



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Ligandos de NKG2D: nuevos aspectos sobre su
bioquímica, su papel en interacciones celulares y su
modulación por fármacos antitumorales**

Sheila López Cobo

Tesis doctoral

Madrid

2017



Universidad Autónoma de Madrid

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

**Ligandos de NKG2D: nuevos aspectos sobre su
bioquímica, su papel en interacciones celulares y su
modulación por fármacos antitumorales**

Sheila López Cobo

Licenciada en Biología

Memoria de tesis doctoral para optar al grado de Doctor
por la Universidad Autónoma de Madrid

Dirigida por:

Dra. María del Mar Valés Gómez

Realizada en:

Centro Nacional de Biotecnología (CSIC)

Los experimentos presentados en esta tesis doctoral se han llevado a cabo en el Centro Nacional de Biotecnología del CSIC en el Departamento de Inmunología y Oncología bajo la supervisión de la Dra. María del Mar Valés Gómez.

Para la realización de esta tesis doctoral se ha contado con una beca predoctoral FPU del Ministerio de Educación con referencia AP2010-1174, además de una ayuda para una estancia breve asociada a dicha beca. La financiación necesaria para el desarrollo de los experimentos fue de proyectos MINECO, SAF2015-69169-R y SAF-32293. Además también se recibió el premio Immunotools IT-BOX-139 award 2012.

Índice

RESUMEN.....	17
ABSTRACT.....	18
ABREVIATURAS.....	21
INTRODUCCIÓN.....	27
1. Las células Natural Killer.....	27
1.1 Receptores de las células NK.....	28
1.1.1 Receptores inhibidores de las células NK.....	28
1.1.2 Receptores activadores de las células NK.....	29
1.1.3 Señalización de los receptores de las células NK.....	30
1.1.4 Receptores de factores solubles.....	30
1.1.5 Moléculas de adhesión.....	31
1.2 Activación de las células NK.....	31
2. Receptor NKG2D y sus ligandos.....	32
2.1 Regulación de los ligandos de NKG2D.....	34
2.2 Liberación de ligandos de NKG2D.....	34
3. Papel de las células NK y el sistema NKG2D en el reconocimiento de melanoma.....	36
3.1 Células NK y sistema NKG2D en cáncer.....	37
3.2 Melanoma cutáneo metastásico.....	37
3.3 Respuesta de las células NK frente a melanoma.....	38
3.4 Tratamientos para el melanoma cutáneo.....	39
3.4.1 Inmunoterapias.....	39
3.4.2 Terapias dirigidas: Vemurafenib.....	40
3.4.3 Inmunoterapias basadas en puntos de control inmunológico.....	42
3.4.4 Terapias basadas en la actividad de las células NK.....	43
3.5 Melanoma y exosomas.....	43
4. Transferencia de proteínas mediante trogocitosis.....	44
4.1 Definición y ejemplos de trogocitosis.....	44
4.2 Función y mecanismo de la trogocitosis.....	45
4.3 Trogocitosis y células NK.....	46

OBJETIVOS.....	51
MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
1. Reactivos.....	55
2. Líneas celulares.....	55
3. Células NK humanas.....	56
3.1 Purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)	56
3.2 Purificación de células NK y establecimiento de líneas primarias de células NK.....	56
3.3 Estimulación de células NK en PBMC totales.....	56
4. Citometría de flujo.....	57
5. Biotinilación de proteínas en la superficie celular.....	59
6. Inmunoprecipitación.....	59
7. Análisis de expresión proteica por inmunodetección (Western blot).....	60
7.1 Preparación de los extractos celulares.....	60
7.2 Western blot.....	60
8. Fraccionamiento de regiones de membranas resistentes a detergentes (DRM).....	62
9. Aislamiento de exosomas.....	62
10. Experimentos de co-cultivo para el análisis de transferencia de ligandos de NKG2D.....	63
11. Análisis de la liberación de gránulos líticos y citotoxicidad en los experimentos de transferencia.....	64
12. Separación de células NK mediante citómetro de flujo separador para experimentos de retransferencia.....	64
13. Tipaje de MICA en líneas de melanoma.....	64
14. Ensayo MTT y xCELLigence.....	65
15. Ensayos de muerte en células de melanoma.....	65
16. Análisis de liberación de gránulos líticos frente a células de melanoma.....	65
17. Microscopía electrónica de transmisión.....	66
18. Detección de ligandos de NKG2D solubles mediante ELISA.....	66
19. Análisis estadístico.....	67
RESULTADOS.....	71

1. Estudio bioquímico del ligando MICA*008 y su reclutamiento a exosomas.....	71
1.1 MICA*008 se ancla a la membrana mediante GPI.....	72
1.2 El anclaje GPI de MICA*008 es necesario para su reclutamiento a DRM y exosomas.....	75
2. Transferencia de los ULBP desde la célula diana a la célula NK.....	77
2.1 Los ULBP humanos se transfieren a células NK y se anclan en su membrana, en un proceso dependiente de contacto celular.....	77
2.2 La transferencia de diferentes ligandos de NKG2D ocurre con distinta cinética y eficiencia.....	82
2.3 La activación de las células NK y la interacción con el receptor son necesarias para la transferencia de los ligandos de NKG2D.....	86
2.4 Los ULBP transferidos se encuentran próximos a NKG2D y se pueden mantener de manera estable en la membrana.....	90
2.5 Las células NK que adquieren ULBP se convierten en células diana y transfieren los ligandos a otras células NK.....	93
3. Efecto de vemurafenib en los ligandos de NKG2D en melanoma.....	96
3.1 Caracterización de las líneas celulares derivadas de metástasis de pacientes de melanoma.....	97
3.2 Efecto del tratamiento con vemurafenib en la expresión de ligandos de NK en células de melanoma.....	98
3.2.1 El tratamiento con vemurafenib afecta a la expresión de ligandos implicados en la activación de las células NK.....	98
3.2.2 La cinética del efecto de vemurafenib en los ligandos activadores está ligada a la proliferación.....	102
3.2.3 Las células NK son menos citotóxicas frente a células de melanoma tratadas con vemurafenib.....	106
3.2.4 Los efectos de Vemurafenib pueden ser revertidos con inhibidores de desacetilasas de histonas.....	108
3.3 Efecto del tratamiento con vemurafenib en la liberación de los ligandos de NKG2D.....	112
3.3.1 Los exosomas derivados de células de melanoma expresan MICA y antígenos de melanoma.....	112

3.3.2 El tratamiento con vemurafenib reduce los niveles de MICA en los exosomas derivados de las células de melanoma.....	114
3.3.3 El tratamiento con vemurafenib reduce la liberación de ligandos de ULBP2 solubles.....	116
DISCUSIÓN.....	121
1. Estudio bioquímico del ligando MICA*008 y su reclutamiento a exosomas.....	121
2. Transferencia de ligandos de los ULBP desde la célula diana a la célula NK.....	123
3. Efecto de vemurafenib en los ligandos de NKG2D en melanoma.....	129
CONCLUSIONES.....	139
BIBLIOGRAFÍA.....	143
ANEXOS.....	165

Resumen

Abstract

Las células *Natural Killer* (NK) tienen un papel importante en el control de tumores y uno de los sistemas que se ha demostrado crucial para esta actividad NK, es el formado por el receptor activador NKG2D y sus ligandos. Los ligandos de NKG2D (NKG2D-L) se expresan en células sometidas a estrés celular en varias situaciones patológicas. Además de encontrarse en diferentes compartimentos celulares y en la membrana plasmática, los NKG2D-L se pueden liberar al medio extracelular a través de exosomas o como moléculas solubles. Dicha liberación de NKG2D-L se relaciona con el bloqueo e internalización del receptor en células efectoras y la consecuente reducción de su actividad citotóxica. Otra propiedad que se ha observado en los NKG2D-L, es su capacidad para transferirse desde la célula diana a la célula NK. La implicación de NKG2D y sus ligandos en el control antitumoral depende, por tanto, de muchos factores, indicando la necesidad del estudio de diferentes aspectos de la biología de estas moléculas para entender su modulación en un contexto patológico.

En esta tesis, se aborda la biología de los NKG2D-L a varios niveles: a nivel molecular, estudiando las características bioquímicas específicas del NKG2D-L, MICA, que afectan a su liberación en exosomas; a nivel celular, explorando la comunicación mediada por la transferencia de los NKG2D-L de la célula diana a la célula NK; y por último, en un modelo tumoral, utilizando células metastásicas de melanoma, en el que se estudia la expresión de NKG2D-L, así como su capacidad de modular la respuesta de las células NK, en el contexto de terapias dirigidas.

El estudio bioquímico del alelo MICA*008 establece que esta molécula no es transmembrana sino que se ancla a membrana mediante GPI, el cual es imprescindible para su reclutamiento a regiones de membrana ricas en esfingolípidos (DRM) y a exosomas. Además, los resultados obtenidos demuestran que los NKG2D-L anclados a la membrana mediante GPI se transfieren desde las células diana a células NK. La eficiencia de este proceso depende tanto del ligando particular, como de su abundancia en la célula diana. Las células NK adquieren los ligandos en su conformación funcional tras una respuesta citotóxica y pueden ser, a su vez, células diana para otras células NK autólogas que, además, pueden adquirir el ligando. Por último, se prueba que el tratamiento con vemurafenib de células metastásicas de melanoma con la mutación en BRAF^{V600E} induce una disminución de NKG2D-L y el ligando de DNAM-1, CD155, así como un aumento de MHC-I. Esta alteración del equilibrio entre señales activadoras e inhibitoras provoca una disminución en la actividad citotóxica de las células NK, que puede ser revertida con el inhibidor de desacetilasas de histonas, butirato sódico. Estos resultados implican un papel inmunomodulador de fármacos cuyo uso está, en principio, dirigido a la proliferación celular del tumor.

Todos estos datos establecen nuevos aspectos que contribuyen a comprender la complejidad del sistema NKG2D y permiten proponer nuevas estrategias terapéuticas y de seguimiento para los pacientes de cáncer.

Natural Killer (NK) cells play a key role in tumour control, and recognition by the activating receptor NKG2D of its ligands is particularly important for this activity, since although absent on healthy cells, NKG2D ligands (NKG2D-L) are expressed by stressed cells in different pathological situations. In addition to their localization in different cellular compartments and at the plasma membrane, NKG2D-L can also be shed to the extracellular milieu in exosomes or as soluble proteins. NKG2D-L shedding leads to receptor blocking and internalization in effector cells, reducing cytotoxic activity and aiding the tumour to evade immune responses. NKG2D-L can also transfer from the target cell and insert in the NK cell membrane as an intact molecule. Therefore, the role of NKG2D and its ligands in anti-tumour control depends on many factors, emphasizing the need to study different aspects of the biology of these molecules in order to understand their modulation in disease.

In this thesis, different aspects of NKG2D-L biology have been addressed: at a molecular level, studying the specific biochemical characteristics of the NKG2D-L, MICA, affecting its release in exosomes; at a cellular level, exploring the communication mediated by the transfer of NKG2D-L from the target cell to the NK cell; and finally, in a model of NK recognition of metastatic melanoma cells, studying how chemotherapeutic agents modulate NKG2D-L expression and the consequences for the NK cell response to the tumour.

The biochemical study of MICA*008 allele proved that it is not a transmembrane, but it is a GPI-anchored protein, an essential property for MICA*008 recruitment to specific sphingolipid enriched membrane regions, known as detergent resistant membranes (DRM), and exosomes. The work in this thesis showed that GPI-anchored NKG2D-L are transferred from target cells to NK cells. The transfer efficiency varied between different ligands and was influenced by their abundance in the target cell membrane. NK cells acquire the ligands, after a cytotoxic response, in a functional conformation, and these NK cells then become targets for other autologous NK cells, which can in turn acquire the ligand. Finally, although treatment of metastatic melanoma cells expressing the mutant BRAF^{V600E} protein with vemurafenib inhibited tumour cell growth, this therapy also downmodulated NKG2D-L and CD155 (DNAM-1 ligand) expression and increased MHC-I levels. These changes in the balance of activating and inhibitory signals, which reduced NK cell response, can be reversed by exposure to the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate. These results reveal a new immunomodulatory mechanism for drugs used in tumour chemotherapy.

These data together establish new aspects of the biology of NKG2D-L that increase our understanding of the NKG2D system complexity; allow the proposal of new therapeutic uses for certain drugs, and provide strategies for cancer patient classification.

Abreviaturas

7-AAD	7-aminoactinomicina D
ADCC	Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos
ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
APC	Aloficocianina
APCs	Células Presentadoras de Antígeno
ARN	Ácido RiboNucleico
ARNm	ARN mensajero
BRAF^{V600E}	BRAF con la mutación V600E
BSA	Albúmina de Suero Bovino
BUT	Butirato sódico
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
DAP10	<i>DNAX Adapter Protein of 10 kDa</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNAM-1	DNAX Accessory Molecule-1
DO	Densidad óptica
DRM	Membrana Resistente a Detergentes
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMA	Agencia Europea del Medicamento
Endo F	Endoglicosidasa F
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinases</i>
FBS	Suero Fetal Bovino
Fc	Fracción cristalizable de la inmunoglobulina
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína fluorescente verde
GPI	Glicosil-fosfatidil-inositol

h	horas
HCMV	Citomegalovirus humano
HDAC	Desacetilasas de histonas
HDACi	Inhibidor de desacetilasas de histonas
HLA	Antígeno Leucocitario Humano
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HS	Suero Humano AB masculino
IFN	Interferón
IgG	Inmunoglobulina G
IL	Interleuquina
ITAM	<i>Immunoreceptor Tyrosin-based Activating Motif</i>
ITIM	<i>Immunoreceptor Tyrosin-based Inhibitory Motif</i>
kDa	KiloDalton
KIR	<i>Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors</i>
LAMP1	<i>Lysosomal-Associated Membrane Protein-1</i>
MAPK	<i>Mitogen Activate Protein Kinase</i>
MEK	<i>MAPK ERK Kinase</i>
MFI	Intensidad Media de Fluorescencia
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
MHC-I	Complejo Principal de Histocompatibilidad de clase I
MIC	<i>MHC class-I-related Chain</i>
min	minutos
MMP	Metaloproteasa de matriz
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
n.s.	no significativo
NK	<i>Natural Killer</i>
NKG2	<i>Natural Killer Group 2</i>
NKG2D	<i>Natural Killer Group 2 D</i>
NKG2D-L	Ligando de NKG2D

NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
p	p-valor
PBA	PBS-BSA-Azida sódica
PBMC	Célula mononuclear de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PC7	PE-Cy7
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PD-1L	ligando de PD-1
PE	Ficoeritrina
PI3K	Fosfatidilinositol 3-quinasa
PI-PLC	<i>Phosphoinositide-specific phospholipase C</i>
PLX	PLX 4032, vemurafenib
rh-IL	Interleuquina humana recombinante
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Desviación estándar de la media
TNE	Tris-NaCl-EDTA
ULBP	<i>UL-16 Binding Protein</i>

Introducción

1. Las células *Natural Killer*

Las células *Natural Killer* (NK) o células asesinas naturales son linfocitos citotóxicos del sistema inmunitario. Su actividad se describió por primera vez en ratón en 1975, cuando se descubrieron unos linfocitos granulares de gran tamaño (*large granular lymphocytes*, LGL) capaces de matar células diana *in vitro*, sin exposición previa al antígeno (Herberman et al., 1975; Kiessling et al., 1975). Aunque inicialmente se pensó que se trataba de un artefacto o señal inespecífica en los ensayos de citotoxicidad, con el tiempo se ha ido demostrando que son fundamentales en el control de infecciones y progresión tumoral. Las células NK constituyen la tercera población de linfocitos más numerosa en sangre periférica, después de los linfocitos T y los linfocitos B, representando entre un 10 y un 15% de los linfocitos circulantes en humanos.

Las células NK humanas se caracterizan fenotípicamente por la expresión de CD56 (NCAM1, del inglés *Neural Cell Adhesion Molecule 1*), y la ausencia de expresión del marcador característico de las células T, CD3 (Robertson y Ritz, 1990). Existen diferentes subpoblaciones de células NK que muestran diferentes estados de maduración y especificidades funcionales. Las dos principales subpoblaciones se identifican por sus niveles de expresión de CD56: la mayoría ($\approx 90\%$) de las células NK humanas en sangre periférica tienen un nivel de expresión bajo (CD56^{tenue} o CD56^{dim}) y expresan niveles altos de CD16 (receptor de Fc γ III o Fc γ RIII); mientras que el $\approx 10\%$ de las células NK en periferia (aunque constituyen la práctica totalidad de la población NK en órganos linfoides secundarios), tienen niveles altos de expresión de CD56 (CD56^{brillante} o CD56^{bright}) y expresan niveles bajos o nulos de CD16 (Cooper et al., 2001).

La actividad de las células NK está implicada en la protección frente a células infectadas por virus y células tumorales (Cerwenka y Lanier, 2001; Orange y Ballas, 2006). La maquinaria lítica de estas células se basa en la liberación de sus gránulos líticos, que contienen perforina y granzimas, o a través de rutas relacionadas con receptores de muerte, tales como Fas o TRAIL (Smyth et al., 2005). Debido a su rápida respuesta, en ausencia de una estimulación antigénica previa, las células NK se clasificaron, en un principio, como parte del sistema inmunitario innato. Sin embargo, actualmente, se sabe que contribuyen a la generación de una respuesta inmunológica adaptativa a través de la producción de quimioquinas y citoquinas, principalmente IFN- γ , importante para la inducción de una respuesta inmunológica tipo Th1 (Martín-Fontecha et al., 2004), o TNF α , y, también, a través de la activación directa de células dendríticas (Fernandez et al., 1999; Gerosa et al., 2002; Orange and Ballas, 2006; Robertson, 2002). Además, las células NK presentan algunas características propias de las células del sistema inmunitario adaptativo, como por ejemplo, la expansión clonal o la generación de memoria inmunológica a largo plazo, descrita recientemente (Vivier et al., 2011). Como ya se ha descrito anteriormente, las subpoblaciones de las células NK se corresponden con sus diferencias funcionales, de tal manera que la actividad citotóxica suele estar ligada a las células CD56^{dim}, mientras que la secreción de citoquinas se asocia a la subpoblación CD56^{bright} (Caligiuri, 2008).

1.1 Receptores de las células NK

A diferencia de los linfocitos T, las células NK no requieren de reordenamiento genético de sus receptores, sino que para distinguir las células infectadas o transformadas, de las células sanas, las células NK presentan en su superficie un amplio repertorio de receptores activadores e inhibidores que reconocen a sus respectivos ligandos expresados en las células diana. Tras una compleja integración de señales derivadas de los distintos receptores, el equilibrio resultante conlleva a la activación o inhibición de la célula NK (Long et al., 2013; Vivier, 2004).

1.1.1 Receptores inhibidores de las células NK

Una de las primeras acciones que se descubrió en las células NK era la capacidad de matar células tumorales que no expresaban moléculas MHC de clase I (MHC-I). Esta característica hizo que los primeros receptores de células NK estudiados fueran los receptores inhibidores, ya que la mayoría de ellos reconocen estas moléculas MHC-I, en humano HLA-I, impidiendo la activación de las células NK frente a células propias. Las células NK presentan en su superficie un amplio repertorio de receptores inhibidores, que pertenecen a diferentes familias:

- La familia de los **receptores KIR** (del inglés, *Killer cell Immunoglobulin-like Receptors*) son los receptores inhibidores mejor estudiados. Reconocen específicamente las moléculas de MHC-I clásicas, HLA A, B y C (Colonna y Samaridis, 1995; Wagtmann et al., 1995), y también la no clásica HLA-G. Esta familia la componen receptores con distintas estructuras que se clasifican por tener 2 o 3 dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (KIR2D o KIR3D, respectivamente). También se distinguen por la longitud de su cola citoplasmática, pudiendo ésta ser corta (KIR2DS o KIR3DS) o larga (KIR2DL o KIR3DL). Esta característica estructural determinará la función del receptor, ya que los receptores KIR de cola larga presentan motivos de señalización inhibidora ITIM (del inglés, *Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*), y, por lo tanto, serán receptores inhibidores; mientras que los receptores KIR de cola corta, son activadores, ya que se asocian con proteínas adaptadoras que poseen motivos de señalización activadora ITAM (del inglés *Immunoreceptor Tyrosine-based Activating Motif*) (Frag y Caligiuri, 2006). Sin embargo, KIR2DL4 es activador (Rajagopalan et al., 2001), a pesar de su cola citoplasmática larga (Cantoni et al., 1998).
- La **familia LILR** (del inglés, *Leukocyte Immunoglobulin-like Receptors*) incluye receptores como ILT2 y ILT4, que son capaces de reconocer moléculas de MHC-I clásicas o no clásicas como HLAG- o HLA-F (Lepin et al., 2000; Navarro et al., 1999).
- A diferencia de los receptores anteriores que son monoméricos, el heterodímero **CD94-NKG2A** (Carretero et al., 1997) es un receptor inhibidor, cuyo ligando es la molécula de MHC-I no clásica, HLA-E (Lee et al., 1998). Aunque CD94 también puede formar heterodímeros con NKG2C, siendo en este caso un receptor activador.

- Además, las células NK también expresan receptores inhibidores que no reconocen moléculas de MHC-I como KLRG1, que reconoce cadherinas (Ito et al., 2006), o PD-1, que se une a PD-1 ligando (PD-1L) (Benson et al., 2010).

1.1.2 Receptores activadores de las células NK

Los receptores activadores comenzaron a ser estudiados tras conocer el papel de los receptores inhibidores, ya que había evidencias que sugerían la posible existencia de este tipo de receptores.

Los receptores activadores reconocen a las células diana, mediante diferentes estrategias:

- **NKG2D** (del inglés *Natural Killer Group 2 D*) es uno de los receptores activadores más potente y mejor caracterizado. Sus ligandos, pese a estar codificados en el genoma, no se expresan, o lo hacen a niveles bajos, en condiciones normales, pero aumentan en situaciones patológicas o de estrés celular. Debido a que en esta tesis se estudiarán varios procesos relacionados con los ligandos de NKG2D, se definirá este sistema con más detalle en el apartado 2.
- Los receptores de citotoxicidad natural o **NCRs** (del inglés, *Natural cytotoxicity Receptors*), NCR1 o NKp46, NCR2 o NKp44 y NCR3 o NKp30 (Moretta et al., 2000), tienen una expresión restringida a las células NK, aunque no todas expresan todos los componentes de la familia. Algunos de ellos, como NKp46 y NKp44, se pueden unir a moléculas no propias como las hemaglutininas virales (Arnon et al., 2001; Mandelboim et al., 2001). Sin embargo, el receptor NKp30 se une a B7-H6 (Brandt et al., 2009), molécula propia que se expresa en algunas células tumorales.
- **CD16** es un receptor de baja afinidad de la fracción Fc de la inmunoglobulina G1 (también llamado Fc γ RIII), que permite a las células NK reconocer células opsonizadas y mediar la citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADCC, del inglés *Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity*).
- Como ya se ha descrito en el apartado anterior, también hay receptores activadores en la familia de los KIR, o el heterodímero de CD94 con NKG2C.
- Otros receptores activadores son: DNAM-1 (CD226) que reconoce, en las células diana, al receptor del poliovirus (PVR, CD155) y a Nectina-2 (CD112), moléculas que aumentan su expresión en algunas células tumorales (Bottino et al., 2003; Pende et al., 2005); 2B4 (CD244), que se une a CD48 (Brown et al., 1998); CD2, que reconoce a LFA-3 (CD58) (McNerney y Kumar, 2006); NKp80, el cual se une a AICL (del inglés, *Activation-induced C-type Lectin*), receptor que aumenta su expresión en células mieloides a través de activación de TLRs (Welte et al., 2006); NKp65, que reconoce a KACL (del inglés, *Keratinocyte-Associated C-type Lectin*), expresado en queratinocitos (Spree et al., 2010).

- También se consideran receptores activadores de células NK, algunos TLRs (del inglés, *Toll-Like Receptors*), como TLR3 y TLR9, que pueden reconocer en el espacio intracelular oligodesoxinucleótidos que contienen dinucleótidos CpG desmetilados (Sivori et al., 2006).

1.1.3 Señalización de los receptores de las células NK

La mayoría de los receptores activadores no tienen motivos de señalización intracelular, por lo que, para la transducción de la señal, necesitan asociarse con moléculas adaptadoras. Estas moléculas adaptadoras, tienen uno (FcεRγI and DAP12), o varios (CD3-ζ) **motivos activadores (ITAM)**, o el motivo YXXM del adaptador DAP10, en el caso de NKG2D (Wu et al., 1999). Otras moléculas como SAP pueden también actuar como adaptadoras que transducen la señal activadora (Meinke y Watzl, 2013). Tras el reconocimiento del ligando, se activan las quinasas de la familia Src, que fosforilan los residuos tirosina de los ITAMs. Esta fosforilación provoca el reclutamiento y la activación de las tirosina quinasas Syk, o ZAP70 en el caso de adaptadores con ITAM, o fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y Grb2-Vav1, en el caso de DAP10. Finalmente, estas cascadas de señalización inducen procesos relacionados con la reorganización del citoesqueleto, el cual es necesario para la polarización de la célula NK y la liberación de los gránulos líticos, así como la transcripción de genes de citoquinas y quimioquinas (Lanier, 2008; Long et al., 2013).

En el caso de los receptores inhibidores, aunque todos ellos difieren en sus dominios extracelulares, comparten **motivos inhibidores (ITIM)** en su cola citoplasmática. De esta manera, cuando el receptor inhibidor reconoce a su ligando, las quinasas de la familia Src fosforilan el motivo ITIM, lo que provoca el reclutamiento de fosfatasas (como SHP-1, SHP-2 o SHIP). Estas fosfatasas desfosforilan proteínas implicadas en la activación de células NK, bloqueando, así, etapas tempranas de la activación (Lanier, 2008). Sin embargo, esta inhibición no afecta a la respuesta de las células NK frente a otros estímulos activadores (Eriksson et al., 1999).

1.1.4 Receptores de factores solubles

Las células NK expresan, de manera constitutiva, receptores para distintas moléculas solubles, tales como citoquinas y quimioquinas. El reconocimiento de algunas de ellas, desencadena procesos biológicos relacionados con supervivencia, proliferación o migración.

Las células NK presentan receptores para interleuquinas como IL-1, IL-2, IL-10, IL-12, IL-15 o IL-18. Uno de los receptores más estudiados es el de IL-2. Mientras que todas las células NK expresan el receptor de IL-2 de afinidad intermedia (IL-2Rβγ), sólo la población CD56^{bright} expresa constitutivamente el receptor de IL-2 de alta afinidad (IL-2Rαβγ) (Nagler et al., 1990). Además se conoce que el tratamiento de las células NK con IL-2 activa su capacidad citotóxica (Zwirner y Domaica, 2010), y que combinaciones de IL-12, IL-15 e IL-18 también activan a las células NK (Romee et al., 2012).

Todas las células NK expresan los receptores de quimioquinas CXCR3 y CXCR4. Mientras que otros, como CCR7, sólo se expresa en la subpoblación CD56^{bright}, lo cual podría explicar la localización de esta población en tejidos y el hecho de que la población CD56^{dim} sea la mayoritaria en circulación (Inngjerdingen et al., 2001; Maghazachi, 2010).

1.1.5 Moléculas de adhesión

Para el establecimiento de la sinapsis inmunológica entre la célula NK y la célula diana también son importantes las moléculas de adhesión. Se pueden englobar, dentro de estas moléculas, diferentes familias de proteínas como son las integrinas (como LFA-1, LFA-3, Mac-1, VLA-4 y VLA-5), los receptores de la superfamilia inmunoglobulina, selectinas, cadherinas y mucinas. Además receptores activadores como DNAM-1 y CD2, también tienen función en la adhesión celular. Otras moléculas implicadas en la adhesión son PSGL-1, CD96, CD44, ICAM-1, y PEN5 (Faray y Caligiuri, 2006; Helander y Timonen, 1998; Long et al., 2013).

1.2 Activación de las células NK

Como ya se ha descrito anteriormente, la activación de las células NK depende del equilibrio de señales procedentes de los diferentes receptores activadores e inhibidores. En primer lugar, la célula NK debe regular su activación para no responder frente a células sanas. Esto ocurre gracias a que los receptores inhibidores reconocen moléculas de MHC-I, que se expresan de manera ubicua en células sanas. Como consecuencia, se propuso la hipótesis de “**pérdida de lo propio**” o “*missing-self*”, según la cual, una disminución de los niveles de MHC-I, como ocurre en algunas células que sufren transformación tumoral o infecciones víricas, disminuiría la interacción con receptores inhibidores, y esta reducción de señales inhibitoras provocaría la activación de las células NK (Ljunggren y Kärre, 1990).

En otros casos, las células NK se activan al reconocer ligandos de los receptores activadores. En este contexto, se describió el modelo de “**inducción de lo propio**” o “*induced-self*”, el cual explica que moléculas propias que actúan como ligandos de receptores activadores, tienen niveles más altos en células estresadas, convirtiéndolas en células diana, como ocurre con los ligandos del receptor NKG2D (ver apartado 2). Sin embargo, otros receptores activadores pueden reconocer moléculas no propias que, por ejemplo, se expresen en las células diana infectadas por virus, como ocurre con NKp46 y NKp44 (Arnon et al., 2001; Mandelboim et al., 2001), lo cual se conoce como el modelo de “**inducción de lo no propio**” o “*induced-non-self*”.

Otro tipo de activación de las células NK muy importante en la respuesta a infecciones ocurre a través de CD16, dando lugar al mecanismo de **ADCC** (Ojo y Wigzell, 1978). CD16 reconoce la porción constante de la IgG en células opsonizadas. Estos anticuerpos, pueden proceder de células

plasmáticas, en el caso de la respuesta inmunológica adaptativa, o ser anticuerpos monoclonales utilizados como inmunoterapia.

Todas estas activaciones resultan, en último término, en la activación de la célula NK y la consecuente liberación de gránulos líticos y citoquinas, responsables de la lisis de la célula diana y la activación de otras células del sistema inmunitario, respectivamente. Debido a que las células NK sin activar presentan gránulos líticos preformados en su citoplasma, su activación debe ser un mecanismo muy regulado.

2. Receptor NKG2D y sus ligandos

El **receptor activador NKG2D**, también conocido como CD314, es uno de los receptores activadores mejor caracterizados. Se trata de un receptor transmembrana de tipo 2, perteneciente a la familia de las lectinas tipo C, que se encuentra en la superficie celular formando homodímeros. A pesar de encontrarse codificado en el llamado “Complejo NK” del cromosoma 12 (Houchins et al., 1991), presenta una secuencia muy diferente a otros miembros de la familia NKG2, codificados en la misma región. Como consecuencia, no se asocia a CD94 ni comparte los ligandos con otros miembros de la familia.

Este receptor se expresa en la membrana de todas las células NK humanas, pero además también funciona como receptor co-estimulador en linfocitos T CD8⁺ $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ y en linfocitos T CD4⁺ en contextos de enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, granulomatosis de Wegener o infección por citomegalovirus humano (HCMV) (Allez et al., 2007; Capraru et al., 2008; Groh et al., 2003; Raulet, 2003; Sáez-Borderías et al., 2006). La expresión de NKG2D puede modularse por la acción citoquinas, como IL-2, IL-12, IL-15, IL-8 y IL-21 que aumentan su expresión, o TGF- β e IFN- γ que la disminuyen (Burgess et al., 2008; Friese et al., 2004; Horng et al., 2007; Takaki et al., 2005; Zhang et al., 2008b, 2005). Para la transducción de la señal activadora, el receptor NKG2D humano se asocia a homodímeros de la molécula adaptadora DAP10, formando hexámeros (Garrity et al., 2005).

