y col., 1998).

La unión con los péptidos derivados de la secuencia líder de las moléculas HLA de clase I, es requisito para que HLA-E interactúe con CD94/NKG2. La naturaleza del péptido unido a la molécula HLA-E influye en la interacción con el receptor CD94/NKG2. Estudios realizados de la unión implican que pueden existir diferencias entre los ligandos de HLA-E con respecto a su afinidad por CD94/NKG2A o C. En particular cuando el ligando de HLA-E es el HLA-C parece que interactúa preferentemente con CD94/NKG2C (Llano y col., 1998).

Borrego y col. (2005) han demostrado que el receptor CD94/NKG2A está continuamente reciclándose entre la membrana plasmática y el compartimento intracelular, con un tiempo de reciclaje de 1-2 horas. Este reciclaje no requiere de ITIMs en funcionamiento y la unión con HLA-E aparentemente no altera el proceso.

En condiciones fisiológicas, se asume que el receptor CD94/NKG2A está constantemente expuesto al HLA-E portado por las células normales y que la disociación durante el proceso de reciclaje desde la transmisión de la señal inhibitoria puede ser necesaria para garantizar el mantenimiento de niveles constantes de nuevos receptores en la superficie celular listos para interactuar con HLA-E (Borrego y col., 2005). No se conocen aún los compartimentos endosomales por donde se produce el tráfico de CD94/NKG2A y si el receptor ligado va por sitios diferentes al no ligado.

Se ha demostrado que el receptor CD94/NKG2A se dirige al sitio de contacto con el ligando, y esto implica que otros receptores CD94/NKG2A, de fuera del área de contacto con el ligando, se recluten en ese área. El origen de estos receptores puede ser compartimentos intracelulares o receptores no ligados residentes en la membrana plasmática. Se ha visto que CD94/NKG2A es un receptor móvil en ausencia de unión y que posee un coeficiente de difusión en el rango obtenido por otros receptores de membrana ($0.067 \mu\text{m}^2\text{s}^{-1}$) mediante FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching).

1.1. 3.- Otros receptores inhibidores NK

Además de los KIR, ILT/LIR y NKG2A, se incluyen como receptores inhibidores en leucocitos los siguientes: Fc γ RIIB, PIR-B, LAIRs, SIRP- α , CD72, gp49B1, PD-1, Ly49, CD66, CD22 y MAFA. La mayor parte de estos receptores se expresan en células de origen hematopoyético, aunque SIRP- α se expresa además en otros tejidos (Navarro y col., 2001). CD72, gp49B1, PD-1, Ly49, KIRs, NKG2A CD66, CD22 y MAFA son los que presentan una distribución más restringida. Estas familias incluyen otros miembros con función activadora. Algunos pares de receptores inhibidores y activadores comparten incluso el mismo ligando, y en todos los casos la afinidad del receptor inhibidor es superior (Navarro y col., 2001).

1.1.4.-Mecanismo de inhibición de las células NK.

Como se ha comentado con anterioridad, la unión del ligando a los receptores inhibidores de la célula NK previene la actividad citolítica y la producción de citocinas. Las dianas de la inhibición parecen ser las tirosinas kinasas (PTKs), ya que estas son mediadoras de la activación celular. La presencia de motivos inhibidores de la tirosina, ITIMs (I/VxYxxL/V), en el tallo

citoplásmico de los receptores tipo NK, permiten reclutar las tirosín-fosfatasa (SHP-1 y SHP-2). El ITIM N-terminal parece necesario y suficiente para reclutar SP-2 *in vivo*, mientras que el ensamblaje de SPH-1 requiere ambos ITIMs (Navarro y col., 2001).

1.2.- Receptores activadores de las células NK: NKG2D.

Aunque el papel de las moléculas del MHC en la protección tumoral ha sido puesto de manifiesto en numerosos modelos de sistemas tumorales, la contribución de la expresión de las moléculas del MHC a la evasión por los tumores es algo controvertida. En muchas situaciones, las células NK han destruido ciertas líneas tumorales a pesar de poseer niveles significativos de MHC en su superficie. Esto implica que la destrucción de estos tumores HLA clase I + fue mediada por receptores activadores que proporcionaron suficiente estimulación para sobrepasar la regulación negativa.

La activación de la célula NK probablemente resulta de la acción concertada de los receptores de citoquinas, de las moléculas de adhesión y de la interacción con los ligandos presentes en la superficie de las células tumorales o de aquellas infectadas que se unen a estos receptores (Cerwenka y col., 2001).

La mayoría de los receptores activadores de las NK son moléculas transmembrana con un dominio intracelular corto que pierde la actividad de señalización intrínseca. Ellos funcionan mediante el acoplamiento con una molécula adaptadora a través de aminoácidos cargados en la región transmembrana. DAP12 se asocia a los receptores KIR2DS, CD94/NKG2C, Ly49D/H y a NKP44. Por otra parte CD16, NKp30 y NKp46 se acoplan a los adaptadores FcεRIγ y CD3ζ (Cerwenka y col., 2001) (ver tabla 1 y figura 2).

Cabe destacar dentro del grupo de los receptores activadores una lectina tipo C denominada NKG2D, la cual no pertenece estrictamente a la familia NKG2, ya que posee diferencias con estas en su secuencia y no forma dímeros con CD94.

Es codificada por un gen situado en el cromosoma 12 en humanos (figura 1) y cercano a otros genes NKG2 en el complejo genético NK.

Tabla 1.-Receptores activadores de las células NK y sus ligandos (Cerwenka y col., 2001).

Receptor	Species	Signalling adaptor	Signalling Pathway	Ligand*
CD16	Mouse, human	FcεR1γ or CD3ζ	ZAP70/Syk	IgG
NKp30	Human	FcεR1γ or CD3ζ	ZAP70/Syk	?
NKp46	Mouse, human	FcεR1γ or CD3ζ	ZAP70/Syk	Influenza haemagglutinin, others?
NKR-P1C	Mouse	FcεR1γ or CD3ζ	ZAP70/Syk	?
KIR2DS	Human	DAP12	ZAP70/Syk	HLA-C, others?
CD94/NKG2C	Mouse, human	DAP12	ZAP70/Syk	HLA-E (Qα-1)
Ly49D	Mouse	DAP12	ZAP70/Syk	H-2D ^d
Ly49H	Mouse	DAP12	ZAP70/Syk	MCMV-induced?
NKp44	Human	DAP12	ZAP70/Syk	Influenza haemagglutinin, others?
NKG2D	Mouse, human	DAP10	PI3K	MIC, ULBP (RAE-1, H60)
CD244	Mouse, human	SAP	?	CD48

Este receptor se acopla a la molécula adaptadora DAP-10 de forma no covalente. Este adaptador presenta en su dominio citoplasmático un motivo YINM y recluta fosfatidil-inositol kinasa (PI3K) (figura 2), (Raulet, D. H., 2003).

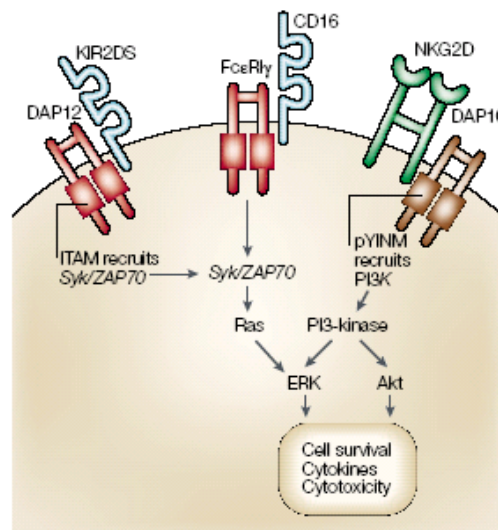


Figura 2. Receptores activadores de la célula NK (Cerwenka y col., 2001). En la figura se representan los complejos formados por los receptores activadores con las moléculas adaptadoras: KIRDS asociado a DAP-12, CD16 asociado a FcεRIγ y NKG2D asociado a DAP-10.

El receptor NKG2D se expresa en las células NK, siendo incrementado tras la exposición con IL15. Todos los linfocitos T CD8⁺ de sangre periférica expresan el receptor antes de su activación, incluyendo aquellos que han perdido la expresión de la molécula co-estimuladora CD28 (linfocitos de memoria). Además se encuentra en los linfocitos Tγδ. A nivel intestinal, los linfocitos intraepiteliales Tγδ expresan NKG2D a bajos niveles, pudiendo ser aumentada la expresión tras la incubación con IL15. Por el contrario los linfocitos T CD4⁺ no expresan NKG2D, salvo en una fracción de células T

CD4+ de pacientes con artritis reumatoide (Groh y col., 2003).

Los ligandos del receptor activador NKG2D son en humanos MIC-A y -B, proteínas homólogas a HLA de clase I, las cuales se inducen por el estrés celular, así como la proteína ULBPs y RAET1 (ULBP4). Estas últimas son proteínas que se unen a la proteína UL16 del citomegalovirus humano (HCMV). Esta proteína UL16 está implicada en la evasión de este virus del sistema inmune.

Las consecuencias de la estimulación de NKG2D son diferentes en los distintos tipos celulares donde se expresa. Así, en las células NK tras la unión de ULBPs solubles con NKG2D se ha observado la producción de citoquinas incluyendo IFN- γ , TNF, linfotoxina y GM-CSF, así como las quimoquinas CCL4 y CCL1. La adición de IL-12 presenta un efecto sinérgico con ULBPs. Cabe señalar que no todos los ligandos provocan los mismos resultados en la célula NK, pudiendo esto ser debido a la activación de otros receptores diferentes a NKG2D. Por otro lado, los macrófagos estimulados a través de NKG2D producen óxido nítrico y TNF, mientras que los linfocitos T CD8+ produce IFN- γ , TNF, IL-2 e IL-4. (Raulet, D. H., 2003).

1.2.1.- Vía de estimulación de la célula NK a través de NKG2D.

Los receptores de reconocimiento primario son moléculas multicanal que poseen una unidad de reconocimiento del ligando que está unido de modo no covalentemente con una subunidad de señalización (adaptador). Estos adaptadores (p.e. DAP o CD3) poseen un motivo activador basado en la tirosina (ITAM) citoplasmático, que cuando se produce la unión del ligando al receptor produce un reclutamiento y activación de las tirosino-kinasas, Syk o ZAP70, y una fosforilación del efector que induce la activación celular (Raulet, D. H., 2003). A diferencia de estos adaptadores, DAP10 carece de ITAM en su dominio citoplasmático y posee un motivo YINM que recluta fosfatidil inositol kinasa (PI3K).

A nivel de los linfocitos T CD8, NKG2D funciona como un receptor co-estimulador, al igual que CD28 y la molécula co-estimuladora inducible, amplificando la activación mediada por el TCR, mientras que en las células NK actuaría como receptor de reconocimiento primario.

Parece que la distinta función de NKG2D en las diferentes líneas puede ser debida, en parte, a la existencia de dos proteínas NKG2D y a la expresión de diferentes proteínas adaptadoras. Una de las proteínas es la denominada NKG2DL (long) cuyo transcrito da lugar a una proteína que se une a DAP-10 pero no a DAP12, y la otra es la NKG2DS (short) cuyo transcrito posee un dominio citoplásmico más corto y que se asocia tanto a DAP10 como a DAP12. Ambos transcritos están presentes en las

células NK activadas, en las células T CD8+ y macrófagos, pero en las células T, a diferencia de estas, no se expresa DAP12 (figura 3) (Raulet, H. D., 2003).

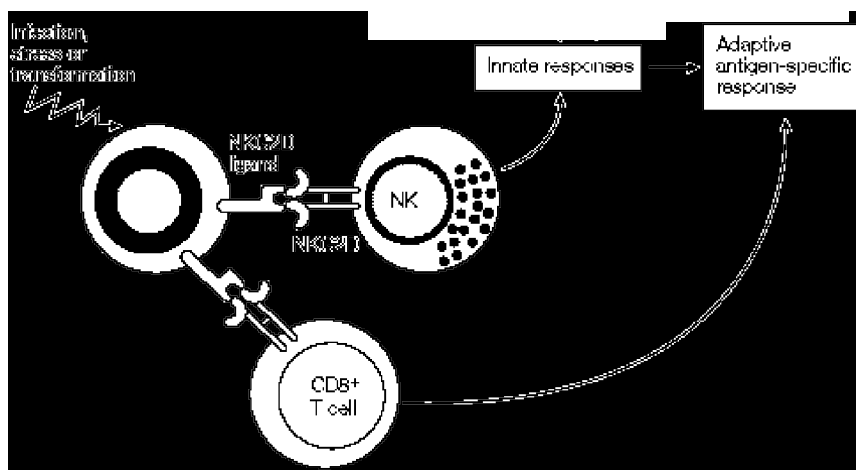


Figura 3.- NKG2D en el reconocimiento inmune. El receptor NKG2D reconoce ligandos autólogos cuya expresión se encuentra incrementada en las células tumorales, infectadas o sometidas a estrés. Este receptor es capaz de estimular tanto la respuesta innata y como la adaptativa.

1.2.2.- NKG2D y cáncer

Este receptor ha sido implicado en la citotoxicidad mediada contra ciertos tumores (Moretta y col., 2003). De hecho, en experimentos de transfección o mediante bloqueo con anticuerpos, la expresión tanto natural como inducida de ligandos de este receptor provoca una sensibilidad marcada a las células NK “in vitro”. Además la capacidad de los linfocitos T CD8+ y T $\gamma\delta$ para atacar a las células tumorales se ve incrementada si el tumor expresa los ligandos de NKG2D, pero en este caso, el receptor antigénico expresado por los linfocitos T debe ser específico para el tumor. En el caso de los linfocitos T CD8+ deben ser antígenos tumorales presentados por las moléculas del MHC. Algunas células T $\gamma\delta$ deben ser específicas para antígenos tumorales pero en algunos casos el receptor debe ser específico para MICA (Wu, J. y col., 2002).

La expresión de los ligandos de NKG2D por las células tumorales sirve de barrera para el crecimiento tumoral. Numerosos tumores primarios y líneas celulares tumorales expresan ligandos NKG2D. El hecho del escape inmunológico puede ser debido a que las células tumorales expresen insuficientes niveles de ligandos de NKG2D para estimular el rechazo tumoral, quizás porque la expresión de estos ligandos no esté suficientemente aumentada en las etapas tempranas del desarrollo tumoral, o bien, porque exista una selección del sistema inmune de aquellas células con menor expresión. Además se ha visto que ciertos tumores, aunque expresen MICA, pueden evadir el

reconocimiento del sistema inmune a través de NKG2D, al producir una versión soluble de MICA (sMICA), la cual aparece en altas concentraciones en el suero causando una pérdida de sensibilidad del receptor en las células T y posiblemente en otros tipo celulares (Groh, V. y col., 2002). A pesar de esto, otros muchos tumores son eliminados a través de la activación de este receptor.

2.- Moléculas del MHC no clásicas (MHC Ib): Generalidades.

Las moléculas HLA-E y MICA pertenecen a un grupo de moléculas denominadas MHC no clásicas o clase Ib, que se encuentra codificado en el brazo corto del cromosoma 6. Dentro de este grupo también se encuentran, HLA-F, HLA-G, MICB y Hfe, los cuales están codificados en el mismo cromosoma 6, mientras que los genes de CD1, MR1, FcRn (neonatal Fc receptor molecule) son codificados en cromosoma 1 (Hudhes y col., 1999) (figura 4).

En el ratón, el complejo mayor de histocompatibilidad H2 da lugar a tres grupos de genes no clásicos representados por los clusters Q, T y M. Sólo unos pocos productos de esos genes han sido caracterizados, incluyendo H2-M3, Qa-1, Qa-2 y T10. También han sido descritos los homólogos a los humanos HFE, CD1d y FcRn. La presencia y conservación de las moléculas no clásicas entre las diferentes especies subraya la importancia de su papel (De Franco y col., 2001; Braud y col., 1999). Este conjunto de moléculas clase Ib, no constituye un grupo homogéneo en cuanto a su estructura y función, en algunos casos, la misma función parece estar desarrollada por diferentes moléculas en cada especie (De Franco y col., 2001).

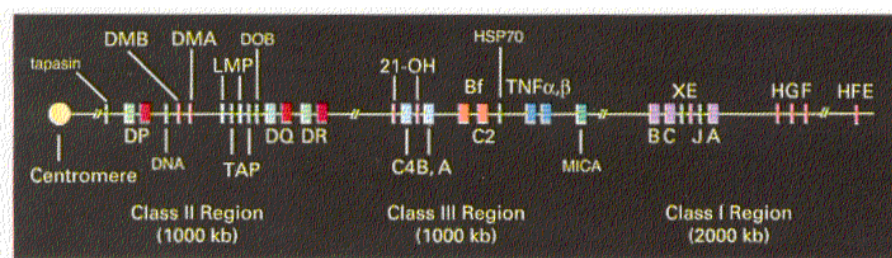


Figura 4.- Esquema del Cromosoma 6. En este se encuentran los genes de HLA clase I y II; TAP: transportadores de péptidos antigénicos; 21-OH: enzima 21 hidroxilasa; C4A y B: locus del complemento C4; Bf: Factor B de la vía alternativa del complemento; C2: complemento C2; TNF: factor de necrosis tumoral; MICA: gen relacionado con las cadenas de clase I; HFE: gen de la hemocromatosis.

Todas las moléculas no clásicas presentan modificaciones estructurales, a veces importantes, que afectan al transporte hacia la superficie celular, por ejemplo, puede haber modificaciones o ausencia de la hendidura de unión al péptido, algunas no son estabilizadas por la β 2-microglobulina (β 2-m) y otras son ancladas a la membrana mediante tallos de glicosil-fosfatidil-inositol en vez de segmentos de proteína transmembrana. Además poseen una distribución tisular especializada (De Franco y col., 2001; Braud y col., 1999).

En un principio se las diferenciaba de las moléculas clásicas por su escaso polimorfismo, si bien hoy se conocen algunas más polimórficas. A pesar de esto, no se comprende el polimorfismo, ya que los receptores que reconocen a las mismas permanecen constantes (Braud y col., 1999).

Otra característica de estas moléculas es que exhiben un patrón de expresión restringido. Mientras que la expresión de HLA-E es ubicua, HLA-F por ejemplo, sólo se expresa en linfocitos B, y HLA-G en células del citotrofoblasto extraveloso. La expresión de HLA-G en este tejido coincide con la pérdida de expresión de moléculas HLA clásicas, por esto se piensa que puede tener un papel importante en la tolerancia materno-fetal (De Franco y col., 2001 ; Braud y col., 1999).

No todas las moléculas no clásicas poseen funciones relacionadas con el sistema inmune, aunque, la mayoría están implicadas en la presentación de antígenos no peptídicos a los linfocitos T; otras están relacionadas con señalización de estrés, daño o anomalía celular a las células NK o a clases especializadas de linfocitos T. De hecho, parece que las moléculas del MHC Ib pueden jugar un papel importante en la protección contra la lisis celular mediada por células NK, aunque su papel en la respuesta inmune de células T se encuentra aun en debate (De Franco y col., 2001; Braud y col., 1999).

3.- La molécula HLA-E

El HLA-E es una molécula HLA de clase Ib o no clásica, cuyo gen está situado en el cromosoma 6, entre el locus de HLA-C y HLA-A (O'Callaghan y Bell, 1998a).

La molécula HLA-E fue descrita en 1988 por Koller y col., a raíz del hallazgo de la existencia de una segunda categoría de genes del MHC en el ratón, Qa y Tla, que a diferencia de los genes clásicos, presentaban un menor polimorfismo, y no se encontraban en todas las células somáticas. Estos autores se propusieron encontrar homólogos en el ser humano. Los estudios fueron realizados en linfocitos de una leucemia linfática crónica B (LLC-B), ya que estas moléculas, Qa y Tla, en el ratón se expresan

preferentemente en las células linfoides, por lo que se les adjudica un papel en la diferenciación de las células de este origen.

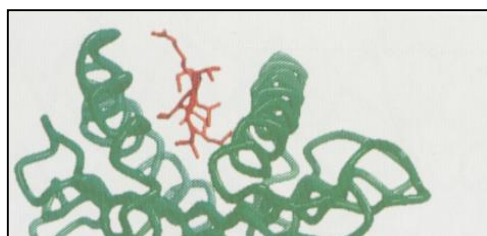
El locus de HLA-E se encuentra conservado (Boyson y col., 1995), lo que se ha observado secuenciando genes de primates. Presenta un escaso polimorfismo, que se encuentra codificado en las posiciones 83, 107 y 157, lo que da origen a cuatro alelos: E0101, E0102, E0103, E0104 (tabla 2) (O'Callaghan y Bell, 1998). El significado funcional de estos alelos está poco claro. Dos de estos alelos son presentados con igual frecuencia en la población general (Matte y col., 2000), y se diferencian por contener una arginina (R) o una glicina (G) en la posición 107. La poca variación de HLA-E sugiere que puede haber diferencias funcionales entre estos dos alelos, hecho al que haremos referencia más tarde (Ulbrecht y col., 1999).

Posición	83	107	157
E0101	G	R	R
E0102	R	R	R
E0103	G	G	R
E0104	G	G	G

Tabla 2. Polimorfismo de HLA-E.

3.1.- Estructura de la molécula HLA-E

La estructura de HLA-E fue determinada mediante difracción de rayos-X (O'Callaghan y col., 1998). Esta estructura es muy similar a las de las moléculas HLA de clase Ia en toda su arquitectura (figura 5). Al igual que la de éstas presenta una cadena pesada, constituida por los dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$. Se conserva la interacción con la $\beta 2$ -m y la conformación del lazo de unión con CD8, así como, la orientación del péptido dentro del surco de unión peptídica, con el extremo N-terminal del péptido reposando entre el C-terminal de la $\alpha 2$ -hélice y el N-terminal de la $\alpha 1$ hélice. La medida del surco es similar a la de las moléculas clásicas (O'Callaghan y col., 1998b).



De cualquier modo, se encuentra ausente una porción crítica en el extremo carboxilo-terminal, como es la sustitución de una serina por un triptófano en p14. Este hecho excluye la posibilidad de una unión

Figura 5. Estructura de la Molécula HLA-E.
El aminoácido 107 se encuentra en el fondo del lazo entre el plegamiento β en la base de la

HLA-E se une a péptidos derivados de la secuencia líder de las moléculas clásicas. Esta secuencia de aminoácidos es tremendamente hidrofóbica, por lo que para facilitar su unión con HLA-E, el surco de unión al péptido de esta molécula también es hidrofóbico. En el suelo de este surco, existe un grupo de residuos aromáticos, que forman una zona hidrofóbica estable, con los sitios cíclicos de las cadenas señalando hacia el extremo N-terminal del péptido. La presencia de esas cadenas hidrofóbicas restringe el número de péptidos que pueden unirse a HLA-E. En particular, en la posición 97 hay un triptófano en HLA-E (en la mayoría de los alelos de clase Ia hay una arginina o asparragina) que junto con la fenilalanina en posición 116, crea una envuelta hidrofóbica para interactuar con la mitad carboxilo-terminal del péptido (O'Callaghan y col., 1998a) (figura 6).

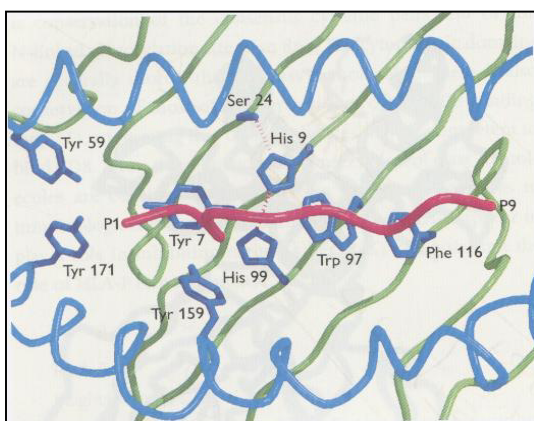


Figura 6. Imagen del surco de HLA-E. Vista de la conformación principal de la cadena pesada con los residuos aromáticos llave y del péptido. Con la línea roja discontinua se muestran los enlaces de hidrógeno que envuelven a la Histidina 9 y 99.

El sitio de unión peptídica de HLA-E posee seis bolsillos hidrofóbicos que se denominan A, B, C, D, E, Y F, que se unen al péptido por las posiciones P1, P2, P6, P3, P9 y P9 respectivamente. A diferencia de las moléculas HLA clásicas, todos los bolsillos del sitio de unión al péptido de la molécula HLA-E están ocupados, para unir péptidos específicos (figura 7) (tabla 3) (O'Callaghan y col., 1998c).

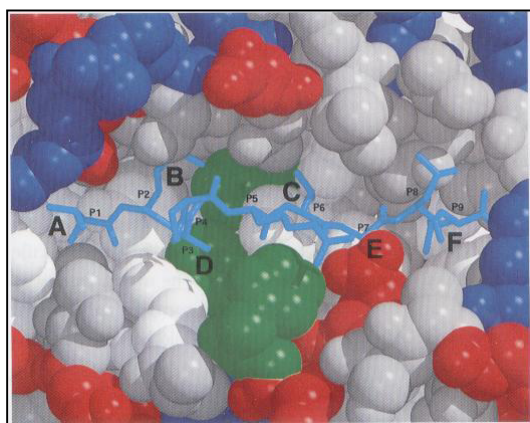


Figura 7. La imagen muestra los bolsillos en el surco de HLA-E. Los átomos son representados por esferas de radio de Van der Waals apropiado. Los residuos cargados son coloreados, la arginina y lisina en azul, y el glutamato y aspártico en rojo. Las histidinas vienen representadas en verde y los residuos aromáticos en blanco.

de anclaje y son las más profundas. En cambio, P3 y P6 son poco profundas. A diferencia del surco de las moléculas clásicas, P7 es profundo en HLA-E y arrastra hacia abajo la mitad carboxilo terminal del péptido. HLA-E preserva el extremo de unión hidroxilo N- y C-terminal que caracteriza a las moléculas clásicas (O'Callaghan y col., 1998c) (figura 7).

Sólo se unirán al surco, mediante puentes de hidrógeno, aquellos péptidos que sean capaces de adoptar una conformación adecuada e interaccionen de forma simultánea y óptima con los múltiples bolsillos. La ocupación de todos los bolsillos, además de la unión de las cadenas laterales del péptido a la molécula, así como el alojamiento interno del péptido dentro de la gruta favorecen esta selectividad (O'Callaghan y col., 1998c).

Los residuos llave del surco parecen estar conservados, incluyendo His9, His99, Trp 97, Phe116, Ser143, Ser147. Dentro de los bolsillos, los residuos también están conservados a través las especies, encontrándose la única variación en la p73 la cual juega un papel en el bolsillo C y es una isoleucina en HLA-E humano, pero es una treonina todas las otras especies (O'Callaghan y col., 1998c).

Bolsillo	Residuos de aminoácidos
A	167, 59,171,168,159,163
B	45,67,9,22,24
C	70,74,73,116,97
D	156,159,97,99
E	147,116,124,133,114
F	81,123,124,95,116

Tabla 3. Residuos llave implicados en los bolsillos de HLA-E.

3.2.- Expresión en superficie de la molécula HLA-E: Factores condicionantes.

La molécula de clase Ib HLA-E se transcribe en todos los tejidos estudiados, es decir que presenta niveles de RNAm detectables en todos ellos (Wei y Orr, 1990).

Pocos son los datos disponibles sobre su expresión en superficie, aunque se sabe que su estabilización en la membrana plasmática depende su unión a péptidos y a la β 2-m. En efecto, en estudios realizados con la transfectante AEH, se observó que la expresión de la proteína HLA-E en la superficie celular se produce como un complejo trimolecular típico de clase I, constituido por la unión de la cadena pesada de HLA-E con el péptido (en el caso de esta línea derivado de la secuencia líder de A2) y con la β 2-m (Lee y col., 1998). El transporte dentro de la célula también depende de la disponibilidad de péptidos en el retículo endoplásmico.