Hay una gran variedad de **ligandos** de NKG2D (NKG2D-L) descritos, lo cual demuestra la plasticidad de este receptor. Estos ligandos pertenecen a dos familias relacionadas con las moléculas de MHC-I: la familia MIC (del inglés, *MHC class I chain-related proteins*), y los ULBP (del inglés, *ULI6 binding proteins*).

La **familia MIC** está formada por los genes MICA y MICB. Son moléculas de MHC-I no clásicas codificadas en la región MHC humana, altamente glicosiladas. Estos ligandos poseen, dominios $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$ homólogos a MHC, pero no se asocian con $\beta 2$ -microglobulina, ni presentan péptidos antigénicos. Se trata de una familia muy polimórfica: hay descritos más de 100 alelos para MICA y más de 40 para MICB (Steven GE Marsh, Anthony Nolan Research

Institute, <http://hla.alleles.org/terms.html>). Uno de los polimorfismos más curiosos se debe a la inserción de nucleótidos en la región transmembrana de MICA, siendo el más común el triplete GCT, que da lugar a varios residuos alanina (entre 4 y 9). De esta manera, los alelos de MICA se pueden agrupar en función de las repeticiones de alanina en la región transmembrana, perteneciendo al grupo A4, aquellos alelos con 4 alaninas, al grupo A5, si contiene 5 alaninas, y así sucesivamente. Una excepción en esta clasificación es el grupo de alelos MICA5.1, (al que pertenecen alelos como MICA*008, MICA*023, MICA*028 o MICA*054). Estos alelos son altamente frecuentes en distintas poblaciones mundiales (con una frecuencia alélica de entre 21-47%) (Poulikakos et al., 2010; Romphruk et al., 2001; Tian et al., 2001; Zhang et al., 2002, 2001) y se caracterizan por la inserción de un nucleótido que cambia la fase de lectura, dando lugar a una señal de parada temprana, y por lo tanto, a una proteína truncada (Ota et al., 1997). Esta secuencia sugiere que este ligando tiene una cola citoplasmática corta, lo cual podría conferirle características particulares (Figura 1). Algunos alelos de MICA se encuentran asociados con enfermedades como Crohn, diabetes mellitus tipo 1, artritis reumatoide, psoriasis o enfermedad de Behçet (Bahram et al., 2005).

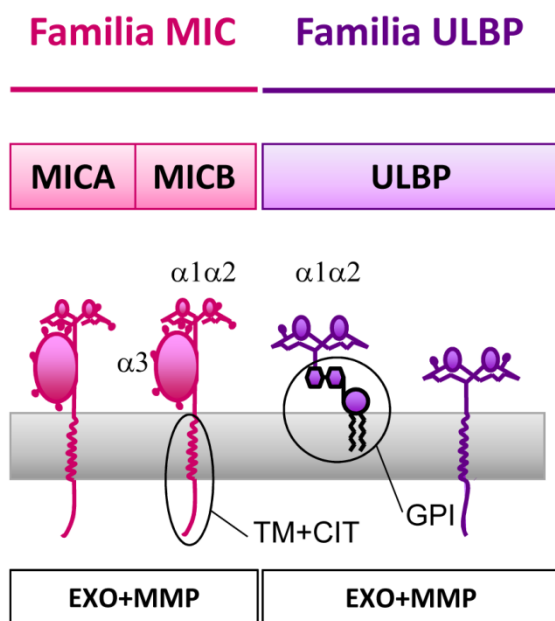


Figura 1. Familias de ligandos de NKG2D. Los NKG2D-L pertenecen a dos familias de proteínas relacionadas con moléculas de MHC clase I: MIC y ULBP. Pueden ser proteínas con una región transmembrana (TM) y citoplasmática (CIT) o ancladas mediante Glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), y se liberan al medio extracelular formando parte de exosomas (EXO) o por la acción de metaloproteasas de matriz (MMP). Adaptado de López-Cobo et al., 2016.

La **familia ULBP** son un total de 6 proteínas que deben su nombre a que se descubrieron buscando los ligandos de la glicoproteína de HCMV, UL16, aunque también se conocen como RAET1 (del inglés, *Retinoic Acid Early Transcripts*) (Cosman et al., 2001; Eagle et al., 2009a, 2009b). Se codifican en el otro brazo del cromosoma 6, fuera del locus MHC. Aunque también están relacionados con MHC, poseen sólo los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. La mayoría de los ULBP tienen un anclaje glico-lipídico GPI (Glicosil-fosfatidil-inositol) para unirlos a la membrana, mientras que ULBP4 es transmembrana (Bacon et al., 2004; Chalupny et al., 2003) y ULBP2 y ULBP5 se pueden encontrar en ambas formas (Fernandez-Messina et al., 2011; Ohashi et al., 2010). La presencia de los dos tipos de anclaje (transmembrana o GPI) en los NKG2D-L es llamativa y sugiere que podrían

desempeñar diferentes funciones biológicas (Figura 1). Además, en los genes de ULBP se han descrito polimorfismos de nucleótido único (SNP, del inglés *single nucleotide polymorphism*) tanto en la región del promotor como en la región codificante, aunque el número de estos variantes es menor que en la familia MIC (entre 1 y 6) (Antoun et al., 2010).

2.1 Regulación de los ligandos de NKG2D

Como ya se ha descrito anteriormente, los NKG2D-L no se expresan en células sanas o lo hacen en niveles bajos, excepto en células epiteliales del intestino (Groh et al., 1996). En general, el nivel de expresión de estos ligandos aumenta en células sometidas a distintos tipos de estrés, como puede ser el causado por transformación tumoral, infecciones virales o bacterianas, o enfermedades autoinmunes. Se han identificado diferentes mecanismos que pueden causar esta modulación: choque térmico, aumento de la tasa de proliferación, estrés oxidativo, daño al ADN, inhibición del proteasoma o de desacetilasas de histonas, o microARNs. Además, se han encontrado evidencias de la regulación de los NKG2D-L en los distintos niveles de su biogénesis, desde la transcripción, la estabilización del ARN o la proteína, y su corte y liberación (ver apartado 2.2) (Huergo-Zapico et al., 2014; Raulet et al., 2013). Es de gran importancia conocer estos mecanismos de regulación, ya que tienen efectos distintos dependiendo de cada NKG2D-L, del tipo celular y de su estado metabólico. También se ha descrito que diferentes citoquinas pueden modular la expresión de NKG2D-L en células del sistema inmunitario como: MICA y MICB en células dendríticas por la acción de IFN α ; ULBP1 en monocitos en respuesta a factores de crecimiento e IFN γ ; o ULBP1, ULBP2, ULBP3 y MICA en macrófagos activados con LPS (Mistry y O'Callaghan, 2007). Sin embargo, en células tumorales se ha descrito que IFN γ disminuye los niveles de MICA y ULBP2 (Schwinn et al., 2009) mientras que IFN α tiene el efecto contrario (Zhang et al., 2008a).

2.2 Liberación de ligandos de NKG2D

Los NKG2D-L pueden liberarse al medio extracelular en forma soluble, por la acción de metaloproteasas, o incluidos en las vesículas extracelulares denominadas exosomas. Por tanto, conocer los mecanismos implicados en esta liberación es de gran importancia, para entender los efectos en la respuesta de las células NK.

El primer ligando soluble descrito fue MICA, presente en sueros de pacientes con cáncer de pulmón, mama y gastrointestinal (Groh et al., 2002; Salih et al., 2002). Después, se han encontrado MICB y ULBP solubles en una gran variedad de tumores (revisado en Raulet et al., 2013). Diferentes miembros de las familias de metaloproteasas pertenecientes a la familia MMP (del inglés, *matrix metalloproteases*) y ADAM (desintegrina y metaloproteinasas) se han descrito como responsables del corte proteolítico de los NKG2D-L, (revisado en López-Cobo et al., 2016). Además de la acción de las metaloproteasas, Kaiser y colaboradores describieron que para el corte de MICA también es necesaria su asociación con ERp5 (Kaiser et al., 2007).

Los NKG2D-L pueden ser liberados al medio extracelular incluidos en **exosomas** (Ashiru et al., 2010; Fernandez-Messina et al., 2010). Los exosomas son vesículas pequeñas de 30-150 nm de diámetro que se originan a partir de la invaginación de la membrana del endosoma, a lo largo de la ruta endocítica, dando lugar a un conjunto de pequeñas vesículas y membranas internas dentro de los cuerpos multivesiculares. Cuando este orgánulo se fusiona con la membrana plasmática, los exosomas que contiene son liberados al medio extracelular, con la particularidad de presentar las proteínas de membrana en la misma orientación que en la membrana plasmática. La composición de los exosomas ha sido muy estudiada, presentando moléculas que son reclutadas desde la célula de origen, y que incluyen: lípidos, proteínas (receptores, ligandos, factores de transcripción o enzimas) y ácidos nucleicos (ADN, ARNm, microARN y otros ARN no codificantes). Debido a su origen, los exosomas se caracterizan por la presencia de marcadores de la ruta endosomal, como son las tetraspaninas (Zöller, 2009). Estas vesículas son consideradas vehículos de información, ya que tienen un papel importante en la comunicación intercelular local y sistémica, transfiriendo las moléculas que contienen y pudiendo afectar a la función de otras células (revisado en Raposo y Stoorvogel, 2013).

La liberación como molécula soluble al medio extracelular varía entre los diferentes NKG2D-L. Esta liberación va a depender de su susceptibilidad a la acción de las metaloproteasas y a diferentes factores que afectan a su permanencia en la membrana plasmática, como pueden ser procesos relacionados con la endocitosis y su posterior degradación (Aguera-Gonzalez et al., 2009; Fernández-Messina et al., 2016, 2010). Por ejemplo, el corte proteolítico es más común en ULBP2, mientras que ULBP3 se libera incluido en exosomas (Fernández-Messina et al., 2010). También ocurre algo parecido con diferentes alelos de MICA, mientras algunos son más susceptibles de proteólisis, MICA*008 es liberado principalmente en exosomas. En concreto, se relaciona la diferente estructura de este NKG2D-L, perteneciente al grupo A5.1, con su capacidad para ser liberado en exosomas (Ashiru et al., 2010), lo cual suma interés a dilucidar las propiedades particulares de esta proteína para anclarse a la membrana plasmática y para liberarse en exosomas (Figura 1).

Conocer la biología celular de los NKG2D-L y, en concreto, su modo de liberación es muy importante, ya que tiene varias consecuencias en la modulación de la activación de células efectoras que expresen NKG2D: 1) la liberación de ligandos puede provocar, de una manera directa, una reducción en sus niveles en la superficie celular, disminuyendo su capacidad de activar a la célula efectora; 2) los ligandos solubles se pueden unir al receptor y, así, bloquearlo, o provocar su internalización (Salih et al., 2008), desensibilizando, de esta forma, a la célula efectora a través de NKG2D (Figura 2). Además, los NKG2D-L en exosomas pueden provocar un efecto en el receptor más potente, debido a su forma multimérica, que aumenta la avidéz al compararlo con las proteínas solubles monoméricas que se liberan por la acción de metaloproteasas (Ashiru et al., 2010;

Fernández-Messina et al., 2010). Por todo ello, mientras que la expresión de NKG2D-L en tumores es una señal de buen pronóstico, no lo es la expresión de estos ligandos en sus formas solubles. De hecho, hay muchos datos publicados que relacionan niveles altos de ligandos solubles en suero de pacientes con mal pronóstico, como en el caso de tumores de colon (Dobrovina et al., 2003), próstata (Wu et al., 2004), o melanoma (Paschen et al., 2009). Sin embargo, también se ha observado el efecto contrario con los niveles de MICA soluble y los datos de supervivencia de pacientes con adenocarcinoma cervical (Samuels et al., 2015).

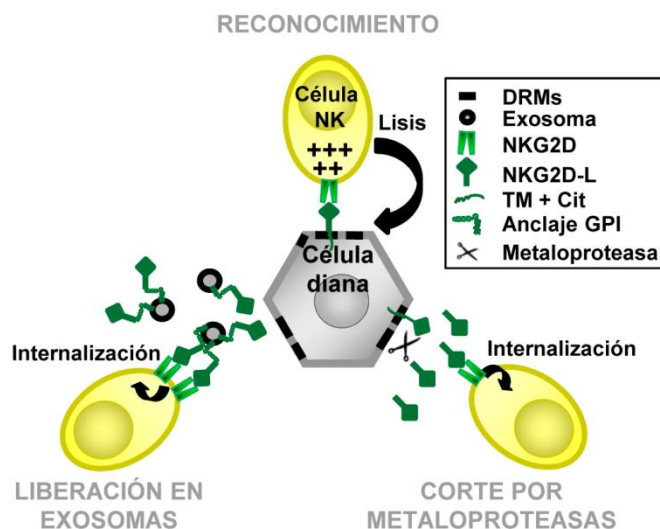


Figura 2. Biología de los ligandos de NKG2D. Cuando NKG2D reconoce sus ligandos expresados en las células diana provoca la activación de la maquinaria lítica de la célula efectora y, finalmente, la muerte de la célula diana. Los ligandos de NKG2D pueden ser liberados en exosomas o por la acción de metaloproteasas, provocando el bloqueo y la internalización del receptor. Adaptado de López-Cobo et al., 2016.

Además de la liberación de NKG2D-L en exosomas o por la acción de metaloproteasa, se ha visto que ULBP4 y ULBP5 también son secretados por mecanismos de procesamiento alternativo (Bacon et al., 2004; Cao et al., 2007).

3. Papel de las células NK y el sistema NKG2D en el reconocimiento de melanoma

El melanoma está descrito como uno de los tumores más inmunogénicos, lo que ha llevado a estudiar la respuesta inmunológica frente a melanoma y desarrollar multitud de terapias relacionadas con el sistema inmunitario desde los años 80. Sin embargo, estas terapias no llegaron a utilizarse de manera generalizada. Un aspecto a tener en cuenta es que, mientras se desarrollaban estas terapias, no se había estudiado en detalle la biología de las células NK. En cambio, en la actualidad se conoce que estas células reconocen a las células de melanoma, por lo que podrían tener un papel importante en algunas de las inmunoterapias que fueron investigadas. Además, un hecho que apoya la importancia del sistema inmunitario en su acción frente a melanoma, son los buenos

resultados obtenidos recientemente con las inmunoterapias basadas en puntos de control inmunológico.

3.1 Células NK y sistema NKG2D en cáncer

La primera vez que se relacionó a las células NK con la función antitumoral fue en los años 80, ya que se encontró la relación entre inmunodeficiencias que afectaban a la función NK y un aumento en la incidencia de cáncer. Esta función antitumoral también se ha demostrado en modelos murinos con actividad NK reducida o células NK deplecionadas, aumentando el crecimiento de tumores y metástasis. Además, en humanos, se observó esta relación en el sentido contrario, las células NK de pacientes con tumores presentaban una menor actividad. En este sentido, un estudio epidemiológico que se realizó durante 11 años, demostró la asociación de una baja actividad NK con mayor riesgo de desarrollo de tumores (Imai et al., 2000). Asimismo, apoyando el papel de las células NK en la eliminación de tumores, se ha relacionado un mayor infiltrado de células NK en los tumores con mejor pronóstico (Coca et al., 1997; Ishigami et al., 2000; Villegas et al., 2002). Sin embargo, la presión ejercida por el continuo contacto de las células tumorales con las células NK, podría conllevar al desarrollo de tumores más resistentes a las estrategias de evasión.

En concreto, el sistema NKG2D es relevante en la actividad anti-tumoral, ya que se ha visto tanto la expresión de NKG2D-L en multitud de tumores (Nausch y Cerwenka, 2008), como la detección de ligandos solubles en el suero de pacientes. Además, se ha observado mediante experimentos con modelos murinos deficientes en NKG2D o neutralizando el receptor, que los ratones eran más susceptibles a procesos tumorigénicos (revisado en Morvan y Lanier, 2015).

3.2 Melanoma cutáneo metastásico

El melanoma es un tumor maligno de los melanocitos, células productoras de melanina situadas en la capa más profunda de la piel. El melanoma se manifiesta normalmente como cáncer de piel (95% de los casos), aunque también puede aparecer en mucosas o en la úvea ocular. Los **factores de riesgo** de melanoma pueden ser: intrínsecos, como factores genéticos, la presencia de nevos melanocíticos congénitos o la pigmentación de la piel; o extrínsecos, como la exposición solar y ultravioleta, siendo más peligrosa cuando ésta es aguda e intermitente (Gandini et al., 2005; Miller y Mihm, 2006). La **incidencia** del melanoma ha aumentado en los últimos 40 años (Siegel et al., 2016). Pese a ser uno de los tumores de piel menos frecuentes, presenta la mayor tasa de mortalidad (75%) (Jerant et al., 2000) que se debe, principalmente, a la capacidad metastásica de estos tumores. Cuando el tumor es diagnosticado en fases tempranas, el 95% de los pacientes sobreviven, mientras que el 75% de los pacientes con melanoma que presentan metástasis no supera un año de vida. Las impactantes cifras de mortalidad de este tipo de tumor, muestran la importancia de mejorar el diagnóstico temprano y encontrar tratamientos que controlen las fases avanzadas (Garbe y Leiter, 2009).

3.3 Respuesta de las células NK frente a melanoma

Las células NK se acumulan en los nódulos linfáticos con metástasis de células de melanoma, pudiendo lisarlas tras la activación con citoquinas (Ali et al., 2014; Messaoudene et al., 2014). Sin embargo, las células NK no sólo participan en la lisis de células de melanoma, sino que también secretan citoquinas y promueven la maduración de APCs (células presentadoras de antígeno), participando así en la respuesta inmunológica adaptativa frente a este tipo de tumor. En concreto, en melanoma hay dos evidencias que parecen indicar que las células NK podrían tener un papel fundamental en la eliminación de este tipo de tumores: las células de melanoma tienen niveles reducidos de moléculas de HLA y expresan ligandos de receptores activadores.

Uno de los mecanismos de evasión de las células de melanoma se basa en alteraciones en la expresión de **moléculas MHC de clase I**, lo cual impide su reconocimiento por parte de las células T (Garrido et al., 2010) y es una limitación para las inmunoterapias que se centran en la actividad citotóxica de estas células. Sin embargo, la reducción de MHC-I puede facilitar la activación de las células NK, ya que esto implica una pérdida de señalización a través de los receptores inhibidores. Estas alteraciones en la expresión de MHC-I pueden ser causadas por varios mecanismos: mutaciones en el gen de la beta-2 microglobulina, reducción de la transcripción de los genes de HLA-I o pérdida de heterocigosidad del cromosoma 6 (Mendez et al., 2009; Zhao et al., 2016), y se pueden clasificar en: reversibles, mediante el tratamiento con citoquinas; o irreversibles, asociadas a progresión tumoral. Además de alteraciones en moléculas clásicas de HLA, en melanoma también se ha observado un aumento de las moléculas de HLA no clásicas como HLA-G (Rebmann et al., 2007), así como un aumento en las moléculas de HLA-I (Balsamo et al., 2012).

Las células NK también reconocen a las células de melanoma gracias a los receptores NKG2D, Nkp46 y DNAM-1 (Casado et al., 2009; Lakshmikanth et al., 2009). En melanoma se ha encontrado la expresión de **ligandos de NKG2D y DNAM-1**, así como de ligandos de NCR, aunque sobre estos últimos, los datos en la literatura son más controvertidos. Los NKG2D-L pertenecientes a la familia MIC son más frecuentes que ULBP en melanoma, y aparecen más en lesiones metastásicas. Aunque se ha visto que, en particular, MICA, se expresa más en melanoma primario que en metástasis (revisado en Morgado et al., 2011). En cuanto a los ligandos de DNAM-1, CD155 se encuentra con mayor frecuencia que CD112, y son más frecuentes en metástasis que en lesiones primarias. Frente a estos sistemas de activación, también se han descrito distintos mecanismos de evasión como: la reducción de la expresión de ligandos (MICA y ligandos de NCR); el aumento de la liberación de NKG2D-L (MICA y ULBP2) (Paschen et al., 2009); la reducción en la expresión del receptor activador, Nkp30; o la secreción de las citoquinas, IFN- γ e IL-10, que provocan una reducción en los niveles de expresión de NKG2D-L (Schwinn et al., 2009; Serrano et al., 2011). Además de estos mecanismos de evasión, se ha observado en células NK de pacientes con melanoma metastásico, una reducción en la expresión de NKG2D, que se relaciona con una reducción en la capacidad citotóxica

de estas células, demostrando el papel de este receptor en la respuesta frente a melanoma (Konjević et al., 2009; Morgado et al., 2011; Tarazona et al., 2015).

3.4 Tratamientos para el melanoma cutáneo

El melanoma es uno de los tumores más estudiados, debido a su importancia clínica, y se han intentado utilizar multitud de tratamientos para luchar contra este tipo de tumor tan agresivo. El tratamiento del melanoma se puede abordar de diferentes formas dependiendo de su estadio. Así, en etapas tempranas cuando los tumores primarios miden menos de 1 mm, se practica la resección quirúrgica. También se utilizan terapias convencionales de radioterapia y quimioterapia. Muchos de los tratamientos quimioterapéuticos se centraron en la eliminación de las células tumorales mediada por mecanismos relacionados con la apoptosis. Sin embargo, es posible que la resistencia que presentan las células de melanoma a mecanismos de inducción de apoptosis (Soengas y Lowe, 2003), sea responsable de la baja eficacia de estos tratamientos.

A continuación se describirán las terapias frente a melanoma metastásico más importantes que se han desarrollado a lo largo del tiempo, y que pueden clasificarse en dos tipos de terapias: la inmunoterapia y la terapia dirigida.

3.4.1 Inmunoterapias

En los últimos 30 años, se han estudiado diferentes tipos de inmunoterapia frente a melanoma, aunque actualmente han cobrado gran importancia los tratamientos con anticuerpos monoclonales por el éxito obtenido. Steven A. Rosenberg fue el pionero en demostrar el papel del sistema inmunitario en la regresión de melanoma, siendo el tratamiento con **altas dosis de IL-2**, la primera inmunoterapia aprobada por la FDA (Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos) en 1998 (Kammula et al., 1998), aunque la tasa de respuesta a este tratamiento fue baja y provocaba una toxicidad alta. También se probaron otras terapias sistémicas con citoquinas, como por ejemplo con IFN α 2b (Tsao et al., 2004). Por otra parte, la vacunación terapéutica ha sido otra estrategia seguida para el tratamiento del melanoma.

La **transferencia celular adoptiva**, utilizando linfocitos T autólogos, también ha sido una inmunoterapia estudiada en melanoma. En este sentido, fueron muy famosos los estudios con linfocitos activados con IL-2 (Rosenberg y Restifo, 2015), en los que las células NK podrían tener un papel muy importante, ya que pueden activarse por esta citoquina. Aunque los resultados de regresión son buenos, todavía existen limitaciones técnicas y económicas con este tipo de terapias. Un avance muy reciente en esta técnica, consiste en modificar las células genéticamente para que expresen receptores quiméricos, conocidos como **CAR** (del inglés, *Chimeric Antigen Receptor*), que reconocen, en este caso, antígenos específicos de melanoma y tienen fusionado un dominio de señalización, de tal manera que el linfocito T puede responder sin necesidad de señales de co-

estimulación. La limitación que se puede encontrar en estas terapias es la reducción de la expresión de antígenos de melanoma, necesarios para este tipo de respuestas (Rosenberg et al., 2008).

Recientemente, han cobrado gran importancia las inmunoterapias basadas en puntos de control inmunológico, que se describirán en más detalle en el apartado 3.4.3. Además, otro tratamiento reciente es la **viroterapia oncolítica**, basada en la replicación vírica en células tumorales y su posterior reconocimiento por células del sistema inmunitario también está dando algunos resultados positivos. El uso de uno de estos virus, T-VEC (Talimogene laherparepvec), fue aprobado por la EMA (Agencia Europea del Medicamento) en diciembre de 2015. Se trata de un virus HSV (del inglés, *Herpes Simplex Virus*) tipo I modificado genéticamente para producir GM-CSF, y es el único que ha demostrado efectos beneficiosos para pacientes con melanoma (Kohlhapp y Kaufman, 2016).

3.4.2 Terapias dirigidas: Vemurafenib

Las terapias dirigidas se desarrollaron cuando se conocieron en detalle las mutaciones más comunes en melanoma (revisado en (Fiskus y Mitsiades, 2016) y (Tran et al., 2016)). Entre las muchas modificaciones genéticas que se han encontrado en melanoma hay mutaciones puntuales, reordenamientos de cromosomas o mutaciones relacionadas con las rutas de BRAF y NRAS (Berger et al., 2012). Las mutaciones más frecuentes en melanoma se dan en proteínas de la ruta de las MAPK (del inglés, *Mitogen Activate Protein Kinase*), implicadas en la progresión tumoral. Por ello, varias terapias se basan en inhibidores específicos de las formas mutadas de estas proteínas (Gray-Schopfer et al., 2007). También se han estudiado terapias dirigidas a proteínas de la ruta PI3K o el inhibidor de quinasas de amplio espectro, sorafenib, sin embargo para una buena eficacia es necesaria la combinación con otros quimioterapéuticos (Flaherty, 2006)

En 2002 se descubrió que la mayoría de las mutaciones encontradas en las lesiones de melanoma ocurrían en la proteína quinasa, B-RAF (BRAF). En concreto, aproximadamente el 50% de las lesiones de melanoma presentan una mutación que implica el cambio de un ácido glutámico por una valina en el codón 600, **BRAF^{V600E}** (Davies et al., 2002). BRAF es uno de los 3 miembros de la familia RAF (Ikawa et al., 1988), siendo el más potente activando MEK. La mutación V600E ocurre en el dominio quinasa, y cambia la conformación de la proteína, de manera que permanece siempre en su forma activa. La activación constitutiva de BRAF^{V600E} provoca la activación de la ruta de señalización MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK), relacionada con procesos de proliferación, supervivencia y angiogénesis, y por lo tanto, contribuyendo al progreso tumoral (Gray-Schopfer et al., 2007; Solit et al., 2006) (Figura 3). Por esta razón, se pensó en BRAF^{V600E} como diana terapéutica, y se generaron varios fármacos para inhibir esta forma mutada de la proteína, entre ellos vemurafenib (Roche) y dabrafenib (GSK2118436).

Vemurafenib (PLX 4032) fue aprobado por la FDA en 2011 (Flaherty et al., 2011) y por la EMA en 2012 para el tratamiento de pacientes de melanoma metastásico que presentaran lesiones con

BRAF^{V600E}. La aproximación utilizada en su descubrimiento fue basada en su estructura, y una posterior selección de moléculas pequeñas con propiedades químicas específicas (Bollag et al., 2012, 2010; Tsai et al., 2008). El tratamiento con vemurafenib afecta a la activación de la ruta de las MAPK, con disminución de fosforilación de ERK, parada del ciclo celular, y apoptosis en experimentos *in vitro*, mientras que *in vivo* también se ha observado regresión tumoral. Sin embargo, estos efectos sólo se observan en células con BRAF mutado, ya que en las células con la forma de BRAF silvestre tratadas con vemurafenib se activa la ruta de las MAPK (Joseph et al., 2010; Søndergaard et al., 2010; Yang et al., 2010). El tratamiento con vemurafenib funciona en el 50% de los pacientes y, por lo general, se trata de una respuesta rápida, con buenos datos de supervivencia (Sosman et al., 2012).

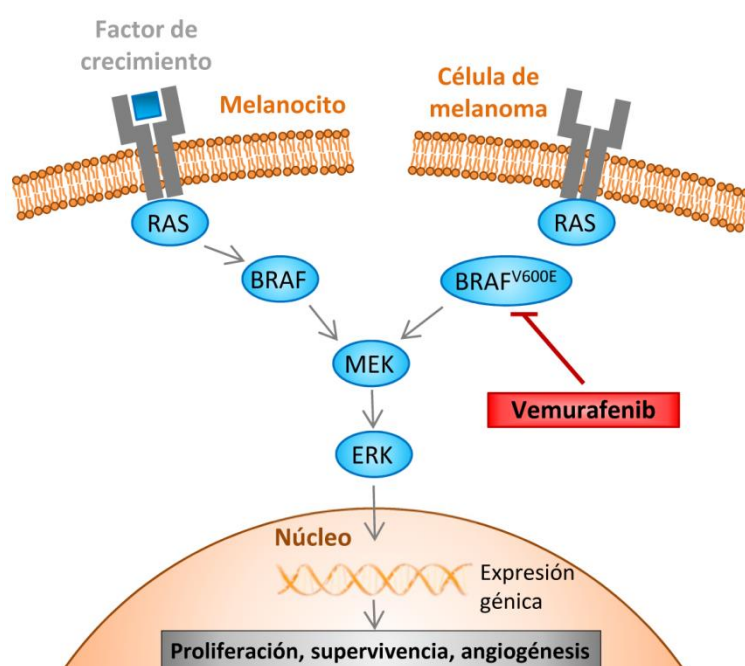


Figura 3. **Acción de Vemurafenib.** Esquema simplificado de la ruta de señalización RAS-RAF-MEK-ERK en melanocitos y células de melanoma con BRAF^{V600E}, indicando el punto de inhibición de vemurafenib.

A pesar de sus buenos resultados, el tratamiento da lugar a la rápida aparición (6 meses) de mecanismos de **resistencia**. Los mecanismos que se han estudiado relacionados con la resistencia implican reactivación de la ruta de señalización de las MAPK o PI3K, como: amplificación de BRAF^{V600E}; nuevas mutaciones en *BRAF* o en genes de otras proteínas de su ruta de señalización; activación de proteínas implicadas en la ruta de las MAPK por rutas alternativas de señalización; sobreexpresión de moléculas anti-apoptóticas o factores de transcripción que promueven la proliferación; autofagia e interacciones entre la célula tumoral y el microambiente, como la activación de fibroblastos asociados a melanoma (revisado en Fiskus y Mitsiades, 2016). Además de la resistencia al fármaco, otro problema del tratamiento con vemurafenib es la aparición de **tumores secundarios**. Como ya ha sido mencionado, el tratamiento con vemurafenib provoca la activación de la ruta de las MAPK en células que tienen la forma no mutada de BRAF (Poulikakos et al., 2010). Por ello, en los pacientes tratados con vemurafenib es frecuente la aparición de tumores dependientes

de Ras, como carcinoma cutáneo de células escamosas, pólipos gastrointestinales, cáncer de vejiga o leucemia. Para evitar estos tumores y las resistencias provocadas por reactivación de la ruta de las MAPK, se está probando actualmente la combinación de vemurafenib con el inhibidor de MEK, cobimetinib. Esta combinación mejora los datos de respuesta y reduce la aparición de tumores secundarios, aunque el tratamiento genera más toxicidad en los pacientes (revisado en Eroglu y Ribas, 2016).

Dabrafenib presenta resultados muy similares a los observados con vemurafenib (Falchook et al., 2012). En 2013, este tratamiento fue aprobado por la FDA para el melanoma metastásico. Para evitar resistencias y tumores secundarios, también se está probando su tratamiento en combinación con un inhibidor de MEK, el cual fue aprobado por la FDA en 2013 (Long et al., 2016) (revisado en Fiskus y Mitsiades, 2016).