La mayoría de péptidos que se unen a la molécula de HLA-E son péptidos de nueve aminoácidos derivados de la secuencia líder de clase I o de HLA-G, y esta unión es dependiente de TAP (Transportadores asociados al procesamiento antigénico) (Furukawa y col., 1999).

Tanto Qa-1 en el ratón como HLA-E en humanos, se unen a la secuencia líder de los péptidos derivados del MHC, induciendo el movimiento del complejo formado hacia la superficie celular.

La secuencia líder de clase Ia es “MAVMAPRTLVLVLLSGALALTQTWA” y tiene un motivo de unión al HLA-E en la porción VMAPRTVLL (O’Callaghan and Bell, 1998a). La existencia de una treonina en posición 2 no es compatible con las características del bolsillo B de la molécula HLA-E impidiendo la unión al HLA-E en experimentos funcionales (Ulbrecht y col., 2000). Un número significativo de las secuencias líder derivadas de alelos HLA-B, presentan una treonina en P2, lo cual sugiere que estos alelos serán incapaces de jugar un papel asociado a la inhibición de la lisis por NK. Por el contrario, las otras variaciones comunes de la secuencia líder de las moléculas HLA de clase Ia, mostradas en la tabla 4, pueden unirse al surco. Estas variantes están conservadas, pudiendo estar la

posición 7 ocupada por una valina o leucina, y la posición 8 por valina, leucina o isoleucina (Ulbrecht y col., 2000).

VTAPRTVLL	VMAPRTLIL
VTAPRTLIL	VMAPRTLVL
VMAPRTLLL	VMAPRTLLL
VMAPRTVLL	IMAPRTLVL
VMPRTLIL	VMEPRTLIL

Tabla 4. Secuencias líder de las moléculas HLA clásicas

La secuencia líder derivada de HLA-E es diferente a la de las moléculas clásicas, siendo tres aminoácidos mas corta que la de las moléculas HLA clásicas. El residuo en el extremo amino-terminal es un aspártico cargado negativamente en el HLA-E, mientras que el encontrado en las clásicas es una arginina cargada positivamente. Esta secuencia es incapaz de unirse al surco peptídico de HLA-E (Braud y col., 1997), como tampoco se puede unir la secuencia líder de HLA-F que es más corta (MAPRSLLL).

Según Ulbrecht y col., (1999) los niveles de expresión en superficie de HLA-E no están relacionados con su capacidad para inhibir la lisis por NK, sino que existe un reconocimiento diferencial de los ligandos unidos al HLA-E por parte del receptor CD94/NKG2A de las NK.

La expresión de la molécula HLA-E no solo está en relación con los péptidos derivados de las moléculas clásicas, sino con las diferencias alélicas de esta molécula. Los dos alelos más frecuentes de HLA-E se diferenciaban en la posición 107, pudiendo ésta ser ocupada por una glicina (HLA-E^G) o por una arginina (HLA-E^R). Se ha observado, en estudios llevados a cabo con líneas transfectantes de ratón, que esa simple sustitución de aminoácidos afecta de forma importante al procesamiento de las cadenas pesadas de HLA-E.

Con respecto a las diferencias funcionales entre los dos alelos de HLA-E, fue observado que las moléculas HLA-E^R cargadas con péptido derivado de A2 o de G no inhibían el reconocimiento por CD94/NKG2A+ de la línea celular NKL. Por otro lado, la unión al HLA-E^G del péptido derivado de A2 resultó ser sólo parcialmente efectivo; en cambio la unión al péptido derivado de HLA-G resulta en una protección efectiva. Por tanto, la función de CD94/NKG2A no dependería sólo del ligando derivado de

la secuencia señal presentada, sino también de la variante de HLA-E presentadora (Ulbrecht y col., 1999).

Por tanto, podemos deducir que para el conocimiento de la función del HLA-E “in vivo”, es necesario conocer el tipo de alelo expresado, así como el haplotipo HLA de clase I.

3. 3.- Función de la molécula HLA-E

- **HLA-E modula la función de las NK.** HLA-E es el ligando de los receptores CD94/NKG2 presentes en las estas células. Este receptor se encuentra también en un subtipo de células T. Se une, tanto a las formas inhibitoras del receptor (CD94/NKG2A), como a las formas activadoras (CD94/NKG2C) (Martínez y col., 2001).

La expresión en superficie de HLA-E en las células diana es suficiente para inhibir las células NK que expresan CD94/NKG2A o para la estimular la muerte de las células que están expresando CD94/NKG2C. Se ha comprobado que esos efectos pueden ser revertidos mediante el uso de anticuerpos monoclonales, anti-CD94 y anti-HLA-E. Estos hallazgos explicaron la especificidad del receptor CD94/NKG2A que hasta entonces era poco clara. Recientes experimentos, sugieren que el polimorfismo limitado de HLA-E junto con la secuencia líder derivada de las moléculas clásicas, pueden influir en el reconocimiento por diferentes subtipos de receptores CD94/NKG2 (Ulbrecht y col., 1999) (figura 8).

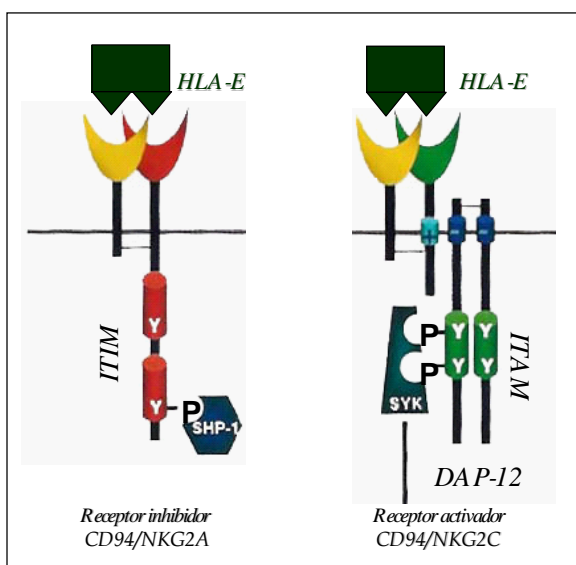


Figura 8. Esquema de los receptores tipo lectina C, CD94/NKG2, de la célula NK.

Como se ha comentado con anterioridad, los virus han desarrollado múltiples estrategias para escapar a los CTLs mediante la interferencia en los diferentes pasos del procesamiento antigénico de las moléculas del MHC.

Así, el citomegalovirus humano (HCMV), a través del producto de los genes gpUS3 retiene a las moléculas del MHC en el retículo endoplásmico (RE). La proteína gpUS6 inhibe la entrega del péptido antigénico al interior del RE por los TAP. El resultado de la actuación de estos mecanismos produce una disminución de la expresión de las moléculas HLA clase I. Esta disminución de la expresión HLA de clase Ia hace que las células infectadas sean invisibles a los CTLs, pero pueden ser detectadas por las células NK, y ser más susceptibles a la lisis mediada por las mismas (Ulbrecht y col., 2000).

El HCMV también ha desarrollado estrategias para contrarrestar la susceptibilidad frente a NK. A través de los productos de los genes US2 y US11 no afectan a la expresión de las moléculas HLA-C, permitiendo la inhibición de la lisis NK, en una subpoblación de células NK que presentan KIR2DL1, KIR2DL2 Y KIR2DL3. Además se ha observado que puede sintetizar un homólogo de clase I, gpUL18, que puede actuar como un ligando subrogado previniendo la lisis por NK, habiéndose demostrado que interactúa con ILT2. Este receptor ILT2 es expresado únicamente en un subtipo de células NK (Ulbrecht y col., 1999).

El fragmento UL40 de éste virus, da lugar a un ligando para HLA-E, idéntico a la secuencia señal derivada de HLA-Cw03 (Ulbrecht y col., 2000). La expresión de UL40 en células diana HLA-E positivas confiere resistencia a la lisis por células NK a través de su unión al receptor CD94/NG2A. Este gen viral es un importante regulador de la actividad NK. La generación del ligando del UL40-HLA-E ha sido también observada en las células deficientes en TAP, estos autores, observan que UL40 es procesado y cargado al HLA-E en ausencia de este complejo TAP (Ulbrecht y col., 2000).

Recientemente, se ha descrito que dos péptidos derivados de proteínas víricas del virus de la influenza y del virus de Epstein-Barr (VEB) estabilizan la molécula HLA-E en la superficie celular al ser añadidos al medio de cultivo mantenidos a 26° C.

- **La molécula HLA-E juega un papel importante en la regulación de la función de la célula T.** Los antígenos virales pueden ser presentados por HLA-E a las células T de modo similar a como lo hacen las moléculas de clase I. A diferencia de éstas, se ha visto que las moléculas de HLA-E solubles no se unen al CD8. Este hallazgo ha sido relacionado con el polimorfismo de HLA-E en el sitio de unión al CD8. Por tanto, parece que la restricción de las células T para HLA-E no existe, siendo la activación del linfocito T independiente del CD8 (Moretta y col., 2003).

Además se ha visto expresión de CD94/NKG2 en un subtipo de éstas células (Moretta y col., 2003).

- **HLA-E es ligando también de las células NK-CTLs** (Moretta y col., 2003b). NK-CTLs representan una pequeña fracción de CD8⁺ TCR $\alpha\beta$ detectable en sangre periférica de algunos donantes. Estas células se denominan así por poseer una actividad similar a las NK (“NK like”) (son capaces de lisar líneas celulares susceptibles a NK), y constituyen un subtipo de linfocitos TCD8⁺ caracterizado por un fenotipo de memoria y por presentar en superficie unos receptores inhibidores denominados iNKR. Además, presentan un reordenamiento TCRV β que es diferente en los distintos individuos.

Estas células exhiben una fuerte actividad citolítica frente a líneas celulares que eran susceptibles a células NK. Difieren de las células NK en que no destruyen a las líneas celulares tumorales deficientes en β 2-m. Sí son capaces de destruir las líneas celulares que han perdido la expresión de las moléculas clásicas, pero aún expresan β 2-m.

La lisis está mediada por el TCR, ya que el uso de anticuerpos monoclonales que bloquean el TCR, inhiben la citotoxicidad mediada por NK-CTL. El ligando para este TCR no son las moléculas clásicas, como hemos comentado con anterioridad, sino la molécula HLA-E.

La evidencia de que estas células reconocen HLA-E fue proporcionada por el estudio de la línea celular RMA-S deficiente en TAP-2 co-transfectada con HLA-E y β 2-m humana, la cual fue cultivada con varios péptidos que estabilizan a HLA-E en superficie. Cuando RMA-S se cultiva con péptidos que se unen a HLA-E las células se hacen susceptibles a la lisis, pero si se cultivan con péptidos irrelevantes, no son destruidas (Moretta y col., 2003a).

NK-CTL poseen la capacidad de crecer en respuesta a células alogénicas en cultivo mixto de linfocitos. NK-CTLs presentan una mayor reactividad que los CTLs aloreactivos, y puede

discriminar entre diferentes células alogénicas diana. No se han observado diferencias de polimorfismo de HLA-E en cuanto a donantes susceptibles y resistentes. Parece que la susceptibilidad o resistencia estaría en reconocer a HLA-E en las células alogénicas asociado a péptidos que no están en condiciones normales presentes en el huésped (Moretta y col., 2003b).

Las células NK-CTLs junto con las NK pueden jugar un papel importante en la defensa contra los virus que inducen la disminución de la expresión de las moléculas clásicas como mecanismo de escape al sistema inmune.

- **Se ha sugerido que HLA-E juega un papel importante en la regulación de la implantación de la placenta.** El embarazo representa uno de los más interesantes ejemplos de acomodación del sistema inmune a la biología materna. La placenta proporciona una barrera entre la madre y el feto, evitando que las células inmunes maternas actúen contra los tejidos fetales en formación (Moffett-king, A., 2002).

Se ha observado, la existencia de expresión de la molécula HLA-E a nivel del tejido placentario que se encuentra en íntimo contacto con el tejido materno (expresión de HLA-E en las células de trofoblasto y de CD94/NKG2 en las células NK de la decidua materna).

Como hemos descrito antes, esta molécula puede interactuar con los receptores de las células NK tipo leptina, CD94/NKG2, los cuales ejercerán una acción inhibitoria o estimuladora dependiendo del subtipo de receptor. Para realizar su función el HLA-E necesita unirse al péptido derivado de otras moléculas MHC clásicas. En la placenta se une al péptido líder derivado de la molécula HLA-G. El complejo HLA-E-nonapéptido derivado de HLA-G interactúa con un único receptor, CD94/NKG2A, inhibiendo la acción de las NK, con el beneficio de la implantación del embrión, Geraghty y col., 1998 (15th European Histocompatibility Conference, Granada).

Malmberg y col. en 2002, describieron la resistencia a la lisis por NK de la línea de carcinoma ovárico OVACs a través del receptor inhibitorio CD94/NKG2A cuando se trataba con IFN- γ . Observaron la existencia de un aumento de los niveles de RNAm tanto de HLA-E como de HLA-G.

4.- LA MOLÉCULA RELACIONADA CON EL MHC: MICA.

Los genes MICA son un grupo de genes que han sido descritos recientemente y que se encuentran codificados en el cromosoma 6 (figura 1). El mapa de los genes de MICA y MICB en la región del MHC de clase I, se encuentra situado centroméricamente al HLA-B, entre éste y el TNF α , y presenta desequilibrio de unión con el HLA-B. Comparten homología entre un 18-30% con el MHC de clase I (Hudges y col., 1999).

MICA codifica para una molécula no clásica, la cual, al igual que las moléculas clase I clásicas, es expresada en la superficie celular. Las moléculas MICA y MICB son expresadas en la superficie celular mientras MICC, MICD y MICE son pseudogenes (Brahram y col., 2000).

El gen tiene cinco exones dando lugar a un tallo citoplásmico, una región transmembrana y tres dominios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$). Aunque la estructura general de la glicoproteína MIC es similar a la de cadena pesada de otras moléculas de clase I, a diferencia de estas, parecen ser expresadas sin $\beta 2$ -m. Esta molécula puede ser expresada en células TAP negativas, sugiriendo que su expresión es independiente de la unión a péptidos. Presentan además, la pérdida del sitio de unión al receptor CD8 y no tienen función como presentadora de antígeno (Bahram y col, 2000).

Exhiben, al igual que las moléculas HLA de clase I, un alto polimorfismo, el cual se encuentra en la región transmembrana y el dominio extracelular. Se han descrito 54 alelos. Las variantes alélicas de MICA no han sido relacionadas con diferencias funcionales, y no todas son expresadas en la superficie celular (Stephens y col, 2001).

4.1.- Expresión de la molécula MICA.

MICA exhibe una expresión tisular restringida. Se encuentra constitutivamente expresada en las células del epitelio intestinal. Se expresa también, en bajos niveles, en las células endoteliales y en fibroblastos, pero no en células de linaje linfohematopoyético. MICA también se expresa en epitelio de la cortical del timo. Al encontrarse tanto MICA como MICB en la cortical del timo, es posible que jueguen un papel en la selección del repertorio de células T (Bahram, S y col., 2000; Gkoh y col., 1996).

Parece que la presencia de expresión de MICA no es esencial, si bien puede colaborar con la defensa inmune. Los individuos homocigotos para la pérdida de MICA/B están sanos, o por lo menos, no tienen una deficiencia aparente.

La expresión en superficie de MICA es inducible por el estrés celular. El estrés oxidativo induce daño celular alterando las proteínas, los lípidos y el DNA e induce apoptosis directamente sobre las células diana. La proteína HSP70, que aumenta el estrés oxidativo, induce la expresión del gen MIC y los niveles de proteína, así como la respuesta de los CTLs contra las células diana. Yahamoto y col. (2001) demostraron que tras la incubación de la línea celular de colon CaCo-2 con H₂O₂ durante dos días, la expresión génica de MICA y MICB se veía incrementada, así como tras HSP. A diferencia de las moléculas del MHC, MICA no es modulada por citoquinas como el IFN- γ .

MICA y MICB son expresados también en tumores y en líneas celulares de origen epitelial, como carcinomas de pulmón, mama, riñón, ovario, próstata, y colon, así como en lesiones de melanoma cutáneo (Seliger y col., 2003). MICA es raramente expresado en leucemias de células T, LMA y en líneas de linfoma B. Según estos autores no está clara la relación entre MICA y las características histopatológicas del tumor.

Kennedy y col. (2000), publican que el polimorfismo de MICA no parece estar asociado con la neoplasia intraepitelial cervical inducida por el papilomavirus y ni con el cáncer de piel excepto con melanoma. Parece que la frecuencia y el nivel de expresión de MIC no está asociado con el grado de invasión y potenciales metástasis tumorales (Pende y col., 2002). Según Seliger y col. (2003) esto puede ser debido a que el número de especímenes estudiados sea limitado para sugerir una asociación entre el incremento de expresión de MICA y la progresión de la enfermedad.

Como se hizo referencia anteriormente, no todos los alelos MICA se expresan en la superficie celular. En este sentido, Li y col. (2000) describieron dos líneas tumorales derivadas de epitelio gástrico, AGS y KATO III, que habían perdido, o era débil, la expresión de la proteína MICA en superficie a pesar de la gran cantidad de RNA mensajero. Al analizar estas líneas encontraron que ambas expresaban el alelo 010 de MICA. Este alelo es defectivo debido a una sustitución de un aminoácido en el dominio α 1, lo cuál genera una proteína inestable (se sustituye una prolina por una arginina en la posición 6 en la primera cadena β del dominio α 1. La arginina en esta posición está conservada en todos los alelos MICA y MICB). La expresión de esta molécula en esas líneas fue recuperada tras la transfección de cDNA o de un cósmido que encodaba el alelo de MICA 004, indicando que la causa de la alteración, a la que se debía la no expresión de MICA, no era debida ni a un mecanismo post-transcripcional, ni a un defecto en el procesamiento proteico, sino a una alteración en la secuencia de la molécula. Esta alteración parece que bloquearía la unión de un hidrógeno del plegamiento β con el carboxilo de la histidina de la posición 27 de la cadena β 2, interfiriendo en la formación de la estructura secundaria.

Petersdorf y col. (1999) describieron que la frecuencia de del alelo 010 es un 5% en caucasianos, mientras que Komatsu y col. (2000) encuentran que es de un 12.5% en japoneses. Según estos autores, el gen MICA se encontraría deletado en aquellos individuos japoneses que poseen un haplotipo HLA-B*4801. Por otra parte, Ando y col. (1997) han descrito la existencia de un gen no funcional de MICB, el cual presenta un codón stop en su secuencia de RNA.

4.2.- Papel de MICA en la respuesta inmune.

- La molécula MICA parece ser crucial en el mantenimiento de la integridad del epitelio intestinal, ya que su expresión, favorecería la eliminación de las células epiteliales infectadas o dañadas (Pende y col., 2002). Además de la presencia de altos niveles de expresión de MICA junto con el aumento de la expresión de SHP en las células epiteliales podría representar el mecanismo por el cual el sistema inmune puede reconocer y destruir las células sometidas a estrés (Pende y col., 2002).

La molécula MICA es reconocida por un subgrupo de linfocitos $T\gamma\delta+$, los $LT\gamma\delta V\delta 1$. Estos linfocitos $V\delta 1$ está limitada al epitelio intestinal, representando entre el 70-90% de los linfocitos $T\gamma\delta$, y se correlaciona con la expresión de MICA/B en las células tumorales (Seliger y col., 2003). Como hemos comentado con anterioridad, la moléculas MICA es inducida por el estrés celular y su reconocimiento por parte de los linfocitos $V\delta 1$ serviría como mecanismo de la inmunovigilancia para detectar células del epitelio intestinal dañadas, infectadas o transformadas o puede estimular la secreción por parte de las células T de factores de crecimiento requeridos para el mantenimiento de la homeostasis del epitelio intestinal. La limitada variedad del receptor de los linfocitos $T\gamma\delta$ podría explicar que cada TCR reconoce a varios alelos MICA (Das y col., 2003).

- Al igual que ocurre con las moléculas de clase I, las moléculas MIC interactúan con los receptores inhibidores o estimuladores tanto de las células NK, como con las células T. MICA y MICB son ligandos del receptor activador de las células NK, NKG2D, el cual es expresado en la mayoría de células NK, en los linfocitos $T\alpha\beta CD8+$ y en los linfocitos $T\gamma\delta$ (Carosella y col., 2000).

En estudios “in vitro” se ha demostrado que la interacción del receptor NKG2D con las moléculas MICA y MICB, expresadas en la superficie de las células de los tumores epiteliales,

estimula la respuesta citolítica de las células NK y de linfocitos $T\gamma\delta+$ de forma independiente a la presentación antigénica. De hecho, se ha observado en tumores epiteliales MIC+ un incremento del número de linfocitos infiltrantes que son NKG2D+ (Vetter y col., 2002).

Los receptores de las células NK y la IL-15 juegan un papel importante en la activación y/o expansión de las células efectoras/memoria. La expresión y función de NKG2D fue selectivamente aumentada por la IL-15. Esta es una citoquina que es secretada de forma predominante en el microambiente intestinal durante el estrés o la infección. Además, es reguladora de la activación y expansión de CTL durante la inflamación y confiere a las células similares a las células NK, actividad de CTL, dándole propiedades citotóxicas a través de NKG2D, según Robert y col. (2001). Esto puede explicar las publicaciones previas, que mostraban que los linfocitos intraepiteliales, podían matar las células epiteliales infectadas por virus o tumorales, las cuales potencialmente expresan proteínas MIC.

Estos autores han investigado además en tejidos frescos del intestino normal la función de NKG2D expresado por los CTL. Mediante la utilización de clones de células T específicos contra HCMV y PBL, células T $\alpha\beta$ CD28-CD8+, demuestran que NKG2D aumenta en el contexto de células diana con infección viral que presentan inducción de MICA/MICB.

- Los propios tejidos tienen control sobre la activación y expansión de la inmunidad adaptativa, favoreciendo las funciones efectoras de los CTL cuando cualquier agente que causa daño o inflamación está presente. En condiciones normales, esas vías coestimuladoras están reprimidas. El estrés, la inflamación, y la IL-15 inducen la expresión de varios componentes de ese sistema de coestimulación, pudiendo aumentar la respuesta de CTL a diferentes antígenos.

La existencia de una secreción incontrolada de la IL-15 puede participar en la inducción o persistencia de respuestas autoinmunes: artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad celiaca. Esos hallazgos sugieren que NKG2D y MIC puede contribuir a la destrucción de las células epiteliales en la enfermedad celiaca y en otras condiciones inmunopatológicas. Se ha descrito una asociación de la enfermedad de Behcet con un alelo de MICA que posee una repetición de tripletes en la región transmembrana, pero su papel causal queda por ser demostrado (Orchard y col., 2001). Orchard y col. (2001) también estudiaron la asociación de los alelos MICA en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, ya que estudios anteriores habían descrito una asociación de HLA de clase II con la enfermedad de Crohn y con la colitis ulcerosa. Estos autores encuentran asociación estadísticamente significativa entre el alelo MICA*007 con la

susceptibilidad para padecer colitis ulcerosa y el alelo MICA*008 con la enfermedad inflamatoria intestinal asociada a artritis tipo 2.

Por otro lado, Stastny (2002) estudió en su laboratorio la antigenicidad y capacidad de MICA para inducir respuestas inmunes debidas a diferencias alogénicas, como ocurre en trasplantados. Estudió la presencia de anticuerpos anti-MICA en receptores de trasplantes de diferentes órganos (riñón, hígado y pulmón), donde encontró la presencia en suero de anticuerpos anti-MICA contra alelos MICA del donante (figura 10).

Actualmente, existe una falta de información sobre la expresión de los ligandos de los receptores activadores de las células T en las lesiones malignas, la pérdida de expresión de estos receptores activadores podría suponer una estrategia tumoral para escapar de la respuesta innata. Recientemente, ha sido publicado por Groh y col. (2000), la existencia de moléculas MIC solubles en pacientes con cáncer, que inducirían la endocitosis y la degradación de NKG2D en los linfocitos del tumor infiltrante y de sangre periférica. Estos cambios resultan en alteraciones específicas de la respuesta inmune. Estos autores sugieren que sería interesante estudiar esto en un número importante de pacientes para poder confirmar la presencia de MIC en suero como un mecanismo de escape tumoral.

La existencia de una pérdida de expresión de las moléculas MICA y MICB en melanomas HLA Ia negativos (Ugurel y col., 2001), ha sido relacionada con la existencia de metástasis recurrentes en pacientes que estaban sometidos a inmunoterapia basada en las células T.

Estudios “in vitro” recientes han demostrado que la estimulación de la destrucción de la célula tumoral ejercida por MICA sobre la célula NK puede ser inhibida mediante la coexpresión con el antígeno HLA-G (Menier y col., 2002).

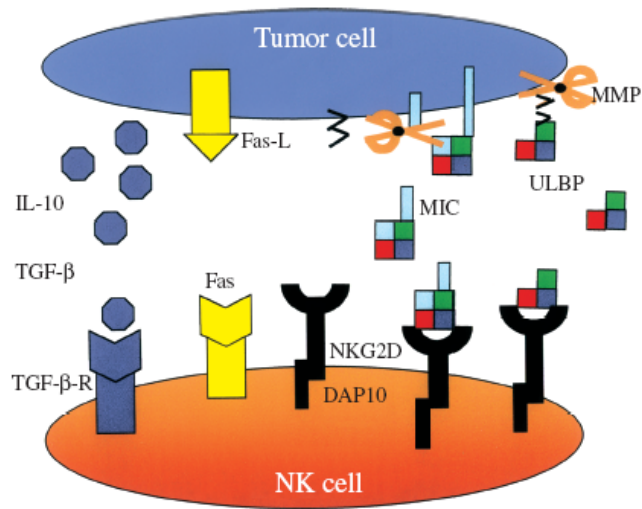


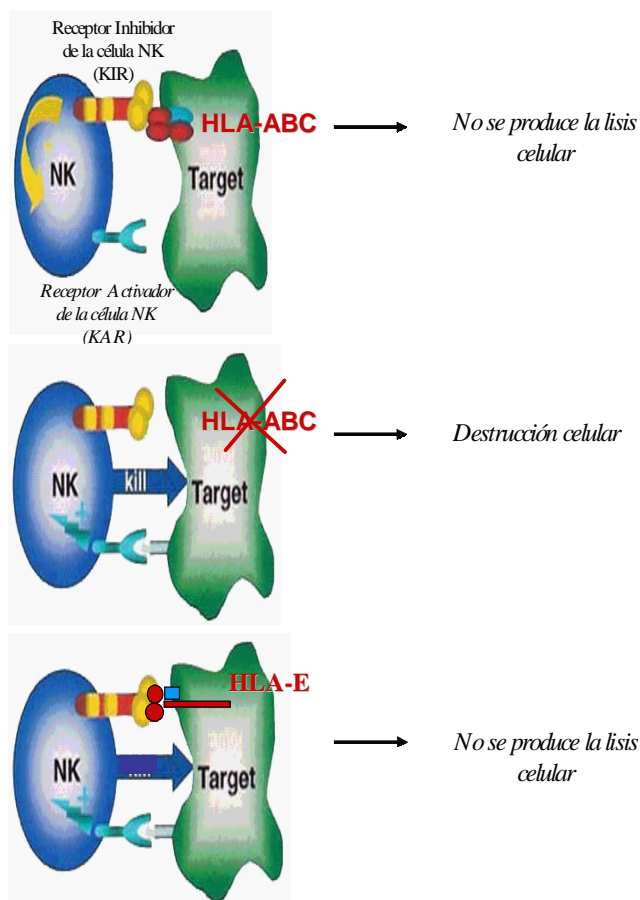
Figura 9. Estrategias de escape de las células tumorales del ataque de las células NK. Las células tumorales expresan ligandos Fas (Fas-L) para eliminar a las células efectoras a través de la vía Fas_Fas-L. Además las células tumorales expresan citoquinas como TGF- β e IL-10, las cuales suprimen directa o indirectamente las funciones efectoras de los linfocitos T y células NK. Además pueden emitir ligandos de NKG2D, MICA, y posiblemente de otros miembros de la familia de ULBP, estos se unen a los receptores NKG2D expresados en las células NK y en los linfocitos T CD8+ modulando el receptor NKG2D y dañando la vía NKG2D/ligando. Las metaloproteínas (MMP) son descritas como escisoras.

II. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis de la vigilancia inmunológica establece que el sistema inmune puede controlar el desarrollo tumoral, al menos en sus primeras etapas, mediante la eliminación de clonas de alta inmunogenicidad. Esta teoría, entre otros hallazgos, se sostiene por el incremento de cáncer en pacientes con inmunodeficiencias congénitas o adquiridas. Recientemente, se ha incorporado la teoría de “inmunoedición” del cáncer que viene a refrendar la hipótesis de inmunovigilancia.

Es sabido que los antígenos tumorales pueden ser presentados a los linfocitos T citotóxicos por las moléculas HLA, esa puede ser la razón por la que numerosos tumores humanos presentan alteraciones en la expresión de estas moléculas. Algunos de los mecanismos empleados por las células tumorales como escape a los linfocitos T citotóxicos (CTLs) sensibilizarían, por otra parte, a las células a células NK. Particularmente, entre estos mecanismos estaría las alteraciones totales y parciales, en algunos casos, de la expresión de las moléculas HLA clásicas.

Al igual que ocurre en células infectadas por virus, la expresión de la molécula HLA-E podría ser usada por las células tumorales como mecanismo de escape a las células NK



que hubiesen perdido la expresión de las moléculas clásicas. Esta disminución o pérdida de las moléculas de clase I podría afectar también a la expresión de HLA-E, no evitando la eliminación de estas por células NK CD94/NKG2A+. (Ulbrecht y col., 2000) (figura 9).

Por otro lado la falta de expresión de MICA como señal de alerta de malignización también contribuirá al escape inmunológico de las células aberrantes.

Figura 10. Reconocimiento de las moléculas HLA clásicas y de HLA-E por la célula NK.

Objetivo principal: Estudiar la expresión de moléculas inhibidoras (HLA-E) y activadoras (MICA) de la actividad NK en líneas tumorales humanas de diferente origen histológico, que pueden justificar un escape simultáneo a células T Y NK en células con expresión alterada de moléculas HLA clásicas.

Objetivo secundario: Se ha querido conocer los factores que pueden condicionar la expresión de HLA-E en la superficie de líneas tumorales.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

1.- LÍNEAS CELULARES Y CULTIVO CELULAR

Para la realización de este trabajo se han utilizado un total de 36 líneas diferentes estirpe histológica.

Dentro de las *líneas de origen hematológico* se encuentran linfomas Burkitt como *DAUDI*, la cual presenta una mutación en el gen de la $\beta 2$ -m, *LUNDAC*, *RAJI* y *RAMOS*. Dentro del grupo de leucemias se encuentran: la línea celular derivada de un linfoma histiocítico, *U937*, obtenida de la ATCC; *NALM-6* es una leucemia pre-B obtenida también de la ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD); *K562* es una eritroleucemia, HLA clase Ia negativa, obtenida de la *KM-3* ATCC; *JURKATT* es un linfoma T; *HL60* es una leucemia promielocítica; y las líneas de leucemia linfoblástica aguda *CEM* y *KM-3*.

Se han analizado un grupo de *líneas celulares de melanoma* comprendido por: *FM55M1*, esta línea muestra una baja regulación del locus B, revertida tras tratamiento con IFN- γ (Real y col., 1998); La línea *R22.2* que expresa un solo alelo de HLA clase I; *IRNE* presenta una mutación del gen de la $\beta 2$ -m, no presentando expresión de HLA clase I (Benítez y col., 1998) y fue originada en el Instituto Ludwig (Bruselas, Bélgica); *MSR3-mel* que presenta una pérdida total de expresión HLA-ABC (Serrano y col., 2003). *NW145E8* es otro melanoma de donde deriva *NW145C5*, la cuál presenta una pérdida de haplotipo HLA (Méndez y col., 2001).

Las tres *líneas celulares derivadas de carcinoma de colon*: *LOVO*, *HCT-15* y *DLD-1*, presentan mutaciones en el gen de la $\beta 2$ -m y carecen de expresión HLA Ia en superficie (Bicknell y col., 1994; Rosa y col., 1983). Son obtenidas de la ATCC (Rockville, MD).

Los *carcinomas de pulmón* *CALU-1*, *SK-MES* y *A549* fueron obtenidos también de la ATCC.

El *carcinoma de laringe* *HEP-2* muestra una disminución de la expresión del locus B (Garrido y col., 1991). La línea celular *CALU-6*, *carcinoma de cabeza y cuello*, fue obtenida de la ATCC.

Las *líneas de carcinoma de mama* (*MCF-7* y *MDA-231*) y los *carcinomas de cervix* (*HeLa*, *SiHa*, *CASKI*) provienen de la ATCC. La línea de cervix 808 presenta una mutación en el exón 3 de HLA-A2 descrita por Brady y col. en el 2000.

Tanto *líneas tumorales de páncreas* (*MZPC-1* y *SKPC-3*), como la *próstata* *PC-3*, son derivadas de la ATCC.

La línea celular *AEH*, fue usada en los estudios de citometría de flujo como control positivo por expresar el antígeno HLA-E en la superficie celular. Ésta es una línea derivada de la leucemia LCL721.221 y está formada por un gen híbrido usando las porciones complementarias de los genes HLA-E y HLA-A2, (Lee y col., 1998).

Las líneas celulares fueron cultivadas en medio de cultivo estéril Dulbecco's MEN 1X (Seromed), suplementado con suero fetal bovino al 10% (Gibco BRL, life technologies, Karlsruhe, Germany), previamente inactivado durante 45 minutos a 60° C; L-glutamina al 5% (Biochorm KG, Berlin, Germa); 500µg/ml de ampicilina (Gobemicina®, Normon S.A.) y 40µg/ml de gentamicina (Genta-Gobens®, Normon S.A.).

La línea celular *MSR3-mel* fue cultivada en medio ISCOVE más un suplemento adicional con la siguiente composición final en el medio: insulina (20mg/ml); transferrina (10mg/ml); selenito sódico (25nM), hidrocortisona (50nM), fosforiletanolamina(10mM), factor de crecimiento epidérmico (1ng/ml), etanolamina (10mM), Triiodo-L-tironina(100pM), albúmina sérica bovina 2mg/ml y piruvato de sodio (0.5mM).

La línea *AEH* fue cultivada con medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal, penicilina y estreptomicina al 1%, 1% de piruvato, 1% de Hepes, 300µg/ml de Higromicina.

El cultivo fue realizado en frascos de cultivos estériles de 50 ml o de 250 ml (Falcon), incubando las células en estufa a 37° C, en atmósfera de CO₂ al 5% y 90% de humedad. El mantenimiento de los cultivos requiere la renovación periódica del medio de cultivo que se realiza en ambiente estéril en campana de flujo laminar. Aquellas células que crecían adheridas al frasco de cultivo para despegarlas para su posterior manipulación se requería la incubación con 2-3 ml de PBS-EDTA 0.02% durante 5 minutos, previo lavado con PBS.

2.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS HLA-E Y MICA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO

Mediante esta técnica fueron estudiadas la expresión en superficie de las moléculas HLA-E y MICA, así como la de las moléculas HLA clásicas, usando un método estandarizado de inmunofluorescencia indirecta.

Material:

- Anticuerpos monoclonales específicos: *3D12*, anti-HLA-E, reconoce la cadena pesada unida a la $\beta 2$ -m (cedido por el Dr. Gerarghty – Seattle, USA. Lee y col., 1998); *SR99* anti-MICA (cedido por la Dra. Caillat-Zucman, París); *W6/32*, anticuerpo monomórfico anti-HLA-ABC unido a $\beta 2$ -m (Barnstable y col., 1978).
- Tampón Buffer fosfato (PBS).
- Anticuerpo de ratón anti-IgG marcado con isocianato de fluoresceína diluido al 1/40 (anti-mouse IgG Fab specific)(Sigma).
- Citómetro de flujo FACsort (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

Método:

- Las células a estudiar, contenidas en un frasco de cultivo, son extraídas y lavadas tres veces en PBS frío, con el fin de eliminar restos de inmunoglobulinas que pudiera contener el suero fetal del medio de cultivo donde se encontraban, centrifugando a 1500 r.p.m entre cada lavado.
- Tras el último lavado, se resuspenden a una concentración de 10^7 células/ml. 50 μ l de esta solución son incubadas a 4° C durante 30 minutos con el anticuerpo adecuado.
- Seguidamente las células son lavadas dos veces con PBS frío para eliminar el anticuerpo en exceso. Después del último lavado, el botón de células se resuspende en 50 μ l de una dilución 1:40 de un segundo anticuerpo de ratón anti-IgG marcado con isocianato de fluoresceína, incubándose a 4° C durante 30 minutos.
- Por último, son lavadas de nuevo tres veces en frío, tras el último lavado, fueron resuspendidas en 500 μ l de PBS.
- El análisis de ésta técnica se realiza midiendo la intensidad de fluorescencia a través de un citómetro de flujo.

3.- ANÁLISIS DEL TRÁNSCRITO DE HLA-E MEDIANTE RT-PCR: OBTENCIÓN DE RNA, RT-PCR Y AMPLIFICACIÓN

La RT-PCR consiste en sintetizar, a partir de RNA total, ADNc. A partir de este ADNc amplificamos los posibles transcritos de las moléculas que deseamos estudiar. Los productos de esa PCR los analizamos en un gel de agarosa al 2% junto con un peso molecular patrón.

A partir de este DNAc y mediante PCR sintetizamos múltiples copias de una secuencia concreta de ADN mediante la repetición de ciclos de desnaturalización, hibridación y síntesis o extensión. Esta técnica fue utilizada para detectar transcritos de cadena pesada de moléculas clásicas Ia, β 2-m y HLA-E.

3. 1.- Extracción de ARN total de líneas celulares tumorales.

Material:

- Células de líneas tumorales
- RNeasy Mini Kit (Quiagen, Hilden, Germany).
- Agua destilada tratada con DPEC
- Etanol 70% con agua DPEC (Merck).
- Agarosa 1%.
- Espectofotómetro (Gene Quant pro)

Método:

- Se extraen las células contenidas en un frasco de cultivo (4×10^6 aproximadamente) y se lavan en PBS frío dos veces.

- Se centrifugan a 1500 r.p.m, decantando todo el sobrenadante.

- El botón celular se resuspende en 175 μ l de tampón de lisis frío (4° C)(RLN) (incluido en el Kit, el cual contiene 50mM Tris-HCL pH 8.0, 140mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.5% NP-40, 1.000 U/ml de inhibidor de ARNasa, 1mM DTT). Se incuba la mezcla 5 minutos en hielo.

- Posteriormente, se centrifuga en frío en microcentrífuga a velocidad máxima durante dos minutos. El sobrenadante lo transferimos a otro tubo eppendorf nuevo, desechándose el botón, ya que éste contiene el núcleo y los restos de membranas.

- Se añaden 600 μ l de tampón RTL y se mezcla en vórtex. Se centrifuga y se decanta en sobrenadante en otro tubo nuevo, añadiéndole 430 μ l de etanol al 70% y se mezcla bien.

- La muestra se pasa por una minicolumna RNeasy Spin Column, para ello se centrifuga a 10.000 r.p.m durante 1 minuto. La microcolumna capta el ARN que es lavado con 700 μ l de tampón RW1 (del Kit), centrifugando 15 segundos a 10.000 r.p.m. Después se lava dos veces con 500 μ l de tampón de lavado RPE, se centrifuga del modo anterior.

- Por último se eluye el ARN en agua, haciendo pasar por la columna 30µl de agua destilada libre de ARNasas, centrifugando durante 1 minuto a 10.000 r.p.m.

- La cantidad de ARN es cuantificada en un espectrofotómetro a una dilución 1:100 y su calidad se observa tras la electroforesis de 5µl en gel 1%(Sigma).

3. 2.- Síntesis de ADNc.

Material:

- ARN total de las líneas celulares.
- Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI).

Método:

A partir de 2 µg de ARN total se sintetiza ADNc por la acción de la transcriptasa inversa, según la siguiente reacción:

MgCl ₂ 25mM.....	4µl
Tampón de la enzima transcriptasa inversa 10X (Tris HCl 100mM, pH 8.8, KCl 500mM, Tritón X-100 al 1%).....	2µl
dNTP 10mM.....	2µl
Inhibidor de ARNasas (RNasin)	0.5µl
Transcriptasa inversa AMLV(10 U/µl)	1.5µl
Oligo (dT) ₁	1µl
ARN total.....	2 µl
Agua destilada libre de ARNasa.....	c.s.p. 20µl

Esta reacción se incuba a 42° C durante 60 minutos. Posteriormente se mantuvo 5 a 95° C para inactivar la enzima.

La reacción se deja 5 minutos a 4°C y se le añade 80µl de agua destilada, se alícuota y se almacena a -20°C hasta el momento de su uso en la PCR.

3. 3.- Amplificación del cADN de la β -actina.

La amplificación del ADNc de la β -actina se utilizó como control de calidad del cADN extraído de las diferentes líneas para la técnica de la transcripción inversa (RT-PCR), según la reacción:

ADNc..... 5 μ l
CHO15Fw..... 1 μ l (100ng)
CHO16Bw..... 1 μ l (100ng)
Mezcla de dNTPs 10mM.....5 μ l
(500 mM KCl, 15mM MgCl₂, 100 mM Tris HCl, 0.1% gelatina, pH 8.4)(Boehringer)
Tampón de PCR 10 x.....5 μ l
Taq polimerasa..... 1 μ l (1U)
Agua destilada.....c.p.s. 50 μ l

CHO15Fw	5'-TACCTCATGAAGATCCTCACCGAGGCG-3'
CHO16Bw	5'-TTTCGTGGATGCCACAGGACTCCATG-3'

Las condiciones de la PCR fueron:

94°C 5 minutos.....1 ciclo

94°C 1 minuto, 58°C 1 minuto, 72°C 1 minuto.....21 ciclos

72°C 1 minutos.....1 ciclo

10 μ l del amplificado de PCR fueron sometidos a electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

3. 4.- Amplificación de la molécula HLA-E

Material:

- ADNc de las líneas celulares
- Primers:

E5'UT	5'-CCA CCA TGG TAG ATG GAA CCC TC-3'
E3'UT	5'- GCT TTA CAA GCT GTG AGA CTC-3'

- Mezcla de dNTP: 2mM de cada dNTP (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Boehringer Mannheim).
- Taq ADN polimerasa (Boehringer Mannheim).
- Tampón PCR 10 x: 100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCL, pH 8.3. (Boehringer Mannheim).

Método:

Para llevar a cabo la amplificación de los transcritos de la molécula HLA-E, en cada una de las muestras, fueron utilizados los Primers E5'UT y E3'UT, complementarios a dos regiones específicas para el ARN de HLA-E (Ulbrecht y col., 1999).

La reacción de PCR en cada una de las muestras fue la siguiente:

ADNc.....	2.5 µl
E5'UT.....	1 µl (100 ng)
E3'UT.....	1 µl (100 ng)
Mezcla de dNTPs.....	5µl
Tampón de PCR 10x.....	5µl
Taq polimerasa.....	1 µl (1U)
Agua destilada.....	c.s.p.50µl

Las condiciones de la PCR fueron:

95°C 4 minutos.....	1 ciclo
94°C 5 minutos, 68°C 5 minutos, 72°C minutos...	30 ciclos
72°C 10 minutos.....	1 ciclo

Para comprobar que la amplificación fuese específica, el producto de la PCR de las líneas ha sido secuenciado tal y como se especifica en el apartado 5 de Material y Métodos.

3. 5.- Electroforesis de los productos de la PCR en gel de agarosa

Material:

- Productos de la PCR.
- Tampón de carga 10x: 2.5 mg/ml de Azul de bromofenol, 2.5 mg/ml de Xileno-cianol, 0.25 g/ml de Ficoll 400.
- Agarosa (Sigma).
- TAE 1x.
- 25µl de bromuro de etidio por cada 50ml de TAE 1x.

Método:

Una vez realizada la PCR, 9µl del amplificado se mezclan con 1µl de tampón de carga 10x, y se someten a electroforesis con una diferencia de potencial de 100 V en un gel de agarosa al 2% en 1x TAE con bromuro de etidio. Al 1% si lo que se analiza es RNA.

4.- PCR CUANTITATIVA

La PCR a tiempo real consiste en la relación cuantitativa entre la cantidad de secuencia diana de inicio y la cantidad de productos de PCR dados en un ciclo determinado. Mediante esta metodología se puede comparar la cantidad de ARN de un determinado gen y establecer estudios comparativos entre el nivel de transcripción de ese gen entre distintas células.

El desarrollo de la PCR a tiempo real ha eliminado la variabilidad tradicional asociada a la cuantificación de PCR, permitiendo la cuantificación de los productos de la PCR y la reproductividad. La PCR cuantitativa se ha realizado en el LightCycler (Roche Diagnostics), es un fluorímetro integrado con un termociclador que usa microvolúmenes, el cual combina una PCR de ciclos rápidos con una monitorización de la fluorescencia a tiempo real. El Software del equipo analiza la señal de fluorescencia a tiempo real inmediatamente tras cada medida, la adquisición de la fluorescencia se realiza cada 10-100 milisegundos. Por tanto, la PCR a tiempo real o cinética es un método poderoso para estimar el número de copias, ya que la fluorescencia es adquirida una vez por ciclo y posteriormente la cantidad de fluorescencia se refiere relaciona con el número de ciclos en una gráfica.

Para ello se emplearon los métodos de detección mediante sondas y mediante el marcador de doble cadena SYBR Green I.

-Detección por sondas. Se emplean como sondas dos oligonucleótidos bloqueados en 3' para evitar que sirvan de cebadores de la PCR, estos van a ser complementarios a dos secuencias contiguas del amplificado. La sonda que se une más hacia 5' de la secuencia amplificada va marcada con fluoresceína en 3', mientras que la otra sonda va marcada en 5' con un emisor fluorescente que sólo emitirá cuando sea excitado por la fluoresceína de la primera sonda; para que la fluoresceína excite al marcador fluorescente, las dos moléculas han de estar muy próximas y esto solamente ocurrirá cuando las dos sondas se unan a la secuencia específica.

-Detección por SYBR Green I. Este sistema de detección es más inespecífico, pues se trata de un fluorocromo que emite fluorescencia cuando se intercala al DNA de doble cadena, por lo que un amplificado distinto al deseado dará también señal de amplificación. Para solucionar este problema, tras la amplificación se realiza un programa de temperatura que consiste en renaturalizar el amplificado y después calentar de forma progresiva a la vez que medimos emisión fluorescente en cada muestra. El amplificado específico tiene una temperatura característica de fusión dependiente de su contenido en G+C y de su longitud; a esta temperatura las dos hebras de ADN se separan y la emisión fluorescente disminuye con gran rapidez. La caída de la fluorescencia en cada muestra a la temperatura correspondiente al amplicón que estamos estudiando nos confirmará la especificidad de la amplificación.

4. 1.- Condiciones de la PCR para amplificar cuantitativamente β 2-m, GPDH, de la cadena pesada de HLA-ABC (H.C) y HLA-E.

- **Amplificación de la β 2-m y del gen de la GPDH:**

Para ello se emplea el kit comercial de β 2-m y de GPDH House Keeping gene (Lyghcycler h- β 2M and h -G6PDH Housekeeping gene set, Roche Diagnostic) y fue realizada mediante la siguiente reacción recomendada por el fabricante, realizándose según protocolo:

	GPDH	β 2-m
CIMg ₂	0.6	–
H ₂ O	2.15	2.75
Sonda	0.5	0.5
Master	0.5	0.5

Volumen final	3.75µl	3.75µl
---------------	--------	--------

En cada capilar del Light Cycler añadimos los 3.75µl de la mezcla anterior y 1.5µl de cDNA.

El gen de la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa no está implicado en el procesamiento y presentación de péptidos antigénicos; se ha comprobado que su expresión es constante y puede ser empleado como factor corrector de diferencias debidas a la cantidad de RNA obtenido en cada muestra (Barthe et al., 2001; Kletzien et al. 1994).

- **Amplificación de la cadena pesada de HLA-ABC (H.C.):**

H2O	0.65
Cl ₂ Mg 4mM	0.6
Sonda F (CCATCCGCTGCCAGGTCA)	0.5
Sonda (TGTGATCTCCGCAGGGTAGAAGC)	L 0.5
Primer F(GAGAACGGGAAGGAGACGC)	0.5
Primer B (CATCTCAGGGTGAGGGGCT)	0.5
LC-Fast Start DNA Hybridazion Probes	0.5
CDNA	1.25
Volumen final	5µl

- **Amplificación de HLA-E:**

Cl ₂ Mg	0.6
H2O	4.3
Primer (GGGAGCTACTCTAAGGCTGAGTGG)*	E7 0.5
Primer (GCTTTACAAGCTGTGAGACTC)	E2 0.5
Light cycler FastStart DNA Master SYRB 1 green I	

CDNA	2.5
Volumen final	10 μ l

* Amplifica exón 7 de HLA-E dando un tamaño de transcrito de 240bp.

En cada tanda de reacciones se incluyeron estándares de concentración conocida para el cálculo de la recta de regresión, recta que nos relacionará el ciclo de detección del amplificado con la concentración de la molécula en la muestra. La temperatura de Meeting específica para HLA-E es 89.47 °C. Para tener una mayor seguridad de la especificidad del amplificado, se realizó en todas las amplificaciones el posterior análisis en gel de agarosa al 2% en tampón TAE y una concentración de bromuro de etidio de 0.5 μ g/ml.

4. 2.- Realización de las Curvas estándares.

Para que los datos obtenidos en la PCR cuantitativa sean reproducibles y fiables de un ensayo a otro, construimos una curva estándar para cada una de las moléculas estudiadas (H.C., β 2-m, HLA-E y GPDH).

Para construir cada una de estas curvas fue realizada una amplificación selectiva de estas moléculas y posterior clonación.

4. 2. 1.- Amplificación de la cadena pesada de las moléculas clásicas, β 2-microglobulina, HLA-E, MICA y GPDH.

La amplificación de todas estas moléculas se describieron en el apartado 3 de Material y Métodos.

4. 2. 2.- Clonación del inserto:

Material:

- TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen)
- Vacuum manifold (Promega)
- Wizard PCR Preps DNA purification systems (Promega)
- Wizard Plus SV Minipreps DNA purification systems (Promega)

Método:

- En primer lugar los productos de la PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 2%, seleccionando sólo los amplificados en los que hubiese una sola banda y fueran específicas. Posteriormente, los productos de la PCR deben ser purificados mediante el Kit Wizard PCR Preps DNA purification systems según el protocolo del fabricante.

- Una vez purificados, los productos de la PCR, fueron insertados directamente en un plásmido vector* mediante el kit de clonación TOPO TA Cloning Kit for Sequencing, mediante la siguiente reacción:

Productos PCR purificados.....	0.5 a 4µl
Solución salina (kit).....	1µl
Agua esteril	completar hasta 5µl
TOPO vector.....	1µl

- Se mezcla en vortex y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente (22-23°C).

** El plásmido vector es lineal y está suministrado por el kit (pCR4-TOPO), contiene una sola timidina (T) en la posición 3' y una topoisomerasa que se une de forma no covalente con el vector.*

La Taq polimerasa, usada previamente para amplificar, tiene una actividad transferasa terminal, la cual añade un adenosina (A) a la producto final de la PCR. Esta adenosina se liga eficientemente con la timidina de la región 3' del vector. La topoisomerasa se une a la doble cadena de DNA en sitios específicos y se une mediante un enlace no covalente a su residuo de tirosina-274 con el fosfato 3' de la cadena del plásmido. Pudiendo ser atacada esta formación por el hidroxilo 5' eliminado de la doble cadena de DNA, dejando libre la topoisomerasa de nuevo.

- Posteriormente, se procede a la transformación en bacterias E. coli (TOP10); Para ello se añaden 2µl de la reacción preparada con anterioridad al vial que contiene las bacterias E. coli (One Shot TOP10 suministrado en el kit). Se mezcla en vórtex y se incuba durante 30 minutos en hielo.

- Pasado este tiempo, se somete el vial a un choque térmico a 42° C durante un minuto (sin movimiento) e inmediatamente se pasan los tubos a hielo.

- Se añaden 250µl de medio SOC (2% de triptona, 10mM de NaCl, 2.5mM de KCl, 10mM de MgCl₂, 10mM de MgSO₄, 20mM de glucosa). Se incuba 1 hora a 37° C en agitación.

- Se siembra en una placa de agar que contiene medio LB con 50µg/ml de ampicilina y lo dejamos toda la noche a 37° C (dentro de una campana de flujo laminar).

4. 2. 3.- Aislamiento del plásmido

Material:

- Kit Wizard plus S.V. Minipreps DNA purification System, Promega
- Aplicador de vacío, Vacuum manifold (Promega)
- Placas de agar LB con antibióticos
- Medio de cultivo LB con antibióticos
- Etanol al 95%
- Microcentrífuga (14.000 g)
- Tubos estériles para microcentrífuga
- Centrífuga (10.000 g)

Método:

- Al día siguiente, se aísla el plásmido mediante el uso del kit Wizard Plus SV Minipreps DNA purification systems; Para ello, se aísla una colonia de la placa de agar y se inocula en un tubo de 10 ml con medio LB con ampicilina a la misma concentración que la pusimos en la placa de agar. Se incuba entre 12-16 horas a 37° C en agitación.

- Del cultivo se cogen 5ml, se transfieren a un tubo de microcentrífuga y se centrifugan a 10.000 g durante 5 minutos. Se desecha el sobrenadante, se elimina el exceso de medio, se agita bien y se añaden 250µl de Cell resuspensión solution.

- Se agita en vortex y se añaden 250µl de Cell Lysis Solution. Se mezcla invirtiendo el tubo 4 veces. Se añaden 10µl de de solución alcalina con acción proteasa y se invierte 4 veces. Tras esto se añaden 350 µl de Wizar Plus SV Neutralization Solution y se mezcla invirtiendo el tubo de nuevo 4 veces.

- Por último, se centrifugan las bacterias lisadas a 14.000 g durante 10 minutos.

- Este DNA plasmídico debe ser purificado del lisado de las bacterias; Para ello aplicamos el vacío (38.1 cm de Hg)(Vac-Man Laboratory Manifold) sobre 850 μ l del lisado de las bacterias, el cual se ha dispuesto en unas columnas con filtro suministradas por el fabricante (Wizard Plus SV Minipreps Spin Column), y siguiendo el protocolo del mismo.

- Una vez ha pasado el líquido se desecha y se añade a la columna 750 μ l de Column Wash Solution diluida con etanol al 95%. Se aplica de nuevo el vacío y se repite el paso anterior, esta vez usando 250 μ l Column Wash Solution, aplicando de nuevo vacío. Una vez eliminada toda la Column Wash Solution de la columna, ésta se coloca sobre un tubo estéril de 2 ml (eppendorf) y se centrifuga durante 2 minutos a velocidad máxima en una microcentrífuga para eliminar cualquier resto de la solución.

- Se transfiere la columna a un tubo estéril nuevo y se añade a la columna 100 μ l de agua libre de nucleasas y se centrifuga en microcentrífuga a velocidad máxima.

- Después de eluir el DNA, separamos el tubo de la columna, eliminando esta última y posteriormente se procede al lavado del DNA del plásmido.