Aunque estos fármacos se diseñaron para bloquear la ruta MAPK, pueden afectar a otras funciones celulares. Entre ellas, es importante estudiar los efectos de estos tratamientos en el sistema inmunitario. Varios estudios han relacionado el tratamiento con vemurafenib con procesos relacionados con el aumento de la respuesta inmunológica. Por ejemplo, se observó que el tratamiento con vemurafenib reducía la inducción de MDSC (del inglés, *Myeloid-derived Suppressor cells*) por las células tumorales (Schilling et al., 2013), y aumentaba la expresión de antígenos de melanoma, cuya reducción previa se encuentra asociada a la mutación V600E en BRAF (Boni et al., 2010; Kono et al., 2006). Además, los inhibidores de BRAF aumentaban la infiltración de linfocitos T citotóxicos al tumor (Frederick et al., 2013; Wilmott et al., 2012). Como ya se ha mencionado anteriormente, las células NK pueden responder frente a células NK a través de NKG2D. En este sentido, se ha descrito que las células NK son las responsables del control de la metástasis en un modelo murino tratado con terapias dirigidas a BRAF^{V600E} (Ferrari de Andrade et al., 2014). Por todo ello, un objetivo de esta tesis doctoral persigue comprobar si vemurafenib podría tener algún papel en la modulación de la respuesta NK a través de NKG2D. Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, se han puesto en marcha numerosos ensayos clínicos utilizando diferentes anticuerpos monoclonales dirigidos frente a puntos de control inmunológico, demostrando la importancia de la respuesta inmunológica en la eliminación de las células de melanoma.

3.4.3 Inmunoterapias basadas en puntos de control inmunológico

La inmunoterapia basada en el bloqueo de **puntos de control inmunológico** ha cobrado recientemente gran importancia para el tratamiento del melanoma, debido a los buenos resultados obtenidos en los ensayos clínicos. Estos tratamientos buscan aumentar la respuesta de los linfocitos T bloqueando señales inhibitoras procedentes de receptores como CTLA-4 (del inglés, *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*), PD-1 (del inglés, *Programmed cell Death protein 1*) o su ligando PD-L1. Ipilimumab (BMS), anticuerpo dirigido frente a CTLA-4, fue el primero en aprobarse por la FDA en

2011. Este tratamiento aumenta la supervivencia media (Hodi et al., 2010; Robert et al., 2011), aunque el porcentaje de pacientes que responden es muy bajo, aproximadamente 10%. Sin embargo, los pacientes que responden aumentan la supervivencia a largo plazo, algunos incluso más de 10 años (Page et al., 2014; Schadendorf et al., 2015). Más tarde, en 2014, se aprobaron por la FDA anticuerpos frente a PD-1, como nivolumab (BMS), y PD-L1, como pembrolizumab (MSD). Ambos anticuerpos en combinación, y nivolumab en monoterapia, mejoraban los resultados de respuesta en comparación con ipilimumab (Robert et al., 2015). Nivolumab e ipilimumab, en combinación, es un tratamiento que fue aprobado por la EMA en mayo del 2016 (Franklin et al., 2016), ya que mejoran los datos de respuesta, aunque aparecen más efectos secundarios (Larkin et al., 2015; Postow et al., 2015).

A pesar de los buenos resultados que presentan estas últimas terapias, aún siguen presentando limitaciones. En el caso de las terapias dirigidas, aunque la tasa de éxito es alta, es frecuente la aparición temprana de resistencias. Sin embargo, las inmunoterapias basadas en el bloqueo de puntos de control inmunológico, generan respuestas mantenidas, incluso en largos períodos de tiempo, pero en un porcentaje reducido de pacientes. Por estas razones, los futuros retos en el tratamiento del melanoma avanzado giran alrededor de dos conceptos: encontrar biomarcadores que ayuden a decidir la terapia a seguir en cada paciente, y seleccionar la combinación de terapias que logre mejorar los resultados en los distintos pacientes (Zhu et al., 2016).

3.4.4 Terapias basadas en la actividad de las células NK

Pese a que son muchas las evidencias que demuestran la importancia de las células NK en la lucha frente a tumores, han quedado relegadas a un segundo plano en el desarrollo de inmunoterapias. Se están empezando a desarrollar algunas inmunoterapias dirigidas a la actividad de las células NK, como: anticuerpos monoclonales frente a KIR, en monoterapia o en combinación con ipilimumab, o anticuerpos dirigidos frente a NKG2A; inhibidores del proteasoma e inhibidores de desacetilasas de histonas que aumentan los niveles de NKG2D-L, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias o la expresión del receptor de TNF; y estudios de transferencia adoptiva con células NK (revisado en Tarazona et al., 2015). También se han estudiado inhibidores de metaloproteasas para evitar la liberación de CD16 (Zhou et al., 2013), y favorecer con ello la respuesta ADCC, que puede participar en la respuesta frente a células diana en dichas inmunoterapias. Además estos tratamientos también controlarían el corte proteolítico de ligandos de NKG2D.

3.5 Melanoma y exosomas

Las células tumorales pueden liberar cantidades altas de exosomas, pudiendo incluir antígenos tumorales. Por ejemplo, se ha observado que el plasma de pacientes de melanoma presenta una mayor cantidad de exosomas que expresan CD63 y caveolina-1 (Logozzi et al., 2009). La función de los exosomas en cáncer se ha relacionado tanto con procesos activadores como inhibidores,

dependiendo de la molécula estudiada y del fenotipo de la célula de origen, ya que se ha visto que pueden transferir el fenotipo de la célula de origen a otras células (O'Brien et al., 2013). Diferentes estudios demuestran que los exosomas tienen un papel importante en el progreso tumoral y en metástasis (Becker et al., 2016). Por ejemplo, se ha observado que exosomas derivados de tumores tienen tropismo hacia órganos específicos, contribuyendo a la formación del nicho pre-metástático, por una expresión diferencial de integrinas (Hoshino et al., 2015). También se ha observado el papel de los exosomas en otros procesos tumorales como angiogénesis, coagulación, remodelación del tejido parenquimático, o modulación del sistema inmunitario (Whiteside, 2016). En cuanto a las células NK, se ha demostrado que éstas liberan exosomas, y que exosomas derivados de tumores pueden modular la actividad de las células NK (revisado en Benito-Martin et al., 2015). Debido al importante papel que tienen los exosomas en la progresión tumoral, estas vesículas están cobrando importancia en diagnóstico y en su uso como dianas terapéuticas (revisado en Becker et al., 2016).

Los exosomas derivados de melanoma son capaces de educar a progenitores de las células de médula ósea, teniendo una función clave en crecimiento tumoral y metástasis (Peinado et al., 2012). Dado que los exosomas tienen un papel importante en el progreso de tumores y que se encuentran en suero de pacientes de melanoma, uno de los objetivos de esta tesis fue estudiar los exosomas derivados de melanoma y la expresión de NKG2D-L.

4. Transferencia de proteínas mediante trogocitosis

La comunicación intercelular es un proceso esencial en organismos multicelulares y puede estar mediado por contacto celular o por la transferencia de moléculas que son secretadas. La transferencia de proteínas es un fenómeno común entre células del sistema inmunitario y varios mecanismos han sido descritos como responsables de esta transferencia. Uno de estos mecanismos podría ser el corte proteolítico de proteínas que se encuentran ancladas en la membrana plasmática y la posterior unión a sus receptores. También se han identificado estructuras celulares que funcionan como vehículos de transferencia, como: los nanotubos de membrana (Onfelt et al., 2004); o proteínas que se encuentren incluidas en vesículas extracelulares, como son los exosomas. Además, otro mecanismo que implica transferencia de proteínas entre células es la trogocitosis (revisado en Davis, 2007).

4.1 Definición y ejemplos de trogocitosis

La **trogocitosis** es un fenómeno que fue definido por Joly y Hudridier en 2003 como la transferencia intercelular de fragmentos intactos de membrana plasmática y sus proteínas asociadas. Su nombre proviene de la palabra *trogo*, que en griego antiguo significa roer. Las características de la trogocitosis son (Joly y Hudrisier, 2003):

- La transferencia de **fragmentos de membrana** y, como consecuencia, de las moléculas que se encuentran en ella. Se trata de un proceso selectivo, ya que diferentes moléculas se transfieren con diferentes eficiencias.
- Dependencia del **contacto celular**.
- **Cinética rápida**. Treinta minutos son suficientes, lo cual implica que no se debe a mecanismos de fagocitosis o cuerpos apoptóticos (Hudrisier et al., 2001)

La trogocitosis se ha descrito en muchos tipos celulares, aunque es en el sistema inmunitario donde está mejor estudiada, tanto *in vitro* como *in vivo* (Mostböck et al., 2007; Riond et al., 2007; Xia et al., 2006). Probablemente, este fenómeno ocurre con más frecuencia en el sistema inmunitario porque se trata de una consecuencia de la interacción que supone la sinapsis inmunológica. Se han descrito procesos relacionados con trogocitosis que implican tanto a linfocitos B y T, como a células NK (ver apartado 3.3). Además, se ha sugerido que la trogocitosis puede tener una función en el mantenimiento de la sinapsis inmunológica o en la recuperación de membrana tras la exocitosis de gránulos líticos. Sin embargo, este último argumento es controvertido debido a que también se ha descrito tras sinapsis inhibitorias (Williams et al., 2007).

Uno de los modelos de trogocitosis mejor estudiado es la transferencia de proteínas de la membrana de APCs a linfocitos T, más concretamente la transferencia del complejo MHC (Dhainaut y Moser, 2014; Patel et al., 1999). Por ejemplo, se ha descrito que se transfieren otras moléculas importantes para la respuesta inmunológica como moléculas co-estimuladoras (CD80 y CD86), moléculas de adhesión (ICAM) o receptores (neuropilin-1) (Bourbié-Vaudaine et al., 2006; Hwang et al., 2000; Zhou et al., 2005).

La eficiencia de este fenómeno depende de la naturaleza de las células implicadas (Daubeuf et al., 2010b) y de la molécula transferida, siendo los receptores Fc, CD4 y las tetraspaninas, las proteínas que mejor se transfieren desde APCs a linfocitos T y B (Daubeuf et al., 2010a).

4.2 Función y mecanismo de la trogocitosis

La adquisición de proteínas provenientes de otras células, puede cambiar el fenotipo y afectar a la función de las célulasceptoras. Este efecto va a depender de la función de la molécula transferida y del tipo de célula aceptora. Por ejemplo, cuando se transfieren ligandos inhibitorios, como HLA-G, la célula aceptora adquiere un fenotipo inhibitorio (Caumartin et al., 2007). Sin embargo, ocurre lo contrario cuando las células adquieren moléculas activadoras. Por ejemplo, ligandos de los receptores activadores NKG2D y NKp46 transferidos desde células tumorales a células T, son capaces de activar a las células NK (Domaica et al., 2009). Pero el fenotipo adquirido puede ser más complejo, ya que también depende del fenotipo original de la célula aceptora. De esta manera, se ha demostrado que cuando los complejos de MHC se transfieren desde APCs a linfocitos T CD4⁺, estas células pueden estimular linfocitos T *naïve*, mientras que si la célula aceptora tiene fenotipo

regulador, el efecto es el contrario (Zhou et al., 2011). Todos estos datos, indican que la trogocitosis puede participar en la regulación de la respuesta inmunológica, dependiendo de la molécula que se transfiere y de la célula que la adquiere.

Además, algunos artículos demuestran la importancia clínica de este fenómeno. Por ejemplo, la transferencia de HLA-G ocurre en células hematológicas tumorales de pacientes (LeMaoult et al., 2015) y en linfocitos T de pacientes con mieloma múltiple (Brown et al., 2012), adquiriendo un fenotipo regulador. También se ha visto la adquisición de antígenos de melanoma por linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de pacientes (Eisenberg et al., 2013), y CD14 y CD19 en el caso de las células NK de pacientes con diferentes tipos de cáncer hematológico (Krzywinska et al., 2015). Actualmente, el fenómeno de trogocitosis está cobrando más importancia ya que se ha implicado en procesos relacionados con la inmunoterapia basada en anticuerpos monoclonales. Se ha descrito que la trogocitosis podría ser el principal mecanismo responsable de la desaparición de estos anticuerpos monoclonales, como por ejemplo el anti-CD20, rituximab (Beum et al., 2011; Pham et al., 2011), anti-KIR2D (Carlsten et al., 2016), o anti-CD22. A pesar de que este fenómeno sería perjudicial en estos tratamientos, se describe como beneficioso en el caso de algunos tratamientos frente a enfermedades autoinmunes (Rossi et al., 2013; Taylor, 2013; Taylor y Lindorfer, 2015).

Algunos grupos han utilizado la trogocitosis como herramienta para modificar células NK, sin intervención genética, para una futura aplicación en tratamientos con transferencia adoptiva de células NK. Por ejemplo, se ha estudiado la transferencia de CCR7 para ayudar en el reclutamiento a nódulos linfáticos (Somanchi et al., 2012) o para la expresión del receptor antigénico quimérico anti-CD19 en células NK (Cho et al., 2014).

Pese a que son muchos los ejemplos de proteínas transferidas mediante trogocitosis, implicando diferentes poblaciones de células del sistema inmunitario, el mecanismo molecular no está bien definido. Se ha observado que son necesarias las GTPasas TC21 y RhoG, que también tienen un papel en procesos de fagocitosis. Estas moléculas se han visto implicadas en la transferencia de moléculas de MHC desde APCs a linfocitos T, que además es promovida por la internalización del TCR (Martínez-Martín et al., 2011).

4.3 Trogocitosis y células NK

La primera evidencia de trogocitosis que implicaba a las células NK, fue la transferencia de MHC-I en modelos de ratón (Sjöström et al., 2001). Más tarde, se observó que células NK humanas también podían adquirir fragmentos de membrana de la célula diana (Tabiasco et al., 2002). En la literatura científica se encuentran descritos varios ejemplos de transferencia de proteínas relacionados con las células NK, tanto en moléculas activadoras como inhibidoras. Durante la sinapsis inhibidora, se ha demostrado la transferencia del ligando HLA-C desde la célula diana a la célula NK, y de KIR en el sentido contrario (Carlin et al., 2001; Vanherberghen et al., 2004;

Williams et al., 2007). Como ejemplo de moléculas implicadas en la activación de las células NK, se ha observado la transferencia del ligando CD155 a células NK (Fuchs et al., 2004) o el receptor 2B4 que se transfiere en el sentido contrario (Roda-Navarro et al., 2004).

En cuanto al sistema NKG2D, también se ha demostrado la transferencia de los ligandos MICA (McCann et al., 2007) y MICB desde células diana a células NK, en este último caso también se encontró la transferencia de NKG2D en el sentido contrario (Roda-Navarro et al., 2006). En ambos estudios, se demostró que para la transferencia de estas proteínas es necesaria la interacción entre el receptor y el ligando. Además, McCann y colaboradores demostraron que el MICA adquirido por la célula NK se encontraba en su orientación nativa, de tal manera que podía ser reconocido por el receptor NKG2D de otras células NK, activándolas, provocando la liberación de sus gránulos líticos e induciendo la internalización del receptor. Debido a que la transferencia de los NKG2D-L parece afectar a la activación de las células NK, y que sólo se había descrito en ligandos transmembrana de la familia MIC, se decidió estudiar la transferencia de los ULBP anclados mediante GPI, ya que la particularidad del tipo de anclaje a membrana podría tener un papel en este fenómeno.

Objetivos

Conocer la biología y la regulación de los ligandos de NKG2D es de gran relevancia debido al papel que desempeñan en ciertas situaciones patológicas, en las que se expresan de manera específica, así como por su capacidad para liberarse al medio extracelular, bien incluidos en exosomas o bien como proteínas solubles. La variabilidad en las formas bioquímicas y la biología celular de los distintos ligandos resulta en una capacidad diferente por parte de cada ligando para modular la actividad de las células NK. Por tanto, es importante dilucidar los distintos aspectos de la biología de estas familias de proteínas para poder entender sus diferentes actividades biológicas.

Los objetivos que se plantean en esta tesis son los siguientes:

1. Estudiar las características bioquímicas del ligando NKG2D, MICA*008, y en particular, aquellas implicadas en su reclutamiento a exosomas.
2. Analizar la transferencia de ligandos de NKG2D, pertenecientes a la familia ULBP, desde la célula diana a la célula NK, así como su mecanismo y consecuencias funcionales.
3. Estudiar el efecto del tratamiento con el inhibidor de BRAF^{V600E}, vemurafenib, en la expresión y liberación de los ligandos de NKG2D y en la respuesta de las células NK en un modelo de melanoma metastásico.

Materiales y Métodos

1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados, si no se indica lo contrario, se adquirieron de Sigma-Aldrich. Vemurafenib (PLX 4032) fue cedido por la Dra. Annette Paschen (Hospital Universitario de Essen, Alemania). Los tratamientos con vemurafenib, butirato sódico y MG132 se realizaron a las concentraciones y tiempos indicados para cada experimento.

2. Líneas celulares

Todas las líneas celulares se incubaron a 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad relativa.

A todos los medios de cultivo designados como “completos” se les añadió: 10% FBS, L-glutamina 1 mM, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 0.1 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 U/ml (Biowest).

Se utilizaron células de ovario de hámster chino (CHO) transfectadas con ligandos de NKG2D se describen en (Ashiru et al., 2010; Fernández-Messina et al., 2010). La línea CHO deficiente en GPI G9-PLAP-0.85 (Stevens et al., 1996) (también referida como CHO-ΔGPI) fue donada por la Dra. Victoria L. Stevens (Epidemiology Research Program, American Cancer Society, Atlanta, U.S.A.) a través del Dr. Saulis Vainauskas y Dr Anant K. Menon (Cornell University, New York, U.S.A.). Las células CHO transfectadas con las quimeras GFP-GPI se describen en (Ashiru et al., 2013). Las células CHO se mantuvieron en medio Ham's F12 completo (Biowest), añadiendo puromicina a 8 µg/ml como antibiótico de selección en el caso de las transfectantes.

La línea celular U373 se describió en (Valés-Gómez et al., 2003), y junto con la línea de riñón embrionario humano HEK (del inglés, *human embryonic kidney*)-293T se cultivaron en DMEM (Lonza) completo.

Las líneas de cáncer de vejiga (J82 y RT-112) fueron donadas por el Dr. Francisco Real (CNIO, Madrid) y genotipadas por el servicio de genómica del IIB (CSIC) utilizando StemElite ID System (Promega). Estas células se mantuvieron en cultivo en medio EMEM (Lonza).

La línea K562 (eritroleucemia), utilizada como control positivo al ser diana de células NK por carecer de moléculas MHC y expresar ULBP1 y ULBP2, y las líneas Daudi y RPMI-8866 (ambas, linfoma de células B), utilizadas para el mantenimiento de los cultivos de células NK, se incubaron en medio RPMI-1640 (Biowest) completo.

Las líneas metastásicas de melanoma Ma-Mel-55, Ma-Mel-86c, Ma-Mel-86f y Ma-Mel-103b fueron donadas por la Dra. Annette Paschen (Hospital Universitario de Essen, Alemania), en cuyo laboratorio se aislaron siguiendo los métodos definidos en (Zhao et al., 2016), se tipó HLA y se analizó la presencia de mutaciones en BRAF. Se mantuvieron en cultivo en medio RPMI-1640 (Biowest) completo.

3. Células NK humanas

3.1 Purificación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Se purificaron las PBMC a partir de preparados linfocitarios (del inglés, *buffy coats*) de voluntarios sanos, obtenidos del Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid. Estos experimentos fueron aprobados por los comités éticos locales (Centro de transfusiones y CSIC-UAM). La purificación se realizó mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare). Para ello, primero se diluyó la sangre 1:2 en PBS, se puso sobre el Ficoll-Paque y se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 minutos a 1800 rpm y sin freno. Se recogieron las PBMC de la interfase entre el Ficoll y el plasma, y se lavaron en PBS 4 veces para eliminar las plaquetas.

3.2 Purificación de células NK y establecimiento de líneas primarias de células NK

A partir de las PBMC obtenidas como se describe en el apartado anterior, se aislaron las células NK por selección negativa siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de Miltenyi (*MACS NK isolation kit*).

Las células NK primarias se incubaron con células Daudi y RPMI-8866, sometidas a una dosis de radiación gamma letal, en medio RPMI-1640 (Biowest) suplementado con 10% suero humano (HS), 10% FBS (durante la primera semana, después 5% HS y 5% FBS), L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 U/ml (Biowest), β -mercaptoetanol (Merck) 50 μ M, HEPES (Lonza) 10 mM y rhIL-2 (Peprotech) 50 U/ml.

La composición de los cultivos primarios de células NK se comprobó semanalmente por citometría de flujo, y eran re-estimulados durante un mes y medio, como máximo, si el porcentaje de NK era mayor al 95% del cultivo.

Los experimentos funcionales se realizaron con células NK que habían sido estimuladas con IL-2 entre 4 y 5 días antes. Para los experimentos con células NK recién purificadas, se cultivaron durante 16 horas en la presencia o ausencia de IL-2 (50 U/ml) tras ser aisladas por selección negativa, y se comprobó su estado de activación midiendo la expresión de CD69 por citometría de flujo.

3.3 Estimulación de células NK en PBMC totales

Para los experimentos funcionales frente a las células de melanoma se usaron células NK primarias no purificadas. Para ello, tras obtener las PBMC como se describe en el apartado 3.1, se resuspendieron en RPMI-1640 (Biowest) y se incubaron durante 1 hora en placa. Tras este paso de adherencia, se recuperaron las células en suspensión, se lavaron y se incubaron con células Daudi y RPMI-8866 irradiadas a una dosis de radiación gamma letal en el mismo medio que las células NK, pero en lugar de rhIL-2, con rhIL-12 (Peprotech) 10 U/ml y rhIL-18 (MBL) 25ng/ml. Tras 5-6 días

de cultivo, se añadió rhIL-2 a 50 IU/ml. Dos días después, se comprobó la expansión de las células NK por citometría de flujo usando anticuerpos específicos para CD3 y CD56, y se usaron las células para los experimentos funcionales. En el caso de las PBMC del paciente 86, fueron necesarias dos re-estimulaciones semanales, para ello se lavaron las células y se resuspendieron, junto con las células irradiadas, en medio con rhIL-2 (Peprotech) 50 U/ml.

4. Citometría de flujo

Se utilizó citometría de flujo para determinar los niveles de expresión de ciertas moléculas de superficie en diferentes experimentos.

Las células adherentes se despegaron con PBS con EDTA 5 mM y 1% BSA (albúmina de suero bovino).

Las células NK recuperadas de los experimentos de transferencia y, en general, todas las células humanas, se pre-incubaron con 10% HS para bloquear los receptores de Ig. Las células se pre-incubaron con 10% NMS (suero de ratón) tras la incubación con anticuerpos secundarios anti-Ig de ratón, si posteriormente iban a ser incubadas con anticuerpos conjugados de ratón. Todos los lavados se realizaron con PBA (PBS con 1% BSA, 1% FBS y 0.1% de azida sódica).

Para las tinciones, se incubaron las células con anticuerpos conjugados directamente con un fluorocromo o con anticuerpos primarios monoclonales de ratón específicos para cada molécula de interés, utilizando siempre controles de isotipo. Estos anticuerpos se incubaron 40 minutos a 4°C. En el caso de la utilización de un anticuerpo primario, esta incubación fue seguida de la incubación con un anticuerpo secundario marcado en FITC o PE (fragmentos F(ab')₂ de cabra anti-Ig de ratón, de DakoCytomation), a 5-10 µg/ml, durante 30 minutos a 4°C. Cuando las incubaciones se realizaron con anticuerpos marcados con fluorocromos, la incubación se realizó en oscuridad. Para los experimentos en los que era necesario excluir las células muertas, se añadió a las tinciones yoduro de propidio o 7-aminoactinomicina D (7-AAD) (Beckman Coulter), ambos reactivos se intercalan en los ácidos nucleicos de doble hebra.

Para la digestión con fosfoinosítido fosfolipasa C, **PI-PLC** (del inglés, *phosphoinositide-specific phospholipase C*) (Invitrogen), las células se lavaron en PBS y se resuspendieron en un tampón (Tris-HCl 10mM, NaCl 150mM pH 7.4) con PI-PLC (0,1 unidades enzimáticas/10⁵ células). Tras 30 minutos a 37 °C, se paró el tratamiento lavando las células con PBS con 1% BSA y 0.1% de azida sódica.

Cuando las tinciones se realizaron con la construcción **NKG2D-Fc**, preparada como se describe en (Valés-Gómez et al., 2003), se usó como control negativo Fc humana. Las células se incubaron 45 minutos a 4°C y posteriormente se utilizó anticuerpo de cabra frente IgG humano marcado en PE (Immunotech) como anticuerpo secundario.

Los anticuerpos monoclonales de ratón utilizados para citometría de flujo han sido:

Molécula que reconoce	Clon	Procedencia
CD3	T3d	Prof J.L. Strominger (Harvard University)
CD56	#301040	R&D
CD112/Nectina2	B-C12	Santa Cruz Biotechnology
CD155/PVR	D171	Abcam
FLAG	M2	Sigma
GFP	7.1+13.1	Roche
MHC-I	HP-1F7	Dr. Miguel López-Botet (Universidad Pompeu Fabra) (Pérez-Villar et al., 1997)
MICA	1H10	(Valés-Gómez et al., 2006)
NKG2D	149810	R&D
ULBP1	170818	R&D
ULBP2/5/6	165903	R&D
ULBP3	166510	R&D
Isotipo (IgG1 ratón)	MOPC-21	Sigma

.Los anticuerpos conjugados utilizados para citometría de flujo han sido:

Molécula que reconoce	Fluorocromo	Clon	Procedencia
CD3	FITC	OKT3	Biolegend
CD8	FITC	UCHT-4	ImmunoTools
CD56	PE	HCD56	Biolegend
CD69	PC7	FN50	Biolegend
CD155	FITC	SKII.4	Santa Cruz Biotechnology

Molécula que reconoce	Fluorocromo	Clon	Procedencia
CD158a/KIR2DL1	PE	EB6	Beckman Coulter
CD158b/KIR2DL2/3	PE	GL183	Beckman Coulter
LAMP1/CD107a	APC	H4A3	Biolegend
MICA	PE	159227	R&D
NKG2A	PE	Z199	Biolegend
ULBP2/5/6	PE	165903	R&D
ULBP3	PE	166510	R&D
IgG1 de ratón	FITC		DakoCytomation
IgG1 de ratón	PE		DakoCytomation

Las muestras se analizaron usando los citómetros de flujo: BD FACSCalibur (Becton Dickinson), Gallios Flow Cytometer o Cytomics FC 500 (Beckman Coulter). Para analizar los experimentos de citometría de flujo se usaron los *softwares* Summit, Kaluza (Beckman Coulter) o FlowJo (Tree Star, Inc).

5. Biotinilación de proteínas en la superficie celular

Se lavaron 20 millones de células 4 veces con PBS-CaMg (PBS con CaCl_2 0,1 mM y MgCl_2 1 mM) a 4°C. Para el marcaje con biotina en superficie, se incubaron con sulfo-NHS-LC-biotina [hexonoato de sulfosuccinimidil-6-(biotinamido)] a una concentración 0,25 mg/ml en PBS-CaMg durante 30 minutos a 4°C. Tras un lavado de las células con PBS que contenía 0,5% BSA y 3 lavados más con PBS-CaMg, se recogieron las células de las placas. Se procedió a la lisis de las células y la posterior inmunoprecipitación con anti-MICA (1H10 (Valés-Gómez et al., 2006)) como se describe en el apartado 6.

6. Inmunoprecipitación

Para la inmunoprecipitación de NKG2D, se lisaron 20 millones de células NK que habían sido co-incubadas con células CHO o células CHO-ULBP3. También se realizaron inmunoprecipitaciones mezclando lisados de células NK con lisados de células CHO-ULBP3 (6%, en la misma proporción que podría encontrarse tras recoger las células NK tras el co-cultivo).

El tampón de lisis utilizado fue 0,5% de Triton X-100 en tampón TNE (Tris 50 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 5mM) con inhibidores de proteasas (pepstatina A 1 μ M y leupeptina 1 μ M) durante 30 minutos a 4°C. Los núcleos se eliminaron centrifugando los lisados celulares a 13000 xg. Tras preaclara con Pansorbin (Calbiochem), los lisados se dividieron para inmunoprecipitar con el anticuerpo de interés: anti-NKG2D (clon 5C6, de eBioscience) o con el correspondiente control de isotipo, MOPC. Posteriormente se incubaron con bolitas de sefarosa acopladas a proteína G durante 16 horas a 4°C, previamente lavadas y resuspendidas en tampón de lisis. Tras lavar las muestras 3 veces con tampón de lisis se procedió a su análisis mediante *Western blot*.

7. Análisis de expresión proteica por inmunodetección (*Western blot*)

7.1 Preparación de los extractos celulares

Las células adherentes se levantaron de las placas utilizando PBS con EDTA 5 mM y 1% BSA.

Las células CHO-MICA*008, CHO-MICA*019 y las líneas de melanoma se lisaron en 1% NP40 en tampón TNE (Tris 50 mM, pH 7,6, NaCl 150 mM, EDTA 5mM) con inhibidores de proteasas (pepstatina A 1 μ M y leupeptina 1 μ M). En el caso de los experimentos de co-inmunoprecipitación, las células biotiniladas se lisaron con tampón de lisis que contenía HEPES 50mM, pH 7,6, CaCl₂ 5mM, yodoacetamida 5mM, 1% digitonina con inhibidores de proteasas (pepstatina A 1 μ M y leupeptina 1 μ M). Para obtener los lisados, las células se incubaron durante 30 minutos a 4°C en el tampón correspondiente. Los núcleos se eliminaron centrifugando los lisados celulares a 13000 xg.

En algunos experimentos, las muestras se trataron con endoglicosidasa F (New England Biolabs) siguiendo instrucciones del fabricante.

La concentración de proteínas se midió por el método Bradford (Coomassie Plus™ Protein Assay Reagent, Thermo Scientific), usando BSA como proteína patrón. En el caso de los lisados se cargaron 30 μ g, y $6,8 \times 10^9$ partículas en el caso de los exosomas.

7.2 *Western blot*

Las muestras se desnaturalizaron a 95°C en tampón de carga 2 x (Tris 125 mM pH 6,8, 4% SDS, 20% glicerol y azul bromofenol) con o sin DTT 100 mM (según se realizara en condiciones reductoras o no reductoras). Para el análisis de la expresión de proteínas se realizó electroforesis en geles de poliacrilamida (10-12%) con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). El tampón de electroforesis utilizado fue: glicina 195 mM, Tris 24,8 mM, 0,1% SDS. Posteriormente, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) usando un sistema semi-seco o el tradicional sistema húmedo (BioRad) en tampón de transferencia (Tris 25 mM, Glicina 192 mM, 20% metanol). Las membranas se bloquearon con PBS con 0,05% Tween-20 (PBS-T) y 5% leche en polvo libre de grasa durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras lavar la membrana con PBS-T se incubó con el anticuerpo primario apropiado diluido en PBS-T 16 horas a

4⁰C. Tras varios lavados se incubaron con anticuerpos secundarios o estreptavidina, conjugados a HRP (del inglés, *Horseradish Peroxidase*) durante 1 hora a temperatura ambiente en PBS-T. Las incubaciones de algunos anticuerpos se hicieron en tampones diferentes: el anticuerpo para tirosinasa con Signal Booster (Beacle, Inc.); los anticuerpos para MelanA y MICA de cabra con PBS-T con 5% leche en polvo libre de grasa; y los anticuerpos para GAPDH, ERK y p-ERK con PBS-T con 5% BSA. Tras lavar las membranas, se visualizaron con el sistema de detección mediante quimioluminiscencia ECL (GE Healthcare) usando películas de rayos X (Konica Minolta).