4. 2. 4.- Preparación de las diluciones seriadas

El DNA plasmídico se cuantifica por espectrofotometría y se calcula el nº de copias/ μ l a partir de la concentración y del peso molecular del plásmido que es usado en cada experimento. Este cálculo nos sirve para establecer las curvas estándares a partir de diluciones seriadas. Los puntos de la curva nos servirán de control de calidad interno, al analizarlos junto con las muestras.

5.- SECUENCIACIÓN DE LA MOLÉCULA HLA-E

5. 1.- Secuenciación mediante el método Didesoxi: Fundamento.

Desarrollada en 1977 por Fred Sanger, basándose en la síntesis de una población de moléculas mediante la utilización de una polimerasa, utilizando como molde el fragmento de ADN que quiere secuenciarse y como cebador, un oligonucleótido cuya secuencia es complementaria a la secuencia del fragmento.

El proceso consiste en preparar una mezcla de reacción que contiene ADN molde, la polimerasa, dNTP y los cuatro ddNTP cada uno marcado con fluorocromos que son excitados por la misma longitud

de onda pero que emiten luz con diferente longitud. Los productos sintetizados, son posteriormente separados mediante electroforesis a través de un capilar, el cual se encuentra relleno con polímero especial (POP-6, en nuestro caso). Cuando un fragmento es alcanzado por el haz del láser de argón, se excita el fluorocromo emitiendo luz de la longitud de onda correspondiente al ddNTP incorporado. Los secuenciadores detectan la fluorescencia de cuatro colorantes diferentes, que son usados para identificar la A, C, T y G en las reacciones de extensión.

Las señales recogidas son transferidas al ordenador donde se procesan con el software “Sequencing Análisis” (Applied Biosystems).

Material:

- Microcon (Millipore)
- Centri-sep columns (Princeton separations)
- Microcentrífuga
- Mezcla de reacción Big Dye™ ABI PRISM (Ampli Taq DNA polimerasa, finalizadores se la síntesis (dyes) marcados).
- Termociclador Gene Amp® PCR System 9700
- Secador de vacío DNA Speed Vac® DNA 120 Savant
- Template Suspension Reagent (Applied Biosystems)
- Termobloque (Grant)
- Secuenciador ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer
- Performance Optimized Polymer 6 (POP-6)(Applied Biosystems)
- Cebadores específicos (diluidos al 1/10 de la concentración empleada para la PCR) para la amplificación de molécula HLA-E: E5'UT, E3'UT (ver apartado 3. 4. de Material y Métodos) y E7 (ver página 69).

Método:

5. 1. 1.- Purificación de las muestras amplificadas.

- En primer lugar se concentra la PCR inicial, usando para ello las columnas “microcon”. Se situa la columna con la parte azul hacia arriba en un tubo de microcentrífuga y se añade el producto de la PCR completando con agua bidestilada libre de DNAsas hasta 500µl.
- Se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 8 minutos. Se desecha el tubo colector.

- Se da la vuelta a la columna, se coloca en otro tubo nuevo de microcentrífuga, y se añaden 20 μl de agua.
- Se centrifuga a 3000 r.p.m. durante 2 minutos. El tubo de microcentrífuga contiene ahora el producto de la PCR purificado.

5.1. 2.- Reacción de secuenciación.

- La reacción de secuenciación se debe preparar en hielo. Se disponen dos tubos por muestra, uno para cada cebador. La reacción se hará de la siguiente manera:

5 μl Big-Dye (Perkin Elmer)

5 μl de agua bidestilada

5 μl de la PCR purificada obtenida en el apartado 5.1.1. de Material y Métodos.

1 μl de cebador (en un tubo pondremos el sentido y en otro el antisentido).

Programa termociclador:

94°C 3 minutos

96°C 10 segundos

58°C 5 segundos

60°C 4 minutos

5. 1. 3.- Purificación de las reacciones de secuenciación.

- Se emplean las columnas CentriSep Spin Columns (Applied Biosystems). Estas columnas en primer lugar deben ser hidratadas. Para ello se abre la columna y se añaden 800 μl de agua bidestilada, se agita lentamente para homogeneizar el contenido, evitando la formación de burbujas. Reposar 30 minutos.

- Transcurrido este tiempo, se quitan las burbujas invirtiendo cuidadosamente.

- Se destapa la columna por ambos lados (superior e inferior) y se dispone sobre un tubo colector. Se deja drenar durante 15-30 minutos.

- Se centrifuga durante 2 minutos a 3000 r.p.m., se desecha el tubo de recogida y ponemos otro nuevo.

- Se transfieren 20 μ l de la reacción de secuenciación al centro de la columna (sin remover) y se centrifuga durante 2 minutos a 3000 r.p.m.

- La columna se desecha, y pasamos a secar la muestra del tubo de recogida en vacío, durante 20 minutos. Una vez este el tubo libre de líquido si no se va proceder a la realización de la secuenciación en ese momento se almacena a -20°C hasta su posterior estudio. Si se va a secuenciar se añaden 25 μ l de Template Suspension Reagent a cada muestra y se dejan 15 minutos a temperatura ambiente.

- Posteriormente, se procede a desnaturalizar las muestras durante 3 minutos a 95°C en un termobloque.

- Se ponen los tubos en hielo inmediatamente, donde permanecerán hasta el momento de ser cargadas en el secuenciador.

6.- ENSAYOS DE ESTABILIDAD DE LA MOLÉCULA HLA-E

Las líneas celulares se incuban con 100 $\mu\text{g/ml}$ del péptido líder derivado de la secuencia de HLA-A2 (EpA*2403) (Research genetics) con o sin $\beta_2\text{-m}$ humana (Sigma) durante toda la noche a 26°C .

Además, se incuban, durante ese mismo tiempo, los cultivos de esas mismas líneas celulares por duplicado a 37°C y a 26°C sin adicción ni péptido, ni $\beta_2\text{-m}$.

IV. RESULTADOS

1.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE HLA-E EN TUMORES HUMANOS

La presencia de alteraciones en la expresión de las moléculas HLA clásicas es un hecho que ocurre frecuentemente en tumores (Garrido y col., 1993). Esto es interpretado como un mecanismo de escape de las células aberrantes a la acción de los linfocitos T citotóxicos. A pesar de que la pérdida de estas moléculas HLA-Ia hace que las células sean más susceptibles a la acción lítica de las células NK, las células tumorales sobreviven. Por este motivo, deben existir otros mecanismos que les permitan escapar a la lisis NK. Uno de ellos, podría ser la escasa accesibilidad de estas células a los tumores; En efecto, se ha observado que la mayor parte de los tumores presentan escaso infiltrado de células NK. Otro motivo podría ser la inhibición de la actividad NK, en este sentido la molécula no clásica HLA-E a través del receptor CD94/NKG2A (Lee y col., 1998) es capaz de inhibir la actuación de la célula NK, y podría contribuir al escape de la célula tumoral a la vigilancia inmunológica. Por otra parte, podía existir una alteración en los mecanismos de señalización de malignidad o estrés celular, como la no expresión de MICA.

Para evaluar la relevancia de estos mecanismos de escape tumoral se ha estudiado la expresión de las moléculas MICA y HLA-E en la superficie de líneas tumorales humanas. Además, se han estudiado los factores que contribuyen a la expresión de HLA-E, así como, la transcripción del gen en líneas celulares humanas.

1.1- Expresión de moléculas HLA-E en la superficie de líneas celulares humanas

Debido a la falta de anticuerpos monoclonales específicos, hasta hace poco tiempo no se ha conocido cual era la distribución tisular de los antígenos HLA, conociéndose sólo datos referentes a la expresión génica, RNA.

En nuestro estudio, la expresión en superficie de la molécula HLA-E fue analizada por citometría de flujo (FacSort), mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), usando para ello un anticuerpo monoclonal dirigido específicamente contra la molécula HLA-E denominado 3D12, cedido por el laboratorio del Dr. Geragthy (Seattle, WA) (Lee y col., 1998). Al mismo tiempo se analizó la expresión de las moléculas HLA clásicas (HLA-ABC) en esas mismas líneas celulares, usando el anticuerpo monoclonal monomórfico W6/32 (Barnstable y col., 1978).

En este estudio, fueron empleadas líneas celulares de diferente estirpe histológica: once líneas de origen hematológico, siete melanomas, tres carcinomas de colon, tres carcinomas de pulmón, un carcinoma de cabeza y cuello, uno de laringe, dos carcinomas de páncreas, dos carcinomas de mama, cuatro carcinomas de cervix, uno carcinoma próstata y un carcinoma gástrico, (tabla 4).

Para la titulación del anticuerpo monoclonal 3D12, así como para control de la expresión de HLA-E en cada ensayo, fue utilizada la línea celular *AEH* (Lee y col., 1998). Esta línea celular deriva de la LCL 721.221. Presenta expresión de HLA-E intracelular pero no en superficie, siendo transfectada para recuperarla con un gen híbrido obtenido de las porciones complementarias de los genes de HLA-E y HLA-A2 (Lee y col., 1998); Es a esta línea transfectada a la que se denomina *AEH* (es sabido que el péptido derivado de la secuencia líder de HLA-A2 estabiliza la molécula HLA-E en la superficie celular). Según el análisis bioquímico realizado por Lee y col. (1998), la cadena pesada tanto del HLA-E endógeno como de las derivadas de *AEH* tenían idéntica estructura.

Los primeros ensayos se llevaron a cabo sobre linfocitos de sangre periférica (*PBLs*) y se demostró la expresión de ésta molécula en la superficie de los mismos. Además la expresión de HLA-E en los *PBLs* fue superior a la observada en la mayoría de las líneas celulares hematológicas y que en todas las no hematológicas, siendo no obstante, la expresión observada más débil al compararla con la encontrada en transfectante *AEH* (Tabla 5, figuras 12 y 13).

Las líneas *U937* y *HL60*, de origen mielo-monocítico, fueron las que presentaron una expresión más evidente de HLA-E, no solo dentro de las de su estirpe sino teniendo en cuenta la generalidad de las líneas celulares tumorales estudiadas (tabla 5, figura 12). Además de en estas dos líneas, HLA-E fue detectado en la superficie, aunque la expresión fue más débil, en otras tres líneas celulares hematológicas: en *JURKATT* (linfoma T) y en las leucemias linfáticas agudas (LLA) *CEM* y *KM-3*. Por el contrario, no hubo evidencia de HLA-E en la superficie celular en el resto de líneas leucémicas y linfomas estudiados (tabla 5, figura 12 y 13).

Tampoco fue encontrada expresión en superficie de HLA-E en el resto de líneas no hematológicas salvo en los sistemas tumorales *FM55M1/R22.2*, *NW145E8/NW145C5* y en la línea *808*, hecho que comentaremos más adelante (tabla 5).

Por otra parte, cabe señalar que en todas las líneas hematológicas se detecta HLA-ABC en superficie siendo esta expresión algo menor al ser comparada con los *PBLs*, salvo en la línea *K562*, con baja expresión de estos antígenos, en la leucemia pre-B *NALM-6* y en dos linfomas Burkitt (*DAUDI* y *LUNDAC*) (tabla 5, Figura 12 y 13).

También fue observada una expresión variable de las moléculas HLA-ABC en las líneas tumorales no hematológicas. Por una parte, existen líneas que no expresan HLA-ABC por encontrarse metilados los genes HLA-Ia, como es el caso de *MSR3-mel* (Serrano y col., 2001), o por tener defectos en los genes de β 2-m, cosa que le ocurre a la línea de melanoma *IRNE* (Benitez y col., 1998). La línea celular *IRNE* transfectada con el gen de la β 2-m re-expresa moléculas clásicas en superficie pero, a pesar de esto, permaneció siendo negativa para 3D12. Las tres líneas de carcinoma de colon estudiadas (*LOVO*, *HCT-15* y *DLD-1*) presentan también mutaciones en el gen de la β 2-m, en ellas, como hemos comentado, tampoco se ha encontrado expresión de HLA-E. (tabla 5, figura 12 y 13).

Por último haremos referencia a las líneas celulares pertenecientes a los sistemas tumorales *FM55M1/R22.2* (Real y col., 1998) y *NW145E8/NW145C5* (Méndez y col., 2001). Los miembros de cada sistema tumoral se diferencian por el fenotipo de HLA-ABC presentado y todas, salvo *NW145E8*, poseen una expresión reducida de moléculas clásicas en la superficie celular. *FM55M1* presenta una disminución de la expresión de HLA-B mientras que *R22.2* expresa sólo HLA-A1. Por otro lado, *NW145C5* presenta la pérdida de un haplotipo completo, en cambio *NW145E8* no posee alteración de la expresión HLA-ABC.

A tenor de los resultados obtenidos, se puede decir en líneas generales, que la expresión de la molécula HLA-E es raramente detectada en la superficie de las células tumorales humanas. Se detecta tanto en linfocitos de sangre periférica como en líneas hematopoyéticas de estirpe monocítica y LT. En líneas tumorales de otro origen histológico la expresión detectada es más débil y no se concreta en una estirpe histológica particular.

Línea Celular	Origen	W6/32	3D12
AEH	Línea celular transfectada con HLA-E	++	+++
PBLs	Control normal	+++	++
DAUDI	Linfoma de Burkitt	-	-
LUNDAC	Linfoma de Burkitt	-	-
RAJI	Linfoma de Burkitt	++	-
RAMOS	Linfoma de Burkitt	++	-
JURKATT	Linfoma T	++	+/-
U937	Linfoma Histiocítico	++	+
HL-60	Leucemia Promielocítica (LMA-M3)	++	+
K-562	Eritroleucemia (LMA-M6)	-	-
NALM-6	Leucemia pre-B	-	-
CEM	Leucemia Linfoblástica aguda (LLA)	++	+
KM-3	LLA	++	+/-
IRNE	Melanoma	-	-
IRNE transfected with β 2-m	Melanoma	+	-
FM55M1	Melanoma	+	+/-
R22.2	Melanoma	+	+
MSR-3	Melanoma	-	-
NW145E8	Melanoma	+	-
NW145C5	Melanoma	+	+/-
LOVO	Carcinoma de Colon	-	-
HCT-15	Carcinoma de Colon	-	-
DLD-1	Carcinoma de Colon	-	-
CALU-1	Carcinoma de Pulmón	++	-
SK-MES	Carcinoma de Pulmón	+	-
A-549	Carcinoma de Pulmón	++	-
CALU-6	Carcinoma de cabeza y cuello	++	-
HEP-2	Carcinoma de Laringe	++	-
MZPC-1	Carcinoma Pancreático	+	-
SKPC-3	Carcinoma Pancreático	++	-
MCF-7	Carcinoma de Mama	++	-
MDA-231	Carcinoma de Mama	++	-
HELA	Carcinoma Cervix	++	-
808	Carcinoma Cervix	++	+
SIHA	Carcinoma Cervix	++	-
CASKI	Carcinoma Cervical	++	-
PC-3	Carcinoma Próstata	++	-
AGS	Carcinoma Gástrico	-	-

Tabla 5.- Análisis mediante citometría de flujo de la expresión en superficie de la molécula HLA-E. Se representan los resultados de acuerdo a una estimación semicuantitativa (-, +/-, +, ++, +++), acorde a la intensidad de la fluorescencia obtenida mediante citometría de flujo, con el anticuerpo monomórfico W6/32 específico contra HLA-ABC, y con en anticuerpo 3D12, específico para HLA-E.

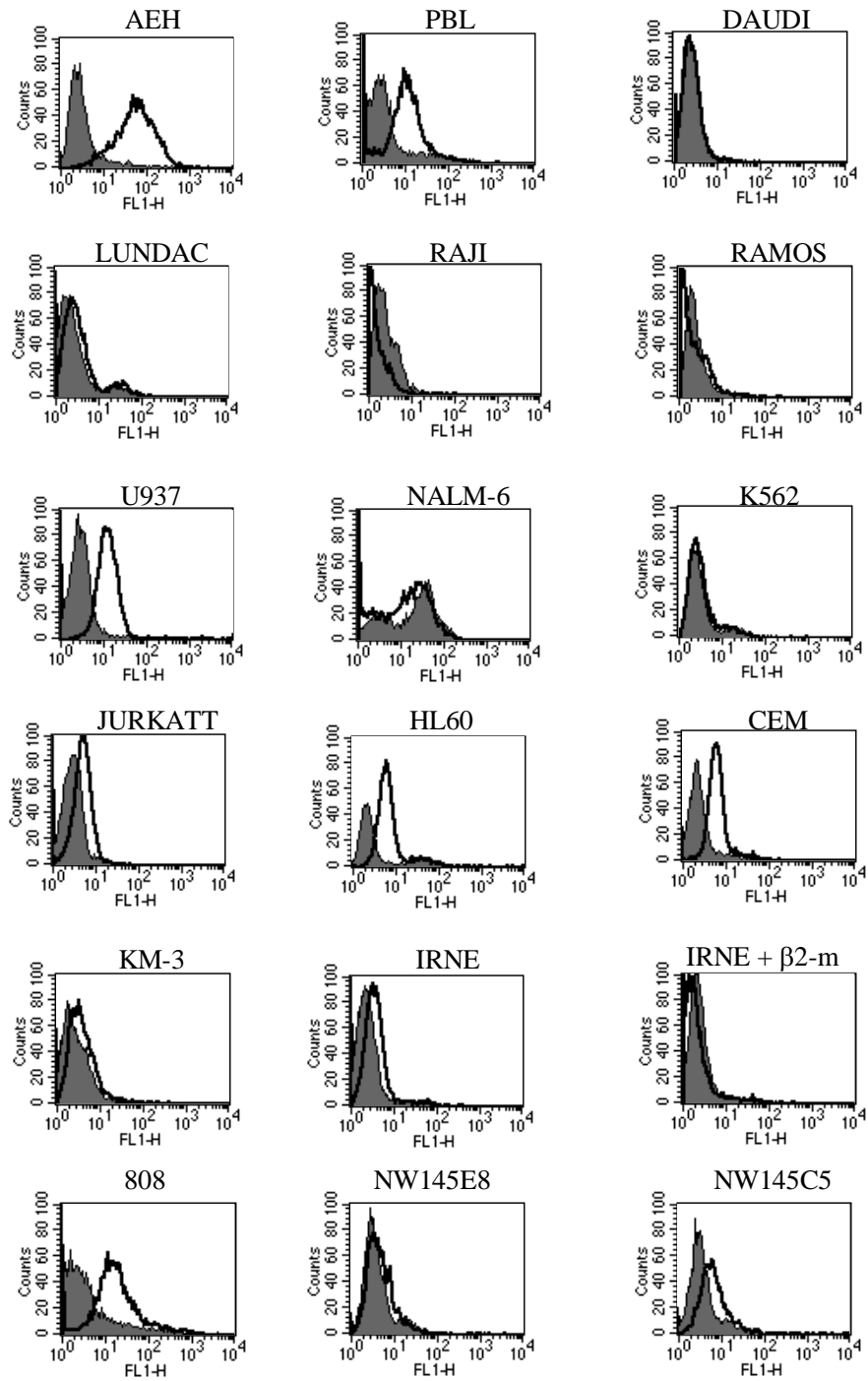
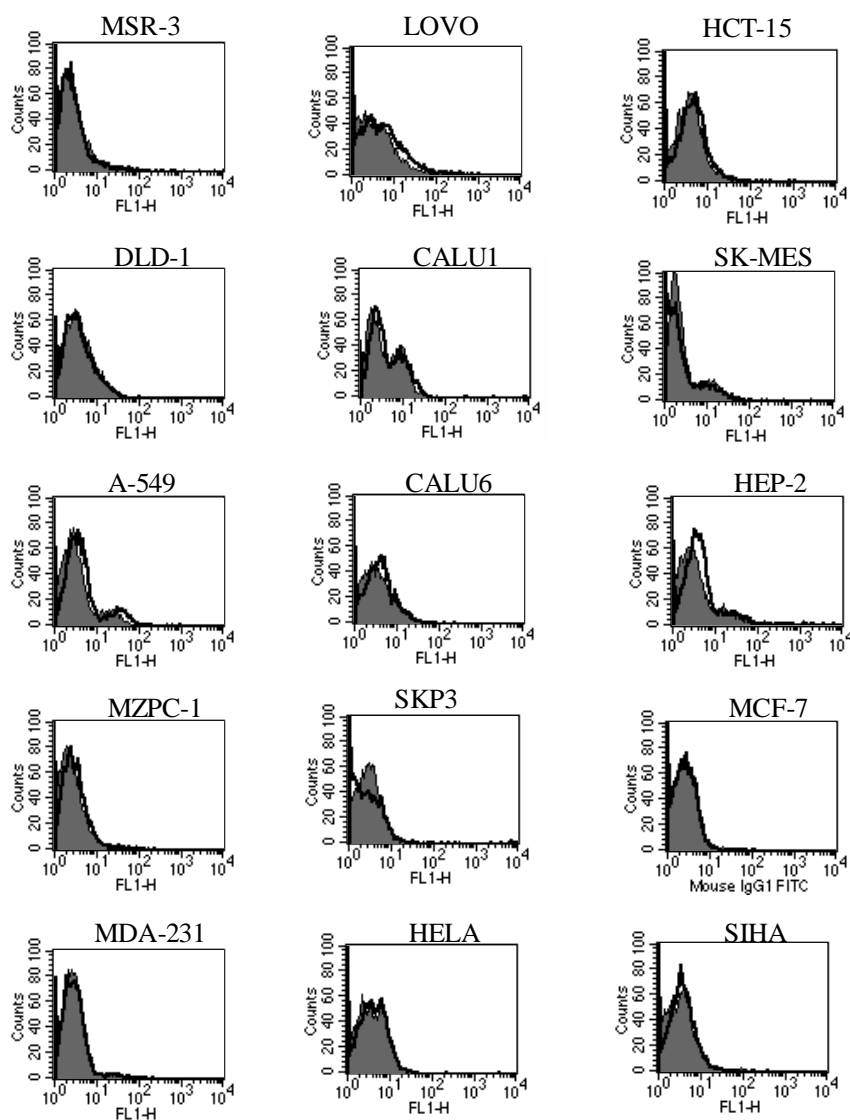


Figura
12



Figuras 12 y 13. Análisis de la expresión de HLA-E en tumores humanos. Los histogramas son el resultado del estudio llevado a cabo por citometría de flujo. El área sombreada representa el control negativo mientras que la línea gruesa representa la expresión en superficie de HLA-E obtenida con el anticuerpo monoclonal 3D12.

1.2.- Expresión génica de HLA-E en líneas tumorales

La causa de no haber sido encontrada proteína HLA-E en la superficie de las células tumorales de la mayoría de las líneas celulares estudiadas, podía ser debida tanto a una baja transcripción génica como a factores post-transcripcionales.

Se quiso por tanto investigar si la ausencia de expresión en superficie de esta molécula se debía a una expresión selectiva a nivel de RNA en las líneas hematopoyéticas y en melanomas. Para resolver esta cuestión se realizó un análisis transcripcional de HLA-E mediante RT-PCR (figura 14), usando para ello, cebadores locus específicos, E5'UT y E3'UT (página 69).

El cDNA fue sintetizado a partir de una concentración de 2 μ g de RNA total de cada línea celular, utilizando para ello la enzima retrotranscriptasa inversa. Como parámetro de control de la integridad del RNA fue utilizado en cada ensayo el gen de la β -actina (figura 14). Como control positivo de la expresión génica de HLA-E, fue utilizado en cada análisis, el cDNA de la línea celular U937, ya que esta línea era la que poseía, de todas las líneas estudiadas, una mayor expresión en superficie de la molécula HLA-E. Es sabido que el tamaño del transcrito de la molécula HLA-E, amplificado con estos cebadores, era de 1200 pares de bases (bp).

Nuestros resultados revelaron que este gen se transcribía en todas las células tumorales analizadas, así que por sí misma, la transcripción no parecía justificar la ausencia de expresión en superficie de esta molécula, por tanto se piensa que deben existir otros mecanismos de control a nivel post-transcripcional.

No obstante, esta aproximación metodológica no es cuantitativa y de hecho, como puede observarse en la figura 14, la cantidad del transcrito varía entre las diferentes líneas celulares. A la vista de estos resultados, se decidió estudiar la expresión cuantitativa de HLA-E relativa a la expresión de varios genes: Cadena pesada de genes HLA-ABC (empleando oligonucleótidos consenso para los tres genes HLA-A,-B y C), β 2-m y GPDH.

El estudio fue llevado a cabo seleccionando un total de 15 líneas celulares de diferente estirpe histológica, en las que se había estudiado previamente la expresión génica y en superficie de HLA-E. Los estudios cuantitativos fueron realizados mediante PCR a tiempo real en un termociclador Light Cycler (Roche Diagnostics).

Para establecer estos cálculos, los datos fueron previamente expresados como número de copias por microlitro (copias/ μ l), a partir de curvas normalizadas realizadas con un plásmido que contiene las secuencias a amplificar de cada uno de los genes a diferentes concentraciones. Posteriormente, como se ha citado antes, los datos fueron relativizados a la expresión del gen GPDH, es decir, que representarían las veces que un gen determinado es más o menos expresado que el gen de referencia, siendo los datos obtenidos recogidos en la tabla 6 y en representados en la figura 15.