Los anticuerpos primarios utilizados para *Western blot* son:

Anticuerpo	Origen	Procedencia	Dilución	Referencia
Anti-β actina	Ratón	Sigma	1:10000	A5441
Anti-caveolina	Policlonal de conejo	BD Bioscience	1:20000	610059
Anti-CD9	Ratón MEM-9	Donado por Vaclav Horejsi (República Checa)	1:1000	MEM-9
Anti-CD63	Ratón MEM-63	Donado por Vaclav Horejsi (República Checa)	1:1000	MEM-63
Anti-CD81	Ratón MEM-81	Donado por Vaclav Horejsi (República Checa)	1:1000	MEM-81
Anti-ERK	Conejo	Cell signalling	1:2500	#9102
Anti-GAPDH	Conejo	Cell signalling	1:5000	14C10
Anti-MICA	Policlonal de cabra	R&D	1:500	AF1300
Anti-MICA biotinilado	Policlonal de cabra	R&D	1:500	BAF1300
Anti-MelanA	Ratón	Zytomed	1:1000	M2-7C10
Anti-NKG2D	Ratón Clon 1D11	Santa Cruz Biotechnology	1:500	SC-23869
Anti-p-ERK	Conejo	Cell signalling	1:5000	#4376
Anti-Tirosinasa	Ratón	Santa Cruz Biotechnology	1:1000	T311
Anti-ULBP3 biotinilado	Policlonal de cabra	R&D	1:500	BAF1517

Los anticuerpos secundarios utilizados fueron HRP-estreptavidina (Biolegend, referencia 405210), o anticuerpos de cabra HRP-anti-Ig de ratón (Dako, referencia R0480), anticuerpos de

burro HRP-anti-Ig de cabra (Santa Cruz Biotechnology, referencia SC-2020) y anticuerpos de cabra HRP-anti-Ig de conejo (Cell signalling, referencia #7074), todos ellos se utilizaron a una dilución 1:5000.

8. Fraccionamiento de regiones de membranas resistentes a detergentes (DRM)

Las células se lisaron en tampón TNE con 1% Brij-58 e inhibidores de proteasas durante 30 minutos a 4 °C y se homogeneizaron utilizando un homogeneizador Dounce. Las muestras se diluyeron en un volumen de sacarosa al 85% en TNE, y se colocó al fondo de un gradiente discontinuo de sacarosa, formado por sacarosa al 30% y al 5%. El fraccionamiento se realizó por ultracentrifugación durante 18-20 horas a 200.000 x g. Se recogieron fracciones de 1 ml desde arriba hasta el fondo del gradiente. Se añadió deoxicolato de sodio (DOC) a una concentración final del 0,2% a cada fracción y se analizaron por *Western blot*.

9. Aislamiento de exosomas

Los exosomas se aislaron mediante centrifugaciones seriadas. En el caso de los exosomas purificados de líneas celulares, las células adherentes se lavaron con PBS y se cultivaron durante 24 horas, ó 48 horas en el caso de los tratamientos con vemurafenib, en medio con 1% FBS libre de exosomas (centrifugado a 100000 xg 16 horas). El sobrenadante de los cultivos celulares se centrifugó a 4°C de manera secuencial a 200 xg, 2 centrifugaciones a 500 xg durante 10 minutos, después 30 minutos a 10.000 xg y 2 horas a 100.000 xg (Beckman instruments). Los pellets se solubilizaron en tampón de carga y se analizaron por *Western blot*. En paralelo también se recuperaron las células de los cultivos para analizarlas por *Western blot*. En el caso de los exosomas aislados de líneas de melanoma, se resuspendieron en tampón HEPES salino (HEPES 10 mM pH 7,2, NaCl 150 mM). Los sobrenadantes se recuperaron para analizar las proteínas solubles por ELISA. En paralelo también se recuperaron las células de los cultivos para analizarlas por *Western blot*. En algunos casos para su liofilización, se añadió sacarosa a una concentración final del 8%, se congelaron inmediatamente a -80°C y se liofilizaron usando el liofilizador Flexi-Dry (FTS Systems). La concentración de exosomas se determinó utilizando NanoSight NS500 (Malvern Instruments Ltd), basado en tecnología NTA (del inglés, *Nanoparticle Tracking Analysis*). El análisis se realizó con el *software* NTA 3.1 (Malvern). Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Dr. Héctor Peinado (CNIO).

Para el estudio de los exosomas de pacientes, se utilizaron sueros de 4 pacientes donados por la Dra. Annette Paschen (Hospital Universitario de Essen, Alemania), de 2 de ellos se analizaron 3 muestras: antes del tratamiento con vemurafenib, tras 3 meses de tratamiento y en el final del tratamiento. Y de los otros 2 pacientes, se analizaron 2 muestras: antes del tratamiento con vemurafenib y tras 3 meses de tratamiento. Se partió de 500 µl de suero y se siguió el mismo

protocolo de centrifugación seriada. Se resuspendieron en 300 µl de HEPES salino y se midieron por tecnología NTA con ZetaView (Particlemetrix). Estos experimentos se realizaron en el laboratorio del Dr. Bernd Giebel (Hospital Universitario de Essen, Alemania).

10. Experimentos de co-cultivo para el análisis de transferencia de ligandos de NKG2D

Las células diana utilizadas para los co-cultivos se plaquearon el día anterior al experimento para que alcanzaran confluencia. En el momento del co-cultivo se añadieron las células NK en una ratio célula efectora:célula diana (E:T) de 1:3. Ambos tipos celulares se co-incubaron durante distintos tiempos, según se indica en cada experimento (desde 5 minutos a 16 horas) en RPMI-1640 (Biowest) suplementado con 5% HS y 5% FBS, L-glutamina 2 mM, piruvato sódico 1 mM, aminoácidos no esenciales 0,1 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 U/ml (Biowest), β-mercaptoetanol (Merck) 50 µM y HEPES (Lonza) 10mM.

Tras el tiempo de co-incubación, las células NK se recuperaron del sobrenadante del co-cultivo y se utilizaron para los distintos experimentos:

- Para los experimentos de *transwell*, se utilizaron placas con soportes permeables *transwell* (Corning), cuyas membranas tenían un poro con un diámetro de 0,4 µm. Las células NK se incubaron en la cámara superior, separadas por estas membranas semi-permeables, de las células diana que se encontraban en la cámara inferior.
- Para la digestión con **PI-PLC** (Invitrogen), las células NK se lavaron en PBS y se resuspendieron en un tampón que contenía Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM pH 7,4 con PI-PLC (0,1 unidades enzimáticas/10⁵ células). Tras 30 minutos a 37 °C, se paró el tratamiento lavando las células con PBS con 1% BSA y 0,1% de azida sódica.
- Para los tratamientos con **lavado ácido**, las células NK se lavaron dos veces con PBS tras el co-cultivo y se resuspendieron en tampón de citrato (ácido cítrico 0,133 M y Na₂HPO₄ 0,066 M pH 3,3). Tras 4 minutos a temperatura ambiente, el tratamiento se detuvo añadiendo PBS con 5% FBS a la suspensión celular. Posteriormente, se lavaron las células. Como control positivo de tratamiento, se utilizó la pérdida de unión del anticuerpo específico que reconoce MHC-I humano dependiente de conformación (HP-1F7) (Pérez-Villar et al., 1997), y del anticuerpo frente a NKG2D. Se comprobó la viabilidad de las células tras el lavado ácido por citometría de flujo mediante la tinción con yoduro de propidio.
- En los experimentos en los que se usó **BB94** (Batimastat, de Tocris Bioscience), se incubaron las células diana con este inhibidor, a una concentración 5µM, 2 horas antes y durante la co-incubación.
- Para los experimentos de **bloqueo de NKG2D**, se utilizó el clon 149810 (R&D systems) a 5 µg/ml durante 20 min a temperatura ambiente.

- En experimentos de co-cultivo con linfocitos T como células efectoras, se utilizaron poblaciones policlonales de **células T** CD3⁺ cultivadas con el mismo medio de crecimiento que los cultivos de células NK.

11. Análisis de la liberación de gránulos líticos y citotoxicidad en los experimentos de transferencia

Las células NK se co-incubaron con células diana durante 2 horas con una ratio E:T de 1:3 y se analizó la expresión superficial de LAMP1 (CD107a) por citometría de flujo. Esta molécula se usa como marcador de liberación de gránulos líticos porque se encuentra en la cara interna de su membrana, y una vez que la célula libera estos gránulos, se queda expuesta sobre la superficie de la célula NK.

Para los experimentos de citotoxicidad, las células NK que habían estado en co-cultivo con células diana o con medio (para analizar la muerte espontánea), se marcaron con PKH2 0,2 μ M y tras varios lavados para eliminar el excedente de colorante, se usaron como células diana. Como células efectoras, se usaron células NK autólogas a una ratio E:T, 3:1. En experimentos funcionales, se usaron K562 como controles positivos de células diana. La muerte celular se analizó con la sonda de muerte celular 7-AAD (Beckman Coulter).

12. Separación de células NK mediante citómetro de flujo separador para experimentos de retransferencia

Las células NK recuperadas del co-cultivo con células CHO-ULBP3, se resuspendieron en PBS con EDTA 5 mM y se separaron, en base a parámetros de tamaño y complejidad, de células CHO-ULBP3 residuales, utilizando un citómetro de flujo separador de alta velocidad (HIPERSORT MoFlow XDP, Beckman Coulter), con el apoyo del servicio de citometría de flujo del Centro Nacional de Biotecnología (CNB).

Posteriormente, las células NK recuperadas se usaron como células diana con células NK autólogas, que se habían marcado previamente con el colorante CellTraceTM Violet Cell Proliferation Kit (Molecular Probes) a una concentración 2 μ M, en una ratio E:T de 1:5 durante 1 hora. La expresión de ULBP3 se analizó por citometría de flujo en las células NK efectoras y diana, tanto antes como después de su co-cultivo.

13. Tipaje de MICA en líneas de melanoma

Para tipar MICA en las líneas de melanoma se extrajo el ADN genómico de las células y se realizó una PCR descrita en (Zou y Stastny, 2012) usando el cebador de MICA 3' acoplado al fluoróforo FAM (6-carboxifluoresceína). Los fragmentos se analizaron en la unidad de genómica de la Universidad Complutense de Madrid y, se estudió su tamaño utilizando el *software* Peak Scanner

v1.0 (Applied Biosystems), de tal manera que se podía determinar el número de repeticiones del trinucleótido GCT en función del tamaño, y así el grupo de alelos de MICA al que pertenecía.

14. Ensayo MTT y xCELLigence

Para los ensayos de proliferación usando MTT (Bromuro de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol), se plaquearon 3000 células en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Tras 16 horas, se añadió el correspondiente tratamiento durante 24 ó 48 horas. Después de la incubación, se eliminaron los sobrenadantes y se añadió la disolución MTT (20% de medio RPMI completo, 70% PBS, 10% MTT a 5mg/ml en PBS). Tras 4 horas de incubación a 37 °C, se eliminó el sobrenadante y se añadió DMSO. Para la lectura, en el caso de los ensayos con vemurafenib se utilizó una OD de 554 nm en TECAN Infinite M200 (Life Sciences), y en el caso de los tratamientos en combinación se utilizó una OD de 570 nm en Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Filter-based Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific), usando como referencia la medida a 690 nm. Se realizaron 4 réplicas por condición y línea celular.

Los experimentos de proliferación usando el sistema xCELLigence ® RTCA DP (Acea Bioscience) se realizaron plaqueando 5000 células en placas de 16 pocillos (E plates). El medio de cultivo se usó como blanco. Tras 16 horas, se añadió vemurafenib o DMSO como control. Se realizaron 4 réplicas por condición y línea celular. Los datos fueron analizados y normalizados al tiempo de tratamiento con el *software* RTCA 2.0 (Acea Bioscience).

15. Ensayos de muerte en células de melanoma

La muerte celular se midió utilizando la sonda de viabilidad 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (Beckman Coulter) y anexina V, que se une a la fosfatidilserina que queda expuesta en la superficie celular en los procesos apoptóticos. Para ello, tras los tratamientos con vemurafenib o DMSO como control, se recogieron tanto las células como los sobrenadantes de los cultivos. Se lavaron con PBA y se incubaron durante 15 minutos a 4°C y en oscuridad con 5 µl de anexina V-PE (Immunostep) y 20 µl de 7-AAD en 100 µl de tampón de unión de anexina (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se analizaron por citometría de flujo.

16. Análisis de liberación de gránulos líticos frente a células de melanoma

Las PBMC se co-incubaron durante 2 horas con células diana en una ratio E:T de 1 célula NK:2 células diana. Para que esta ratio fuera exacta, se midió el porcentaje de células NK en los cultivos de PBMC por citometría de flujo. Además, se plaquearon las células diana por duplicado para poder contarlas antes del ensayo (ya que el tratamiento afecta al número de células). Se analizó la expresión superficial de LAMP1 (CD107a) por citometría de flujo. Esta molécula se usa como marcador de liberación de gránulos líticos porque se encuentra en la cara interna de su membrana, y

una vez que la célula libera estos gránulos, se queda expuesta sobre la superficie de la célula NK. Se usaron células K562 como control positivo. La liberación de gránulos basal se midió utilizando las células efectoras solas como control negativo. Cuando se usaron como efectoras PBMC heterólogas, las células diana se pre-incubaron 30 minutos a temperatura ambiente con 10 µg/ml de anticuerpo anti-MHC-I (HP1F7), con el fin de eliminar la variación entre donantes debida a la posible inhibición por MHC-I en algunos casos.

Para las degranulaciones con las PBMC del paciente 86, los ensayos se realizaron durante 3 horas, poniendo el anticuerpo frente a LAMP1 durante la co-incubación, y 1 hora después se añadió monensina a una concentración final de 2,5 µM, para bloquear el tráfico vesicular e impedir de esta manera la internalización de LAMP1.

17. Microscopía electrónica de transmisión

Los exosomas liofilizados se reconstituyeron y diluyeron 1:20 en PBS. La preparación de la muestra se realizó en el Servicio de Microscopía Electrónica del Centro Nacional de Biotecnología (Madrid). Se puso sobre una gota de muestra, una rejilla cubierta de carbono Formvar EV durante un minuto. La rejilla se lavó con agua desionizada y se puso sobre una gota de acetato de uranilo al 2%. Las muestras se examinaron en el microscopio electrónico Jeol JEM 1011 a 100kV con una cámara CCD Gatan Erlangshen ES1000W.

18. Detección de ligandos de NKG2D solubles mediante ELISA

Todas las diluciones se realizaron en tampón de borato salino, BBS (del inglés, Borate Buffered Saline). Los lavados tras las incubaciones se realizaron con BBS con 0,05% de Tween-20. Las placas de ELISA se tapizaron con los anticuerpos de captura: anticuerpo monoclonal anti-MICA (1H10) (Valés-Gómez et al., 2006) a 10 µg/ml, o los anticuerpos policlonales de cabra anti- ULBP1, -2/5/6 (en ELISA sólo reconoce 10% de ULBP5), o -3 humanos (R&D system) a 4 µg/ml, durante 16 horas a 4 °C. Después se bloquearon con BBS suplementado con 2% BSA durante 2 horas a 37 °C. Posteriormente, se añadieron las muestras en duplicados y se incubaron 1 hora a 37 °C, sin diluir en el caso de las células de melanoma, o en diluciones seriadas en las muestras de los controles positivos. Como blancos se añadieron cuatro réplicas del tampón BBS por cada una de las combinaciones de anticuerpo. A continuación, se usaron como anticuerpos de detección, anticuerpos de cabra anti-MICA o anti- ULBP1, -2, y -3 humano biotinilados (R&D Systems) a 0,4 µg/ml durante 1 hora a 37°C, seguido de HRP-estreptavidina (BioLegend) a 0,25 µg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. Para el revelado se utilizó como sustrato de la peroxidasa, ABTS (Roche Applied Science). La absorbancia se midió a 405 nm usando como medida referencia 492 nm en Thermo Scientific™ Multiskan™ FC Filter-based Microplate Photometer (Thermo Fisher Scientific).

Las concentraciones de proteína soluble se calcularon a partir de las curvas de calibrado con concentraciones conocidas de proteína quimérica ULBP2-Fc recombinante humana (R&D Systems). Las medidas se consideraron positivas cuando eran mayores a la media de los valores del blanco más 3 veces la desviación estándar de los blancos. Para los controles positivos se utilizaron sobrenadantes de células CHO transfectadas con los ligandos de NKG2D.

19. Análisis estadístico

Los datos se presentan como la media \pm error estándar o el error estándar de la media, según se indica en los pies de figura. El análisis de las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron con la prueba t de Student, para muestras relacionadas si no se indica en el pie de figura lo contrario, usando el *software* GraphPad Prism 5. Las diferencias se consideran significativas cuando el p-valor $< 0,05$. El p-valor se indica en las figuras como: n.s. no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. En los casos en los que no esté detallado se entiende que no hay diferencias significativas.

Resultados

La regulación de los ligandos de NKG2D (NKG2D-L) es de gran relevancia debido, por un lado, a su expresión específica en situaciones patológicas, tales como infecciones víricas y bacterianas, autoinmunidad y cáncer. Por otro lado, a que se pueden encontrar en diferentes compartimentos celulares, como la membrana plasmática, o pueden ser liberados al medio extracelular a través de vesículas extracelulares, o como moléculas solubles por la acción de metaloproteasas. Como consecuencia de sus distintas localizaciones, los NKG2D-L van a modular la activación del receptor NKG2D de manera diferente: el reconocimiento del ligando en la membrana de una célula diana conlleva la activación del receptor, mientras que las formas solubles de estos ligandos inducen la internalización del mismo.

Para dilucidar distintos aspectos de la biología de los NKG2D-L importantes para la modulación de la respuesta de las células NK, se estudiaron los siguientes aspectos:

1. Las características bioquímicas específicas del NKG2D-L, MICA, que afectan a su liberación en exosomas.
2. La comunicación intercelular mediada por la transferencia de los NKG2D-L tras la sinapsis inmunológica desde la célula diana a la célula NK y sus implicaciones funcionales.
3. El efecto de terapias antitumorales en la expresión y liberación de NKG2D-L, y en su capacidad de modular la respuesta inmunológica, utilizando como modelo células metastásicas de melanoma.

1. Estudio bioquímico del ligando MICA*008 y su reclutamiento a exosomas

Como ya se ha descrito, los NKG2D-L pueden ser liberados al medio extracelular, dependiendo de cada ligando, por dos mecanismos: incluidos en exosomas o como proteínas solubles por la acción de metaloproteasas. El reconocimiento de estos ligandos en exosomas o solubles no provoca el mismo efecto que cuando son reconocidos en la superficie de una célula diana, ya que, en lugar de activar a la célula NK, se produce la internalización de NKG2D, con la consecuente reducción en su respuesta citotóxica. Además, es importante tener en cuenta que en los exosomas, los ligandos están siendo liberados de manera multimérica y su efecto en la internalización del receptor es más potente que aquellos ligandos que se secretan de manera soluble por la acción de metaloproteasas (Boutet et al., 2009; Kaiser et al., 2007; Waldhauer et al., 2008). Esta diferencia en la modulación de la respuesta de las células NK, hace que sea de gran importancia el estudio de los factores que hacen que estos ligandos se recluten a exosomas.

El NKG2D-L, MICA, es altamente polimórfico en su región transmembrana debido a la repetición de un trinucleótido que da lugar a la inserción de entre 4 y 9 residuos de alanina. Otro grupo de alelos conocidos como MICA A5.1 cuentan en su secuencia con la inserción de un solo

nucleótido, lo que provoca un cambio en la fase de lectura y la expresión de una proteína truncada (Ota et al., 1997). Entre los alelos que pertenecen a este último grupo, se encuentra MICA*008. En datos previos del laboratorio se observó que el alelo MICA*008, se reclutaba específicamente a regiones de la membrana ricas en esfingolípidos y colesterol [DRM (del inglés, *detergent-resistant membranes*)] y se liberaba en exosomas. Además, se observó que su región transmembrana y citoplasmática era clave para este reclutamiento (Ashiru et al., 2010).

Por todo esto, fue de gran interés investigar qué características bioquímicas de MICA*008, relacionadas con su diferente estructura, determinan su reclutamiento a exosomas.

1.1 MICA*008 se ancla a la membrana mediante GPI

Para comenzar con el estudio bioquímico de este alelo de MICA, se estudiaron en paralelo los alelos MICA*019 y MICA*008, pertenecientes a los grupos de MICA A5 y A5.1, respectivamente. Ambas proteínas son casi idénticas en su dominio extracelular, pero muy diferentes en su región C-terminal [(Ashiru et al., 2010) y Figura 4A]. Con el fin de estudiar las diferencias entre ambas proteínas, se usaron células CHO transfectadas con ambos alelos de MICA y se analizaron por *Western blot*. Las muestras se digirieron con endoglicosidasa F (Endo F), enzima que corta los N-oligosacáridos, ya que MICA es una proteína muy glicosilada. De esta manera, se observó que MICA*008 migraba como dos bandas de ~34 kDa y ~37kDa (flecha y punta de flecha grises), mientras que MICA*019 se encuentra como una sola banda (flecha negra) de mayor peso molecular (Figura 4B).

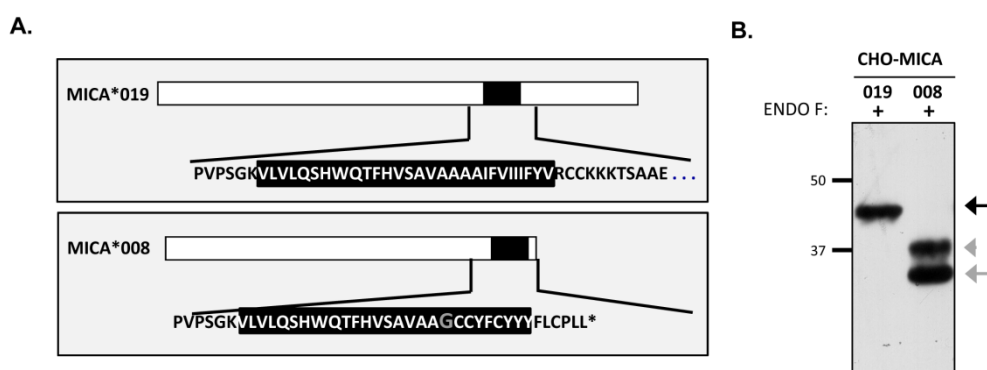


Figura 4. Análisis y *Western blot* de los productos del alelo MICA*008. (A) Estructura y secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de MICA*019 y MICA*008. Las secuencias se muestran desde el final de la región extracelular. La región transmembrana propuesta se encuentra marcada con un rectángulo negro. Se marca en gris el primer aminoácido distinto en la secuencia de MICA*008, debido a la inserción de un nucleótido que resulta en el cambio en la fase de lectura. Sólo se muestra parte de la cola citoplasmática de MICA*019 y con un asterisco se indica el final de la proteína truncada MICA*008. (B) Lisados de células CHO transfectadas con MICA*019 o MICA*008 se analizaron por *Western blot* tras digestión con endoglicosidasa F (Endo F). Se muestra un experimento representativo de tres. La banda de MICA*019 se marca con una flecha negra, las de MICA*008, con flecha gris la banda de 34 kDa y con punta de flecha gris, la banda de ~37kDa. Se indica el peso de los marcadores de peso molecular en kDa.

Las diferencias en el peso molecular de ambas proteínas concuerdan con sus respectivas secuencias de aminoácidos, sin embargo, el hecho de que MICA*008 tras la digestión con endoglicosidasa F se detecte como dos bandas podría deberse a que una de ellas fuese un producto de proteólisis, o a que tuviera alguna modificación post-traduccional, como ubiquitilación, acilación u otro tipo de modificación, que afecte a su carga y que cambie su migración. Debido a que una de las modificaciones presente en muchos NKG2D-L es la sustitución de una región transmembrana corta por un anclaje tipo GPI (Cosman et al., 2001), se decidió comprobar si esto también ocurría en MICA*008. Para ello, se comparó MICA*008 transfectado de manera estable en células CHO parentales con una línea deficiente en la síntesis del anclaje GPI, CHO G9-PLAP-0.85 (Δ GPI) (Stevens et al., 1996). Tras la digestión con endoglicosidasa F y el análisis de MICA por *Western blot*, se observó que la banda de ~34 kDa no se encontraba en los lisados de las células deficientes en GPI (Figura 5A), indicando que dicha banda se correspondía con una forma GPI de la proteína MICA*008.

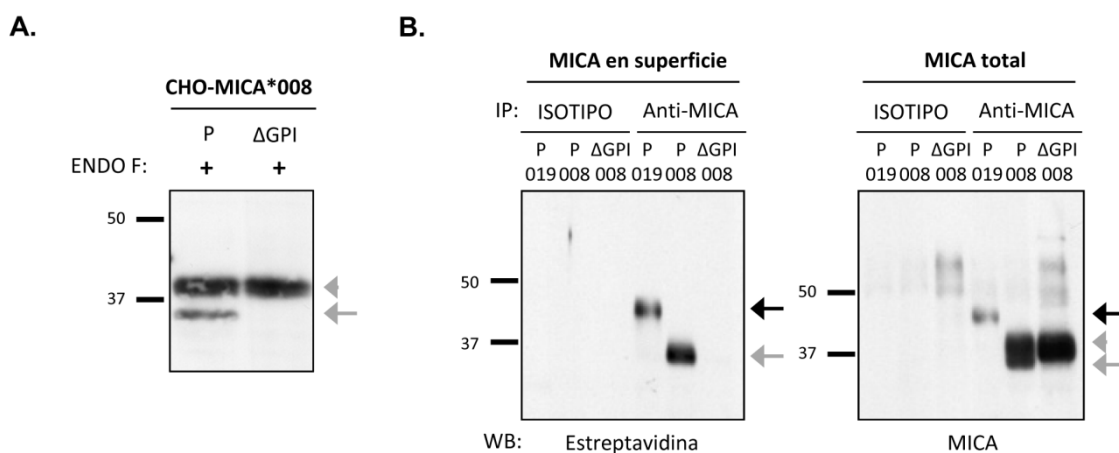


Figura 5. Análisis de la localización y el tipo de anclaje de los productos del alelo MICA*008 por *Western blot*. (A) Se transfectaron células CHO con MICA*008, en la línea parental (P) o la G9-PLAP-0.85 deficiente en GPI (Δ GPI). Los lisados se digirieron con Endo F y se analizó la expresión de MICA por *Western blot*. (B) Células CHO parentales (P) transfectadas con MICA*008 (008) o MICA*019 (019) y células CHO G9-PLAP-0.85 deficientes en GPI (Δ GPI) transfectadas con MICA*008 se marcaron con biotina en su superficie, se lisaron y se inmunoprecipitó (IP) con isotipo o anticuerpo anti-MICA. Las muestras se digirieron con endoglicosidasa F, y se analizó por *Western blot* (WB) la proteína MICA biotinilada superficial al revelar con estreptavidina (panel izquierdo); y la proteína total, revelando con un anticuerpo policlonal anti-MICA (panel derecho). Las bandas de MICA pertenecientes a MICA*019 se identifican con una flecha negra, la de MICA*008 anclada a membrana con flecha gris, y la de MICA*008 soluble con punta de flecha gris. Las bandas de más de 50 kDa no son específicas, ya que también se detectaron en control de inmunoprecipitación con el isotipo. Se muestra un experimento representativo de tres. Se indica el peso de los marcadores de peso molecular en kDa.

Asimismo, para comprobar si las distintas bandas de MICA*008 se encontraban en la membrana plasmática, las dos líneas celulares usadas en el experimento anterior, junto con células CHO transfectadas con MICA*019 se biotinilaron en superficie y se lisaron. Tras esto, se inmunoprecipitó MICA, se digirió con endoglicosidasa F y se analizó por *Western blot*, tanto MICA en superficie (revelando con estreptavidina) como el MICA total (revelando con un anticuerpo anti-MICA). Como

se puede observar en la Figura 5B, de nuevo en la fracción total de MICA*008 se encontraron las dos bandas, pero sólo la banda de ~37kDa en las células deficientes para GPI. Además, cuando se analizan los resultados de MICA en superficie, sólo se encuentra la banda de ~34kDa en las células CHO parentales, indicando que se trata de una proteína anclada a la membrana plasmática, y que además lo hace a través de un GPI, ya que no se encuentra en las células deficientes en este tipo de anclaje.

Además de demostrar el anclaje GPI de MICA*008 por *Western blot*, también se hicieron experimentos usando citometría de flujo, tratando las células CHO transfectadas con MICA*008 con la enzima PI-PLC (del inglés, *phosphoinositide-specific phospholipase C*) que corta específicamente enlaces fosfatidil-inositol, como el que contiene GPI. En las Figuras 6A y B se observa que los niveles de expresión de MICA*008 en la superficie celular se reducen tras la digestión con PI-PLC, indicando que la proteína se une por anclaje GPI. Además también se comprobó la liberación de MICA*008 con PI-PLC analizando el aumento de MICA*008 soluble en los sobrenadantes tras la digestión. Como controles positivos del tratamiento con PI-PLC se utilizaron células CHO transfectadas con los NKG2D-L anclados por GPI, ULBP1, ULBP2 y ULBP3, y como control negativo la proteína transmembrana, MICA*019. Este resultado también se obtuvo con células que expresaban de manera endógena MICA*008 (Figura 6C). Sin embargo, se puede observar que el 40% de MICA*008 fue resistente a la digestión con PI-PLC (Figura 6B).

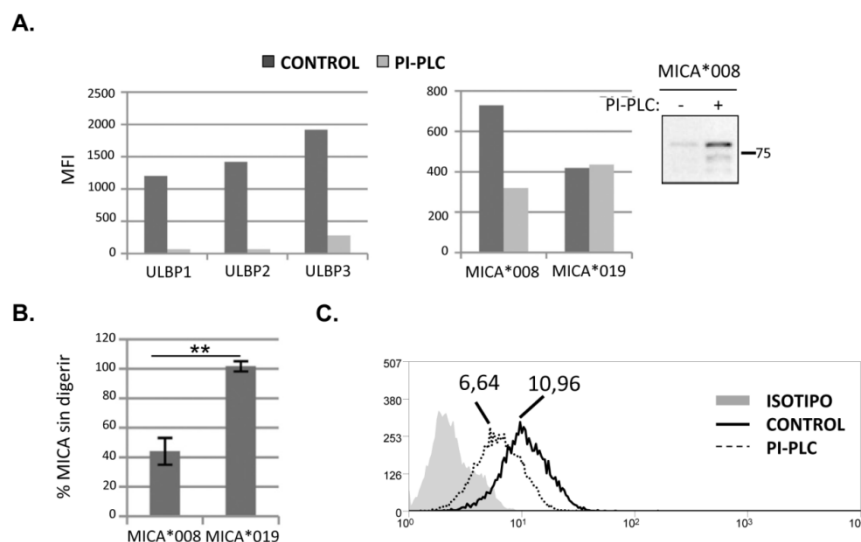


Figura 6. Análisis por citometría de flujo del anclaje GPI de MICA*008 mediante digestión con PI-PLC (A) Células CHO transfectadas con los ligandos de NKG2D indicados, se sometieron a digestión con PI-PLC o con el buffer de la enzima como control negativo y se analizaron por citometría de flujo. Se representa la intensidad media de fluorescencia (MFI). En el recuadro se muestra los niveles de MICA*008 en el sobrenadante libre de células precipitado con TCA y analizado por *Western blot* tras el tratamiento con PI-PLC, así como el control negativo de tratamiento. **(B)** Análisis estadístico del porcentaje de MICA que permanece en la membrana plasmática tras la digestión con PI-PLC. Se representa la intensidad media de fluorescencia de MICA*008 y MICA*019 tras la digestión con PI-PLC relativizada al control sin digerir (** $p < 0,01$). **(C)** Se analizaron por citometría de flujo las células HEK-293T (homocigotas para MICA*008) digeridas con PI-PLC. El número sobre cada pico indica la MFI de MICA*008. Los experimentos se repitieron entre 3 y 5 veces.

Todos estos datos demuestran que MICA*008 presenta dos formas bioquímicas: una que se encuentra en la membrana plasmática mediante un anclaje GPI y otra no anclada (para más información sobre esta forma, ver en Anexos (Ashiru et al., 2013)).

1.2 El anclaje GPI de MICA*008 es necesario para su reclutamiento a DRM y exosomas

Datos previos del laboratorio demostraron que MICA*008, se reclutaba específicamente a regiones de la membrana llamadas DRM, enriquecidas en esfingolípidos y colesterol, y se liberaba en exosomas, siendo responsable su diferente estructura en las regiones transmembrana y citoplasmática (Ashiru et al., 2010). Otras proteínas GPI también se asocian a DRM y se liberan en exosomas (revisado en López-Cobo et al., 2016).

Tras observar que MICA*008 se encontraba anclada en la membrana mediante GPI, se decidió estudiar el papel de este anclaje en el reclutamiento tanto a DRM como a exosomas. Para ello, se volvieron a utilizar como herramientas, tanto las células CHO parentales transfectadas con MICA*019 y MICA*008, como la línea deficiente en GPI transfectada con MICA*008.

Como muestra la Figura 7A, tras realizar un fraccionamiento de DRM por gradiente de densidad, se observó que MICA*008 se encontraba en las fracciones correspondientes a DRM, identificadas por su expresión de caveolina-1. Sin embargo, en las células deficientes para GPI no había MICA*008 en las fracciones que contienen los DRM, indicando la necesidad de este anclaje para el reclutamiento de la proteína a estas regiones de membrana.

Para analizar el papel del anclaje GPI en la incorporación de MICA a exosomas, se purificaron exosomas de las mismas líneas celulares utilizadas en el experimento anterior. Esta purificación se realizó mediante ultracentrifugación, y las vesículas extracelulares obtenidas (a partir de ahora, referidas como exosomas) se trataron con endoglicosidasa F, tanto los lisados de dichas células como sus exosomas, y se analizó MICA por *Western blot*. MICA*008 estaba presente en los exosomas derivados de las células parentales (Figura 7B), mientras que no se incorporaba a los exosomas de las células deficientes en GPI. Además, la banda de MICA*008 que se detectaba en los exosomas es la correspondiente a la proteína anclada mediante GPI a la membrana de ~34 kDa (flecha gris), que no se encuentra ni en las células deficientes para GPI transfectadas con MICA*008 ni en sus exosomas. Sin embargo, a pesar de que una parte del ligando transmembrana MICA*019 es reclutado a DRM, no se encuentra en exosomas.

A.



B.

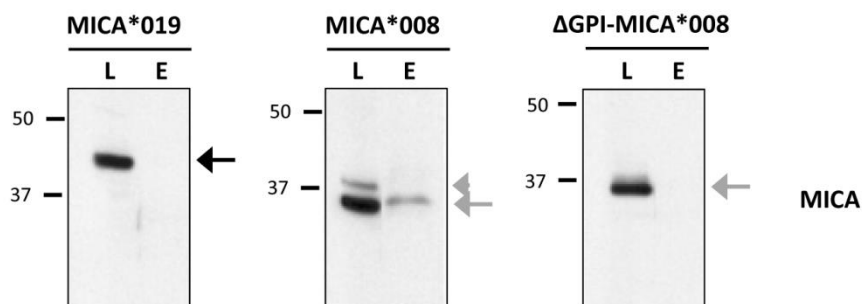


Figura 7. Papel del anclaje GPI en el reclutamiento de MICA*008 a DRM y exosomas. (A) Células parentales CHO transfectadas con MICA*019 o, en el caso de MICA*008, células CHO parentales (MICA*008) o G9-PLAP-0.85 deficiente en GPI (Δ GPI-MICA*008) se fraccionaron por gradiente de densidad con sacarosa. En las fracciones indicadas se analizó por *Western blot* la presencia de MICA y caveolina-1 (CAV-1), como proteína que se recluta a DRM. (B) Lisados (L) y exosomas (E) de las mismas células usadas en (A) se trataron con endo F y MICA se analizó por *Western blot*. La banda perteneciente a MICA*019 se identifica con una flecha negra, y las de MICA*008, con flecha gris, la forma anclada a membrana y con punta de flecha gris, la no anclada a membrana. Estos experimentos se repitieron tres veces. Se indica el peso de los marcadores de peso molecular en kDa.

Estos resultados confirman la importancia del anclaje GPI, no sólo para la expresión en la membrana plasmática de MICA*008, sino también para su reclutamiento a DRM y exosomas. Este dato es de gran relevancia debido a que la expresión de los NKG2D-L en exosomas tiene efectos negativos en la activación de las células NK. Teniendo en cuenta que estos ligandos se expresan en células tumorales y que los alelos de MICA que pertenecen al grupo A5.1, son los más frecuentes en la mayoría de las poblaciones estudiadas, el tipaje de MICA en pacientes de cáncer podría ser importante, ya que permitiría conocer si MICA se va a liberar de manera monomérica o en exosomas, lo que se relaciona con distintas formas de modular la respuesta NK.

2. Transferencia de los ULBP desde la célula diana a la célula NK

Trabajos anteriores han demostrado la transferencia de NKG2D-L, como los humanos MICA y MICB, desde la célula diana a la célula NK en el contexto de una sinapsis inmunológica citotóxica (McCann et al., 2007; Roda-Navarro et al., 2006). El estudio de este fenómeno es de gran importancia, ya que las consecuencias funcionales parecen asociarse con un mecanismo de regulación negativa tras la activación de las células NK. Puesto que sólo se había estudiado la transferencia de los NKG2D-L transmembrana, se planteó estudiar la transferencia de los ULBP, como NKG2D-L anclados mediante GPI. Para investigar el fenómeno de transferencia de estos ligandos desde la células diana a la célula NK, se procedió a la caracterización de la transferencia de los ULBP, así como el mecanismo responsable y las consecuencias funcionales que conlleva dicha transferencia a las células NK.

2.1 Los ULBP humanos se transfieren a células NK y se anclan en su membrana, en un proceso dependiente de contacto celular.

Para estudiar si los ULBP se transferían desde células diana a células NK, se hicieron experimentos de co-incubación entre células NK purificadas y varias posibles células diana. Para ello, se utilizaron células NK primarias, purificadas de las PBMC (células mononucleares de sangre periférica) de donantes sanos, y mantenidas en cultivo con IL-2; y como células diana, se usaron células CHO transfectadas con ULBP1, ULBP2 o ULBP3 (Figura 8A). Las células NK se mantuvieron en co-cultivo con las células adherentes CHO parentales, como control negativo, o transfectadas, durante 30 minutos. Posteriormente, se recogieron las células NK y se analizó el porcentaje de células NK positivas para ULBP por citometría de flujo. En la Figura 8B se muestra un ejemplo del análisis de un experimento de co-incubación con células CHO transfectadas con ULBP3.

En primer lugar, se identificó la población de células NK o de células CHO (despegadas tras el co-cultivo) usando los parámetros de tamaño y complejidad (FSC y SSC). A continuación, se analizó la expresión de CD56 en cada una de las poblaciones, siendo positiva para las células NK y negativa para las células CHO. Para comprobar la transferencia de los ULBP a las células NK, se analizó la región positiva para ULBP y CD56. El resultado muestra que las células NK eran negativas para ULBP3, tanto antes del co-cultivo, como cuando eran co-cultivadas con células CHO sin transfectar. Por el contrario, se detectaron células NK positivas para ULBP3, únicamente cuando eran co-cultivadas con células CHO transfectadas con ULBP3, demostrando así que las células NK podían adquirir este ligando de la célula diana.

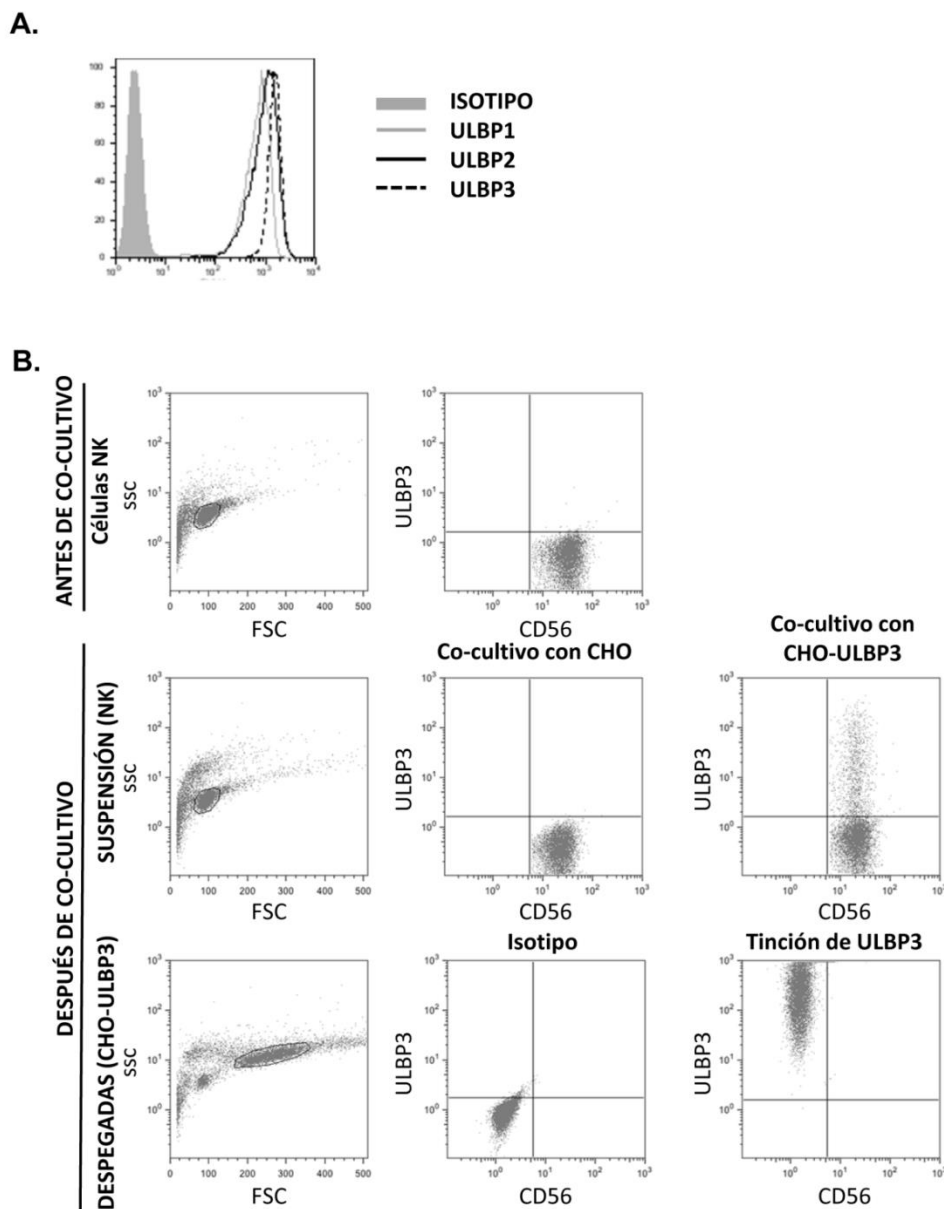


Figura 8. Análisis de transferencia de ULBP desde células CHO transfectadas a células NK. (A) Nivel de expresión de ULBP en células CHO transfectadas. Intensidad de fluorescencia de células CHO transfectadas con ULBP1, ULBP2 o ULBP3 y su control de isotipo. (B) Estrategia de selección de regiones para el análisis por citometría de flujo de los experimentos de transferencia. Se representa un ejemplo de experimento de transferencia, usando como células diana CHO, parentales o transfectadas (en este caso con ULBP3), y células NK. En la fila superior, las células NK se seleccionan por tamaño y complejidad en el gráfico FSC/SSC (izquierda) y se analiza la expresión de ULBP3 en las células CD56 positivas (derecha). Después del co-cultivo, se recogen las células NK en suspensión (fila central) que también se identifican por tamaño y complejidad (izquierda) y se analizan los niveles de ULBP3 y CD56, después del co-cultivo con células CHO parentales (centro) o transfectadas con ULBP3 (derecha). Las células CHO (fila inferior) despegadas tras los co-cultivos pueden distinguirse por tamaño y complejidad (izquierda), así como por la ausencia de CD56 y la expresión de ULBP3 (paneles centro y derecha). Entre las células CHO despegadas pueden observarse algunas células NK remanentes.

Para comprobar que la transferencia ocurría con otros ULBP, se llevaron a cabo experimentos de co-incubación con ULBP1, ULBP2 y ULBP3, y se observó que había células NK positivas para cada uno de estos ULBP tras sólo 30 minutos de co-cultivo con la respectiva célula diana (Figura 9A).

Analizando los resultados con células NK de diferentes donantes, se observaron diferencias en el porcentaje de las células NK positivas para los ULBP, sin embargo, el patrón de los porcentajes entre los diferentes ULBP se mantenía, como se observa en la Figura 9B donde se representan experimentos con 11 donantes diferentes. Se usaron células CHO parentales como control en todos los experimentos de co-incubación con células CHO transfectadas. Los resultados de transferencia de ULBP a células NK con células CHO parentales siempre fue negativa, por lo que no se mostrará en los siguientes experimentos.

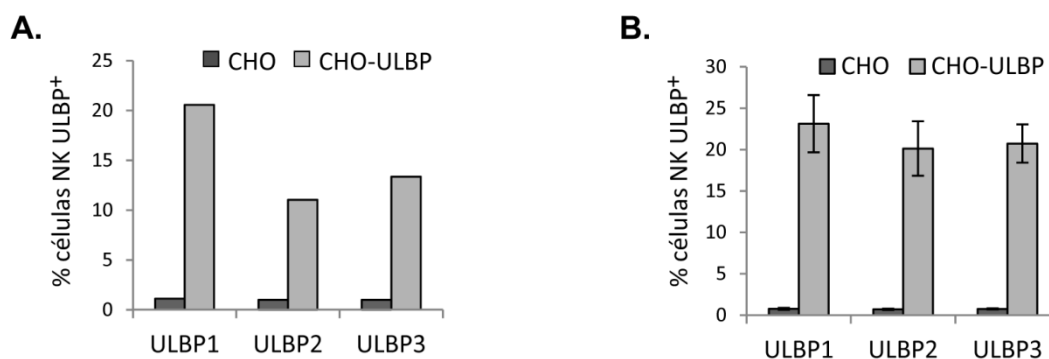


Figura 9. Las células NK adquieren ULBP. Las células NK primarias se co-incubaron con células CHO parentales o transfectadas con ULBP (CHO-ULBP) durante 30 minutos. Se representa el porcentaje de células NK CD56⁺ y ULBP⁺ analizado como se comentó en la Figura 8B. (A) Se muestra un experimento significativo. (B) Para análisis estadístico se muestra la media y la desviación estándar de 11 experimentos con diferentes donantes.

Para comprobar que la transferencia de ULBP se trataba de un proceso específico, se realizaron experimentos de co-incubación con cada transfectante en CHO, pero realizando la tinción con anticuerpos que reconocían un ULBP distinto al que expresaba la célula diana. Como demuestra la Figura 10A, por ejemplo, no se detectó ULBP2 en la superficie de las células NK, si estas habían sido co-cultivadas con células CHO transfectadas con ULBP1, y lo mismo sucedió con otros ULBP, lo cual prueba la ausencia de reacciones cruzadas y que sólo el ULBP transfectado en la célula CHO era el adquirido por la célula NK. Asimismo, para excluir que la expresión de ULBP en las células NK se debiera a síntesis *de novo*, se analizó la transferencia mediante la detección del epítipo *FLAG* presente en las construcciones con las que se realizaron las transfecciones en las células CHO (Figura 10B). Para ello, tras las co-incubaciones se realizó el marcaje con un anticuerpo anti-FLAG, en lugar de anti-ULBP. Como muestra la Figura 10C, las células NK eran positivas para FLAG tras los co-cultivos. Este resultado, junto con la especificidad del ULBP adquirido por la célula NK, descarta la posibilidad de la expresión *de novo* de los ULBP en las células NK y apoya que los ULBP que se encuentran en las células NK tras la co-incubación proceden de la célula diana.

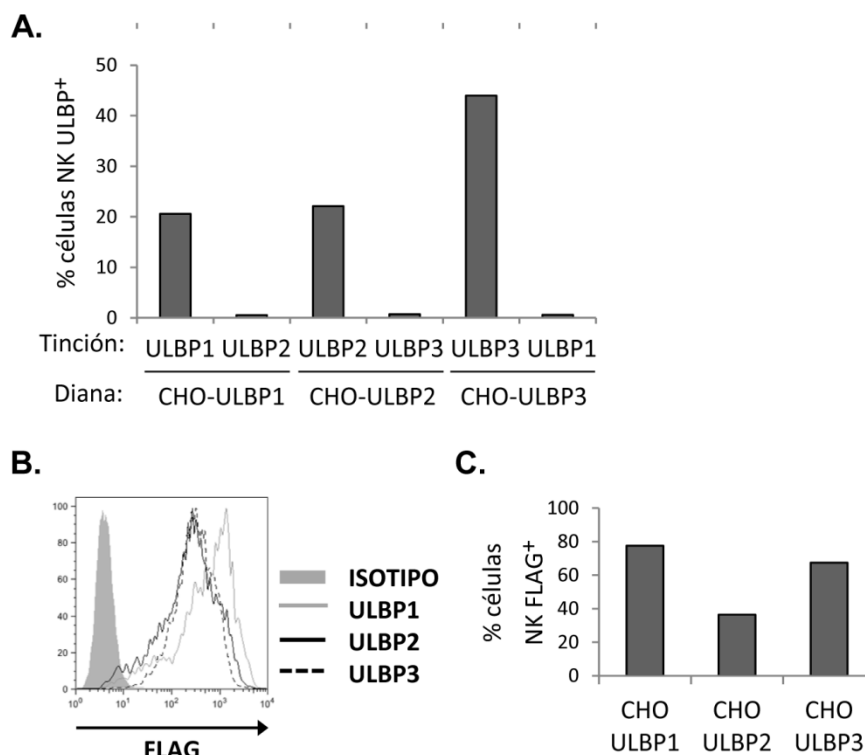


Figura 10. Especificidad de la transferencia de ULBP y detección con anticuerpo anti-FLAG. (A) Los co-cultivos de células NK se hicieron usando como células diana, CHO transfectadas con ULBP (CHO-ULBP1, CHO-ULBP2 o CHO-ULBP3) y la tinción se realizó con los anticuerpos indicados. Se representa el porcentaje de células NK CD56⁺ y ULBP⁺ analizado por citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo de dos. (B) Nivel de expresión del epítipo FLAG en las células CHO transfectadas con ULBP. Intensidad de fluorescencia de células CHO transfectadas con ULBP1, ULBP2 o ULBP3 y su control de isotipo. (C) Células NK primarias se co-incubaron con células CHO transfectadas para ULBP1, ULBP2 y ULBP3, y teñidas con un anticuerpo anti-FLAG. Se representa el porcentaje de células NK CD56⁺ y FLAG⁺ analizado por citometría de flujo en gráfico de barras. Se muestra un experimento representativo de tres.

A continuación, para estudiar la necesidad del contacto celular para la transferencia de los ULBP a las células NK, se realizaron co-cultivos usando placas con soportes semi-permeables *transwell* con un tamaño de poro de 0,4 μm , como barrera de separación entre ambos tipos celulares. La presencia de estas membranas en los experimentos de transferencia anuló completamente la adquisición de ULBP por las células NK (Figura 11), demostrando que este proceso requería contacto celular.

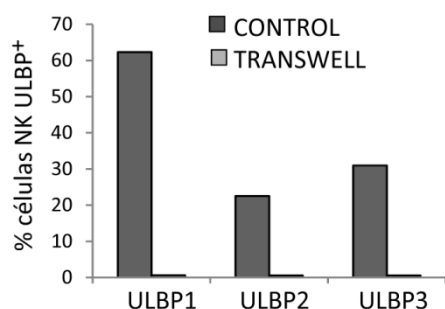


Figura 11. La adquisición de ULBP por las células NK requiere contacto celular. Los co-cultivos se realizaron en la presencia (*transwell*) o ausencia (control) de una membrana semi-permeable *transwell* con poros de un diámetro de 0,4 μm . Se representa el porcentaje de células NK CD56⁺ y ULBP⁺ analizado por citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo de tres.

Tras conocer estos datos, se comprobó en qué orientación y mediante qué tipo de unión se encontraba anclado el ULBP transferido a la célula NK. Como los ULBP son proteínas ancladas a la membrana a través de GPI, son sensibles a la acción de la enzima PI-PLC. Por ello, tras las co-incubaciones entre células CHO transfectadas con ULBP y las células NK, se trataron estas últimas con PI-PLC (Figura 12A). Este tratamiento provocó una reducción en el porcentaje de las células NK que tenían ULBP en su superficie. También se realizaron tratamientos con pH ácido que disociarían interacciones basadas en cargas. Sin embargo, este tratamiento no afectó al porcentaje de células NK que habían adquirido ULBP tras la co-incubación (Figura 12B). Como control positivo para este tratamiento, se analizó su efecto en los niveles de expresión de NKG2D y MHC de clase I (MHC-I) (Figura 12C). Por ejemplo, el plegamiento de la molécula MHC-I requiere la formación de puentes de hidrógeno y la estabilización de cargas, por ello, el tratamiento ácido provoca el desplegamiento de la molécula, y consecuentemente, la pérdida de unión al anticuerpo utilizado. Por esta razón, tras el tratamiento ácido, disminuyen los niveles de fluorescencia de MHC-I. El hecho de que el tratamiento ácido no afecte a la transferencia, junto al resultado obtenido con el tratamiento con PI-PLC, indica que existe una inserción estable y en la orientación nativa de los ULBP, a través del anclaje GPI, en la membrana plasmática de las células NK.

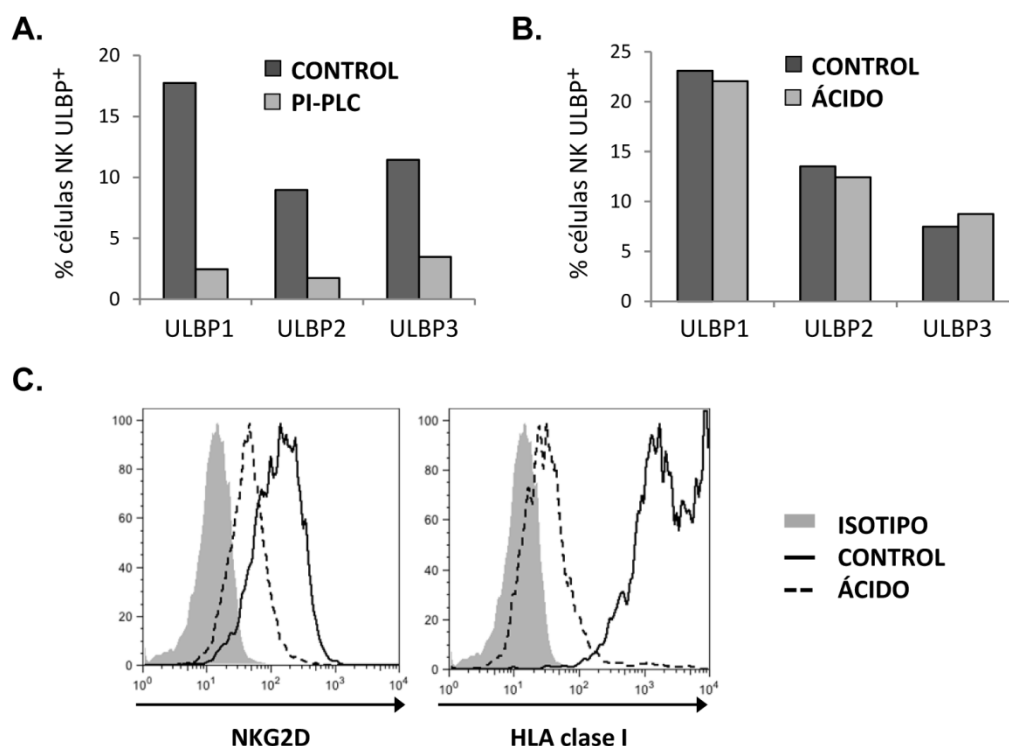


Figura 12. Anclaje del ULBP transferido en la membrana de la célula NK. Tras las co-incubaciones de 30 minutos con células CHO transfectadas con ULBP1, ULBP2 o ULBP3, se tratan las células NK con PI-PLC o el buffer de la enzima (CONTROL) (A); o con lavados ácidos a pH 3,3 (ÁCIDO) (B). Se representa el porcentaje de células NK CD56⁺ y ULBP⁺ analizado por citometría de flujo. (C) Como control positivo de los tratamientos ácidos se analiza la reducción en intensidad de fluorescencia de NKG2D (izquierda) y HLA clase I (derecha) en las células NK y su control de isotipo. Se muestra un experimento representativo de tres.

Los resultados obtenidos hasta ahora, demuestran que los ULBP son transferidos de la célula donante a la célula aceptora, de una manera dependiente de contacto celular, y se encuentran ancladas en la membrana plasmática en su orientación original y mediante un anclaje GPI. Estas características podrían estar relacionadas con el fenómeno conocido como trogocitosis (Joly y Hudrisier, 2003), que se define como la transferencia de porciones intactas de membrana plasmática y sus proteínas asociadas. Durante el desarrollo de estos experimentos, se sugirió que este fenómeno de trogocitosis también estaba implicado en el mecanismo de transferencia de Rae-1 δ y ϵ , ligandos de NKG2D en ratón (Nakamura et al., 2013a).

2.2 La transferencia de diferentes ligandos de NKG2D ocurre con distinta cinética y eficiencia

Para seguir con la caracterización del fenómeno de transferencia, se quiso comparar la transferencia de distintos NKG2D-L y la influencia que podía tener el tipo de anclaje a membrana.

En primer lugar, se estudió la cinética de la transferencia a distintos tiempos de co-incubación (Figura 13). Como ya se había visto, se trata de un proceso muy rápido, ya que se detectó un 10% de células NK positivas para ULBP tras 5 minutos de co-cultivo. A tiempos más largos de co-incubación, se observó un aumento de la transferencia de ULBP, en general, alcanzando el máximo a las 6 horas y empezando a reducirse tras 18 horas. Esta disminución podría explicarse por la internalización o por la liberación de los ULBP adquiridos por las células NK. Un resultado llamativo que se vuelve a mostrar en este experimento, es que los diferentes ULBP siguen un patrón diferente de transferencia: el porcentaje de células NK positivas para ULBP2 siempre fue menor, además la transferencia de ULBP2 alcanzó su máximo a tiempos más cortos de co-cultivo que ULBP1 o ULBP3. Este resultado no se debía a diferencias en la afinidad de los anticuerpos que reconocen ULBP, ya que cuando se usó un anticuerpo anti-FLAG para analizar los niveles de ULBP2 transferido a las células NK se obtuvo el mismo resultado (Figura 10C). Sin embargo, aunque este patrón puede observarse en diferentes experimentos (Figura 9A,B), las diferencias no eran estadísticamente significativas debido a la variabilidad de los valores entre los distintos donantes.

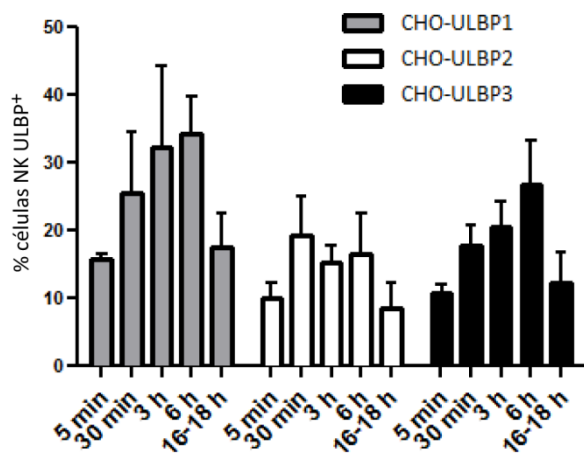


Figura 13. Cinética de la transferencia de ULBP a las células NK. Las células NK se co-cultivaron con células CHO transfectadas con ULBP1 (CHO-ULBP1), ULBP2 (CHO-ULBP2) o ULBP3 (CHO-ULBP3) durante los tiempos indicados. Se representa la media y SEM del porcentaje de células NK CD56⁺ y ULBP⁺ analizado por citometría de flujo de tres experimentos con células NK de tres donantes diferentes.

A continuación, se quiso comparar cómo afectaba el tipo de anclaje a membrana a la transferencia de distintos ligandos. Para ello, se usaron células CHO transfectadas con MICA*019 y MICB, NKG2D-L transmembrana, en experimentos de co-incubación con células NK (Figura 14A, B). En estos experimentos, se detectaron células NK que adquirirían MICA en cantidades comparables a los ULBP, demostrando que la propiedad de ser un ligando transmembrana o GPI no afectaba al nivel de transferencia a las células NK. El porcentaje de células NK positivas para MICB fue menor, y podría deberse a que las células CHO transfectadas con MICB perdían su expresión en superficie, apareciendo una población negativa (Figura 14C). Por tanto, las diferencias en la transferencia de los distintos NKG2D-L, no estaría relacionada con el tipo de anclaje a la membrana, sino con el menor nivel de expresión de partida en las células CHO.

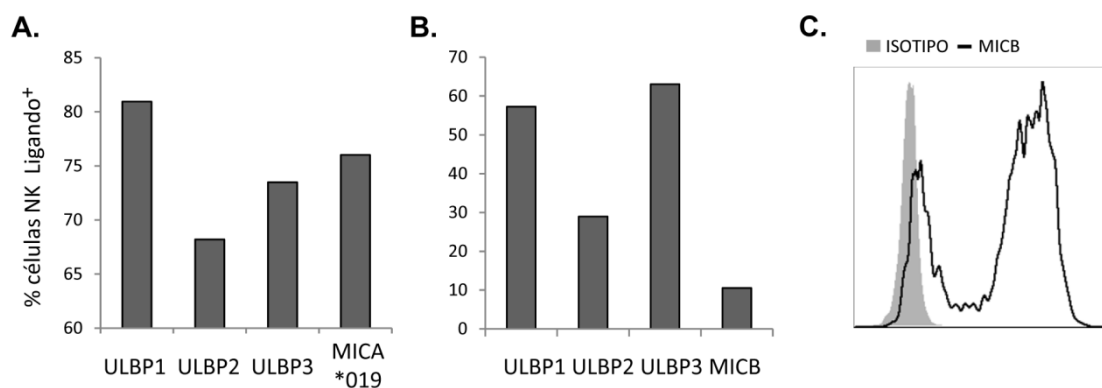


Figura 14. Transferencia de ligandos de NKG2D anclados mediante GPI y transmembrana. Las células NK son co-cultivadas con células CHO transfectadas con ULBP1, ULBP2, ULBP3, MICA*019 (A), o MICB (B) durante una hora. Se representa el porcentaje de células NK CD56⁺ que son positivas para cada uno de los ligandos analizado por citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo de cinco (A) o dos (B). (C) Nivel de expresión de MICB en células CHO transfectadas y su control de isotipo.