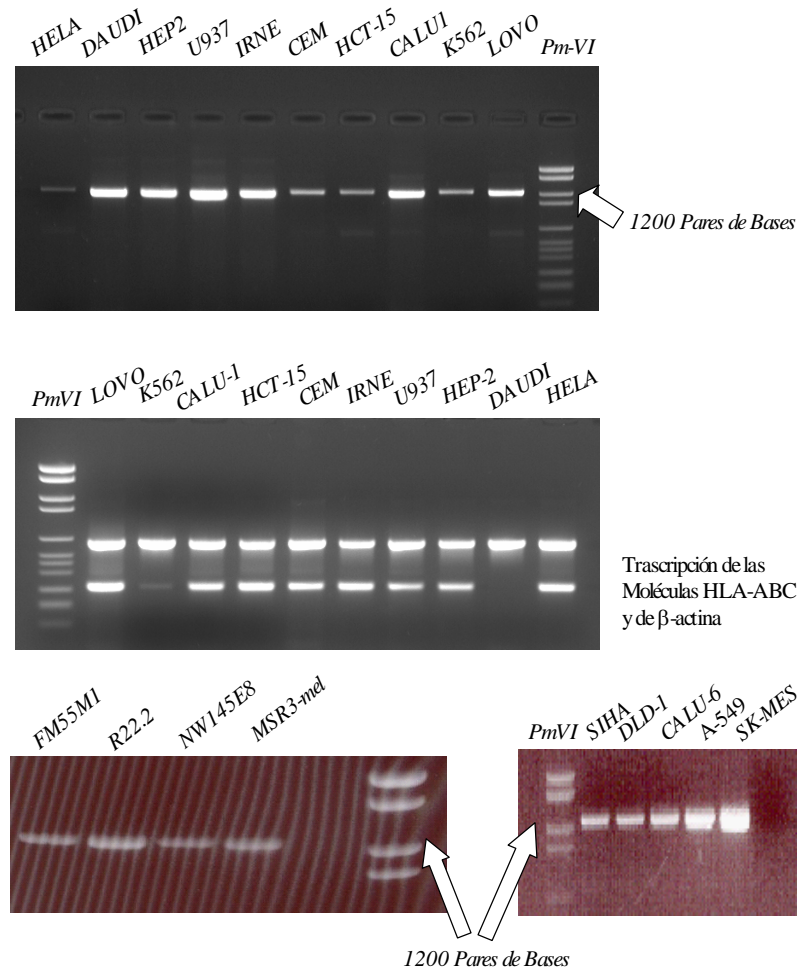


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa de la amplificación de la molécula HLA-E en líneas de diferente estirpe histológica. En la figura se recogen fotos de diferentes geles de agarosa, usados para verificar la presencia de transcrito de HLA-E, este mide 1200bp. Como se puede observar se encuentra RNAm de esta molécula no clásica en todas las líneas celulares

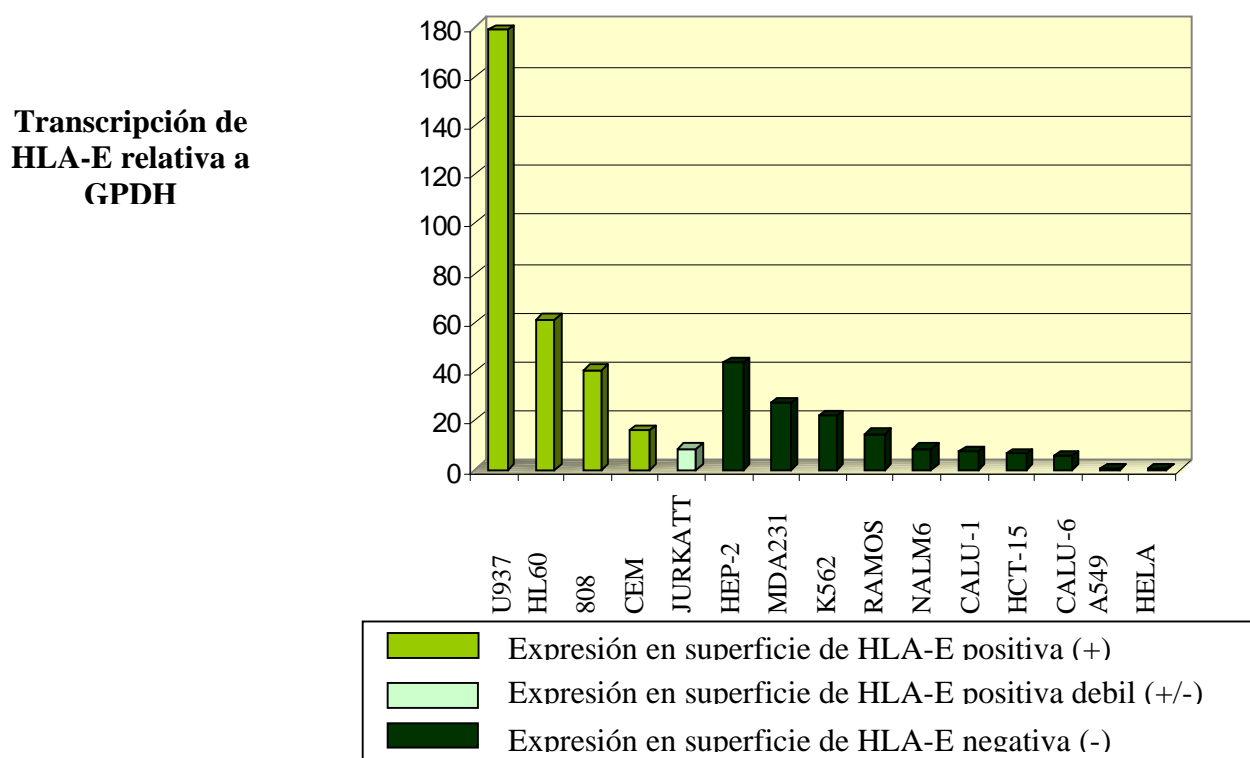
Tabla 6. Datos obtenidos de la transcripción de HLA-E, HLA-ABC y β 2-m en las líneas celulares tumorales en relación al gen de la GPDH, mediante PCR-cuantitativa a tiempo real.

Líneas Celulares	Transcripción de HLA-E*	Transcripción de HLA-ABC*	Transcripción de β 2-m*	Ratio HLA-ABC/ β 2-m
U937	178.85	1461.54	519.23	2.81
HL60	61.11	1555.56	261.11	5.96
CEM	15.66	385.54	107.23	3.60
NALM-6	8.60	604.65	86.05	7.03
K562	21.79	61.54	80.77	0.76
JURKATT	8.42	131.58	57.89	2.27
RAMOS	14.44	1301.59	269.84	4.82
CALU-1	7.39	246.38	52.17	4.72
A549	0.20	2.60	1.00	2.60
HCT-15	6.20	315.01	12.50	25.20
CALU-6	5.58	58.14	79.07	0.74
HEP-2	43.33	3833.33	516.67	7.42
MDA231	27.31	647.01	64.70	10.0
HELA	0.19	25.35	8.12	3.12
808	40.45	10.68	86.36	0.12

* La transcripción de estas moléculas está corregida por la del gen de la GPDH.

*Los resultados cuantitativos del Sistema Tumoral FM55M1/R22.2 serán descritos en el Apartado 1.3. de Resultados (Fig.20 y 21).

Figura 15. Relación entre la cuantificación de la transcripción de HLA-E, mediante PCR-cuantitativa, y su expresión en la superficie de las distintas líneas celulares.



Se puede observar en la tabla 6, la desigualdad en la expresión de los distintos genes en las líneas celulares utilizadas. El primer dato de interés es que HLA-E se expresa en una menor cantidad que los genes de clase I clásicos, HLA-ABC. De hecho, es expresado con una frecuencia del orden de 10 a 100 veces menos que los genes de HLA clásicos (más de tres veces que sería lo esperable de considerar que con los cebadores usados para HLA-ABC, ya que estamos midiendo la expresión de seis genes, correspondientes a los tres locis HLA-ABC).

Resaltar que las líneas en las que se ha encontrado una mayor transcripción del gen HLA-E son precisamente *U937* y *HL60*, que eran de todas las líneas analizadas las que expresaban HLA-E en superficie con más intensidad. A pesar de esto, cabe señalar que el nivel de expresión de mRNA no parece ser suficiente para explicar la expresión en superficie de HLA-E, ya que las líneas *CEM* y *JURKATT*, por ejemplo, las cuales poseían expresión en superficie de esta molécula, transcriben menos que otras que no expresaban como *K562*, *HEP-2* y *MDA231* (tabla 6, figura 15).

También puede observarse en la tabla 6 que el gen de la $\beta 2$ -m, requerido para la expresión en superficie tanto de las moléculas HLA clásicas como de HLA-E, tiene una expresión intermedia, y salvo

excepciones, ésta fue siempre inferior a la expresión HLA-ABC, y en general, en un orden superior a la expresión de HLA-E.

Se ha encontrado una relación estadísticamente significativa entre la transcripción de HLA-ABC y de β 2-m, lo que puede estar relacionado con el hecho de que son genes que se encuentran corregulados por factores comunes ($R=0.851$, $p=0.001$) (figura 16).

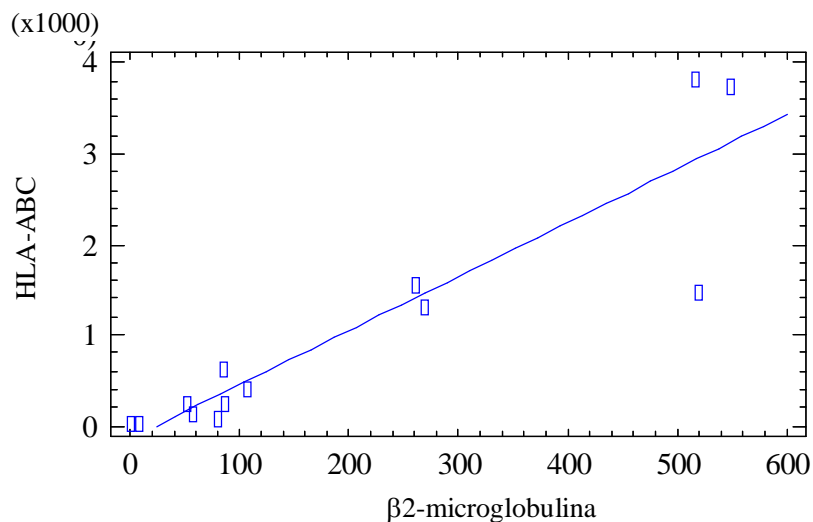


Figura 16. Relación entre la transcripción de HLA-ABC y β 2-m.

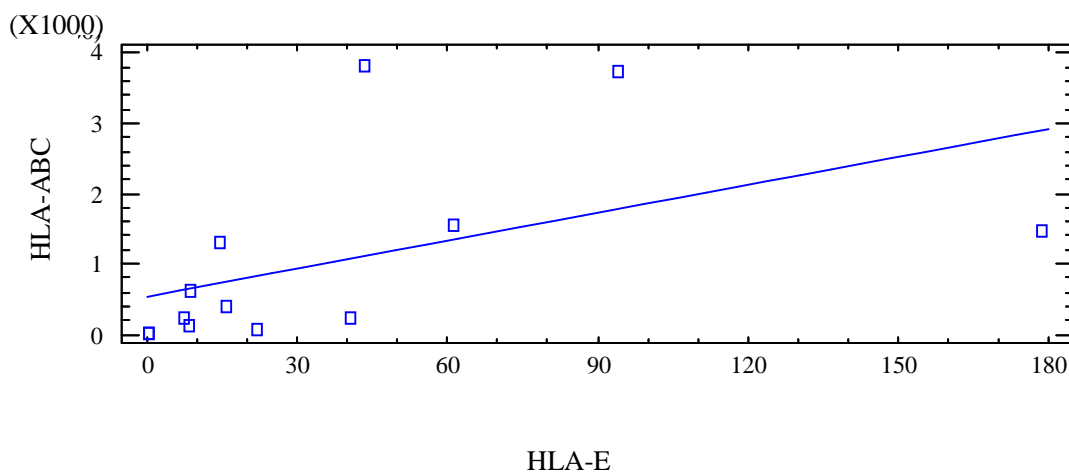


Figura 17. Relación entre la transcripción de HLA-ABC y HLA-E.

Por el contrario, no se ha encontrado relación estadísticamente significativa entre la HLA-ABC y de HLA-E ($R=0.503$, $p=0.047$). Para los cálculos se ha empleado el test de ANOVA (SPSS) (figura 17).

Después de analizar estos resultados, se desprende, por una parte, que la transcripción de HLA-E es débil comparada con la de los genes HLA-ABC, y por otra, que hace falta un nivel mínimo de transcripción para que sea detectable la proteína en la superficie mediante citometría.

La aparición de expresión de HLA-E en líneas con alteraciones en la expresión HLA (*808*, *FM55M1/R22.2*) junto con el hecho de que el nivel de transcripción por sí mismo no parece poder justificar la presencia o ausencia de HLA-E en superficie, hizo que se investigase si la disponibilidad de la $\beta 2$ -m podría ser un factor limitante en la expresión de esta molécula HLA-E en superficie.

Nuestra hipótesis establece que dada la menor transcripción de $\beta 2$ -m en relación a HLA-ABC, toda la $\beta 2$ -m que se produce se encontraría formando complejos con las cadenas pesadas de las moléculas clásicas. Además, dado que había sido demostrada una menor afinidad de HLA-E por la $\beta 2$ -m, cabe pensar que sólo cuando baja el nivel de expresión de cadena pesada HLA-ABC sería posible detectar HLA-E en superficie. Una segunda hipótesis, de nuestro estudio, sería que las diferencias observadas pudieran deberse a que las formas alélicas de HLA-E alcanzasen de forma desigual la superficie celular.

1. 3.- Expresión de HLA-E en líneas con alteración en HLA-ABC/ $\beta 2$ -m

Para probar la primera de las hipótesis establecidas en el apartado anterior, se analiza la expresión de HLA-E en líneas celulares con defectos conocidos en la expresión de las moléculas clásicas. Dentro de este grupo particular de líneas se estudiaron líneas que expresan un solo alelo, como la línea celular de melanoma *R22.2* (Real y col., 1998) y la línea de carcinoma de cervix *808* (Brady y col., 2000), y otra que posee una pérdida de haplotipo, la línea de melanoma *NW145C5* (Méndez y col., 2001).

Como se ha comentado con anterioridad, línea celular *808* expresa un solo alelo de HLA-ABC, el HLA-A24. Este mismo fenotipo es el expresado por *R22.2*, pero en este caso el alelo presente es el HLA-A1. *R22.2* es una línea de melanoma derivada del mismo paciente que la línea *FM55M1* (Real y col., 1998). *R22.2* es obtenida como por inmunoselección “in vitro” usando un clon de linfocitos T citotóxicos (CTLs) restrictivo para HLA-A2.

Por otra parte, el sistema tumoral *NW145* (melanomas) está formado por la línea *NW145E8* la cual presenta una expresión normal de moléculas HLA-ABC y *NW145C5* que presentaba una pérdida de haplotipo.

Tanto en la figura 12 como en la tabla 5, se puede observar la expresión de HLA-E en estas líneas con diferentes fenotipos de alteración de HLA-Ia. Las dos líneas que presentan un solo alelo HLA-ABC (*R22.2* y *808*) poseen expresión de HLA-E en superficie.

Como se puede observar en la figura 18, existen diferencias en cuanto a la expresión en superficie tanto de HLA-E como de las moléculas HLA clásicas entre *FM55M1* y *R22.2*, encontrando una mayor cantidad de HLA-ABC en *FM55M1* y de HLA-E en *R22.2*.

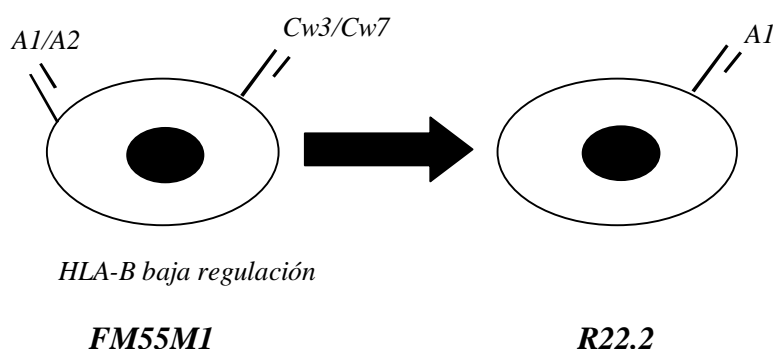
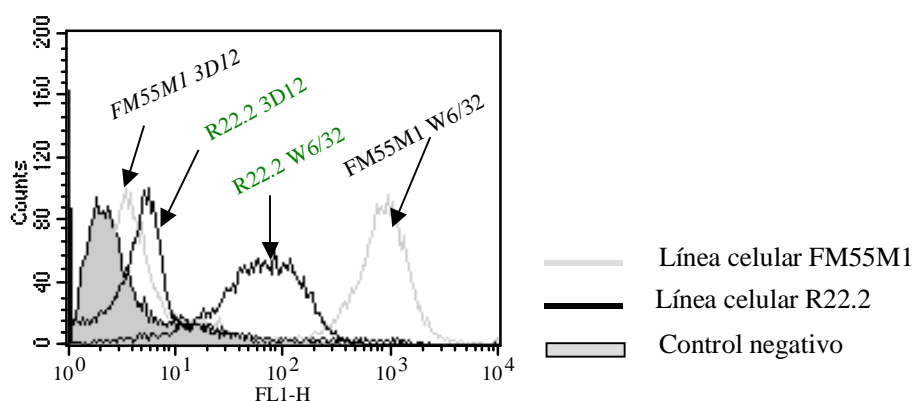


Figura 18. Estudio comparativo de la expresión de HLA-E en las líneas celulares del Sistema Tumoral FM55/R22.2. La expresión en superficie de moléculas clásicas, determinada mediante el uso del anticuerpo monoclonal W6/32, es mayor en *FM55M1* que en *R22.2*. Este hallazgo es compatible con la existencia de expresión de solo un alelo en *R22.2* con respecto a *FM55M1*, la cual expresa todos los alelos salvo una disminución en la expresión de HLA-B. Por el contrario se negativa en *NW145E8* (Méndez y col., 2001) (tabla 5; figura 12).

Además de las líneas pertenecientes a estos sistemas tumorales, hemos estudiado otras con alteraciones en la expresión de moléculas HLA que presentan defectos en la regulación de la expresión génica. Entre ellas se encuentra *A549*, la cual presenta una expresión muy baja tanto de HLA-ABC, HLA-E, como de β 2-m, esta situación explica por sí misma la ausencia de expresión en superficie de HLA-E (tabla 6). Además están aquellas líneas con defectos estructurales de β 2-m, las cuales carecen tanto de expresión de las moléculas clásicas como de HLA-E (*IRNE*, *DAUDI*, *LOVO*), éstas fueron descartadas para realizar los estudios cuantitativos (tabla 5).

Por otra parte, *K562* y *MSR3-mel* presentan también un notable desequilibrio en la expresión de HLA-ABC y β 2-m. Como se observa en la figura 19, la línea celular *K562* presenta una alteración en la transcripción de las moléculas clásicas y por tanto en la expresión de las mismas. Además la transcripción de HLA-E es muy baja siendo ambos factores posiblemente la causa de la falta de expresión de esta molécula. Por otro lado, el desequilibrio encontrado en *MSR3-mel* es mayor y a penas se detecta la expresión de HLA-ABC a nivel de RNAm y a pesar de que posee una mayor transcripción de HLA-E, ésta no se detecta en superficie posiblemente debido a la ausencia de un pool de péptidos adecuados derivados de HLA-ABC (figura 19). En cambio, la línea de cervix *808* posee por una parte expresión de β 2-m y por otra unos niveles apreciables de cadena pesada, como consecuencia de esto se expresa HLA-E en superficie (figura 19). Este estudio fue realizado en un termociclador a tiempo real y parando la amplificación antes de llegar al plateau de fluorescencia.

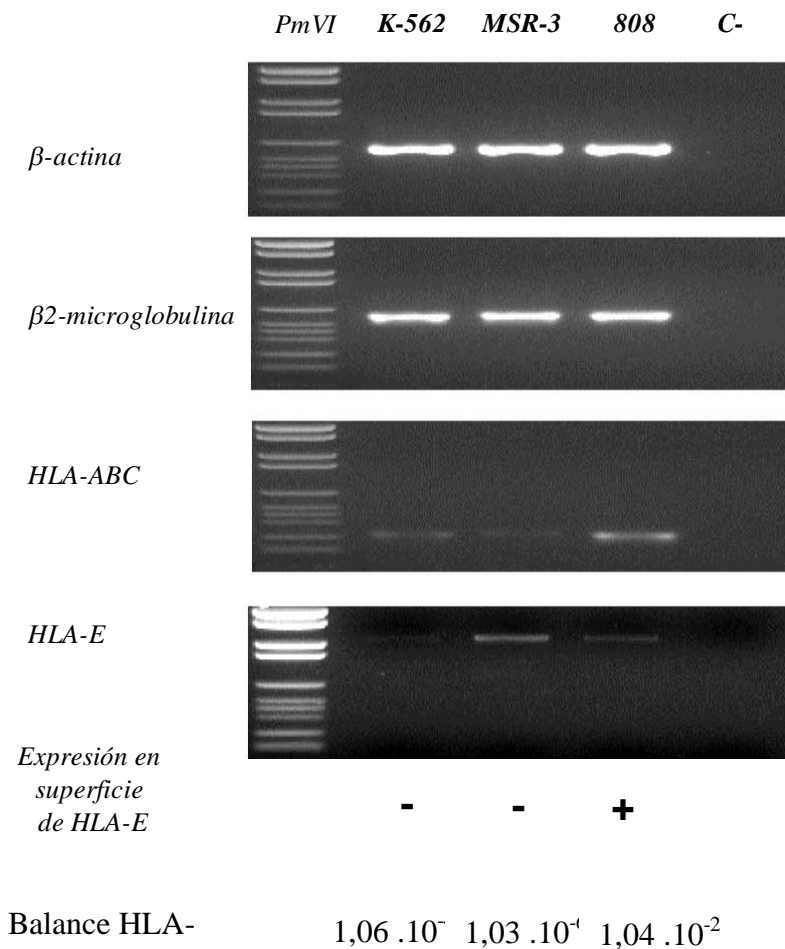


Figura 19. Estudio de la relación entre β2-microglobulina y HLA-ABC en las líneas tumorales K-562, MSR-3 Y 808. En la figura se recogen los resultados de los productos de la PCR cuantitativa de β-actina, β2-microglobulina, HLA-ABC y HLA-E de las líneas K562, MSR3-mel y 808. Los resultados fueron calculados como se describe en el apartado correspondiente de Material y Métodos. Los resultados fueron expresados como valor relativo entre la β2-microglobulina y la cadena pesada encontrada.

Por otra parte, se investigó la razón HLA-ABC/β2-m en el sistema tumoral *FM55M1/R22.2* mediante PCR cuantitativa a tiempo real usando curvas de calibración para cada gen amplificado (ver apartado 4.1. de Material y Métodos). Como se observa en la figura 20, la transcripción relativa de HLA-E es ligeramente mayor en la línea *R22.2* que en la línea *FM55M1*, concordando con los resultados obtenidos en el estudio realizado por citometría de flujo en superficie (figura 18), siendo la razón HLA-ABC/β2-m en cambio muy inferior en *R22.2* (figura 21). Estos datos obtenidos confirman

que la línea R22.2 posee una mayor disponibilidad de $\beta 2$ -m, lo que podría favorecer la aparición de una mayor expresión en superficie de HLA-E.

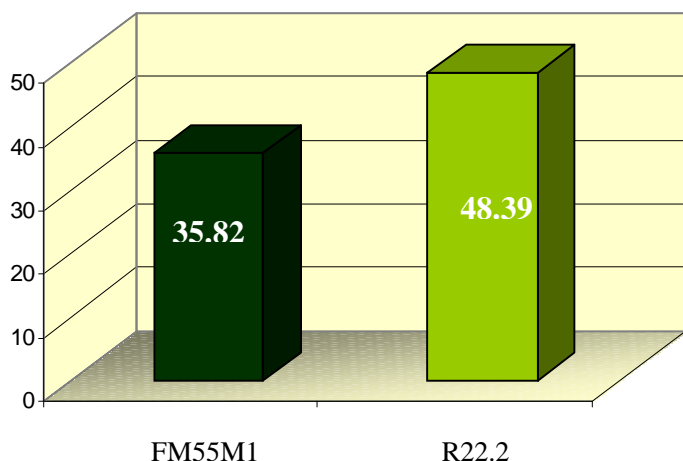


Figura 20. Cuantificación relativa de la transcripción del gen HLA-E en el sistema tumoral FM55/R22.2. Los resultados de la transcripción de HLA-E son obtenidos mediante PCR a tiempo real y corregidos con respecto a la transcripción del gen de la GPDH

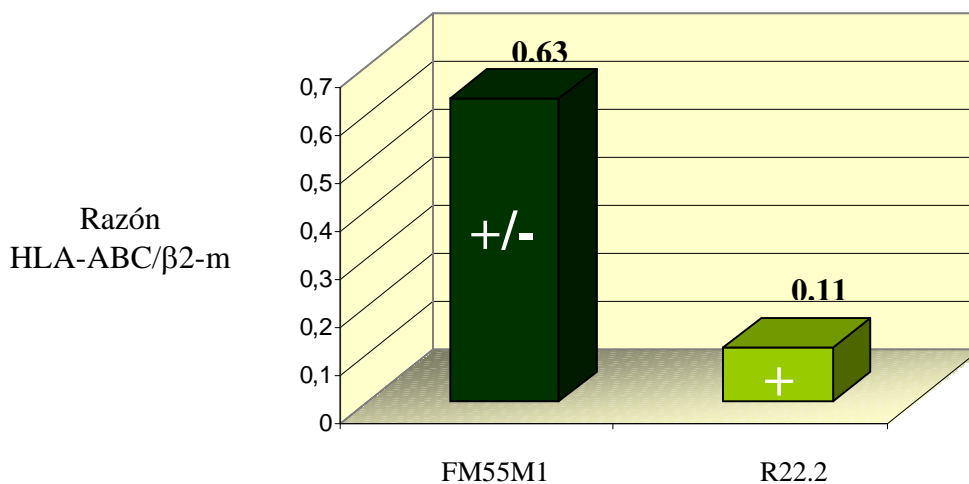


Figura 21. Relación entre la razón HLA-ABC/ $\beta 2$ m y la expresión en superficie de HLA-E en el sistema tumoral FM55/R22.2. La expresión en superficie de HLA-E está representada en términos semicuantitativos como (+/-)· débil o (+)· positiva

Este desequilibrio entre la relación HLA-ABC/ $\beta 2$ -m ocurría, como se ha comentado anteriormente, en la línea 808, la cual también expresaba HLA-E. A partir de una ratio HLA-ABC/ $\beta 2$ -m mayor a 3.6 no se observa HLA-E en superficie a menos que existan niveles de transcripción suficientemente elevados como ocurre en la línea HL60.

En sentido contrario, hay que destacar el caso de dos líneas a pesar de presentar una razón inferior a 3.6 no expresan HLA-E en superficie, una es la *A549* a la que se ha hecho referencia antes y otra la línea *Calu-6*. En esta línea la causa de la no expresión de HLA-E sea probablemente debida a que presenta una baja transcripción del gen. Por último, decir que llama la atención la línea HCT-15 que presenta una razón elevada con una baja transcripción del gen de la $\beta 2$ -m probablemente debida a inestabilidad de los RNAm de $\beta 2$ -m al contener mutaciones sin sentido en ambas copias del gen y al igual que las otras líneas que presentan un fenotipo $\beta 2$ -m negativo la expresión de HLA-E en superficie fue negativa (figura 22).

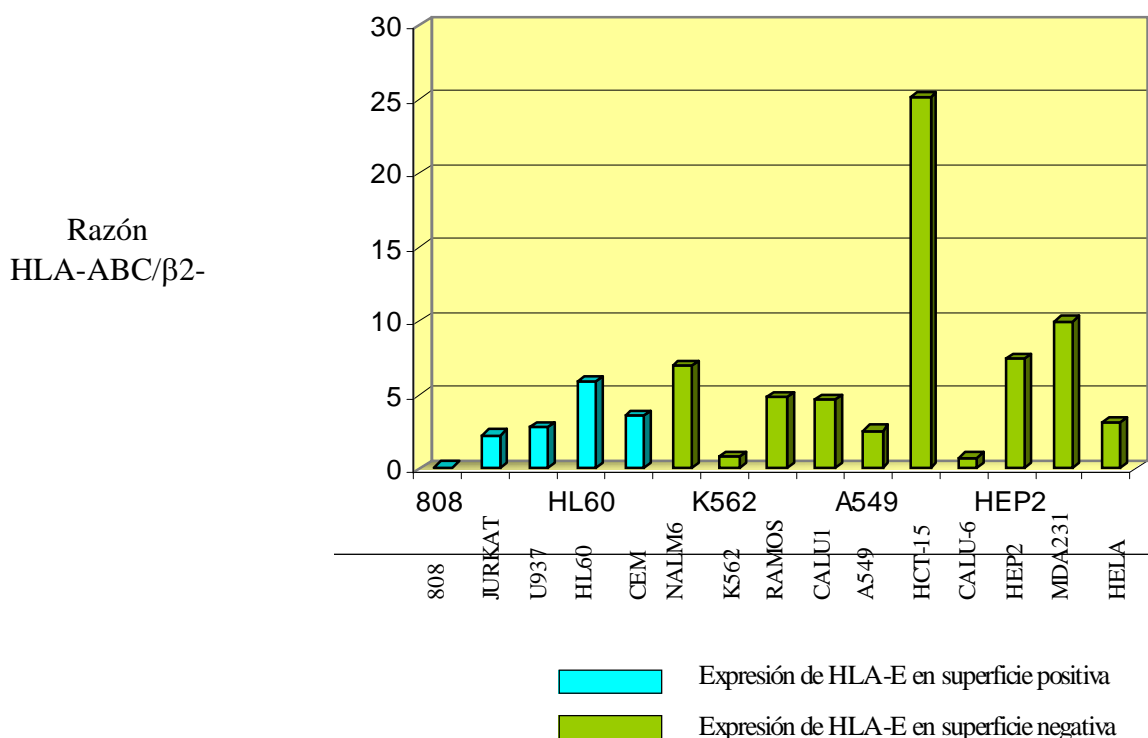


Figura 22. Relación entre la expresión en superficie de HLA-E y la razón HLA-ABC/ $\beta 2$ en líneas celulares de diferente tipo histológico, a partir de los datos obtenidos por PCR cuantitativos,

1.4.- La adición de β 2-m exógena al cultivo incrementa la expresión de HLA-E

Como consecuencia de los resultados obtenidos en el apartado anterior se puede deducir que la β 2-m es preferentemente acoplada con las moléculas HLA-ABC en la mayoría de las líneas celulares, ya que son las moléculas clásicas las que predominan en el citoplasma, impidiendo de forma significativa que HLA-E alcance la superficie celular. De esta manera, la molécula HLA-E no se detectará en superficie a menos que se produzca una reducción significativa en la expresión de las moléculas HLA-ABC o que la transcripción de HLA-E sea elevada.