Los experimentos de transferencia mostrados hasta este punto se habían realizado usando células transfectadas, como células diana, por ello, el siguiente paso fue comprobar que este fenómeno también ocurría con células que expresaban NKG2D-L de manera endógena. Para ello, se usaron como células diana, las líneas de cáncer de vejiga, J82 y RT-112, y la línea celular de glioblastoma, U373, que expresaban diferentes niveles de estos ligandos (Figura 15A,B). Cuando se usaron las células de cáncer de vejiga como donantes en los co-cultivos, también se encontraron células NK que adquirirían MICA, ULBP2 y ULBP3 en su superficie. El porcentaje de células NK que adquirieron los ligandos fueron menores, lo cual se relacionaba con los menores niveles de expresión endógena de estos ligandos, si se comparan con la sobreexpresión en las células CHO. En el caso de la transferencia desde células U373, aunque expresaban menos ULBP3 que ULBP2, ULBP3 se adquiría de manera más eficiente que ULBP2, resultado que también se había encontrado en diferentes experimentos utilizando células CHO, como en las Figuras 9A, 9B, 10C o 13. Además, estos últimos resultados demuestran que el fenómeno de la transferencia también ocurría con células que expresan los NKG2D-L de manera endógena.

Como ya se ha descrito anteriormente, un resultado interesante que se repite en diferentes experimentos es que los diferentes NKG2D-L se transfieren con diferente eficiencia a las células NK, otro ejemplo más que demuestra que no todos los NKG2D-L se comportan de la misma manera y que se suma a otras diferencias que se han descrito relacionados con su biología celular (Fernández-Messina et al., 2012). En concreto, en cuanto a la transferencia, parece bastante llamativo y recurrente el hecho de que ULBP2 siempre se transfería de manera menos eficiente. Debido a que datos previos del laboratorio indican que ULBP2 es más susceptible a la acción de metaloproteasas (Fernández-Messina et al., 2010), se pasó a analizar la influencia de la liberación de esta proteína por corte proteolítico en la transferencia a células NK. Para ello, se llevaron a cabo experimentos usando el inhibidor de metaloproteasas de amplio espectro Batimastat (BB94) (Figura 16). A pesar de que este tratamiento no parecía afectar al nivel de expresión de ULBP2 en la superficie de las células CHO, el porcentaje de células NK positivas para ULBP2 fue mayor en presencia del inhibidor de metaloproteasas. En cambio, el porcentaje de células NK que adquirirían ULBP3 no se vio afectado, sugiriendo que la menor detección de ULBP2 en los experimentos de transferencia podría deberse a procesos proteolíticos. Sin embargo, no se puede concluir de estos resultados, si la proteólisis tuvo lugar en la membrana de la célula donadora o de la aceptora.

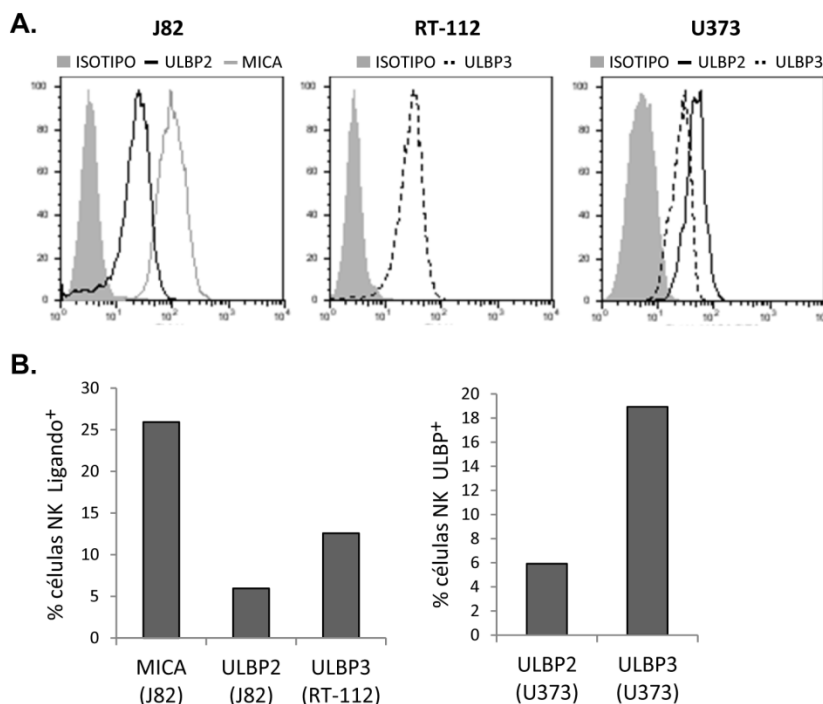


Figura 15. Transferencia de ligandos de NKG2D expresados de manera endógena. (A) Intensidad de fluorescencia de diferentes ligandos de NKG2D expresados de manera endógena por las células de cáncer de vejiga, J82 y RT-112, y las células de glioblastoma, U373, y sus controles de isotipo. (B) Las células NK son co-incubadas con las diferentes células donantes durante una hora. Se representa el porcentaje de células NK CD56⁺ que son positivas para cada uno de los ligandos, analizado por citometría de flujo. Se muestra un experimento representativo de tres.

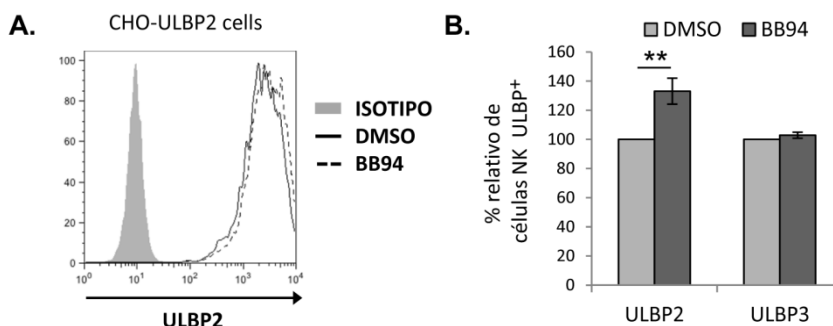


Figura 16. Efecto de la inhibición de metaloproteasas en la transferencia de ULBP2 a las células NK. Células CHO transfectadas con ULBP2 o ULBP3 se trataron con el diluyente (DMSO) o BB94 5 μ M durante 2 horas, a continuación se co-cultivaron con células NK durante una hora manteniendo los tratamientos. (A) Intensidad de fluorescencia de ULBP2 en células CHO transfectadas tratadas con DMSO o BB94 y su control de isotipo. (B) Porcentaje de células NK CD56⁺ ULBP⁺ tratadas con BB94 relativizado al porcentaje de las tratadas con DMSO. Se representa la media y la desviación estándar de cuatro experimentos. La significancia estadística se determinó usando el análisis de varianza *one-way Turkey's multiple comparison test* entre DMSO y BB94. **p < 0,01,

Todos estos datos, demuestran que la transferencia es un proceso rápido y que no depende del tipo de anclaje del ligando a la membrana. Sin embargo, diferentes factores como el nivel de expresión de los NKG2D-L en la membrana de las células donadoras o su susceptibilidad a metaloproteasas influyen en la eficiencia y la cinética de la transferencia de los diferentes NKG2D-L a las células NK.

2.3 La activación de las células NK y la interacción con el receptor son necesarias para la transferencia de los ligandos de NKG2D

Una vez analizadas las propiedades de los ligandos que influían en la transferencia, se pasó a estudiar cuáles eran las características intrínsecas de las células NK necesarias para este proceso.

Teniendo en cuenta que el receptor NKG2D se expresa en todas las células NK humanas, pero únicamente se detectaban ULBP en algunas células NK, se intentó caracterizar si alguna subpoblación específica de células NK era la que estaba adquiriendo los ligandos. Para ello, se analizó la expresión de marcadores presentes en subpoblaciones, como CD8, algunos implicados en la activación o maduración de las células NK, así como receptores activadores e inhibidores, como los KIR - CD158a (KIR2DL1) y CD158b (KIR2DL2/3) - o NKG2A (Figura 17). También se estudiaron otros marcadores como CD94, NKG2C y CD161 (datos no mostrados).

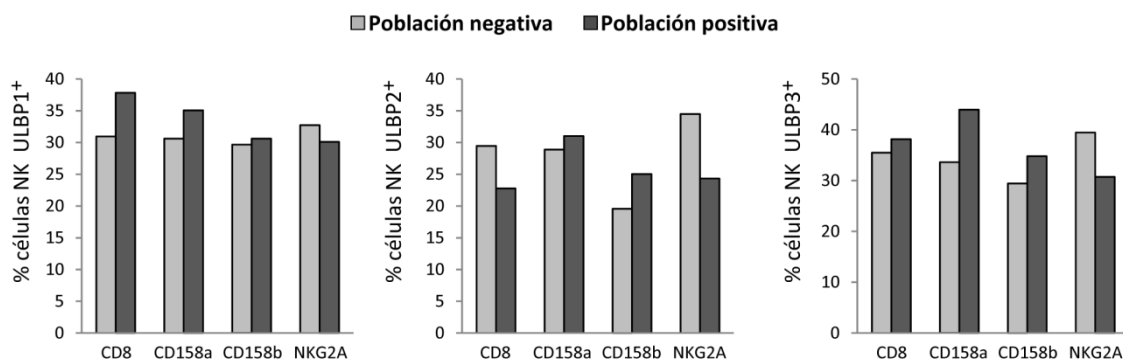


Figura 17. Adquisición de ULBP por diferentes subpoblaciones de células NK. Se co-cultivaron células CHO transfectadas con ULBP1, ULBP2 o ULBP3 con células NK durante una hora. Se representa el porcentaje de células NK CD56⁺ que son positivas para cada ULBP en la población negativa o positiva para cada uno de los marcadores. Se muestra un experimento representativo de tres.

Debido a que ninguna de las subpoblaciones definidas con estos marcadores se correspondía con la población que adquiría los NKG2D-L, a continuación, se estudió el papel del estado de activación de las células NK en la transferencia de los ligandos. Las células NK usadas en todos los experimentos anteriores eran células primarias mantenidas en cultivo en presencia de IL-2 y células diana irradiadas. Sin embargo, para estudiar el papel de la activación de las células NK en la transferencia, se realizaron experimentos de transferencia utilizando células NK recién purificadas, sin estimular con citoquinas o estimuladas con IL-2 durante 16 horas. Para evaluar el estado de activación, se analizó el nivel de expresión de CD69, marcador de activación, en ambos cultivos de células NK (Figura 18A). Los niveles de CD69 fueron ligeramente más altos en las células activadas de manera transitoria con IL-2, pero mucho más bajos que las líneas establecidas de células NK mantenidas en cultivo con IL-2 durante más tiempo, que se utilizaron en los demás experimentos de

transferencia. A pesar de ello, el porcentaje de células NK activadas con IL-2 durante 16 horas que adquirieron ULBP fue mayor que el de las células que se mantuvieron sin estimular (Figura 18B). También se puede observar que el porcentaje de células NK que adquieren ligandos fue mucho menor que los observados con células NK activadas durante más tiempo. Estos datos indican que la activación de la célula NK es importante para la transferencia de los NKG2D-L.

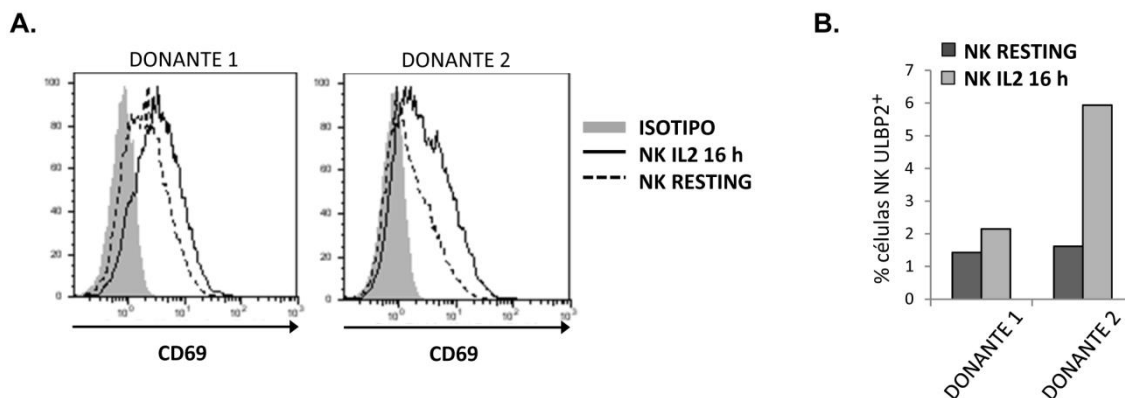


Figura 18. Influencia del estado de activación de las células NK en la transferencia de ligandos. Células NK recién purificadas de 2 donantes se mantuvieron durante 16 h en presencia (NK IL2 16 h) o ausencia (NK *RESTING*) de IL-2. (A) Intensidad de fluorescencia de CD69 en ambos cultivos de células NK de 2 donantes y su control de isotipo. (B) Las células NK de los 2 donantes en los diferentes estados de activación se co-incubaron con células CHO transfectadas con ULBP2 durante una hora. Se representa el porcentaje de células NK CD56⁺ que son positivas para ULBP2.

Tras observar que el estado de activación era importante para la transferencia de ligandos, se estudió la relación entre este proceso y la actividad citotóxica de las células NK frente a las células diana. Para ello, se analizaron simultáneamente por citometría de flujo la liberación de gránulos líticos de las células NK, a través de la expresión del marcador CD107a o LAMP1 (del inglés, *Lysosomal-Associated Membrane Protein-1*) en superficie, como indicador de la activación de la maquinaria lítica, y la adquisición de ULBP tras los co-cultivos. Como se puede ver en las Figuras 19 A y B, cuando se comparan estos parámetros, el porcentaje de células NK positivas para LAMP1, fue mayor en las células NK que habían adquirido el ligando, y las células NK que no habían adquirido ligando, no expresaban LAMP1 en su superficie. Una interpretación de este dato sería que las células NK que habían adquirido ULBP eran aquellas que también habían liberado gránulos. Cuando se analizó el sentido contrario, es decir, la transferencia en las células NK que habían liberado gránulos o no, se observó que las células negativas para LAMP1 tenían niveles de ULBP más bajos en su superficie, sugiriendo que la transferencia era ineficiente en las células que no habían liberado gránulos (Figura 19 C, D). Por lo tanto, esto indica que la transferencia está relacionada con la activación de la maquinaria lítica y la movilización de los gránulos líticos de la célula NK. Estos datos sugieren que la formación de una sinapsis inmunológica citotóxica sería

necesaria para la transferencia de los NKG2D-L, aunque para demostrar esto se necesitarían experimentos más específicos.

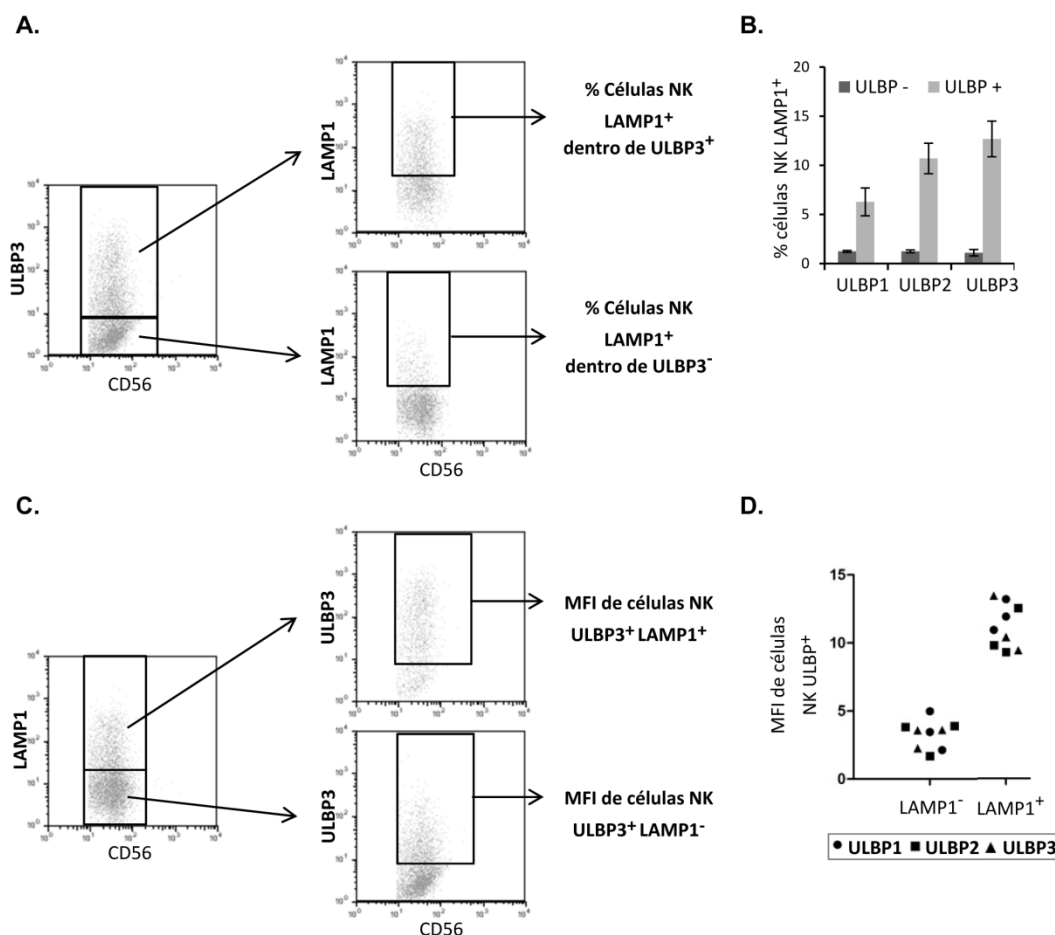


Figura 19. Correlación entre transferencia de ULBP y liberación de gránulos líticos. Se co-cultivaron células NK con células CHO transfectadas con ULBP1, ULBP2 o ULBP3 durante dos horas. Posteriormente se analizó la transferencia de ULBP y la liberación de gránulos por la expresión del marcador LAMP1. **(A)** Estrategia de análisis por citometría de flujo de un experimento representativo con ULBP3 para calcular la liberación de gránulos de las células NK positivas para ULBP. Se identifican las células NK CD56⁺ que adquieren ULBP o no (panel izquierdo), y se analiza la expresión de LAMP1 en cada una de las regiones (paneles de la derecha). **(B)** Expresión de LAMP1 de las células NK CD56⁺. Se representa la media y la desviación estándar del porcentaje de células NK CD56⁺ que son positivas para LAMP1, tanto en la población negativa como positiva para cada uno de los ULBP. El porcentaje de células NK LAMP1⁺ frente a las CHO parentales fue 1-2% de media. Se realizaron 6 experimentos con diferentes donantes con cada ULBP. **(C)** Estrategia de análisis por citometría de flujo de un experimento representativo con ULBP3 para calcular los niveles de adquisición de ULBP en las células NK que habían liberado gránulos. Se identifican las células NK CD56⁺ que expresan o no LAMP1 (panel izquierdo), y se analiza la expresión de ULBP en cada una de las regiones (paneles de la derecha). **(D)** Se representa la MFI de cada ULBP en las células NK que han liberado gránulos (LAMP1⁺) o no (LAMP1⁻). Los diferentes símbolos representan a los distintos ULBP como se muestra en la leyenda. Se realizaron 3 experimentos con diferentes donantes con cada ULBP.

En vista de estos resultados, cabe pensar que la actividad citotóxica en las células NK vendría precedida de la interacción receptor-ligando durante el co-cultivo. Por esta razón, para estudiar el papel del receptor en el proceso de transferencia, se realizaron experimentos de co-incubación bloqueando el receptor NKG2D. Como se observa en la Figura 20, la intensidad de fluorescencia de los ligandos transferidos y el porcentaje de las células NK que adquirieron ULBP fueron menores en la presencia de anticuerpos bloqueantes de NKG2D. Este resultado indica que el reconocimiento por

parte del receptor facilita la transferencia de sus ligandos a la célula NK. Sin embargo, se observó que la reducción en el porcentaje de células NK que adquirieron ULBP debida al bloqueo de NKG2D oscilaba entre 40-80% dependiendo de cada ULBP, siendo menor para ULBP2. Este dato, junto a la diferente cinética de transferencia de ULBP2, podría indicar la existencia de otros mecanismos independientes de interacción receptor-ligando, responsables de la transferencia de ULBP2.

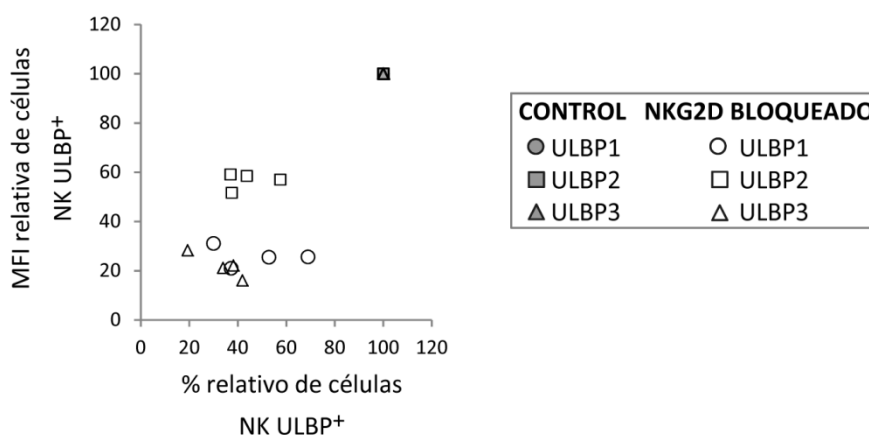


Figura 20. Bloqueo de NKG2D en la transferencia de ULBP. Se realizaron experimentos de transferencia con células NK control, sin bloquear (símbolos grises) o bloqueadas con un anticuerpo monoclonal anti-NKG2D (símbolos blancos). Se representa la MFI y el porcentaje de células NK que adquieren ULBP relativizados a los niveles con las células NK control (todos los símbolos grises se encuentran superpuestos en el valor 100%). Se muestran 4 experimentos con distintos donantes para cada ULBP.

Para continuar estudiando la importancia de la interacción con el receptor, se realizaron otra serie de experimentos. En primer lugar, debido a que NKG2D también se expresa en linfocitos T citotóxicos, se usaron estas células como efectoras en experimentos de transferencia. Las células T $CD3^+$ $NKG2D^+$ también adquirieron ULBP en su superficie tras ser co-incubadas con células CHO transfectantes para ULBP (Figura 21A,B). En segundo lugar, para ver la importancia de la interacción por parte de los ligandos, se utilizaron células CHO transfectadas con quimeras que carecían de la parte extracelular de cada ULBP, necesaria para la interacción con el receptor, y en su lugar expresaban GFP (Figura 22). Como era de esperar, tras los co-cultivos de estas células con células NK, los niveles de transferencia de la señal GFP eran muy similares a los observados con las células CHO parentales sin transfectar. Estos bajos niveles, indican que sólo la parte GPI de la proteína no es suficiente para transferirse a la célula efectora, sino que es necesaria la región extracelular para que permita el reconocimiento por parte del receptor, y la posterior transferencia del ligando a la células NK.

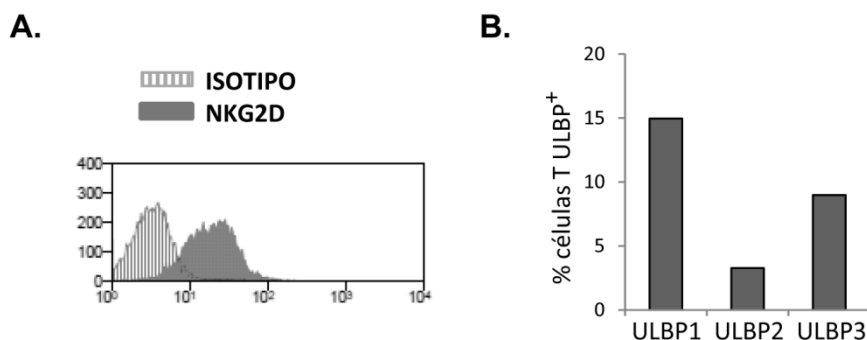


Figura 21. Transferencia de ULBP a linfocitos T NKG2D⁺. (A) Intensidad de fluorescencia de NKG2D en linfocitos T CD3⁺ y su control de isotipo. (B) Se co-incubaron estas células T con CHO transfectadas con los distintos ULBP durante 30 min. Se representa el porcentaje de células T CD3⁺ que son positivas para los ULBP. Se muestra un experimento representativo de dos.

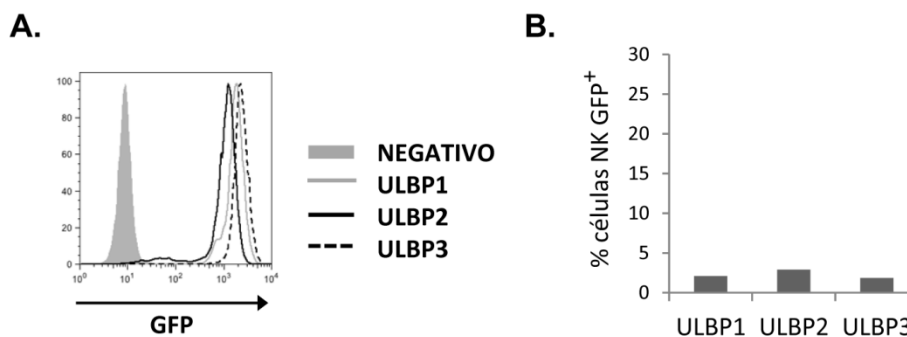


Figura 22. Transferencia de quimeras GFP-GPI. (A) Intensidad de fluorescencia de GFP en células CHO transfectadas con las quimeras que contienen en la región extracelular GFP unida a las regiones C-terminales de ULBP1, ULBP2 o ULBP3, y por tanto, expresadas con los tres anclajes GPI distintos. Se incluye un control negativo sin GFP. (B) Se co-incubaron células NK con las diferentes CHO transfectadas durante 1 h. Se representa el porcentaje de células NK CD56⁺ que son positivas para GFP. Se muestran un experimento representativo de dos.

En resumen, estos datos demuestran que la transferencia de los NKG2D-L depende, principalmente, del estado de activación de las células NK y de su maquinaria lítica, precedida de la interacción receptor-ligando.

2.4 Los ULBP transferidos se encuentran próximos a NKG2D y se pueden mantener de manera estable en la membrana

Tras conocer el mecanismo responsable de la transferencia de los ULBP a las células NK, se quiso profundizar en el estudio del destino de las moléculas transferidas en la membrana de la célula NK. Como se ha descrito anteriormente en la Figura 12A, el ligando transferido se encontraba anclado en la orientación correcta mediante GPI en la membrana de la célula NK. Por esta razón, a continuación, se analizó la localización del ligando con respecto al receptor en la membrana de la célula NK. Para ello, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación de la siguiente manera:

se lisaron las células NK recuperadas tras co-incubaciones de 2 horas, se inmunoprecipitó NKG2D y se analizó por *Western blot* la presencia de ULBP. Así, se pudo observar que ULBP3 era co-inmunoprecipitado sólo en las células NK que habían sido co-incubadas con células CHO transfectadas con ULBP3, pero no con las parentales (Figura 23A), a pesar de que los niveles de NKG2D en las células NK eran iguales en ambos casos. Para descartar que se debiera a interacciones posteriores a la lisis de las células, se mezclaron lisados de células NK y células CHO en la misma proporción que se encontraban tras los co-cultivos. En estos experimentos no se observó la banda correspondiente a ULBP3, lo cual sugiere que la asociación se producía antes de la lisis de las células (Figura 23B,C). Por lo tanto, estos datos demuestran que el ligando transferido, tras 2 horas de co-cultivo, se encuentra cerca de NKG2D en la misma micela formada tras la lisis con detergente.

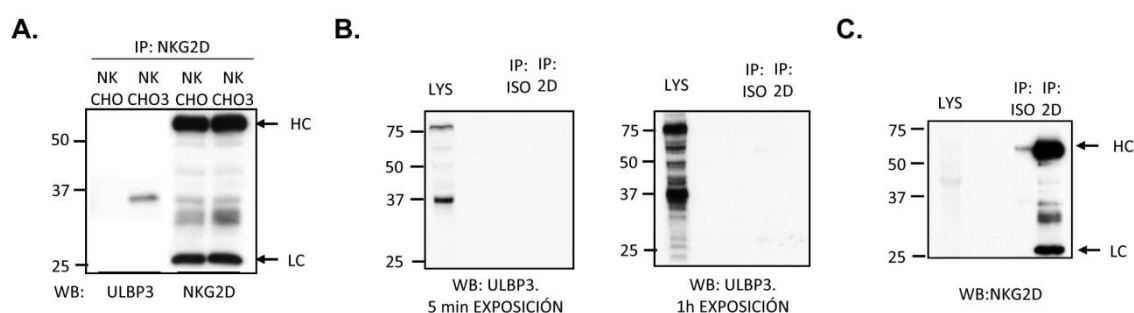


Figura 23. Co-inmunoprecipitación de ULBP3 y NKG2D en las células NK. (A) NKG2D se inmunoprecipitó de células NK co-incubadas 2 h con células CHO transfectadas con ULBP3 (CHO3) o parentales (CHO). ULBP3 co-inmunoprecipitado se detectó por *Western blot*, así como NKG2D como control de inmunoprecipitación y carga. Las bandas correspondientes a la cadena pesada (HC) y ligera (LC) del anticuerpo se indican con flechas. (B) Lisados de células NK y CHO transfectadas con ULBP3 (LYS) se mezclaron en proporciones similares a las de los co-cultivos. Se inmunoprecipitó usando anti-NKG2D (IP:2D) o su correspondiente isotipo (IP:ISO) y se detectó por *Western blot* ULBP3 (se muestra exposición corta y larga) o (C) NKG2D como control de inmunoprecipitación y carga. Se muestra un experimento representativo de tres. Se indica el peso de los marcadores de peso molecular en kDa.

Seguidamente, para investigar una posible interacción entre el ligando y el receptor en la membrana de la célula NK, se realizaron experimentos de transferencia usando la construcción NKG2D-Fc, en lugar de anticuerpos anti-ULBP (Figura 24A,B). De esta manera, también se observó la transferencia de ULBP3, aunque a un nivel menor. Este resultado podría indicar que una parte de los ULBP estarían interaccionando con NKG2D, y por ello impedirían la unión de NKG2D-Fc. Sin embargo, es importante tener en cuenta que interpretar este resultado de manera cuantitativa es difícil, ya que la afinidad de NKG2D-Fc depende de cada ULBP, y además es mucho más baja (del orden μM) que la de los anticuerpos monoclonales específicos para cada ULBP (del orden nM). Además otras evidencias permiten descartar la posibilidad de una interacción entre ambas moléculas: por un lado, se demostró que el tratamiento con pH ácido (Figura 12B) no afectaba a los niveles de ULBP en la membrana de las células NK, mientras que si ULBP estuviera unido a NKG2D, este tratamiento induciría el desensamblaje de NKG2D y habría un aumento en el nivel de ULBP; y por otro lado, el anticuerpo utilizado para inmunoprecipitar NKG2D está descrito como bloqueante de la

interacción receptor-ligando (Bauer et al., 1999) y no permitiría la inmunoprecipitación de NKG2D si este estuviera unido a ULBP. Por lo tanto, estos resultados parecen indicar que ambas proteínas se encuentran cerca en la membrana de la célula NK, pero no se puede concluir que estén interaccionando.