Por este motivo quisimos evaluar cual sería el efecto de la adición de β 2-m exógena al cultivo celular.

Para llevar a cabo este estudio se emplearon las líneas *U937* y *SiHa*, las cuales presentaban alta y nula expresión de HLA-E respectivamente, siendo cultivadas en presencia de β 2-m humana exógena bien aislada o bien conjuntamente con péptidos derivados de la secuencia líder de las moléculas clásicas.

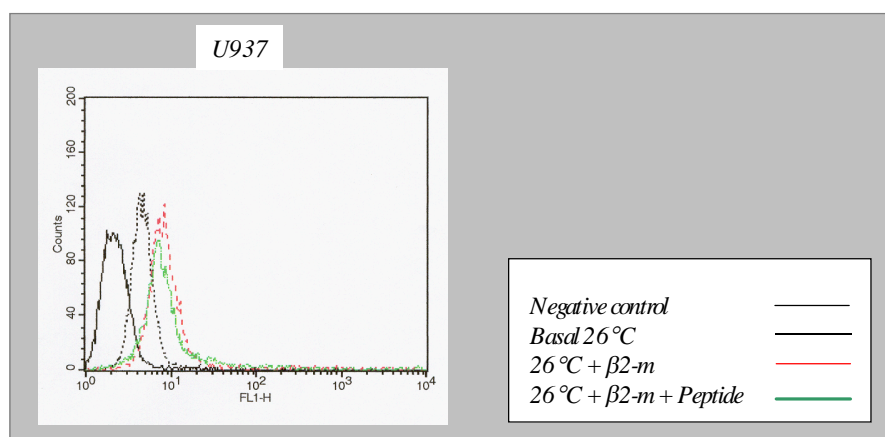


Figura 23. Estabilización de la expresión de la línea celular U937. Los histogramas corresponden a la expresión en superficie de la molécula HLA-E a basal a 26° C y tras la incubación con β 2-m exógena y/o péptido líder de HLA-A2.

La línea *U937* poseía una razón HLA-ABC/ β 2-m inferior a 3.6 (2.81) junto a una alta transcripción de HLA-E y expresaba como se ha visto HLA-E en superficie a 37° C. Esta expresión según se muestra en la figura 23 se incrementa, por estabilización de la molécula, al incubarla a 26° C tanto con β 2-m aislada o añadiendo, junto a ésta, el péptido derivado de HLA-A2. No se encuentran diferencias entre ellas.

En la figura 24 se repite el experimento anterior, en este caso estudiando el efecto sobre la expresión de HLA-E tras la adición de péptidos derivados de la secuencia líder de HLA-G. Como se observa la molécula HLA-E fue estabilizada, aumentando en *U937* y apareciendo expresión en *SiHa*. La adición de HLA-G al cultivo a 26° C de la línea *U937* produjo también un incremento de la expresión en superficie de HLA-E con respecto a la basal a 26° C, de igual forma que al añadir β 2-m a esa misma temperatura. *SiHa*, que en condiciones basales no expresa HLA-E, aumentó su expresión al incubarla a 26° C con β 2-m potenciándose éste efecto en presencia del péptido líder de HLA-G.

Por tanto, a raíz de estos resultados podemos concluir que parece que tanto adición la β 2-m como de péptidos al medio de cultivo celular contribuyen a la estabilización de esta molécula en superficie de la célula.

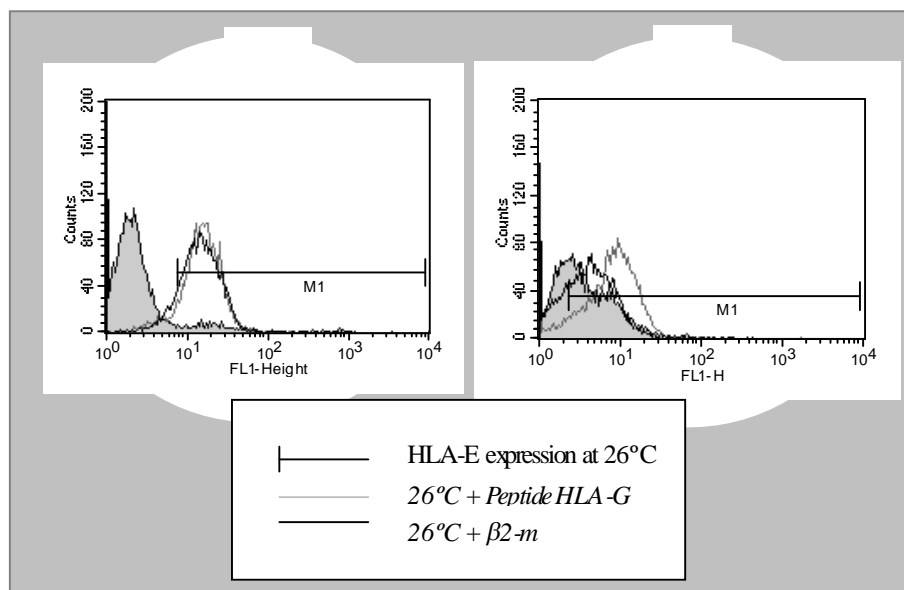



Figura 24. Comparación de la expresión de HLA-E en superficie, basal y tras la incubación con péptidos o β 2-m, en las líneas celulares U937 y SiHa. La zona media del histograma en condiciones basales (26° C) de ambas líneas celulares viene representada por el siguiente símbolo 

1. 6.- Influencia del genotipo de HLA-E en la expresión en superficie.

Como se ha comentado en la Introducción, algunos trabajos habían apuntado que en la expresión de HLA-E también influía el residuo codificado en la posición 107 del gen (Maier y col., 2000). Ulbrecht y col. (1999) habían sugerido que esas variantes alélicas presentaban un diferente transporte intracelular y se expresan de forma desigual en la superficie de la célula. Así que esto hizo que nos planteásemos que, tal vez, la expresión de HLA-E observada en algunas células y que no podía ser justificada ni por una alta transcripción de la misma, ni por una razón HLA-ABC/ β 2-m favorable, como es el caso de *JURKATT* y *CEM*, podía ser explicada por la influencia del genotipo HLA-E expresado. Por tanto, se propuso investigar la influencia de las variantes alélicas HLA-E^G y HLA-E^R descritas, sobre el nivel de expresión alcanzado en la superficie de las células tumorales.

Las dos formas alélicas difieren por un cambio de una guanina por una adenina (G→A), codificando los codones resultantes para el aminoácido glicina (GGG) o arginina (AGG) respectivamente. Los estudios llevados a cabo por Ulbrecht y col (1999) sugieren que la presencia de una glicina (HLA-E^G) favorecería que HLA-E alcanzase la membrana celular y se estabilizase en la superficie de la misma.

El alelo codificado en la posición 107 se estudió mediante la secuenciación del gen en diferentes líneas celulares mediante el método de secuenciación por electroforesis capilar usando didesoxinucleótidos (ddNTP). Las líneas celulares fueron clasificadas en base a los nucleótidos encontrados como homocigotas para ese alelo (HLA-E^{RR} o HLA-E^{GG}), o bien heterocigotas (HLA-E^{R/G}) (figura 25).

Se han estudiado 24 líneas histológicamente distintas, nueve de estas presentan genotipo homocigoto GG, de ellas tres presentan expresión de HLA-E en superficie (*U937*, *JURKAT* y *808*). Otras dos expresan HLA-E (*CEM* y *FM55M1*), dentro del grupo heterocigoto RG formado por nueve líneas. Y por último, seis presentan genotipo RR homocigoto, de las cuales existen dos que expresan en superficie (*HL-60* y *R22.2*). Nuestros resultados se encuentran expuestos en la tabla 7, donde además se recogen los resultados de expresión en superficie de HLA-E en esas líneas.

Por tanto un 33.33% de las que presentan genotipo homocigoto GG expresan HLA-E en superficie frente a un 26.66% del resto de los genotipos. De estos resultados se desprende que el

genotipo (RR, RG, GG) no explica por sí sólo la ausencia o presencia en superficie de HLA-E en líneas tumorales humanas.

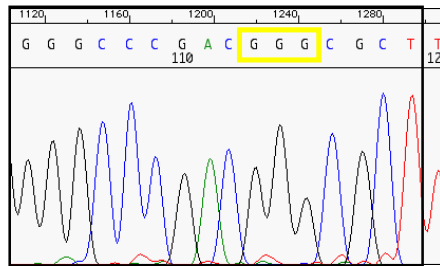


Figura 25a. Línea U937 homocigota para glicina.

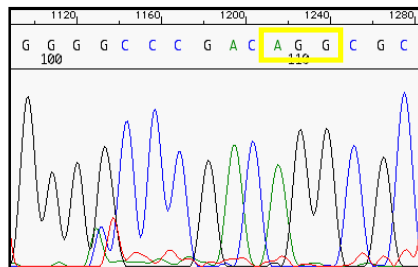


Figura 25b. Línea CALU6 homocigota para arginina.

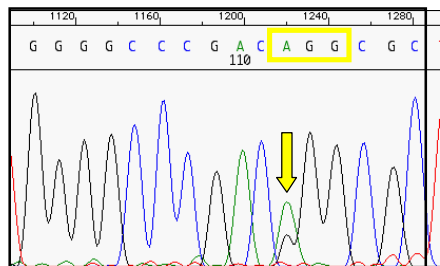


Figura 25c. Línea CALU-1 heterocigota.

Figura 25. Secuenciación del gen HLA-E. El recuadro amarillo resalta el codón que codifica para el aminoácido 107 de la proteína HLA-E. El triplete puede codificar para una glicina (GGG) (figura 25a) o para una arginina (AGG) (figura 25b). En caso de ser la línea celular heterocigoto, aparecerían dos picos en el lugar de la primera base del codón, uno correspondiente a la guanina y otro a la adenina (figura 25c).

<i>Líneas celulares</i>	Genotipo	Expresión en superficie de HLA-E
	HLA-E ^{RR/ GG/ RG}	
DAUDI	GG	-
RAJI	RG	-
U937	GG	+
NALM-6	RG	-
K-562	GG	-
JURKATT	GG	+/-
HL-60	RR	+
CEM	RG	+
IRNE	RR	-
FM55M1	RG	+/-
R22.2	RR	+
MSR3-mel	RG	-
NW145E8	RG	-
IMIM-PC2	RR	+/-
LOVO	RR	-
CALU-1	RG	-
A-549	RG	-
CALU-6	RR	-
HEP-2	GG	-
MDA-231	RG	-
HELA	GG	-
808	GG	+
SiHa	GG	-
PC-3	RR	-
AGS	GG	-

Tabla 7. Relación entre el genotipo de HLA-E, obtenido mediante secuenciación del gen, en y la expresión de esta molécula en superficie líneas celulares de diferente estirpe.

De hecho, en la línea HLA-E positiva, R22.2, el haplotipo retenido de HLA-E es el que contiene en la posición 107 una arginina

Sin embargo, el genotipo sí puede afectar los cambios observados tras la adición de β 2-m exógena in vitro. Así se puede observar en la tabla 8 los resultados obtenidos tras incubar ocho líneas celulares de diferente genotipo con β 2-m, de las cuales cinco presentaban un genotipo homocigoto para glicina (HLA-E^{GG}), con desigual expresión de HLA-E en superficie en condiciones basales, y otras tres eran homocigotas HLA-E^{RR} o heterocigotas HLA-E^{RG}.

Tabla 8. Expresión de HLA-E en superficie tras la adición de β 2-m humana al medio de cultivo al cultivo celular, en función del genotipo.

<i>Líneas Homocigotas HLA-E^{GG}</i>		<i>Líneas Homocigotas HLA-E^{RR} y heterocigotas HLA-E^{RG}</i>	
Líneas celulares	Incremento de la expresión en superficie de HLA-E después de β 2-m exógena	Líneas celulares	Incremento de la expresión en superficie de HLA-E después de β 2-m exógena
U937	+	HL-60	-
HEP-2	+	IRNE+ β 2-m	-
HELA	-	MSR3-mel	-
SiHa	+		
A549	-		

En tres de las homocigotas HLA-E^{GG} se logró incrementar la expresión en superficie después de la adición de β 2m y estabilización a 26° C (tabla 8). Las dos que no lo hicieron, A549 y HELA, partían de unos niveles de expresión a nivel de RNAm HLA-E muy reducidos (tabla 6). Por el contrario, no se logró inducir la expresión en la superficie después de la adición y estabilización con β 2m en ninguna de las líneas HLA-E^{RR} ni HLA-E^{RG} analizadas, a pesar, que en algunos casos se partía de una expresión de RNAm alta (HL60). En el caso de MSR3-mel posiblemente la ausencia de péptidos derivados de las moléculas de clase I sea la responsable de la no estabilización en superficie.

Tanto en la tabla 8 como en la figuras 23 y 24, se observa que el incremento en la expresión en superficie de HLA-E en las líneas estudiadas fue diferente según el alelo codificado en la posición 107. La expresión de esta molécula en superficie sólo fue aumentada en tres de las cuatro líneas (75%) que eran homocigotas para glicina en la posición 107 (HLA-E^{GG}): *U937*, *HEP-2*, *SiHa*. Las líneas heterocigotas (HLA-E^{RG}) y las homocigotas HLA-E^{RR} ni expresan, ni aumentan la expresión tras añadir β 2-m humana.

2.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA RELACIONADA CON HLA-ABC MICA EN TUMORES HUMANOS

2. 1.- Expresión de MICA en líneas celulares tumorales

Como se ha hecho referencia con anterioridad, la molécula MICA aumenta en situaciones relacionadas con el estrés celular y se ha pensado en ellas como un sistema de alerta de la célula al sistema inmune a través de su unión con los receptores de NKG2D de la célula NK (Pende y col., 2002). En condiciones normales sólo se expresa en tejido intestinal probablemente por la estimulación inducida por la flora bacteriana. Sin embargo, ha sido observada su expresión en tumores de origen epitelial (Seliger y col., 2003). Como quiera que la actividad NK va a depender del balance final de señales inhibitoras (HLA-ABC, HLA-E, HLA-G) y activadoras (MICA y MICB), quisimos estudiar, la expresión estos antígenos en las líneas tumorales que ya había sido caracterizadas para HLA-ABC y HLA-E.

Este estudio se analizaron veinte líneas celulares de diferente origen histológico mediante citometría de flujo y usando para ello un anticuerpo monoclonal dirigido contra esta molécula MICA denominado SR99. En la figura 26 y en la tabla 9 se resumen los resultados obtenidos.

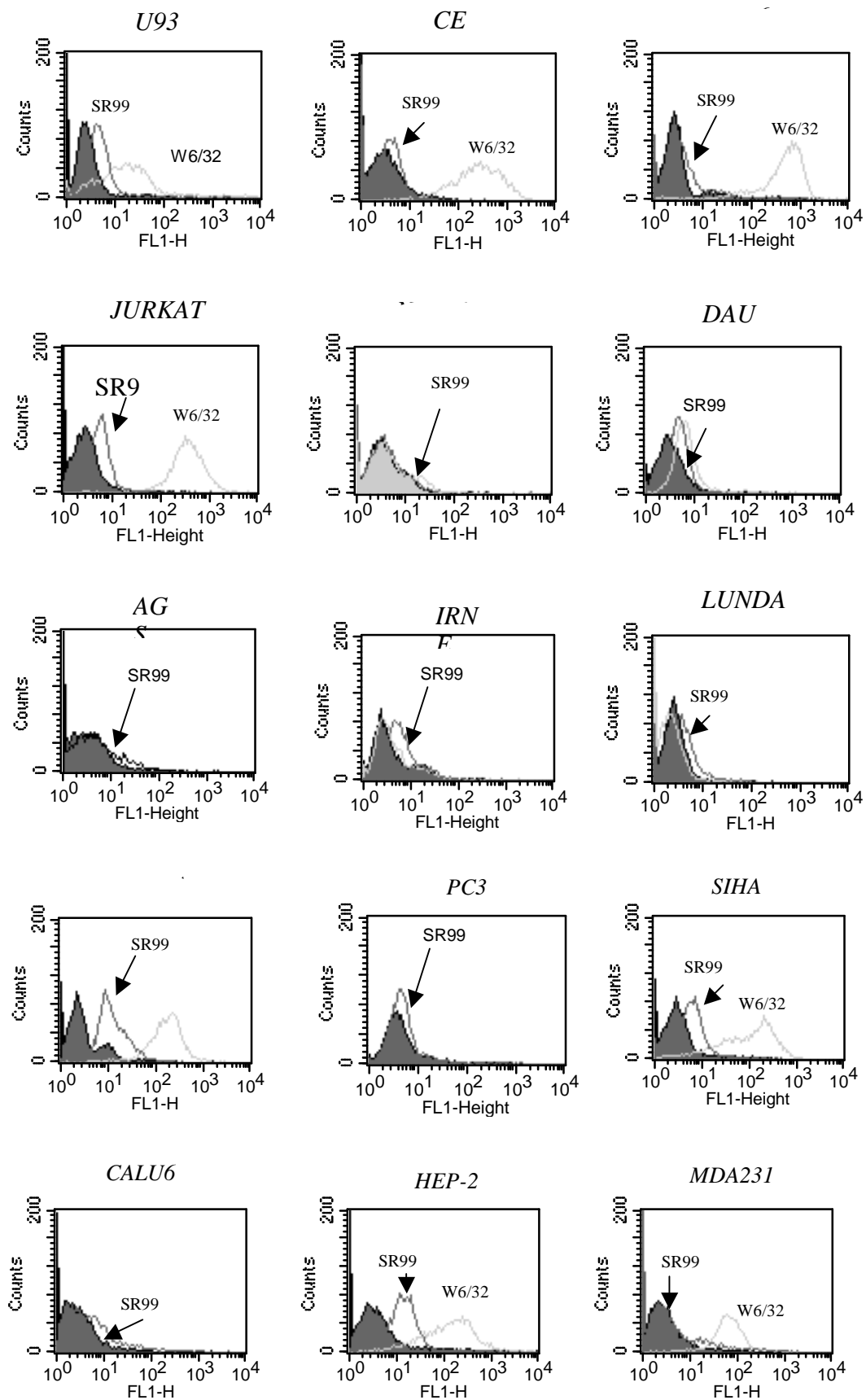


Figura 26. Estudio de la expresión de la molécula MICA. Realizado mediante citometría de flujo usando el anticuerpo monoclonal SR99 dirigido contra MICA. El área sombreada representa el control negativo. SR99: anticuerpo monoclonal anti-MICA. W6/32: anticuerpo monomórfico contra HLA-

Tabla 9. Análisis de la expresión de MICA en líneas de diferente estirpe histológica

Líneas Celulares	Origen histológico	HLA-ABC	MICA
HL60	Leucemia promielocítica	++	-
U937	Linfoma histiocítico	++	+
CEM	LLA	++	-
K562	Leucemia Eritromieloide	-	++
RAJI	Linfoma Burkitt	++	+/-
RAMOS	Linfoma Burkitt	++	+/-
DAUDI	Linfoma Burkitt	-	+/-
LUNDAC	Linfoma Burkitt	-	+/-
JURKAT	Linfoma T	++	+
MDA231	Ca. de mama	++	-
HELA	Ca. de cervix	++	++
SiHa	Ca. de cervix	++	+
808	Ca. de cervix	++	+/-
PC3	Ca. de próstata	++	-
IMIMPC-2	Ca. de próstata	+	++
DLD-1	Ca. de colon	-	-
HCT15	Ca. de colon	-	-
LOVO	Ca. de colon	-	-
AGS	Ca. gástrico	-	-
CALU-6	Ca. de cabeza y cuello	++	-
HEP-2	Ca. de laringe	++	+
IRNE	Melanoma	-	+/-
MSR3-mel	Melanoma	-	+
FM55M1	Melanoma	+	++
R22.2	Melanoma	+	+/-

De los resultados obtenidos destaca que las líneas de colon y gástricas, las cuales carecían de expresión en superficie de moléculas clásicas HLA-ABC, no expresaban tampoco el antígeno MICA

(tabla 9, figura 26). Esto hecho no fue observado en las líneas de otra estirpe histológica HLA-ABC negativas (K562, IRNE, MSR-3, Daudi y Lundac) las cuales expresan MICA en superficie (figura 27).

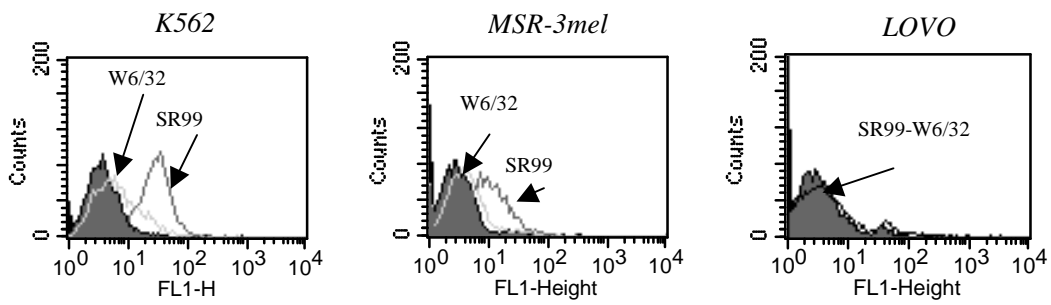


Figura 27. Expresión de MICA en líneas HLA-Ia negativas. El área sombreada representa

Por otra parte en los sistemas tumorales FM55M1/R22.2 y NW145E8/NW145C5 se pudo observar una menor expresión de MICA en las líneas con pérdida de haplotipo (R22.2 y NW145C5), contrariamente a lo que sucedía con HLA-E (figura 28).

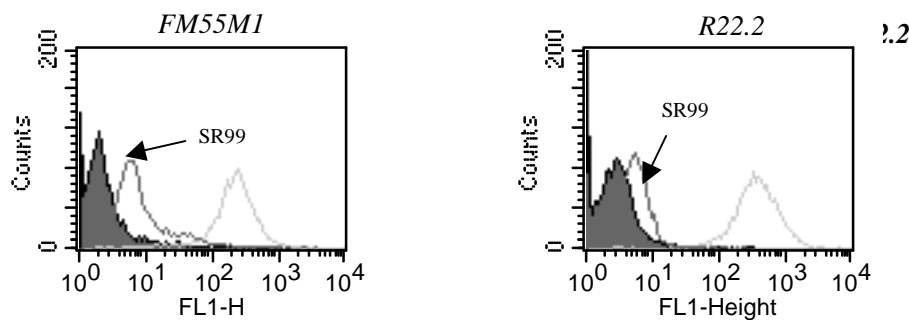


Figura 28. Expresión de MICA en la línea celular de melanoma R22.2 con LOH derivada de línea FM55M1 con expresión HLA-ABC normal.

2. 2.- Relación de la expresión de entre MICA y HLA-E.

Si células con alteraciones en la expresión de antígenos HLA-ABC son susceptibles de sensibilizar células NK, un mecanismo de escape podría suponer o bien la expresión de moléculas inhibitoras del tipo HLA-E o bien la inhibición de MICA. Por este motivo quisimos comprobar si la expresión de ambas moléculas podría guardar alguna relación.

En el grupo de líneas incluidas en este estudio, no fue observada ninguna relación estadísticamente significativa entre la expresión o no expresión de MICA en las líneas tumorales con la expresión de HLA-E, empleando para ello el coeficiente de Correlación de Spearman ($R=0.057$; $p=0.821$) (tabla 10).

No obstante, en las líneas de colon MICA negativas, las cuales no expresaban tampoco HLA-E en superficie al tratarse de líneas con defectos en la producción de $\beta 2m$, sólo en estas líneas, caracterizadas por tener un fenotipo mutador, se puede afirmar que han desaparecido las señales de alerta para un posible reconocimiento inmunológico tanto por células NK como por células T.

Línea Celular	HLA-E	MICA
U937	+	+
K-562	-	++
NALM6	-	-
RAJI	-	+/-
RAMOS	-	+/-
JURKATT	+/-	+
HL-60	+	-
CEM	+	-
IRNE	-	+/-
FM55M1	+/-	+
R22.2	+	+/-
MSR-3	-	+
NW145E8	-	+/-
NW145C5	+/--	-
LOVO	-	-
HCT-15	-	-
DLD-1	-	-
AGS	-	-
IMIMPC2	-	++
CALU-6	-	-
HEP-2	-	+
MDA-231	-	-
HELA	-	++
808	+	+/-
SIHA	-	+
PC-3	-	-

Tabla 10. Descripción comparativa de la expresión de las moléculas HLA-E y MICA.

V.- DISCUSIÓN

La participación del sistema inmune en el control y progresión de los tumores se postuló por primera vez hace más de cien años. Sin embargo esta función del sistema inmune no ha dejado de ser debatida e incluso cuestionada por la dificultad de demostrar las bases moleculares y celulares de la inmunidad antitumoral.

En los últimos años, sin embargo se han acumulado una serie de evidencias que claramente demuestran que el sistema inmune no sólo protege al huésped del desarrollo de tumores, sino que también contribuye a la selección de clonas celulares de baja inmunogenicidad que promueven finalmente la progresión tumoral. Este efecto dual, aparentemente contradictorio, se resume en la hipótesis establecida recientemente por Dunn y cols. (2002) conocida como “Inmunoedición”. Es decir, cómo el sistema inmune es capaz de esculpir y editar el fenotipo de los tumores a través de tres fases: eliminación, equilibrio y escape.

Se ha comprobado que en ausencia de un sistema inmune intacto, los tumores experimentales inducidos en animales de experimentación son más inmunogénicos que los que se observan en huéspedes inmunocompetentes, ya que en estos individuos, se seleccionarían variantes de inmunogenicidad reducida o que hayan adquirido mecanismos de supresión de los efectores inmunológicos (Svane y cols., 1996; Engel y cols., 1997).

Se asume, a través de evidencias indirectas, que esto mismo podría ocurrir en tumores humanos. Ya que por una parte, los pacientes inmunodeprimidos presentan una mayor incidencia de tumores relacionados con virus; además se ha observado que los pacientes con cánceres pueden desarrollar respuestas inmune tanto innatas y como adaptativas; por último, la existencia de un infiltrado inflamatorio en la mayoría de los tumores que suele ser un indicador de mejor pronóstico y de supervivencia (Algarra y cols., 2004).

Recientemente, se ha propuesto que la interacción huésped-tumor pasa estas tres fases antes citadas (eliminación, equilibrio y escape) que ocasionan, incluso después de décadas, la aparición de variantes que crecerían incluso en un ambiente inmunológico aparentemente intacto. Para conseguir esto, los tumores parecen desarrollar múltiples estrategias para evadir al sistema inmune.

Parece lógico pensar que a medida que el tumor está progresando algunas señales de alarma, probablemente debidas a la isquemia o al estrés oxidativo, se tengan que producir. Es en esta fase, donde probablemente se desencadena algún tipo de respuesta inmune que produciría un fenómeno de selección de clonas con múltiples alteraciones y baja inmunogenicidad. Las células tumorales en un

microambiente apropiado, alteran aquellos factores que limitan el crecimiento celular incontrolado en su propio beneficio. Pero al margen de considerar aquellos cambios genéticos presentes en la mayoría de los tumores como la producción permanente de señales mitogénicas, la resistencia a señales de inhibición del crecimiento celular o de apoptosis y la adquisición de capacidad angiogénica; las células tumorales modifican el microambiente y adquieren también características que impiden el desarrollo de respuestas antitumorales efectivas. Esta ignorancia o tolerancia inmunológica se consigue por una parte porque los tumores pueden dar lugar a una disfunción de los mecanismos efectores mediante la producción de citocinas inmunosupresoras, fundamentalmente TGF- β , IL-10 y prostaglandina E-2 (Hahn y cols., 2002).

Sin embargo, también el escape inmunológico ocurre a través de cambios directamente producidos en la célula tumoral confiriéndole un estado de baja inmunogenicidad, siendo los más estudiados aquellos que producen una alteración en la maquinaria de procesamiento y de presentación antigénica (Garrido y col, 1997).

Nuestra hipótesis de estudio establecería que la expresión de HLA-E en células tumorales, en situaciones particulares, puede constituir un factor más de evasión al sistema inmune, similar al papel de esta molécula demostrado en el escape inmunológico de ciertos virus. Nuestra hipótesis se sustenta en los siguientes datos experimentales:

- Cohen y cols. (1999), estudiaron los mecanismos de evasión al sistema inmune del virus del SIDA. Estos investigadores describieron que el producto viral *Nef* del HIV provocaba una baja regulación tanto del locus HLA-A como de HLA-B, pero no de HLA-C, ni de HLA-E. Esta selectiva modulación de los productos del MHC por las células infectadas por HIV les confería protección frente a la acción lítica de las células NK.
- Por otra parte, Ulbrecht y cols. (2000) así como Tomasec y cols. (2000) observaron que la molécula HLA-E era expresada por las células en presencia de infección por el citomegalovirus humano (HCVM), estando su expresión en superficie incrementada. Este aumento de la expresión era debido a un producto génico del HCVM, la glicoproteína de 211 aminoácidos, *UL40*. La producción de un péptido derivado de la secuencia señal de *UL40* era la causa de la estabilización de HLA-E por este virus. Esta proteína se expresaba a las 24 horas post-infección, estando los niveles altos de la misma, relacionados con un incremento en la expresión en superficie de HLA-E, lo cual protegía a las células infectadas de ser destruidas por las células NK. Ambos grupos de investigadores, demostraron que esta protección se llevaba a cabo a través del receptor inhibitor *CD94/NKG2A* de las NK.

- También, el papel de las moléculas HLA no clásicas en el embarazo. El feto puede ser considerado como un aloinjerto que sobreviviría al sistema inmune durante el embarazo. Se sabe que la principal población linfocítica durante el embarazo son las células NK, cuyo número va a ir descendiendo a lo largo del embarazo (Moretta y col., 2003). Estas células van a expresar KIRs específicos contra HLA-C, HLA-G (KIR2DL4 y ILT-2) y contra HLA-E (CD94/NKG2A). Se piensa que la expresión de estas tres moléculas HLA, en el trofoblasto extravascular que invade el útero, es importante para la implantación. (Moffet-King, 2002). Es conocido, además, que la molécula HLA-E se une al péptido señal de la secuencia líder de HLA-G, además de al de las moléculas HLA clásicas, siendo expresada en todas las células que expresan HLA-G a nivel útero-placentario (Ishitani y cols., 2003). Mediante la unión de HLA-E con el receptor CD94/NKG2C se favorecería la estimulación de la célula NK favoreciendo la secreción de citoquinas beneficiosas para el embrión implantado y por otra parte la unión de HLA-E al receptor CD94/NKG2A parece jugar un papel en la interacción materno-fetal inhibiendo la destrucción celular por las NKs (Llano y cols., 1998; Ishitani y cols., 2003).
- Finalmente, la activación de las NK requiere una señal positiva que es proporcionada por los receptores activadores de estas células (Cerwenka y cols., 2001). A través de estos receptores las células NKs reconocen incluso estructuras de las células diana que en condiciones normales no son expresadas o lo son en baja densidad pero que son aumentadas en determinadas circunstancias, como son la expresión de las moléculas MICA/B, (Groh y cols., 1996). En este sentido, un receptor que interviene en la activación de las células NK es NKG2D, que tiene como ligandos a las moléculas MICA y MICB, las cuales se encuentran codificadas dentro de la región del MHC. Así, células que han perdido la totalidad de las moléculas HLA podrían evadir también la respuesta citotóxica NK por la supresión de moléculas activadoras como MICA.

De todos estos datos experimentales se puede deducir que tanto la aparición de HLA-E como la ausencia de MICA podrían favorecer la expansión de una clon celular que serían en estos casos resistentes tanto a los CTLs como células NK. Por esto, nuestro trabajo se ha centrado en investigar la expresión de HLA-E y MICA en líneas tumorales humanas, aparte de conocer algunos de los mecanismos que puedan regular la expresión de estas moléculas.

Hasta hace poco, la falta de anticuerpos monoclonales específicos de HLA-E hacía imposible determinar la expresión de esta molécula en superficie, disponiéndose sólo de datos de expresión génica a nivel de RNA (Lee y cols., 1998; Pacasova y cols., 1999). Los primeros datos ofrecidos referentes a su expresión fueron obtenidos usando líneas transfectantes humanas defectivas de clase I (Lee y cols.,

1998) o líneas de ratón transfectadas con genes de HLA-E (Ulbrech y cols., 1992). Actualmente se sabe que su expresión en los tejidos es ubicua (De Franco y cols., 2001).

La expresión de HLA-E en superficie en líneas celulares encontrada por nosotros es débil y sólo detectable mediante técnicas sensibles como la citometría de flujo. Los anticuerpos usados no nos permitieron identificar la expresión de estos antígenos en tejidos, probablemente por la menor sensibilidad de las técnicas inmunohistoquímicas convencionales en relación a la citometría de flujo.

En nuestro estudio se ha encontrado una diferencia sustancial en cuanto a la expresión cuando se consideran líneas de estirpe hematológica o de otro tipo histológico (tabla 5, figura 12 y 13). Además de en PBLs, hemos observado que se encuentra expresión en líneas de origen mielomonocítico, como son U937, HL-60 y CEM, y de forma débil también en KM-3. Nuestros resultados están en consonancia con los estudios realizados por Lee y cols. (1998) donde demuestran la existencia de expresión de la molécula HLA-E en todas células mononucleares periféricas, encontrándose los niveles de expresión más altos en los linfocitos B y los monocitos.

Por el contrario, no hemos encontrado expresión en superficie en ninguno de los cuatro linfomas de Burkitt estudiados, así como en el resto de líneas leucémicas (tabla 5, figuras 12 y 13).

Lee y cols. (1998) detectan expresión proteica de HLA-E en tejido normal hepático, piel, pulmón y en células placentarias. En cambio, nosotros, en el resto de las líneas tumorales estudiadas (melanomas, carcinomas de pulmón, colon, cervix, mama, gástrico, páncreas, cabeza y cuello, laringe y próstata) no encontramos expresión de esta molécula, salvo en un grupo particular de tumores, los cuales presentaban alteración en la expresión de HLA-ABC, grupo al que haremos referencia más tarde (tabla 5, figuras 12 y 13) (Marín y cols., 2003).

La existencia de una expresión restringida de esta molécula hace que nosotros propongamos que la expresión de HLA-E pueda representar una etapa más del proceso de evolución divergente y selección que se ha mencionado con anterioridad, siendo su expresión subsiguiente a la aparición de alteraciones en la expresión de antígenos HLA clásicos. La expresión de HLA-E tendría una ventaja evolutiva considerable, ya que aquellas clonas tumorales en las que existiese una falta de expresión de antígenos HLA clásicos y expresasen HLA-E podrían evadir la respuesta citotóxica de los CTLs y de las células NK (Braud y cols., 1998; Borrego y cols., 1998).

El hecho de que la molécula HLA-E no se encontrase en la superficie celular parece, según nuestros resultados, no ser debida a la ausencia de transcripción, ya que hemos detectado expresión a nivel de RNA en todas las líneas celulares estudiadas independientemente del origen histológico (figura 14). Otros estudios también encuentran expresión a nivel de RNA prácticamente generalizada: Köller y

cols. (1988), estudiaron también la expresión de RNA en diferentes tejidos encontrando expresión en todos, aunque las cantidades encontradas diferían entre ellos. Así, detectaron pequeñas cantidades de transcrito en LCL-B, melanoma, carcinoma renal, LCL-T madura y en nódulo linfático, un nivel intermedio de expresión en el timo y por último una alta expresión fue detectada en PBLs. Estos hallazgos son también confirmados por Wei y Orr (1990). Estos autores estudiaron la transcripción de las moléculas clásicas y de HLA-E en diferentes tejidos y tumores, encontrando que el transcrito de esta molécula era detectable en todas las líneas celulares estudiadas y tejidos examinados. No obstante, las cantidades de transcrito de HLA-E detectadas diferían entre las distintas líneas y tipos celulares. Existen altos niveles de transcripción en los tejidos linfoides en comparación con los no linfoides, siendo las células T maduras, dentro del grupo de las linfoides, las que expresaban mayor cantidad. La activación con PHA hacía que la concentración de transcrito disminuyese de forma importante. En la piel se encontró también un alto nivel de transcrito de HLA-E. Un nivel intermedio fue detectado en las líneas celulares linfoblastoides transformadas con VEB (LCL FJO, B-LCL721), en el tejido fetal a las 22 semanas de gestación y leucemias humanas T (CEM, HSB-2 y HUT-78). Además era expresado en la placenta y en la membrana extravellosa con la misma intensidad que en la línea de LCL FJO, y a diferencia de la molécula no clásica HLA-G, su expresión no variaba durante la gestación. Recientemente Dutta y cols. (2005) estudiaron la expresión de MHC clase I y HLA-G y -E en carcinomas gástricos mediante RT-PCR, detectando la presencia de mRNA en el 57% de los carcinomas gástricos y en todos los tejidos autólogos normales. Finalmente, a nivel de inmunohistoquímica, Ishitani y cols. (2003) demuestran la presencia de HLA-E, en los mismos lugares en los que se expresaba HLA-G, tanto la forma soluble de HLA-G (a nivel de todo el trofoblasto veloso: cito y sincitotrofoblasto), así como donde lo hace la forma expresada en la membrana (citotrofoblasto extraveloso).

Entonces, si la expresión a nivel de RNA de HLA-E en tejidos es tan generalizada, quedaba por resolver en qué medida ésta es suficiente para alcanzar la superficie, o qué factores pueden reducir el procesamiento intracelular de esta molécula.

Por un lado, en nuestro estudio no se ha encontrado expresión de esta molécula en líneas que presentan una mutación en el gen de la $\beta 2$ -m, como son las líneas de colon LOVO, HCT-15, DLD-1 (Bicknell y cols., 1994), ni en el linfoma de Burkitt DAUDI (Rosa y cols., 1983), ni tampoco en la línea de melanoma IRNE (Benítez y cols., 1998). Es decir, en contraste a HLA-G, HLA-E es absolutamente dependiente de $\beta 2$ -m. En este sentido, ya Martinozzi y cols. (1999) usando un clon de linfocitos T, TER-1, que lisaba selectivamente a aquellas células que expresaban HLA-E en superficie describió que

tanto la línea celular DAUDI como K562 escapaban a la acción de estos CTLs, en cambio, sí destruía a los PBLs. Es sabido que la molécula HLA-E, al igual que ocurre con las moléculas HLA clásicas, para alcanzar la superficie celular además de necesitar estar unida a la β 2-m (Koller y cols., 1988) requiere un péptido de nueve aminoácidos derivado de la secuencia líder de las moléculas clásicas o de HLA-G (Lee y cols., 1998; Furukawa y cols., 1999).

Así, fue observado el antígeno HLA-E era ampliamente expresado en la célula de mieloma de ratón X63 cuando era co-transfectado junto con la β 2-m (Ulbrech y cols., 1992).

Myers y cols. (1996), estudiaron el efecto de la abundancia relativa de β 2-m en la expresión de HLA en superficie. Crearon ratones BALB/C los cuales portaban una delección en el gen de la β 2-m y los cruzaron entre ellos. Los ratones heterocigotos presentaban un nivel menor de la expresión de HLA de clase I con respecto al ratón salvaje (original). Esta alteración en β 2-m provocaba realmente unas diferencias marcadas en la expresión de determinados HLA en aquellos que presentaban una sola copia de β 2-m, afectando más a unos que a otros (K^d y L^d que a D^d). Y al igual que en nuestro trabajo no fue detectada expresión de HLA en la superficie de los PBL en aquellos ratones que eran β 2-m negativos.

Por otra parte, según nuestros resultados, HLA-E y HLA-ABC se expresan a nivel intracelular de forma muy desigual, ya que HLA-E se transcribe del orden entre 10-100 veces menos que HLA-ABC en función de la línea celular de la que se trate (tabla 6). También la β 2-m se expresa en menor cantidad que HLA-ABC (tabla 6). Todo ello, junto con el hecho de que la expresión de HLA-E en líneas tumorales no hematológicas se limite a aquellas que presentan un severo deterioro en la expresión de las moléculas HLA-ABC, nos hizo pensar en la posibilidad que HLA-E posea una menor afinidad por la β 2-m que HLA-ABC, al igual que ha sido descrito con respecto a las distintas moléculas de clase I (figura 15). En este sentido, Neefjes y cols. (1988) observaron en líneas celulares de ratón diferencias en cuanto a la afinidad relativa de las moléculas clase I por la β 2-m, especulando que la expresión en superficie de estas moléculas HLA-ABC está influenciada por esto. Por otro lado, estudios realizados en líneas celulares humanas transfectantes, se ha observado una menor expresión en superficie de la molécula HLA-C menor que las moléculas HLA-A o HLA-B, aunque parecía no ser debido únicamente a una menor afinidad por la β 2-m (Myers y cols., 1996).

Esta hipótesis puede verse reforzada por las observaciones realizadas en el sistema tumoral FM55/R22.2 (figura 18), ambas líneas celulares expresan HLA-E pero la línea que presenta más defectos en la expresión HLA-ABC (R22.2), expresión de un solo alelo, posee en superficie mayor cantidad de HLA-E. El mismo fenómeno ha sido observado en el carcinoma de cervix 808 con respecto a otras líneas del mismo origen histológico que presentan expresión normal del sistema HLA-ABC.

Por todo esto, pensamos en la importancia que el balance entre las moléculas HLA-ABC y la β 2-m pudiera tener en la expresión de HLA-E. Así al analizar los resultados de PCR cuantitativa hemos observado que la mayoría de las líneas estudiadas que expresan el antígeno HLA-E en superficie presentan una razón HLA-ABC/ β 2-m inferior a 3.6 (exceptuando a HL60), pudiendo existir por tanto una mayor cantidad de β 2-m disponible para formar complejo con HLA-E que otras líneas (tabla 6). Este hallazgo se confirma además en el sistema tumoral FM55/R22.2 (figura 21). Este aumento de disponibilidad de β 2-m podría favorecer la expresión de HLA-E en superficie, si bien no parece ser el único factor desencadenante, ya que en algunas líneas celulares (K562, A549, Calu6 o HeLa) a pesar de tener una razón HLA-ABC/ β 2-m baja, no se encuentra expresión de esta molécula.

Otro factor a tener en cuenta, a raíz de los estudios publicados por Geraghty y cols. (1992), es el residuo codificado en la posición 107 de la molécula HLA-E. Estos autores describieron la existencia de dos alelos de la molécula de HLA-E que diferían en el aminoácido ubicado en la posición 107 (glicina o arginina), que a pesar de no encontrarse esta posición en el sitio de unión al péptido, diferían en cuanto a su expresión en superficie, sugiriendo que el residuo podía influir en la unión peptídica y en el transporte intracelular.

No hemos encontrado una clara relación entre la expresión de HLA-E y la variante polimórfica expresada por las distintas líneas tumorales (tabla 7). Sin embargo, si hemos encontrado diferencias entre ambos alelos en los experimentos de estabilización tras la adición de β 2-m humana: no hemos observado incremento de la expresión de HLA-E en superficie en aquellas líneas celulares que presentaban un genotipo HLA-E^{RR} o HLA-E^{RG}; y por el contrario, si existía un incremento de la misma en la mayoría de las líneas, cuando el genotipo era HLA-E^{GG} (tabla 8). Por otra parte puede apreciarse que el cultivo a baja temperatura (26° C) junto con adicción de β 2-m humana estabiliza e induce la expresión de HLA-E en las líneas celulares U937, HEP2 y SiHa con genotipo HLA-E^{GG}, mientras no lo hacía en ninguna de las líneas heterocigotos (HLA-E^{RG}) o en homocigotas HLA-E^{RR} (tabla 8).

Ulbrecht y cols. (1999) estudiaron las diferencias entre los dos alelos de HLA-E en cuanto a la interacción con la β 2-m y con los péptidos. En sus estudios utilizaron la línea de mieloma de ratón X63 co-transfectada con HLA-E (HLA-E^R o HLA-E^G) y con h β 2-m, y las denominaron X63ME^R o X63ME^G respectivamente. La línea celular X63ME^G presentaba expresión en superficie de HLA-E, en cambio no fue detectable en X63ME^R, incluso tras la adición de h β 2-m o tras la reducción de la temperatura del cultivo celular, como que si ocurría con X63ME^G. Además observaron que en la línea X63ME^R la mayoría de las cadenas pesadas de HLA-E eran retenidas en el retículo endoplásmico (RE) y aquellas moléculas que alcanzaban la superficie celular eran rápidamente degradadas.

Por tanto, pensamos que un factor que puede reducir el bajo procesamiento de HLA-E intracelular puede ser la baja afinidad de la cadena pesada de esta molécula por la β 2-m. De hecho, en estudios de termo-estabilidad del complejo HLA-E/h β 2-m ha sido observado que la disociación del complejo es reducida al añadir β 2-m humana exógena y también cuando se disminuye la temperatura al cultivo (Ulbrecht y cols. 1999).

Por tanto, la disposición del residuo de glicina tampoco por sí sola justifica la expresión en superficie, en este sentido, nosotros primamos por un lado el nivel transcripcional y por otro la disponibilidad de β 2-m. Varios ejemplos de nuestros resultados sostienen ésto:

- Existen líneas como HL60 o CEM que expresan HLA-E en superficie a pesar de poseer un genotipo HLA-E^{RR} y HLA-E^{RG} respectivamente.
- Las líneas celulares HEP-2 y SiHa, homocigotas HLA-E^{GG}, sólo expresan HLA-E en superficie si les añade β 2-m humana exógena al cultivo celular. Sin embargo, en línea HeLa, cuya expresión basal de HLA-E es negativa, no hay evidencia de incremento en la expresión en superficie de HLA-E al añadir β 2-m exógena, a pesar de tener genotipo HLA-E^{GG}. La línea HEP-2 posee una transcripción alta HLA-E en comparación con la generalidad de las líneas pero sin embargo la razón HLA-ABC/ β 2-m es elevada. En cambio, según se desprende de análisis cuantitativo de transcripción de la línea HeLa, la ausencia de expresión en superficie a pesar de la adición de β 2-m posiblemente sea debida a la baja transcripción HLA-E que posee esta línea.
- La línea celular JURKATT, es también HLA-E^{GG} y expresa HLA-E en superficie, aún cuando la transcripción del gen es menor que otras líneas que no expresan, como es el caso de NALM-6, MDA231 o HEP-2. Por otra parte, JURKATT presenta una mayor disponibilidad de β 2-m que estas tres líneas, hecho que puede contribuir a la expresión de HLA-E.
- Finalmente, líneas celulares como la línea de carcinoma de laringe CALU-6 y las dos líneas de carcinoma de pulmón, CALU-1 y A549, no expresan en superficie HLA-E probablemente debido a la conjunción de dos factores, de un lado la escasa transcripción tanto del gen de HLA-E como de β 2-m, y en segundo lugar poseer el genotipo que disminuye la estabilidad de la molécula en superficie, siendo CALU-1 y A549 heterocigotas HLA-E^{RG} y CALU-6 homocigota HLA-E^{RR}.

La complejidad de la expresión de HLA-E en superficie se ve condicionada además de todo lo expuesto por la necesidad de disponer de péptidos procedentes de un pool limitado de moléculas. Así,

HLA-E requiere la disponibilidad de un conjunto de péptidos de nueve aminoácidos, altamente conservados, que son derivados de la secuencia señal de otras moléculas HLA de clase I incluyendo HLA-A, -B, -C y -G (Lee y cols., 1998). Ulbrecht y cols. (1998) observaron que HLA-E era expresado débilmente en la superficie celular de la línea de mieloma de ratón X63 tras la co-transfección de β 2-m, siendo debido a un transporte intracelular de HLA-E dañado lo que originaba una ineficiente unión peptídica en el retículo endoplasmático. También, Lee y cols. (1998a) publicaron que la disponibilidad de los péptidos era un requisito necesario para la estabilización de HLA-E en la superficie celular de la línea de leucemia, defectiva en clase I, 721.221.; Además observaron que no todos los péptidos derivados de las moléculas HLA eran capaces de estabilizar a la molécula en superficie. Esto se confirmó también en los ensayos llevados a cabo con la línea híbrida AEH (Lee y cols. 1998b), las células transfectadas con ciertos genes de clase I, incluyendo HLA-G, fueron suficientes para promover la unión peptídica y la expresión de HLA-E en superficie. Finalmente, Maier y cols. (2000), observaron que en ausencia de ligandos de la secuencia señal de HLA clase Ia, en las líneas transfectantes K562 (HLA-E^G y HLA-E^R), sólo K562-HLA-E^G podía ser expresado HLA-E en la superficie celular, aunque era funcionalmente inactivo. En este sentido nosotros al estudiar la línea celular K562 observamos que carece de expresión en superficie de HLA-E a pesar de disponer de un bajo nivel de HLA-ABC/ β 2-m y una transcripción de HLA-E baja. Nosotros creemos que la razón de la falta de expresión en esta línea pueda efectivamente explicarse por el escaso pool de péptidos y la expresión de HLA-E.

Por otra parte, desde un punto de vista funcional, existen diferencias en la capacidad de determinados ligandos de HLA-E para estabilizar la molécula en superficie e inhibir la lisis NK. Maier y cols. (2000) incubaron con péptidos derivados de la secuencia señal de HLA-A2, B7 y G, y realizaron posteriormente un estudio de citotoxicidad con la línea NKL, la cual posee el receptor *CD94/NKG2A*. Llegaron a la conclusión que todos los péptidos estudiados estabilizaban la molécula HLA-E en la superficie pero no conferían resistencia frente a NK, por lo que el fallo en la protección no parecía ser debido a una ineficiente unión peptídica, sino a un reconocimiento diferencial de la molécula HLA-E con su ligando por parte del receptor *CD94/NKG2A*. Además según estos autores el hecho de que exista HLA-E en superficie no es un indicador de la capacidad de este para inhibir NK. Por otra parte, la capacidad de inhibición no sólo depende del ligando presentado sino de la variante de HLA-E que lo expresa.

Nuestros resultados, en cultivos celulares tras la incubación con péptidos derivados de la secuencia líder de HLA-A2 y HLA-G, revelaron una mayor estabilización de HLA-E en el caso de la línea U937 (HLA-E^{GG}) (figura 23 y 24). La línea SiHa también pasa a expresar HLA-E en superficie

tras la adición del péptido derivado de HLA-G (figura 24). Estos resultados están en consonancia con los hallazgos observados en la línea X63ME^G. La línea X63ME^G incrementaba su expresión en superficie de HLA-E al incubarla con diferentes péptidos (HLA-A2₃₋₁₁, HLA-B8₃₋₁₁, HLA-Cw3₃₋₁₁ y BZLF-1₃₉₋₄₇), aumentando sobretodo con HLA-A2₃₋₁₁. En cambio la variante X63ME^R no presentaba niveles detectables en superficie mediante citometría de flujo o eran muy débiles (Ulbrech y cols., 1999).

La activación de las células citotóxicas, linfocitos T y NK van a depender de un balance de señales positivas y negativas que van a condicionar su actividad. En el caso de células NK, su activación puede ocurrir, como se ha comentado, por ausencia de ligandos para los receptores inhibidores (missing-self hipótesis), o bien, por la unión con ligandos específicos para receptores activadores. Se ha descrito que la molécula MICA es el ligando del receptor activador NKG2D. En condiciones normales, como ya se ha comentado, este antígeno es expresado de forma limitada en el tejido epitelial intestinal y en células por la acción de proteínas virales o por "heat shock". (Groh y cols., 1996). Se ha demostrado la presencia de la proteína MICA por Western-blot en monocitos, queratinocitos y células endoteliales, pero no encontraron expresión en LT, ni CD4+ ni CD8+, como tampoco en LB CD19+. Sí se expresaba líneas celulares de diferente origen histológico: células epiteliales (HeLa), queratinocitos (A431), linfoma T (MOLT-4), en linfoma B (Raji), células endoteliales (HUV-EC-C) y en monocitarias (U937, THP-1), Zwirner y cols. (1998). Posteriormente, se detecta expresión de MICA, por citometría de flujo, en la superficie de células endoteliales y en fibroblastos pero no en monocitos ni en queratinocitos, usando como control positivo la línea de carcinoma de cervix HeLa, (Zwirner y cols., 1999).

La presencia de MICA ha sido considerada como un antígeno asociado a tumor, cuya expresión en células tumorales favorecería la destrucción de las mismas (Diefenbach y cols., 2000; Cerwenka y cols., 2000). Muchos son los trabajos que han relacionado la expresión de esta molécula con el cáncer, ya que la expresión de MICA representa una forma de alerta al sistema inmune. Por este motivo nos planteamos estudiar la presencia de este antígeno en líneas celulares de diferente origen histológico, ya que su carencia en la superficie de la célula tumoral podría representar un mecanismo de evasión al sistema inmune. En este contexto, una baja expresión conjunta de HLA-ABC y MICA podría representar un mecanismo de escape simultáneo tanto a efectores CTLs como a NK. Varios hallazgos pueden apoyar esta hipótesis:

- Vette y cols. (2002) observaron que la línea K562, la cual presenta un fenotipo HLA-ABC prácticamente negativo y expresa MICA, era altamente sensible a la citotoxicidad

NK. Además, encontraron en los tumores MICA+ un infiltrado NK CD57+NKG2D+ y observaron una menor expresión de MICA en las metástasis de melanomas uveales junto a un incremento en la expresión de moléculas HLA-ABC.

- Romanski y cols. (2005) estudiaron en los mecanismos de resistencia a la citotoxicidad mediada por las NK en leucemias agudas, encontrando que la sensibilidad varía entre los diferentes tipos de leucemia. Aquellas líneas que expresaban MICA en superficie (K562 y MOLT-4) eran más susceptibles a la lisis NK. Ninguna de las LLA-B que estudiadas fueron destruidas, ya que no poseían niveles detectables de MICA/B en superficie (NALM6 entre otras).
- Raffaghello y cols. (2004) analizan la presencia de MICA y otros ligandos de NKG2D en neuroblastomas (NB). Este tumor extracraneal presenta una alteración en la expresión de las moléculas HLA debida a defectos en el procesamiento antigénico y evade al sistema inmune a pesar de esto. Estos autores estudiaron la presencia de RNAm de MICA en ocho tumores sólidos (3 localizados y 5 diseminados) y en cuatro de las ocho líneas celulares estudiadas. No se detectó expresión en superficie en ninguno cortes histológicos de los tumores y si en la biopsia de tejido intestinal usada como control. Tampoco se detectó ni en el citoplasma ni en citosol en seis de las ocho líneas de NB estudiadas, las otras dos presentaban niveles tan altos como HeLa (por citometría e inmunohistoquímica). Esta downregulación de MICA, así como de otros ligandos de NKG2D, en este tipo de tumor se piensa que favorecería el escape a los efectores citotóxicos NKG2D

Nosotros hemos analizado un panel de 26 líneas celulares de diferente origen histológico, encontrando una expresión de MICA variable dentro de un mismo origen celular (tabla 9, figura 26). Hemos encontrado líneas que no expresan tanto moléculas clásicas como MICA, entre ellas se encuentran la línea leucémica NALM6 así como las líneas de carcinoma de colon (Lovo, DLD-1 y HCT-15) y la gástrica AGS (tabla 9, figura 26 y 27).