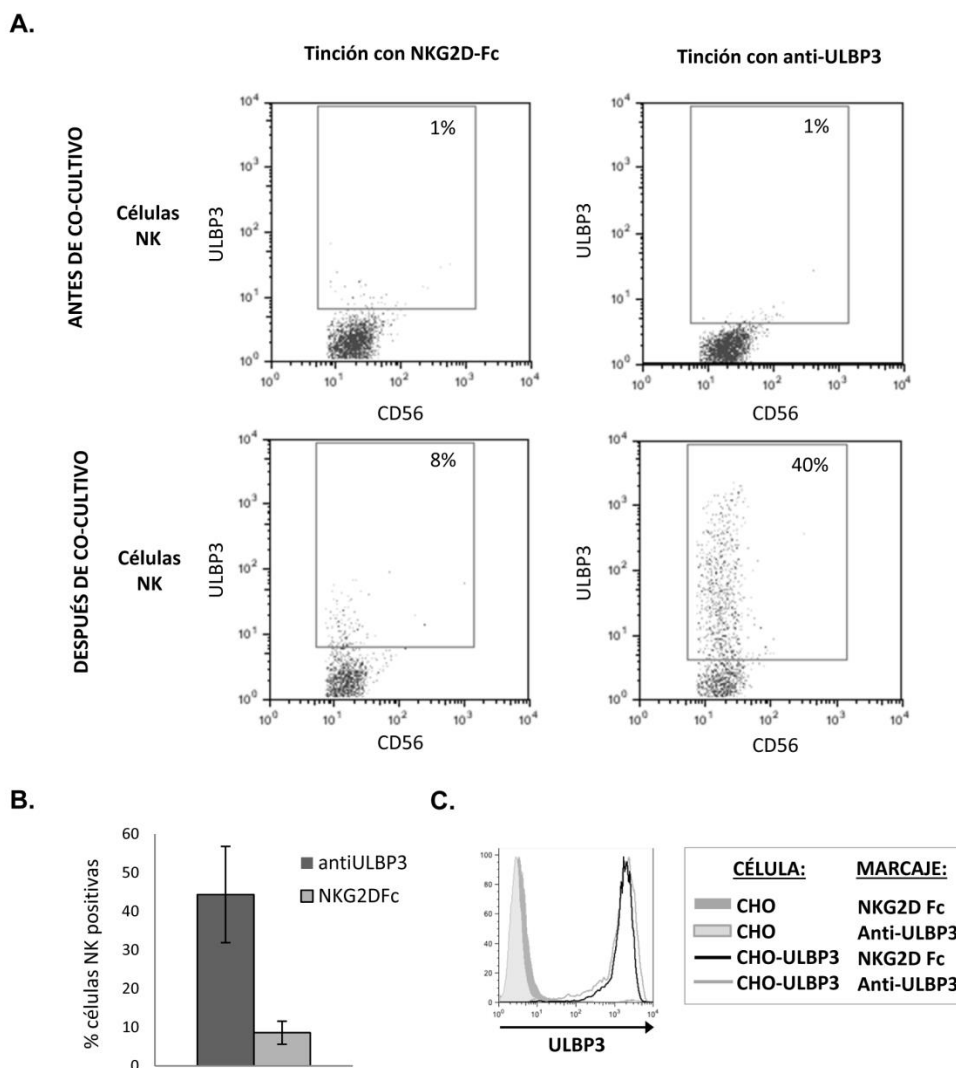


Figura 24. Transferencia de ULBP3 analizada con anticuerpo anti-ULBP3 o NKG2D-Fc. La células NK se co-incubaron con células CHO transfectadas para ULBP3 durante una hora. La detección de ULBP3 se realizó con anticuerpo anti-ULBP3 o con la construcción NKG2D-Fc. (A) Estrategia de análisis por citometría de flujo en un experimento representativo con ULBP3. (B) Se representa la media y la desviación estándar del porcentaje de células NK CD56⁺ que son positivas para ULBP3 con las dos tinciones de cinco experimentos con distintos donantes. (C) Intensidad de fluorescencia de ULBP3 marcado con anticuerpo anti-ULBP3 o con la construcción NKG2D-Fc en células CHO transfectadas con ULBP3 (CHO-ULBP3). Como control negativo se realizaron los mismos marcajes en células CHO parentales (CHO).

A continuación, para estudiar la estabilidad del ULBP transferido, se recogieron las células NK tras los co-cultivos, se mantuvieron en cultivo y se analizó a distintos tiempos el porcentaje de células NK positivas para los ULBP y su intensidad de fluorescencia. Como se muestra en la Figura 25, se observó que al menos el 60% de las células NK mantenía los ligandos en su superficie 4-6

horas después del co-cultivo, sin embargo después de 24 horas este porcentaje era ya muy bajo. Además, cuando se analizó la intensidad de fluorescencia de los ligandos en las células NK, se observó que ésta disminuía a tiempos muy cortos, pero se mantenía bastante estable hasta 24 horas tras el co-cultivo.

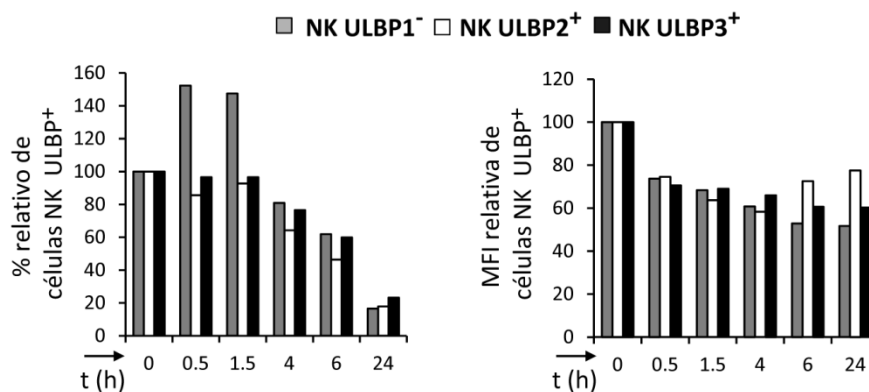


Figura 25. Estabilidad de los ULBP adquiridos por las células NK. Células CHO transfectadas con ULBP1, ULBP2 o ULBP3 se co-cultivaron con células NK, éstas se separaron de las células adherentes y mantenidas en cultivo los tiempos indicados (h) para, posteriormente ser analizadas por citometría de flujo. Se representan el porcentaje y la MFI de células NK CD56⁺ relativizados a los valores a tiempo cero. Se muestra un experimento representativo de seis.

2.5 Las células NK que adquieren ULBP se convierten en células diana y transfieren los ligandos a otras células NK

Datos de otros laboratorios demostraron que NKG2D-L, como MICA o los murinos Rae-1 δ y ϵ (McCann et al., 2007; Nakamura et al., 2013a), eran funcionales tras su transferencia a células NK y podían activar a otras células NK a través de NKG2D, provocando la lisis de la célula NK positiva para el ligando.

Los datos presentados hasta ahora sugieren una posible eliminación de células NK que adquieren ULBP por dos evidencias: la rápida disminución en la intensidad de fluorescencia de ULBP en las células NK tras los co-cultivos (Figura 25); y la asociación de la transferencia de los ULBP con la activación de la citotoxicidad de las células NK (Figura 19). Por ello, a continuación se investigó si las células NK que expresan ULBP, podían convertirse en células diana para otras células NK. En primer lugar, se marcaron con un colorante y se co-incubaron células NK con células CHO transfectadas con ULBP, las cuales adquirieron ULBP. A continuación, se realizaron experimentos de citotoxicidad utilizando estas células NK como células diana, y células NK autólogas sin marcar, como células efectoras (Figura 26). Como control negativo, también se utilizaron células NK, marcadas con el colorante, sin co-incubar o co-incubadas con células CHO parentales, como células diana. También se analizó la muerte espontánea de cada una de las células diana, al ponerlas en cultivo sin células efectoras. Para analizar los niveles de muerte en las distintas poblaciones de

células NK, se midió la incorporación de la sonda de muerte 7-aminoactinomicina D (7-AAD) por citometría de flujo en las células diana marcadas previamente con el colorante. El porcentaje de células muertas aumentó en las células NK que habían adquirido ULBP tras la co-incubación con células CHO que expresaban ULBP, pero no en las que no los habían adquirido. Tampoco se observó un aumento en los niveles de muerte en las células que se co-cultivaron con células parentales o que no se co-cultivaron con células CHO. Por tanto estos datos demuestran que el ULBP transferido a la célula NK es funcional, y es capaz de activar la maquinaria lítica de otras células NK, provocando la muerte de esas células NK que han adquirido ULBP.

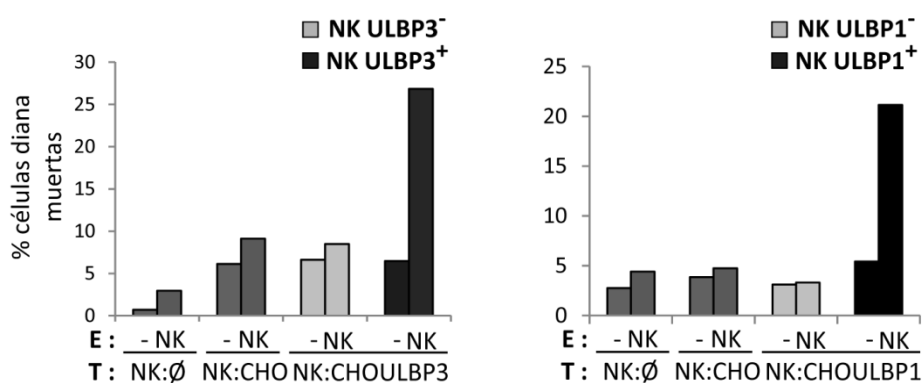


Figura 26. Las células NK que adquieren ULBP se convierten en células diana para células NK autólogas. Células NK se marcaron con el colorante PKH2 y se incubaron solas (NK:Ø) o con células CHO parentales (NK:CHO) o transfectadas con ULBP3 (izquierda) o ULBP1 (derecha) (NK:CHOULBP) durante 1 h. Tras la co-incubación, estas células marcadas se usaron como células diana (T) en experimentos de citotoxicidad, en los cuales las células efectoras (E) fueron células NK autólogas sin marcar (NK). Las células diana también se incubaron sin efectoras (-) para analizar la muerte espontánea. El porcentaje de células diana muertas se analizó mediante la incorporación de la sonda 7-AAD. La muerte de las células NK que adquieren ULBP (NK ULBP⁺) o no (NK ULBP⁻) se analizaron de manera separada. Se muestran dos experimentos representativos de tres

Estos resultados de citotoxicidad entre las células NK ULBP positivas y células NK autólogas, junto a los datos que indican que los niveles de fluorescencia de los ULBP en las células NK se mantienen altos tras 24h del co-cultivo (Figura 25), podrían sugerir que los ligandos adquiridos por las células NK podrían volver a transferirse a otras células NK. Para abordar esta pregunta, primero se co-incubaron células NK con células CHO transfectadas con ULBP para que adquirieran ULBP. A continuación, se utilizó un citómetro de flujo separador que permitió el aislamiento de las células NK recogidas tras el co-cultivo, descartando por completo la presencia de alguna célula CHO. Las células NK aisladas con el citómetro de flujo separador se utilizaron en experimentos de transferencia como donantes y, comoceptoras se utilizaron células NK autólogas (marcadas con un colorante para distinguir ambas poblaciones). Como se observa en la Figura 27, ULBP3 se retransfirió a otras células NK. También se puede observar que el porcentaje de células NK que adquirieron ULBP aumentó, a la vez que disminuyó el de las células donadoras. Lo mismo se observa en la intensidad de fluorescencia, alcanzando finalmente un nivel similar en ambas

poblaciones. En conjunto, estos datos sugieren que el proceso de reconocimiento y retransferencia entre las células NK ocurre de una manera rápida, y podría seguir las características observadas entre las células CHO y NK, como la dependencia de interacción receptor-ligando, aunque estos experimentos no han sido abordados en esta tesis doctoral.

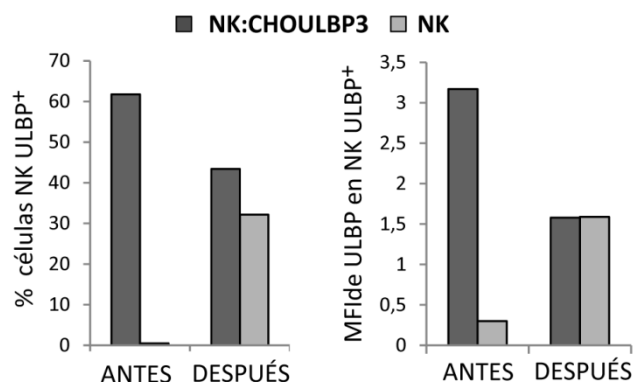


Figura 27. Retransferencia de ULBP entre células NK. Células NK co-incubadas durante 1 h con células CHO transfectadas con ULBP3 (NK:CHOULBP3), se separaron con un citómetro separador y se usaron como donantes en experimentos de transferencia con células NK autólogas marcadas con la sonda *Cell Trace Violet*. Se representa el porcentaje y la MFI de las células NK ULBP positivas que se analizó antes y después de los co-cultivos en cada población de NK. Se muestra un experimento representativo de tres.

Todos estos datos demuestran que existe la transferencia de NKG2D-L de la familia ULBP desde la célula diana a la célula NK, mediada por procesos de trogocitosis, en el contexto de una interacción receptor-ligando, lo que provoca la activación de la maquinaria lítica de las células NK. A pesar de que los ligandos pertenecen a la misma familia, se ha demostrado que la transferencia de cada ULBP sigue diferentes cinéticas y eficiencias. Además, cuando las células NK adquieren ULBP, lo hacen con capacidad funcional, ya que se ha confirmado que las células NK que adquieren ULBP pueden funcionar como células dianas para otras células NK y además volver a transferir el ligando. La transferencia de estos ligandos podría constituir un mecanismo de regulación negativa, relacionado con un proceso de homeostasis, que permitiría la eliminación de las células NK más activadas y, por lo tanto, se trataría de un mecanismo de modulación de la respuesta inmunológica.

3. Efecto de vemurafenib en los ligandos de NKG2D en melanoma

Hasta ahora se han abordado diferentes factores implicados en la expresión de los NKG2D-L y en la modulación de la respuesta de las células NK, como son la transferencia de los ligandos o su reclutamiento a exosomas. A continuación, para estudiar la biología de las diferentes formas de expresión de estas proteínas en un sistema de relevancia clínica, se inició el estudio de la expresión de los ligandos de NKG2D, tanto en membrana como secretados, en un modelo tumoral, utilizando células metastásicas de melanoma como herramienta.

La elección de este modelo se hizo en base a varios datos que apoyan la importancia de los NKG2D-L en melanoma: 1) Se ha comprobado la expresión de NKG2D-L, tanto MIC como ULBP, en metástasis de melanoma (revisado en Morgado et al., 2011); 2) El suero de pacientes de melanoma contiene ligandos, como ULBP2, el cual se puede utilizar como biomarcador del progreso de la enfermedad (Paschen et al, 2009). Por otro lado, aproximadamente, un 50% de los melanomas presentan la mutación BRAF-V600E (Davies et al., 2002), implicada en el progreso tumoral (Tran et al., 2016). Para tratar estos tumores, se han desarrollado inhibidores de la forma mutada de BRAF, como vemurafenib (PLX 4032) (Flaherty et al., 2011). Este tratamiento ha dado muy buenos resultados en pacientes con lesiones de melanoma que presentan dicha mutación (Sosman et al., 2012), sin embargo, los pacientes desarrollan resistencias al inhibidor (Fiskus y Mitsiades, 2016). Se han estudiado algunos mecanismos implicados en esta resistencia, principalmente, relacionados con la activación de la ruta de las MAPK de manera alternativa. No obstante, también hay algunas evidencias del papel de la respuesta inmunológica. En concreto, varios artículos demuestran que el papel de las células NK en este contexto podría ser de gran importancia, ya que se ha demostrado que estas células pueden acumularse en los ganglios linfáticos con metástasis de melanoma, y eliminar las células tumorales tras la activación con citoquinas (Ali et al., 2014; Messaoudene et al., 2014). Además, se ha descrito que las células NK tienen una función importante en el efecto de vemurafenib en el control del melanoma metastásico en modelos murinos (Ferrari de Andrade et al., 2014).

Debido a que el papel de las células NK en los tratamientos con inhibidores de BRAF no se había estudiado en células humanas, a partir de una colaboración con la Dra. Annette Paschen, se comenzó el estudio de una serie de líneas metastásicas que expresaban NKG2D-L, y el efecto que podría tener la terapia dirigida, vemurafenib, en el sistema NKG2D y las células NK.

3.1 Caracterización de las líneas celulares derivadas de metástasis de pacientes de melanoma

En primer lugar, se comenzó por la caracterización de un panel de líneas celulares derivadas de metástasis de pacientes de melanoma. Se estudiaron cuatro líneas (Ma-Mel-55, Ma-Mel86c, Ma-Mel-86f y Ma-Mel-103b) derivadas de tres pacientes de melanoma (55, 86 y 103), dos de ellas pertenecientes a diferentes metástasis del mismo paciente (Ma-Mel-86c y Ma-Mel86f). Se analizó la mutación V600E en BRAF, y como se puede ver en la Tabla 1, tres líneas presentaban la mutación y, una, la forma silvestre de la proteína. Además, se observó que las líneas derivadas del paciente 86 presentaban alteraciones cromosómicas que afectaban a la expresión de MHC-I: Ma-Mel-86c sólo tenía una copia debido a una delección en el cromosoma 6; mientras que Ma-Mel-86f presentaba una delección del gen de β -2 microglobulina, por lo que era incapaz de expresar MHC-I en su superficie. También se genotiparon los alelos del NKG2D-L, MICA, que expresaba cada línea celular. Debido a que MICA se encuentra codificado en la misma región cromosomal que MHC, Ma-Mel-86c también había perdido un alelo de MICA, que sí está presente en la línea Ma-Mel-86f, procedente del mismo paciente. La mayoría de los pacientes presentaban alelos de MICA del grupo A5.1 en homocigosis o heterocigosis con alelos del grupo A5, resultado que era de esperar ya que, como se comentó en el apartado anterior, son alelos muy frecuentes en distintas poblaciones mundiales. Además, es importante conocer el tipaje MICA porque, como ya se ha visto en el capítulo anterior, esto va a determinar si MICA se liberará o no en exosomas.

	Ma-Mel-55	Ma-Mel-86c	Ma-Mel-86f	Ma-Mel-103b
BRAF	V600E	V600E	V600E	No mutación
Origen	Metástasis de nódulo linfático	Metástasis de nódulo linfático	Metástasis de nódulo linfático	Metástasis cutánea/subcutánea
HLA*	A2/A3 B35/B7	A01/- B08/-	β -2 microglobulina ⁻	A2/A3 B8/B62
Alelos de MICA	A5.1/A5.1	A5.1/-	A5.1/A5	A5.1/A5

*-: ausencia de alelo por pérdida de heterocigosis

Tabla 1. Caracterización de líneas celulares derivadas de metástasis de pacientes de melanoma.

A continuación, se analizaron por citometría de flujo los niveles de expresión en superficie de ligandos activadores para células NK, como los ligandos de NKG2D y DNAM-1, así como ligandos inhibidores, como MHC-I (Figura 28). Se puede comprobar la baja y nula expresión de MHC-I en las células Ma-Mel86c y Ma-Mel-86f, respectivamente, consecuencia de las mutaciones cromosómicas (Tabla 1). Además, todas las líneas de melanoma estudiadas expresaban los NKG2D-L, MICA y ULBP2. ULBP3 se expresaba en tres de las líneas, y ULBP1 no se expresaba en ninguna.

También se analizó la expresión de los ligandos de DNAM-1, CD155 (receptor del poliovirus, PVR) y CD112 (Nectina-2), ya que se ha demostrado que las interacciones entre este receptor y sus ligandos, median el reconocimiento y lisis de células de melanoma humanas por parte de las células NK (Casado et al., 2009; Lakshmikanth et al., 2009). Todas las líneas de melanoma eran positivas para estas moléculas de adhesión, y los niveles de expresión variaban levemente entre ellas.

Por lo tanto, se partió de un panel de líneas de melanoma derivadas de metástasis de pacientes, con o sin mutación en *BRAF*, y que expresan de manera diferencial NKG2D-L, ligandos de DNAM-1 y MHC-I.

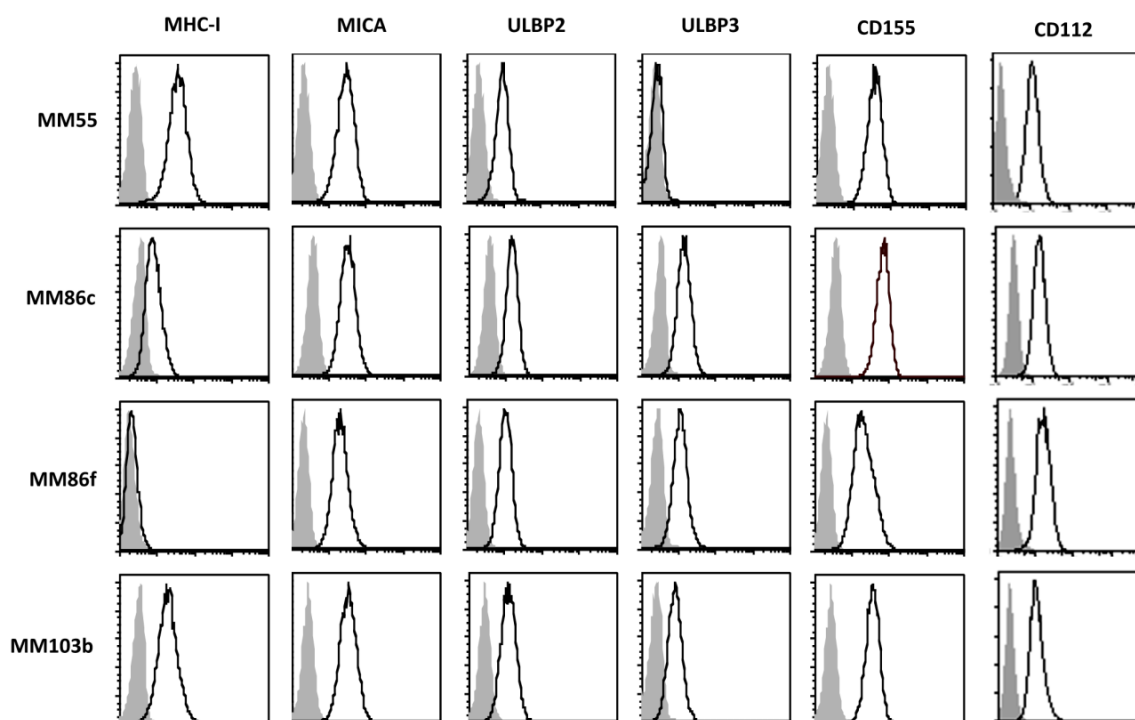


Figura 28. Expresión en superficie de MHC-I, ligandos de NKG2D y DNAM-1 en líneas de melanoma. Se muestra intensidad de fluorescencia de las proteínas indicadas por citometría de flujo, en las líneas de melanoma Ma-Mel-55 (MM55), Ma-Mel-86c (MM86c), Ma-Mel-86f (MM86f) y Ma-Mel-103b (MM103b). El control de isotipo se muestra en gris y la señal de cada anticuerpo con línea negra.

3.2 Efecto del tratamiento con vemurafenib en la expresión de ligandos de NK en células de melanoma

3.2.1 El tratamiento con vemurafenib afecta a la expresión de ligandos implicados en la activación de las células NK

Para estudiar el efecto de la inhibición de BRAF en las células de melanoma, se realizaron tratamientos con vemurafenib (PLX 4032, referido en adelante como PLX) 1 μ M durante 48 horas, utilizando el diluyente del inhibidor, DMSO, como control negativo de tratamiento.

En primer lugar, para comprobar el efecto específico del inhibidor sobre las células mutantes para BRAF, se realizaron ensayos MTT [Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol] para comprobar su actividad metabólica, como reflejo de su efecto en proliferación y viabilidad celular (Figura 29A). Como era de esperar, la actividad metabólica disminuyó con el tratamiento sólo en las líneas mutantes para BRAF, pero no en la línea no mutante. Esta disminución de la actividad metabólica podría deberse a una bajada en la proliferación o un aumento en la muerte de las células mutantes tratadas con PLX. Se evaluó, mediante citometría de flujo, el porcentaje de células que se encontraban en apoptosis y necrosis, por los niveles de anexina V y la sonda de muerte 7-AAD, respectivamente, para comprobar si había cambios en los niveles de muerte con el tratamiento (Figura 29B). Pese a que se analizaron las células que eran positivas para anexina y las subpoblaciones que eran 7-AAD negativas o positivas, ninguna de estas poblaciones presentó una diferencia significativa con el tratamiento de células mutantes para BRAF. Este resultado indica que los menores niveles de la actividad metabólica no se pueden relacionar con un aumento en la muerte celular tras 48 horas de tratamiento, aunque si las células tratadas con el inhibidor hubieran muerto a tiempos más cortos, este método de detección de viabilidad por citometría de flujo no las podría detectar.

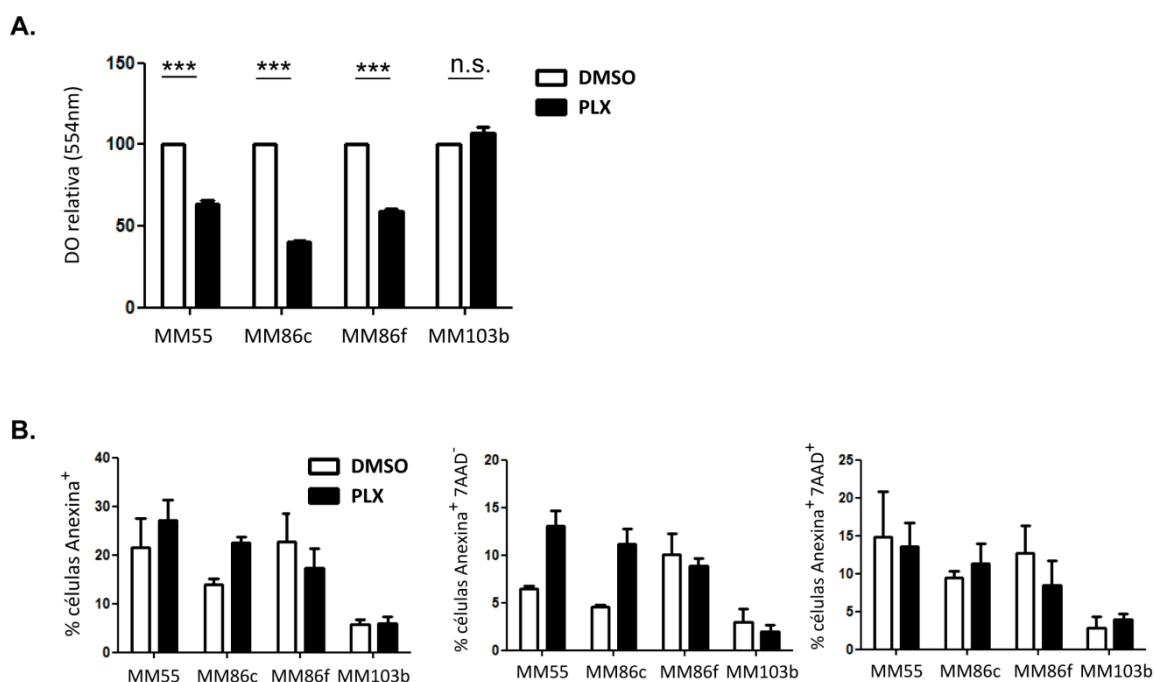


Figura 29. Actividad metabólica y ensayos de muerte en células de melanoma tratadas con PLX. (A) Ensayo MTT para medir actividad metabólica. Se representa la media y la SEM de la lectura a una densidad óptica (DO) de 554 nm tras 48 horas de tratamiento con DMSO (control negativo) o PLX 1 μ M relativizada a los niveles de DMSO de dos experimentos con cuatro réplicas. (B) Ensayo de muerte celular por citometría de flujo. Se representa la media y la SEM del porcentaje del total de células positivas para anexina (izquierda), o subdividiendo en las 7AAD negativas (centro) o positivas (derecha) tras 48 horas de tratamiento con DMSO o PLX 1 μ M. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student para muestras pareadas, *** $p < 0,001$, n.s. no significativo. (n=2 para MM86c y MM86f) (n=3 para MM55 y MM103b). Ma-Mel-55 (MM55), Ma-Mel-86c (MM86c), Ma-Mel-86f (MM86f) y Ma-Mel-103b (MM103b).

A continuación, se analizó por citometría de flujo el efecto de PLX en la expresión en superficie de moléculas importantes para el reconocimiento y la activación de las células NK, como MHC-I y ligandos de receptores activadores, como NKG2D y DNAM-1. Como muestra la Figura 30, el tratamiento con PLX indujo una disminución en la intensidad de fluorescencia de los NKG2D-L, MICA y ULBP3, en la superficie celular de las células mutantes para BRAF, sin embargo, no hay cambios en las células no mutantes. Los cambios en la intensidad de fluorescencia de ULBP2 eran más variables, siendo estadísticamente significativa la bajada en Ma-Mel-86f. En cambio, lo contrario ocurre con los niveles de MHC-I: las células mutantes para BRAF tratadas con el inhibidor presentaban más MHC-I en su superficie, mientras que ocurría lo contrario en las células no mutantes. El efecto de PLX en MICA y ULBP3, también fue observado con el ligando de DNAM-1, CD155, ya que disminuyó con el tratamiento en las líneas mutantes, mientras que CD112 no parecía verse afectado, tan sólo levemente en la línea celular Ma-Mel-55. Los efectos de este tratamiento en las moléculas estudiadas pueden ser de gran relevancia ya que, si disminuyen en la superficie ligandos activadores de células NK y, por el contrario, aumentan los ligandos inhibidores, esto podría tener consecuencias en la activación de las células NK, al disminuir las señales activadoras y aumentar las inhibidoras.

Posteriormente, se estudiaron los cambios en la expresión de los NKG2D-L, analizando los niveles de proteína total en lisados de las líneas de melanoma tratadas durante 48 horas con PLX por *Western blot*. La reducción en los niveles de MICA total, en las células mutantes para BRAF tratadas con PLX fue clara (Figura 31A). También se analizó por *Western blot* la cantidad de proteína total de ULBP2 y ULBP3 en lisados celulares, pero no se detectó ninguna banda específica para dichas proteínas (datos no mostrados).

Debido a que las líneas de melanoma presentaban diferentes alelos de MICA (Tabla 1), se decidió estudiar si la bajada en MICA total observada se debía a algún alelo en particular. Como ya se observó en el apartado 1 de resultados, digiriendo con endoglicosidasa F, se pueden distinguir los productos de los diferentes alelos de MICA en los lisados de las células de melanoma. Así, se lisaron células de las líneas de melanoma tras 48 horas de tratamiento con PLX, se trataron con endoglicosidasa F y se analizaron por *Western blot*. Se observó que se detectaba la banda correspondiente al alelo del grupo A5 (flecha negra), con un peso molecular más alto que los A5.1 (flecha y cabeza de flecha gris), según correspondía al tipaje. Todas las células de melanoma analizadas presentaban al menos una copia de un alelo A5.1: en homocigosis (Ma-Mel-55), en hemicigosis (Ma-Mel-86c) o en heterocigosis con un alelo A5 (MA-Mel-86f y Ma-Mel-103b) (Figura 31B) (Tabla 1). En cuanto al efecto de PLX, parecía afectar a todas las bandas de los distintos alelos.