La alteración de la expresión HLA en las líneas de colon se debe a mutaciones en el gen de la β 2-m que en principio no afectan la expresión de MICA ya que esta molécula no requiere β 2-m para ser expresada en superficie. Este hallazgo no fué extensible a otras líneas de melanoma (IRNE), o hematológicas (Daudi) que también tienen también mutaciones en el gen de la β 2-m pero en contraste con las líneas de colon, no tienen el fenotipo MIN (inestabilidad de microsatélites). Si la falta de expresión en líneas con el fenotipo MIN es un hallazgo casual o si es debida precisamente a la existencia de mutaciones en los

genes MICA, o a la presencia de polimorfismos que dan lugar a alelos nulos (Li y cols., 2000) es algo que se necesita estudiar, así como el impacto funcional que la modulación en la expresión de estas moléculas tenga sobre los procesos de eliminación-escape durante la inmunovigilancia tumoral. En este sentido, ha sido sugerido que los tumores MIN (+) seleccionan, mutaciones de β 2-m, para escapar al sistema inmune, fundamentalmente CTLs, dado que son tumores muy inmunogénicos (Yamamoto y cols. 2001; Cabrera y cols. 2003). Sin embargo, dado que la pérdida total de moléculas clásicas HLA, sensibilizaría a las células tumorales frente a NK; nosotros proponemos que para favorecer el escape simultáneo a células T y NK, puedan seleccionarse además variantes MICA(-). Este papel de MICA ha sido sugerido también a través de la liberación por parte de las células tumorales de MICA soluble. Se ha observado, en pacientes con cáncer, la presencia de altos niveles de una forma soluble de MICA (sMICA) por la célula tumoral que provoca una baja expresión de este ligando en superficie además de una modulación de la expresión de NKG2D en los Linfocitos T y una disminución de la citotoxicidad de la célula NK (Clayton y Tabi, 2005). Desconocemos si las células MICA (-) que hemos descrito en este trabajo, son productoras de la fracción soluble.

En resumen, es probable que el desarrollo y selección mecanismos de evasión se produzcan en un entorno donde el sistema inmune reconduzca la repuesta antitumoral ante la aparición de clonas que hayan desarrollado algún tipo de resistencia. En nuestro caso, suponemos que alteraciones en las moléculas HLA deben de tener un efecto favorable para el escape a la respuesta inmune, sin embargo, estas clonas que podrían ser susceptibles de ataque de células NK, expresarían ligandos inhibidoras tales como HLA-E bajo condiciones muy restrictivas dadas las características de expresión de esta molécula en la superficie celular. También, es posible, que en tumores HLA negativos el escape simultáneo a CTLs y NK se pueda llevar a cabo por supresión de la expresión de moléculas activadoras MICA/B.

Queda por establecer, al tratarse de líneas celulares, si estas alteraciones que se producen al azar en el contexto de cambios epigenéticos o genéticos tienen realmente impacto sobre la progresión tumoral.

VI.- CONCLUSIONES

1.- La expresión de HLA-E en la superficie celular es un hecho infrecuente, salvo en líneas hematopoyéticas de origen mielomonocítico y ciertas líneas tumorales con fenotipos HLA alterados. A pesar de la baja expresión en superficie, se encuentran transcritos de HLA-E de forma generalizada en todas las líneas celulares investigadas.

2.- El factor limitante más importante para la expresión de HLA-E en superficie es la presencia de una transcripción débil en la mayoría de las líneas tumorales no hematopoyéticas. Los niveles más altos de transcripción se han detectado en líneas celulares de estirpe mielomonocítica, lo que sugieren la existencia de factores tejido-específicos que incrementan la transcripción del gen y se traducen en una expresión clara a nivel de superficie. Esta baja transcripción es el motivo principal de la ausencia de esta molécula en tejidos, cuando se analizan por técnicas inmunohistoquímicas.

3.- Los bajos niveles de expresión de HLA-E en líneas tumorales no hematopoyéticas no justifican por sí solos la ausencia de expresión en superficie. Una menor afinidad de la β 2-m por HLA-E, conjuntamente con la expresión limitada de esta molécula, favorecería fundamentalmente el acoplamiento de la β 2-m con las moléculas HLA clásicas. Esto podría ser el motivo que justifique la aparición de HLA-E en superficie en líneas tumorales que presentan un deterioro en la expresión de moléculas HLA clásicas.

4.- En líneas β 2-m (-/-) no se detecta HLA-E en superficie, lo que contrasta con los datos observados para HLA-G, y apoyaría el hecho de que para que exista expresión de HLA-E, éste se debe encontrar siempre acoplado a la β 2-m. Paralelamente, las líneas tumorales HLA clase I negativas (-/-), o con niveles de expresión muy bajos, no expresarían HLA-E probablemente por un nulo o insuficiente aporte de péptidos para estabilizar la molécula.

5.- No existe por tanto un único factor que determine la expresión de esta molécula en superficie, sino que las causas que regulan la expresión son múltiples, siendo requisitos fundamentales el nivel de transcripción, la existencia de un adecuado pool de péptidos y la presencia de un balance de expresión HLA-ABC/ β 2-m reducido.

6.- La expresión de los antígenos MICA también se encuentra de forma variable en líneas tumorales con independencia de la estirpe histológica. La ausencia de MICA en líneas de colon, β 2-m (-/-) y de fenotipo MIN (+), contrasta con su detección en el tracto gastrointestinal normal y tumoral. Estos resultados podrían explicarse en el contexto de un proceso de inmunoselección de variantes celulares resistentes tanto a CTLs (HLA-ABC negativas) como a células NK (MICA negativas), en tumores que como los MIN (+) son altamente inmunogénicos.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Algarra, I; García-Lora, A; Cabrera, T; Ruiz-Cabello, F; Garrido, F. The selection of tumor variants with altered expression of nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol. Immunother.* 2004. 53:904-910.

Ando, H; Mizuki, N; Ota, M; Yamazaki, M; Ohno, S; Goto, K; Miyata, Y; Wakisaka, K; Bahram, S; Inoko, H. Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene. *Immunogenetics.* 1997. 46:499-508.

Bentley, G.A and Mariuzza, R. A. The structure of the T cell antigen receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 1996. 14: 369-396.

Braud, V; Allan, D.S; Wilson, D; McMichael, A.J. TAP- and Tapasin dependent HLA-E surface expression correlates with the binding of an MHC class I leader peptide. *Curr Biol.* 1998. 8: 1-10.

Braud, V; Jones, E.Y; McMichael, A. The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence- derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9. *Eur J Immunol.* 1997. 27: 1164-1169.

Braud, V; Allan, D; McMichael, A; Söderström, K; D'Andrea, A; Ogg, G.s.; Lazetic, S; Young, N.T; Bell, J.I; Phillips, J.H.; Lainier, L.L; McMichael, M.A. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C. *Nature.* 1998. 391: 795-799.

Braud, V; Allan, D; McMichael, A. Functions of nonclassical MHC and non-MHC-encoded class I molecules. *Current Opinion in Immunology.* 1999. 11: 100-108.

Brady, C.S; Bartholomew, J.S; Burt, DL; Duggan-Keen, M.F; Glenville, S; Telford, N; Little, M.A; Davidson, J; Jiménez, P; Ruiz-Cabello, F; Garrido, F; Stern, P.L. Multiple mechanisms underlie HLA dysregulation in cervical cancer: Implications for immunotherapy. *Tissue Antigens.* 2000. 55: 401-411.

Bahram, S; Bresnahan, M; Geraghty, D.E; Spies, T. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *PNAS.* 1994. 91: 6259-6263.

Bahram, S. MIC genes: from genetics to biology. *Adv. Immunol.* 2000. 76: 1-60.

Benitez, R; Godelaine, D; López-Nevot, M.A; Brasseur, F; Jimenez, P; Marchand, M; Oliva, M.R; van Baren, N; Cabrera, T; Andry, G; Landry, C; Ruiz-Cabello, F; Boon, T; 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(6): 520-9.

Borrego, F; Kabat, J; Kim, D; Lieto, L; Maashon, K; Peña, J; Solana, R; Coligan, J.E. Structure and function of major histocompatibility complex (MHC) class I specific receptors expressed on human natural killer (NK) cells. *Molecular Immunology*. 2001. 38: 637-660.

Borrego, F; Masilamani, M; Kabat, J; Sanni, T.B; Coligan, J.E. The cell biology of the human natural killer cell CD94/NKG2A inhibitory receptor. *Molecular immunology*. 2005. 42. 485-488.

Boyson, JE; Mc Adams, S.N ; Gallimore, A; Gobs, T.G; Liu, X; Gotch, F.M; Hudhes, A.L; Watkin, D.I. The HLA-E locus in macaques is polymorphic and is conserved between macaques and humans. *Immunogenetics*. 1995. 41(2-3):59-68.

Cabrera, C.M; 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 Mar; 61(3):211-9.

Caplin, B.E; Rasmussen, R.P; Bernard, P.S; Wittwer, C.T. The most direct way to monitor PCR amplification for quantification and mutation detection.1999. *Biochemica*. 1999. 1.

Carosella, E. D. et al. HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects. *Immunol. Today*. 2000. 21: 532-534.

Cerwenka, A; Lainer, L.L. Natural Killer cells, viruses and cancer. *Nature Reviews*. 2001. 1: 41-49.

Clayton, A; Tabi, S. Exosomes and the MICA-NKG2D system in cancer. *Blood cells, molecules and diseases*. 2005. 34:206-213.

Cohen, GB; Gandhi, RT; Davis, DM; Mandelboim, O; Chen, BK; Strominger, JL; Baltimore, D. The selective downregulation of class I major histocompatibility complex proteins by HIV-1 protects HIV infected cells from NK cells. *Immunity*. 1999. 10: 661.

Das, G; Janeway, C. MHC specificity of iIELs. *Trends Immunology*. 2003. 24 (2): 88-93.

DeFranco, A; Locksley, R; Robertson, M. Non-Classical MHC Class I Molecules. 2001. The immune response to infection (Chapter 3).

De Silva, D; Reiser, A; Herrman, M; Tabiti, K; Wittwer, C. Rapid genotyping and quantification on the LightCycler with hybridization probes. *Biochemica*. 1998. 2.

Dutta, N; Majumder, D; Gupta, A; Mazumder D.; Banerjee, S. Analysis of human lymphocyte antigen class I expression in gastric cancer by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. 2005. *Human Immunology*. 66: 164-169.
Engel y col., 1997 (*Scand J Immunol* 45:463)).

Eleme, K; Taner, S.B; Onfelt, B; Collison, L.M; Mc Cann, F.E; Chalupony, N.J; Cosman, D; Hopkins, C; Magee, A.I; Davis, D.M. Cell surface organization of stress-inducible proteins ULBP and MICA that stimulate human NK cells and T cells via NKG2D. *J. Exp. Med.* 2004. 199 (7):1005-1010.

Ferrone, S; Marincola, F.M. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunology Today*. 1995. 16: 487-494.

Furman, M; Ploegh, H; Schust. Can viruses help us to understand and classify the MHC class I molecules at the maternal-fetal interface?. *Human Immunology*. 2000. 61:1169-1176.

FuruKawa, H; Yabe, T; Akaza, T; Tadokoro, K; Tohma, S; Inoue, T; Tokunaga, K; Yamamoto, K; Geraghty, D.E; Juji, T. Cell surface expression of HLA-E molecules on PBMC from a TAP1- deficient patient. *Tissue antigens*. 1999. 53: 292-295.

Garrido, F; Cabrera, T; Concha, A; Glew, S; Ruiz-Cabello, F; Stern, P. Natural history of HLA expression during tumour development. *Immunology Today*. 1993. 14 (10): 491-499.

Garrido, F; Ruiz-Cabello, F; Cabrera, T; Pérez-Villar, J.J; López-Botet, M; Duggan-Keen, M; Stern, P. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunology Today*. 1997. 18: 89-35.

Geraghty, D.E; Stockschleider, M; Ishitani, A; Hansen, J.A. Polymorfism at the HLA-E locus predates most HLA-A and-B polymorfism. *Human Immunology*. 1992. 33: 174-184.

Groh, V; Wu, J; Yee, C; Spies, T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of the NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002. 419: 734-738.

Groh, V; Rhinehart, R; Secrist, H; Bauer, S; Grabstein, K. H; Spies, T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *PNAS*. 1999. 96: 6879-6884.

Groh, V; Rhinehart, R; Randolph-Habecker, J; Topp, M. S; Riddell, S. R; Spies, T. Costimulation of CD8 $\alpha\beta$ T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nature Immunology*. 2001. 2 (3): 255-260.

Groh, V; Bruhl, A; El-Gabalawy, H; Nelson, J. L.; Spies, T. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its ligands in rheumatoid arthritis. *PNAS*. 2003. 100:9452-9457.

Hahn, W. C; Weinber, M. Rules for making humans tumors cells. *N Engl J Med*. 2002. 347-159

Hickling, D; Marincola, F; Ferrone, S. HLA class I antigen downregulation in human cancers: T-cell immunotherapy revives an old story. *Molecular Medicine Today*. 1999. 5: 178-186.

Hughes, A; Yeager, M; Ten Elshof, A; Chorney, M. A new taxonomy of mammalian MHC class I molecules. *Immunology Today*. 1999. 20(1):22-6.

Ishitani, A; Sageshima, N; Lee, N; Dorofeeva, N; Hatake, K; Marquardt, H; Geraghty, D.E. Protein expression and peptide binding suggest unique and interacting functional roles for HLA-E, F and G in maternal-placental immune recognition. *The Journal Immunology*. 2003. 171:1376-1384.

Kárre, K; Ljunggren, H.G; Piontek, G; Kiessling, R. Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggest alternative immune defense strategy. *Nature*. 1986. 319: 675-678.

Koller, B.H; Geraghty, D.E; Shimizu, Y; DeMars, R; Orr, HT. A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *Journal of immunology*. 1988. 141: 897-904.

Lee, Ni; Llano, M; Carretero, M; Ishitani, A; Navarro, F; López-Botet, M; Geraghty, D.E. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2D. *PNAS*. 1998a. 95: 5199-5204.

Lee, N; Goodlett, D.R.; Ishitani, A; Marquardt, H; Geraghty, D.E. HLA-E surface expression depends on Binding of Tap-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences. *The journal of immunology*. 1998b. 160: 4951-4960.

Li, Z; Groh, V; Strong, R; Strong, R. K; Spies, T. A single amino acid substitution causes loss of expression of a MICA allele. *Immunogenetics*. 2000. 5: 246-248.

Llano, M; Gumá, M; Ortega, M; Angulo, A; López-Botet, M. Differential effects of US2, US6 and US11 human cytomegalovirus proteins on HLA class Ia and HLA-E expression: impact of target susceptibility to NK cell subsets. *Eur. J. Immunol*. 2003. 33: 2744 -2754.

Llano, M; Lee, N; Navarro, F; García, P; Albar, J.P; Geraghty, D.E; López-Botet, M. HLA-E bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD947NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G derived nonamer. *Eur. J. Immunol.* 1998. 28: 2854-2863.

López-Botet, M; Moretta, L; Strominger, J. NK-cell receptor and recognition of MHC class I molecules. *Immunology today.* 1996. 17(5):212-214.

Ljunggren, H.G. and Karre, K. In search of the 'missing self' MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol Today.* 1990. 11: 237-244.

López-Botet. NK cell receptors and recognition of MHC class I molecules. 1996. *Immunology Today.* 1996. 17 (5): 212-214.

Maccalli, C; Pende, D; Castelli, C; Mingari, C; Robbins, P; Parmiani, G. NKG2D engagement of colorectal cancer-specific T cells strengthens TCR-mediated antigen stimulation and elicits TCR independent anti-tumor activity. *Eur. J. Immunol.* 2003. 33: 2033-2043.

Jinushi, M; Takehara, T; Kanto, T; Ghoh, V; Spies, T; Kimura, R; Miyagi, T; Mochizuki, K; Sasaki, Y; Hayashi, N. Expression and role of MICA and MICB in human hepatocellular carcinomas and the regulation by retinoic acid. *Int J Cancer.* 2003.104(3):354-61.

Maier, S; Grzeschik, M; Weiss, E.H; Ulbrecht, M. Implications of HLA-E allele expression and different HLA-E ligand diversity for the regulation of NK cells. *Human Immunology.* 2000. 61: 1059-1065.

Malmberg, K.J; Levitsky, V; Norell, H; Texeira de Matos, C. IFN- gamma protects short-term ovarian cell lysis via a CD94/NKG2A-dependent mechanism. *Journal of Clinical Investigation.* 110. N°10: 1515-1524.

Marín, R; Ruiz-Cabello, F; Pedrinaci, S; Méndez, R; Jiménez, P; Geraghty, D.E; Garrido, F. Analysis of HLA-E expression in human tumors. *Immunogenetics.* 2003. 54: 767-775.

Martínez, E; Parra, J.F; Pérez, A; Gómez, M. Structure and function of "non-classical" HLA class I molecules. *Inmunología.* 2001. 20 (4): 207-213.

Martinozzi, S; Pacasova, R; Boulouis, H-J; Ulbrecht, M; Weiss, E; Sigaux, F; Pla, M. Cutting Edge: Requirement of class I signal sequence-derived peptides for HLA-E recognition by a mouse cytotoxic T cell clone. *The journal of immunology.* 1999. 162:5662-5665.

Matte, C; Lacaille, J; Zijenah, L; Ward, B; the ZVITAMBO study group; Roger, M. HLA-G and HLA-E polymorphisms in an Indigenous African Population. *Human Immunology*. 2000. 61:1150-1156.

Méndez, R; Serrano, A; Jager, E; Maleno, I; Ruiz-Cabello, F; Knuth, A; Garrido, F. Análisis of HLA class I expresión in different metastases from two melanoma patients undergoing peptide immunotherapy. *Tissue Antigens*. 2001. 57: 508-519.

Menier, C; Riteau, B; Carosella, E. D; Rouas- Freiss, N. MICA triggering signal for NK cell tumor lysis is counteracted by HLA-G1-mediated inhibitory signal. *Int. J. Cancer*. 2002. 100: 63-70.

Mingari, MC; Vitale C; Cantón C; Bellomo R; Ponte M; Schiavetti F; Bertone S; Moretta A; Moretta L. Interleukin-15- induced maturation of human Natural Killer cells from early thymic precursors. Selective expresión of CD94/NKG2A as the only class I specific inhibitory receptor. *Europ J Immunol*. 1997. 27: 1374-1380.

Moffett-King, A. Natural Killer cells and pregnancy. *Nature Reviews Immunology*. 2002. 2: 656-663.

Moretta, A; Moretta, L. HLA class I specific inhibitory receptors. *Current Opinion Immunology*. 1997. 9: 694-701.

Moretta L; Ciccone, E, Mingani, MC, Biassoni, R; Moretta A. Human NK cells: origin, clonality, specificity and receptors. *Adv Immunol*. 1994. 55: 341-380.

Moretta L; Ciccone, E Moretta A. Höglund, Öhlen, C; Kärre, K. Allorecognition NK cells: nonself or no self? . *Immunol Today*. 1992. 13: 300-306.

Moretta, L; Migari, M.C; Bottino, C; Pende, D; Biassoni, R; Moretta, A. Cellular and Molecular basis of natural killer and natural killer-like activity. *Immunology Letters*. 2003(a). 88: 89-93.

Moretta, L; Romagnani, C; Pietra, G; Moretta, A; Mingari, M.C. NK-CTLs, a novel HLA-E restricted T-cell subset. *Trends immunology*. 2003(b). 24 (3):136-143.

Myers, N.B; Wormstall, E.M; Hansen, T.H. Differences among various class I molecules in competition for $\beta 2m$ in vivo. *Inmunogenetics*. 1996. 43: 384-387.

Navarro, F; López-Botet, M. Receptores de células NK específicas para moléculas HLA de clase I. (*) 2001. Vol 1 (1):38-48.

O'Callaghan, C.A; Bell, J.I. Structure and function of the human MHC class Ib molecules HLA-E, HLA-F and HLA-G. *Immunological Reviews*. 1998. 163: 129-138.

O'Callaghan, C.A; Tormo, J; Willcox B.E; Blundell, C.D; Jakobsen B.K; Stuart, D.I; McMichael, A.J; Bell, J.I; Jones, E.Y. Production, crystallization and preliminary x-ray analysis of the human class Ib MHC molecule. *Protein Sci*. 1998.

O'Callaghan, C.A; Tormo, J; Willcox B.E; Braud, V.M; Jakobsen B.K; Stuart, D.I; McMichael, A.J; Bell, J.I; Jones, E.Y. Structural features impose tight peptide binding specificity on the nonclassical MHC molecule HLA-E. 1998. *Molecular Cell*. 1: 531-541.

Orchard, T.R; Dhar, A; Simmons, J.D; Vaughan, R; Welsh, K.I; Jewell, D.P. MHC class I chain-gene A (MICA) and its associations with inflammatory bowel disease and peripheral arthropathy. *Clin Exp Immunol*. 2001. 126: 437-440.

Pacasova, R; Martinozzi, H.J.; Boulouis, M; Ulbrecht, J.C.; Vieville, M; Sigaux, F; Weiss, E.H.; Pla, M. Cell-surface expression and alloantigenic function of a human nonclassical class I molecule (HLA-E) in transgenic mice. *J. Immunol*. 1999.162(9):5190-6.

Petersdorf, E.W; Shuler, K.B; Longton, G.M; Spies, T; Hansen, J.A. Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics*. 1999. 49(7-8): 605-12.

Ploegh, H. Viral Strategies of immune invasion. *Science*. 1998. 280: 248-252.

Qi, J ; Zhang, J; Zhang, L; Cui, L; He, W. Immobilized MICA could expand human V δ 1 $\gamma\delta$ T cells in vitro that displayed major histocompatibility complex class I chain-related A- dependent cytotoxicity to human epithelial carcinomas. *Scandinavian Journal of immunology*. 2003. 58: 211-220.

Raffaghello, L; Prigione, I; Airoidi, I; Camoriano,M; Levreri, I; Gambini, C; Pende, D; Steinle, A; Ferrone, A; Pistoia, V. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia*. 2004. 6 (5): 558-568.

Rauled, D. H. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nature Reviews*. 2003. 3: 781-790.

Real, L.M; Jimenez, P; Cantón, J; Kirkin, A; García, A; Abril, E; Zeuthen, J; Ruiz-Cabello, F; Garrido, F. 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*. 1997. 75:317-323.

Real, L.M; Cabrera, T; Collado, A; Jiménez, P; García, A; Ruiz-Cabello. Expression of HLA-G in human tumors is not a frequent event. *Int. J. Cancer.* 1999. 81: 512-518.

Roberts, A; Lee, L; Schwarz, E; Groh, V; Spies, T; Ebert, E; Jabri, B. Cutting Edge: NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *The journal of immunology.* 2001. 5527-5530.

Seliger, B; Abken, H; Ferrone, S. HLA-G and MIC expression in tumors and their role in anti-tumor immunity. *Trends in immunology.* 2003. 24 (2): 82-87.

Stastny, P. Polymorphism and antigenicity of HLA-MICA. *ASHI Quarterly (Scientific communications).* 2002. 64-65.

Strong, R. K; Holmest, M.A; Li, P; Braun, L; Lee, N; Geraghty. HLA-E allelic variants. *The Journal of Biological Chemistry.* 2003. 278 (7): 5082-5090.

Svane, I.M ; Engel, A.M ; Nielsen, M.B; Ljunggren, H.G; Rygaard, J; Werdelin, O. Chemical induced sarcomas from nude mice are more Immunogenetics than similar sarcomas from congenic normal mice. *Eur J Immunol.* 1996. 26:1844-50.

Sykulev, Y; Joo, M; Vturina, I; Tsomides, T.J; Einsen, H.N. Evidence that a single peptide-MHC complex on a target cell can elicit a cytolytic T cell response. *Immunity.* 1996. 4: 565-571.

Tomasec, P; Braud, V.M; Rickards, C; Powell, M.B; McSharry, B.P; Gadola, S; Cerundolo, V; Borysiewicz, L.K; McMichael, A.J; Wilkinson, G.W. Surface expression of HLA-E, an inhibitor of natural killer cells, enhanced by human cytomegalovirus gpUL40. *Science.* 2000. 287: 1031-1033.

Trinchiri, G. Biology of natural Killer cells. *Adv. Immunol.* 1989. 47: 187-376.

Ugurel, S; Rebmann, V; Ferrone, S; Tilgen, W; Grosse-Wilde, H; Reinhold, U. Soluble human leukocyte antigen-G serum level is elevated in melanoma patients and is further increased by interferon- α immunotherapy. *Cancer.* 2001. 92 (2): 369-376.

Ulbrecht, M; Couturier, A; Martinozzi, S; Pla, M; Srivastava, R; Peterson, P.A; Weiss, E. Cell surface expression of HLA-E: Interaction with human β 2-microglobulin and allelic differences. *Eur. J. Immunol.* 1999. 29: 537-547.

Ulbrecht, M.; Kellermann, J; Jonson, J.P; Weiss, E.H. Impaired intracellular transport and cell surface expression of nonpolymorphic HLA-E: evidence for inefficient peptide binding. *J. Exp. Med.* 1992. 176: 1083-1090.

Ulbrecht, M; Martinozzi, S; Grzeschik, M; Hengel, H; Ellwart, J; Pla, M; Weis, E. Cutting Edge: The human cytomegalovirus UL40 gene product contains a ligand for HLA-E and prevents NK cell-mediated lysis. *The journal of immunology.* 2002. 164: 5019-5022.

- Velardi, A; Ruggeri, L; Moretta, A; Moretta, L.** NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends in Immunology*. 2002. 23 (9): 438-444.
- Vetter, C.S; Groh, V; Straten, P; Spies, T; Brocket, E.B; Becker, J.C.** Expression of stress-induced MHC class I related chain molecules on human melanoma. *J. Invest. Dermatol.* 2002. 118: 600-605.
- Wagsäter, D; Dimberg, J; Hugander, A; Sirsjö, A; Ghaderi, M.** Analysis of MICA gene transcripts in human rectal cancers. *Anticancer Reseach.* 2003. 23: 2525-2530.
- Wei, X; Orr, H.** Differential expression of HLA-E, HLA-F, and HLA-G transcripts in human tissue. *Human immunology.* 1990. 159:131-136.
- Wu, J;Groh, V; Spies, T.** T cell antigen receptor engagement and specificity in the recognition of stress-inducible MHC class -I-related chains by human epithelial $\gamma\delta$ T cells. *J. Immunology.* 2002. 169: 1236-1240.
- Yahamoto, K; Fujiyama, Y; Andoh, A; Bamba, T; Okabe, H.** Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochimica et Biophysica Acta.* 2001. 1526: 10-12.
- Yamamoto, H; Yamashita, K; Perucho, M.** Somatic mutation of the beta2-microglobulin gene associates with unfavorable prognosis in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Gastroenterology.* 2001. 120(6): 1565-7.
- Yorl, IA and Rock, K.L.** Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev. Immunol.* 1996. 14:369-396.
- Zwirner, N; Dole, K; Stastny, P.** Differential Surface Expression of MICA by endothelial cells, fibroblasts, keratinocytes and monocytes. *Human Immunology.* 1999. 60: 323-330.