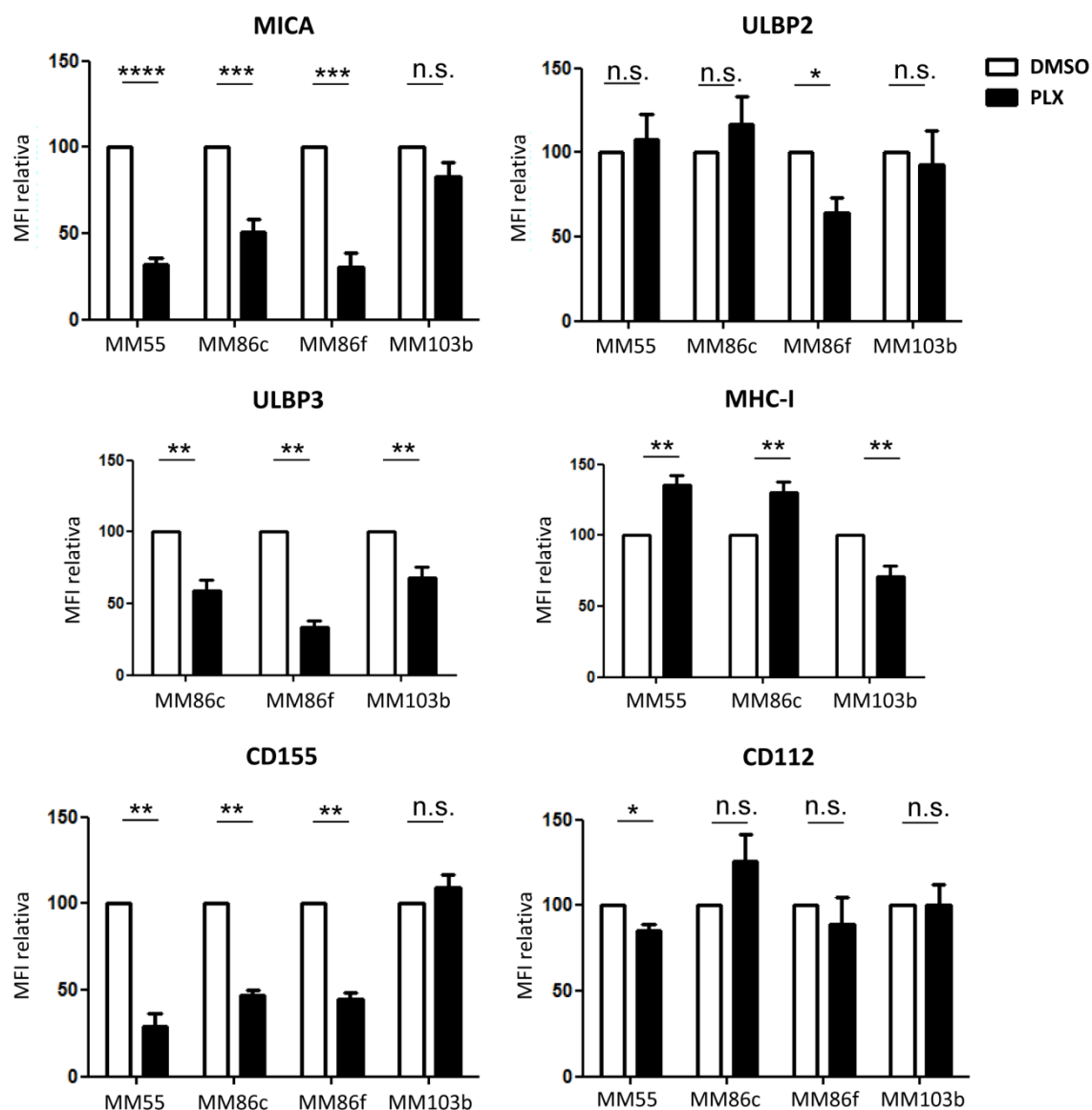


Figura 30. Nivel de expresión de ligandos de NKG2D, MHC-I y ligandos de DNAM-1 en células de melanoma tratadas con PLX. Se analizaron las MFI de las diferentes proteínas por citometría de flujo en las distintas líneas celulares tratadas con DMSO (control negativo) o PLX 1 μ M durante 48 horas. Se representa la media y la SEM de la MFI relativizada a los niveles de DMSO. La MFI del control de isotipo se restó. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student para muestras pareadas, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ n.s. no significativo. ($n \geq 3$). Ma-Mel-55 (MM55), Ma-Mel-86c (MM86c), Ma-Mel-86f (MM86f) y Ma-Mel-103b (MM103b).

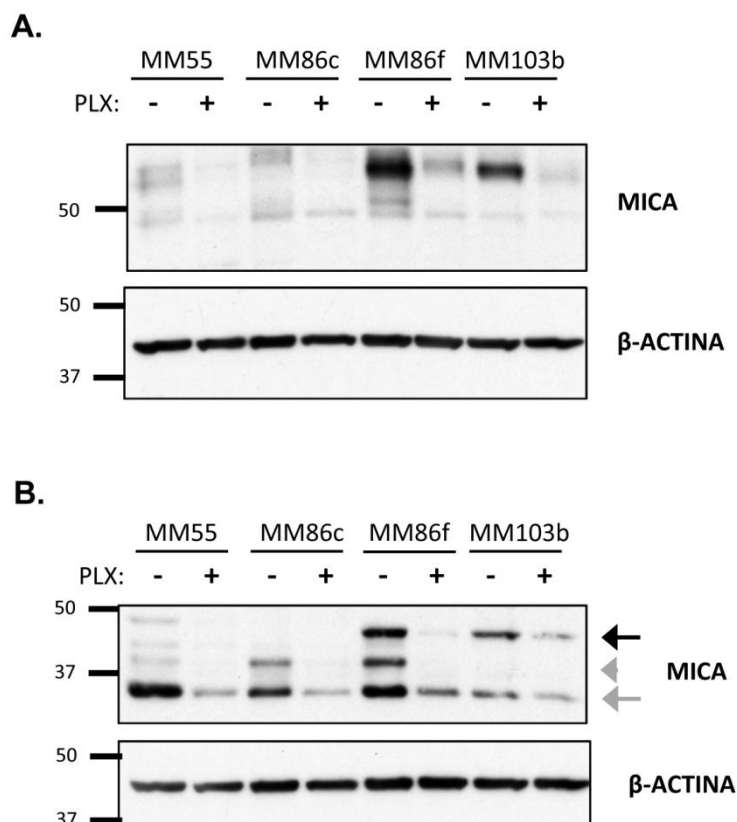


Figura 31. Nivel de expresión total de los alelos de MICA en células de melanoma tratadas con PLX. (A) Análisis por *Western blot* de lisados sin digerir o (B) digeridos con endoglicosidasa F de células Ma-Mel55 (MM55), Ma-Mel-86c (MM86c), Ma-Mel-86f (MM86f) o Ma-Mel103b (MM103b) tratadas con DMSO (-) o PLX 1 μ M (+) durante 48 horas. Se muestran las incubaciones con anticuerpos anti-MICA y anti- β -actina como control de carga. Estos experimentos se repitieron cuatro veces. Las bandas de MICA pertenecientes a MICA*019 se identifican con una flecha negra, la de MICA*008 anclada a membrana con flecha gris, y la de MICA*008 soluble con punta de flecha gris. Se indica el peso de los marcadores de peso molecular en kDa.

En conjunto, estos resultados indican que el tratamiento con vemurafenib reduce la expresión en superficie de NKG2D-L y el ligando de DNAM-1, CD155. Además, se ha comprobado la reducción en los niveles de MICA total. La reducción de los niveles de receptores activadores de células NK y el aumento de la expresión de MHC-I, ligando de receptores inhibidores, causados por el tratamiento con vemurafenib podrían influir en la capacidad citotóxica de las células NK frente a células de melanoma tratadas con el inhibidor de BRAF, ya que el equilibrio entre señales activadoras e inhibidoras, se vería desplazado hacia una inhibición de la respuesta de estas células.

3.2.2 La cinética del efecto de vemurafenib en los ligandos activadores está ligada a la proliferación

Una vez comprobado el efecto del tratamiento con vemurafenib durante 48 horas en las células metastásicas de melanoma, se pasó a evaluar su cinética de acción. En primer lugar, se estudió el efecto en la proliferación celular a tiempo real, utilizando la tecnología xCELLigence RTCA™ (*Real*

Time Cell Analysis). Esta plataforma utiliza la monitorización de la impedancia eléctrica para medir la densidad celular, en tiempo real y de manera indirecta. Como se puede observar en las curvas del índice celular (Figura 32), la línea Ma-Mel-55 presentaba, a tiempos más cortos, mayor diferencia entre las células tratadas con PLX y DMSO, en comparación con las líneas Ma-Mel-86c y Ma-Mel-86f, en las que los cambios se apreciaban tras 36-48 horas de tratamiento. Además, también se puede observar que las curvas con inhibidor y control seguían la misma trayectoria en las células no mutantes, Ma-Mel-103b, confirmando que el inhibidor no tiene efecto en la proliferación de las células no mutantes. Este resultado demuestra que las diferentes líneas mutantes para BRAF presentaban distintas cinéticas en los efectos del vemurafenib en la proliferación de las células.

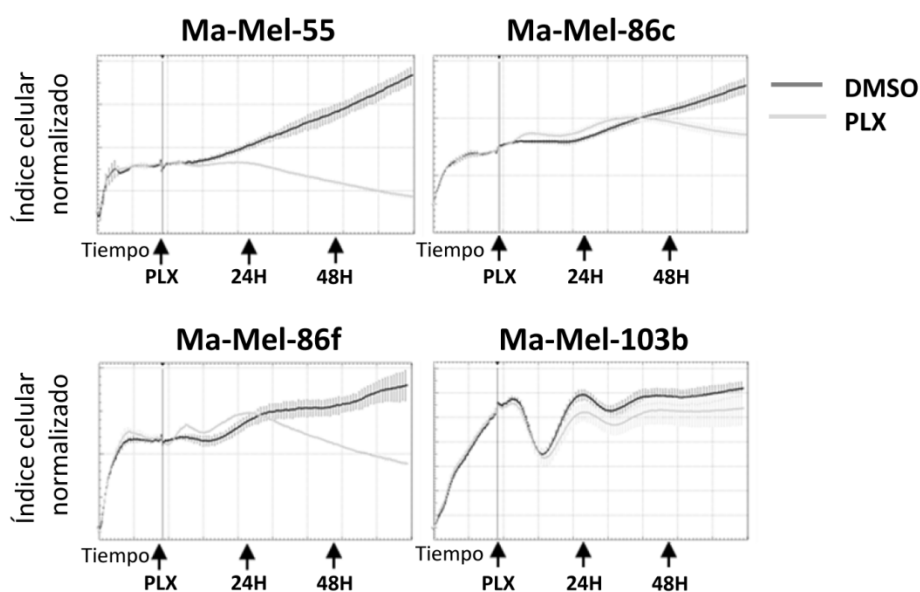


Figura 32. Proliferación medida con xCELLigence RTCA™ en células de melanoma tratadas con PLX. Las células de melanoma se plaquearon y el índice celular se monitorizó en tiempo real. Se representan las curvas del índice celular normalizado al inicio del tratamiento. Se indican mediante flechas, los tiempos correspondientes al inicio del tratamiento con PLX o DMSO, en el caso del control, y las 24 horas y 48 horas tras el tratamiento. Se muestra el resultado de cuatro réplicas, de un experimento representativo de un total de tres.

A continuación, se estudió la cinética del efecto del tratamiento en la expresión en superficie de los ligandos de las células NK más susceptibles a vemurafenib. Así, se trataron las células de melanoma con el inhibidor durante 1, 24 y 48 horas a una concentración de 1 μ M (Figura 33). No se observaron cambios en la intensidad de fluorescencia de MICA, CD155 y MHC-I en la superficie celular tras una hora de tratamiento. Sin embargo, la disminución en los niveles de las líneas mutantes para BRAF empezó a ser evidente a las 24 horas de tratamiento, siendo estadísticamente significativo para CD155 y MHC-I en Ma-Mel-103b y MICA en Ma-Mel-55, y mucho más pronunciado a las 48 horas post-tratamiento. Resulta llamativo observar que, tras 24 horas de tratamiento con PLX, el cambio en MICA sólo era estadísticamente significativo en la línea Ma-Mel-

55, lo cual coincide con el rápido efecto de vemurafenib en la cinética de proliferación de esta línea celular.

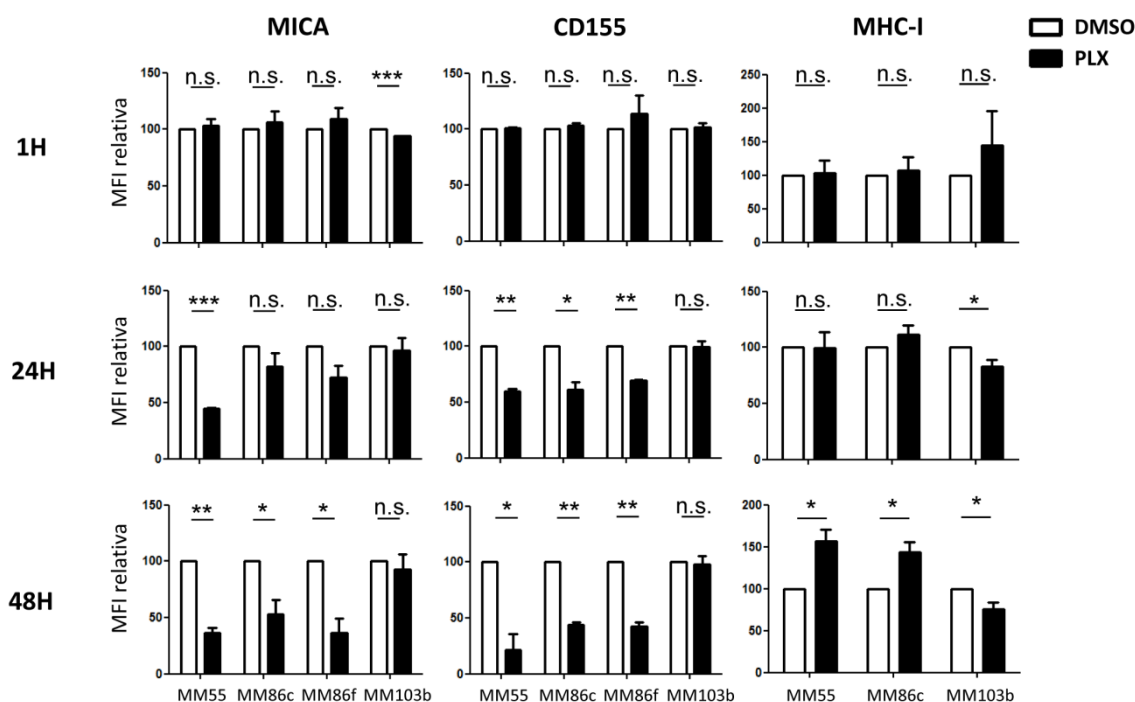


Figura 33. Cinética del cambio en expresión en superficie de MICA, CD155 y MHC-I en células de melanoma tratadas con PLX. Se analizaron las MFI de las diferentes proteínas por citometría de flujo en las distintas líneas celulares tratadas con DMSO (control negativo) o PLX 1 μ M durante 1, 24 y 48 horas. Se representa la media y la SEM de la MFI relativizada a los valores de DMSO. La MFI del control de isotipo se restó. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student para muestras pareadas, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, n.s. no significativo. (n=3). Ma-Mel-55 (MM55), Ma-Mel-86c (MM86c), Ma-Mel-86f (MM86f) y Ma-Mel-103b (MM103b).

Debido a que vemurafenib es un inhibidor de la forma BRAF que tiene la mutación V600E, para comprobar la inhibición de la ruta a los distintos tiempos de tratamiento, se analizaron los niveles de p-ERK por *Western blot*, como ejemplo de proteína que señala por debajo de BRAF en la ruta de señalización. En paralelo también se analizó MICA total, así como ERK total y GAPDH como controles de carga. Como muestra la Figura 34, mientras que la cinética de los cambios en MICA fue similar a la observada por citometría de flujo, los niveles de p-ERK sólo se encontraron disminuidos a tiempos cortos, una cinética mucho más rápida que la que muestra MICA, CD155 y MHC-I. El hecho de que, a tiempos más largos, p-ERK aumentara, indica que, probablemente, estas líneas celulares desarrollan mecanismos de resistencia al tratamiento. Además se puede observar cómo, incluso a tiempos cortos, había células más resistentes a la inhibición de la ruta, como la línea Ma-Mel-86f, en la cual no se apreció la disminución en p-ERK. En cambio, la línea no mutante para BRAF, Ma-Mel-103b, inicialmente tenía menos p-ERK, aumentando a tiempos largos de tratamiento. Este aumento en p-ERK cuando se tratan con inhibidores de BRAF células sin la mutación ya fue descrito previamente (Joseph et al., 2010; Søndergaard et al., 2010; Yang et al., 2010).

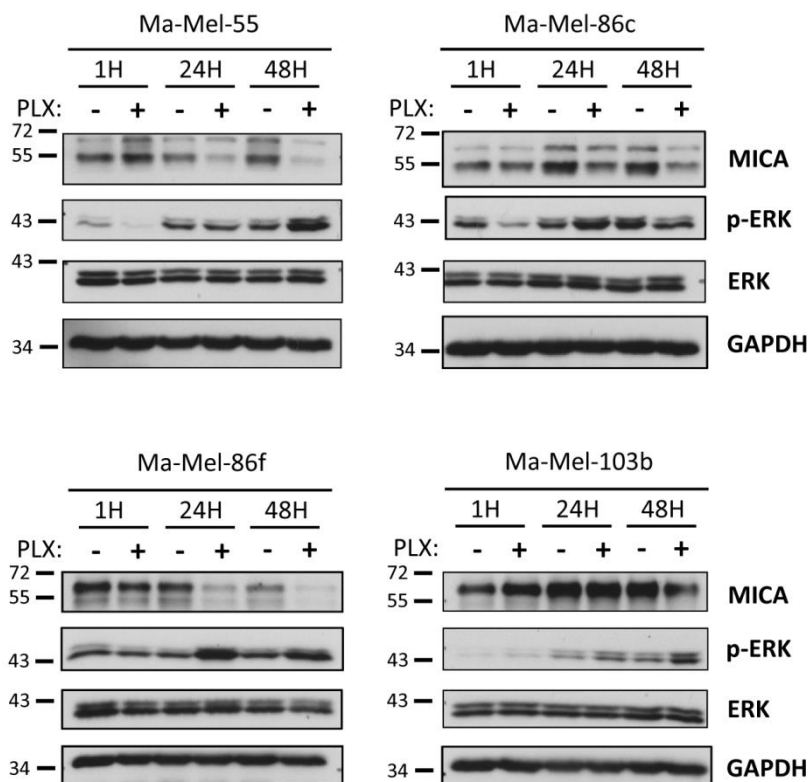


Figura 34. Cinética del nivel de expresión total de MICA y p-ERK en células de melanoma tratadas con PLX. Análisis por *Western blot* de lisados de las distintas líneas celulares de melanoma tratadas con DMSO (-) o PLX 1 μ M (+) durante 1, 24 ó 48 horas. Se muestran las incubaciones con anticuerpos anti-MICA, anti-p-ERK y, anti-ERK y anti-GAPDH como controles de carga. Se muestra un experimento representativo de dos. Se indica el peso de los marcadores de peso molecular en kDa.

Posteriormente, para comprobar la estabilidad de los cambios de expresión debidos al tratamiento con PLX durante 48 horas, se retiró el inhibidor de los cultivos y se analizaron por citometría de flujo los niveles de MICA y MHC-I en el momento de retirar el inhibidor y, 24 y 48 horas después de haberlo retirado. Como se observa en la Figura 35, incluso 48 horas después de la retirada del inhibidor no hubo una recuperación clara de las proteínas estudiadas, excepto en la línea Ma-Mel-103b, que parecía recuperar los niveles de MHC-I y, tras 24 horas sin PLX, aumentaba los niveles de MICA. Este resultado indica que los cambios en la expresión de estas moléculas, tras el tratamiento con PLX, parecen estables, aunque sería interesante analizar también otras proteínas para poder obtener resultados concluyentes sobre su estabilidad.

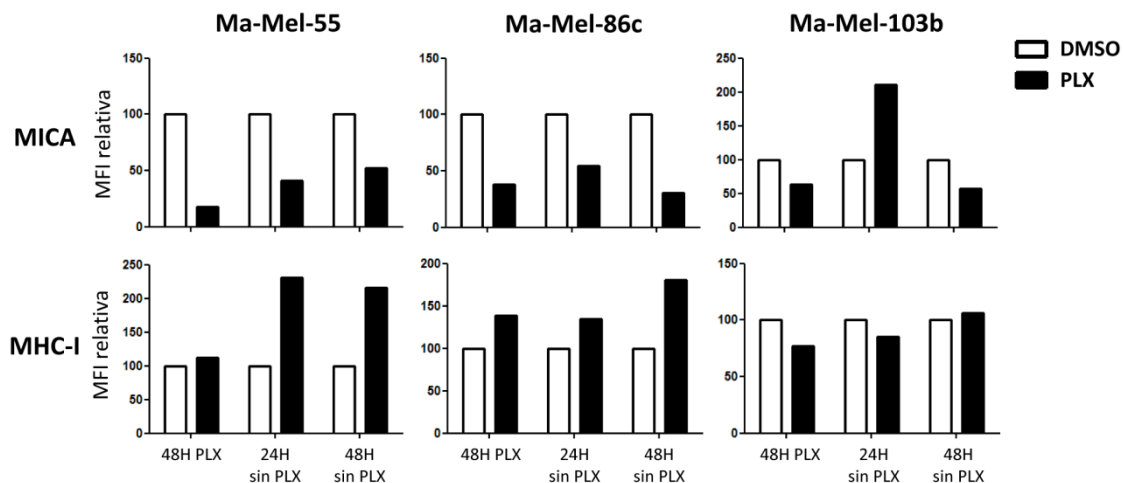


Figura 35. Nivel de expresión de MICA y MHC-I en células de melanoma tras retirar el tratamiento con PLX. Se analizaron por citometría de flujo las MFI de las diferentes proteínas en las distintas líneas celulares tratadas con DMSO (control negativo) o PLX 1 μ M durante 48 horas (48H PLX), y tras 24 y 48 horas después de retirar el tratamiento (24H sin PLX y 48H sin PLX). Se representa la MFI relativizada a los valores de DMSO. La MFI del control de isotipo se restó. (n=2 para MHC-I, n=1 para MICA).

En conjunto estos datos reflejan que la cinética de los efectos del tratamiento con vemurafenib en la expresión de MICA, CD155 y MHC-I, se pueden relacionar con la cinética del efecto en la proliferación celular, siendo ambas más lentas que la inhibición en la ruta de activación de las quinasas Ras-Raf-Erk, ya que parece que la ruta se reactiva, posiblemente debido a mecanismos de resistencia relacionados con rutas alternativas.

3.2.3 Las células NK son menos citotóxicas frente a células de melanoma tratadas con vemurafenib

Tras observar los efectos de vemurafenib en ligandos importantes para la activación de las células NK, se estudió la respuesta de estas células frente a células de melanoma tratadas con el inhibidor. Para ello, se realizaron experimentos funcionales analizando la liberación de gránulos líticos, utilizando células NK activadas *in vitro* autólogas (del paciente 86) o heterólogas (de donantes sanos), en este último caso, se bloquearon las moléculas MHC-I para evitar una variación en las respuestas de distintos donantes debidas a las diferencias en la expresión de KIR.

Como muestra la Figura 36A, se observó una disminución en el porcentaje de células NK positivas para LAMP1 cuando se enfrentaron a células de melanoma mutantes para BRAF que habían sido previamente tratadas con PLX durante 48 horas. En cambio, este efecto no se observó con la línea no mutante para BRAF. En el caso de los experimentos en condiciones autólogas, el efecto fue similar, ya que el porcentaje de células positivas para LAMP1 frente a células tratadas con el inhibidor se redujo aproximadamente un 40% (Figura 36B).

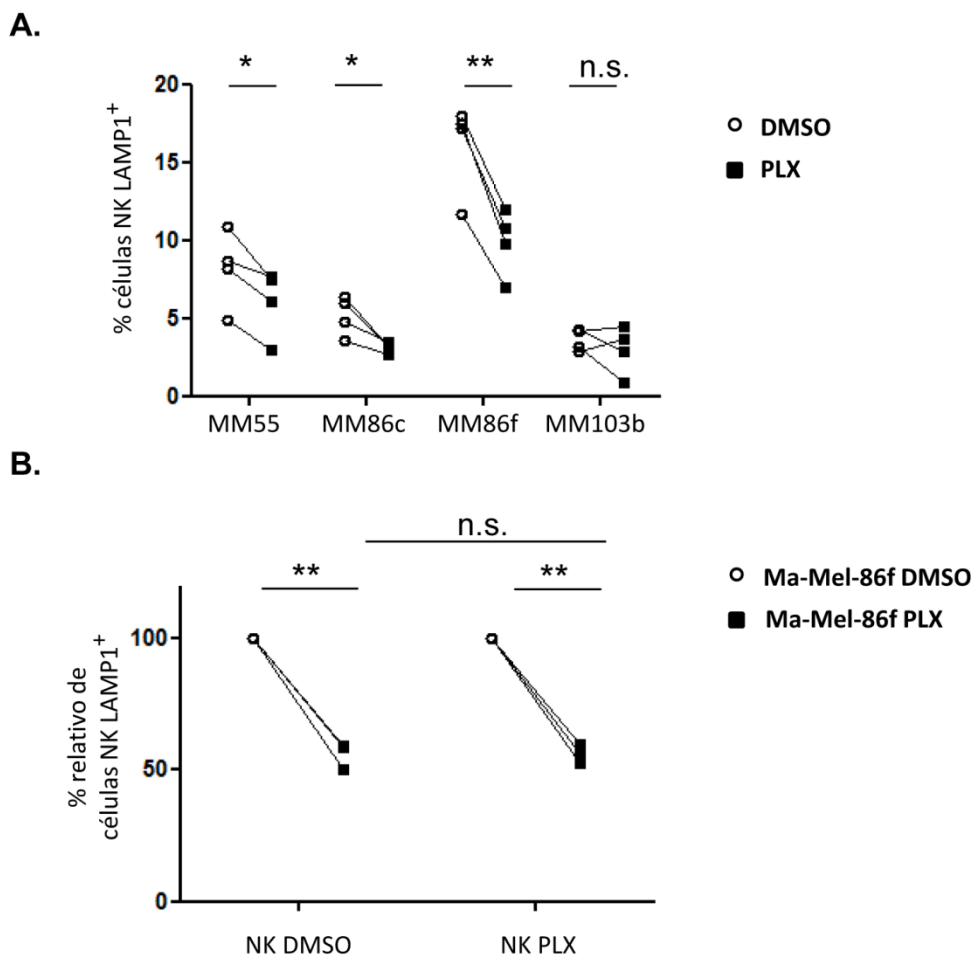


Figura 36. Liberación de gránulos líticos de células NK frente a células de melanoma tratadas con PLX. Se realizaron experimentos de liberación de gránulos líticos co-incubando células de melanoma que habían sido tratadas previamente con DMSO (círculos) o PLX (cuadrados) durante 48 horas, con células NK a una ratio 1:2 (efectora:diana) durante 2 horas. Se representa el porcentaje de células NK que está liberando gránulos como % LAMP-1⁺ en la región de linfocitos CD3⁺CD56⁺ por citometría de flujo. **(A)** Los símbolos representan los resultados obtenidos con las células NK de donantes diferentes. **(B)** Se utilizaron células NK del paciente 86, tratándolas previamente con DMSO o PLX 48 horas y durante el experimento, co-incubándolas con Ma-Mel 86f, tratadas previamente con DMSO o PLX durante 48 horas. Se representa el porcentaje de células NK LAMP1⁺, relativizado a los niveles con DMSO. Los símbolos representan los resultados obtenidos de distintos experimentos. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student para muestras pareadas, *p<0,05 **p<0,01, n.s. no significativo. (n=4 en A; n=3 en B). Ma-Mel-55 (MM55), Ma-Mel-86c (MM86c), Ma-Mel-86f (MM86f) y Ma-Mel-103b (MM103b).

En este último experimento, además se puede observar que el tratamiento con PLX no afectó a la capacidad de las células NK para liberar gránulos líticos. Para ello, se trataron las células NK con PLX durante 48 horas antes del experimento y durante la co-incubación. No se apreció ninguna diferencia entre los porcentajes de células NK positivas para LAMP1 tratadas con DMSO o PLX. Este resultado indica que la reducción en la respuesta de las células NK se debe a la alteración en el equilibrio de ligandos de receptores activadores e inhibidores, expresados por las células de melanoma, provocada por el tratamiento con PLX. Esta reducción en la actividad NK podría estar implicada en un mecanismo de resistencia al inhibidor en fases tempranas del tratamiento, ya que las células de melanoma tratadas con PLX podrían escapar de la acción lítica de las células NK.

3.2.4 Los efectos de Vemurafenib pueden ser revertidos con inhibidores de desacetilasas de histonas.

Los resultados anteriores demuestran que el tratamiento con vemurafenib hace a las células de melanoma menos susceptibles a la acción de las células NK. Sin embargo, datos previos del laboratorio y de otros grupos, demostraron que tratamientos con otros quimioterapéuticos frente al cáncer pueden aumentar la inmunogenicidad de células tumorales, aumentando la expresión de NKG2D-L (Armeanu et al., 2005; Butler et al., 2009). Por ejemplo, los inhibidores del proteasoma, utilizados para el tratamiento del mieloma múltiple, aumentan los NKG2D-L en superficie de varias líneas celulares (Moreau et al., 2012; Valés-Gómez et al., 2008); también, los inhibidores de desacetilasas de histonas, actualmente en desarrollo para su uso como agente quimioterapéuticos en cáncer (West et al., 2014), aumentan la expresión de NKG2D-L (Skov et al., 2005).

Si el uso de dichos tratamientos compensara la bajada de los NKG2D-L debida a los tratamientos con PLX, podrían ser de gran utilidad para evitar la reducción en la actividad de las células NK. Por ello, se estudió el efecto del tratamiento con MG132, como inhibidor del proteasoma, y butirato sódico, como inhibidor de desacetilasas de histonas, en las líneas de melanoma metastásico.

En primer lugar, se analizó la viabilidad de las células de melanoma tras el tratamiento a diferentes concentraciones de estos inhibidores durante 16-18 horas. Para ello, se analizó la incorporación de la sonda de muerte 7-AAD por citometría de flujo (Figura 37A), observando que dicho tratamiento no aumentaba significativamente la muerte celular.

A continuación, se estudió la expresión de los NKG2D-L por citometría de flujo tras utilizar estos inhibidores (Figura 37B). El tratamiento con MG132 únicamente aumentó los niveles de MICA en Ma-Mel-55 a una concentración de 50 nM; mientras que ULBP2, incluso disminuyó a concentraciones crecientes. Este resultado, indica que MG132 no aumenta de manera consistente los NKG2D-L en la superficie de estas líneas celulares. Sin embargo, el tratamiento con butirato sódico, aumentó la expresión de todos los NKG2D-L en la superficie de las células de melanoma, siendo mayor a concentraciones crecientes. Además, esto ocurría tanto en líneas mutantes para BRAF, como no mutantes. También se analizó la intensidad de fluorescencia de los ligandos de DNAM-1, CD155 y CD112, y MHC-I, tras el tratamiento con butirato sódico (Figura 37C). Mientras que CD155 no variaba de manera consistente, sí que parece haber un aumento en los niveles de expresión de CD112 y MHC-I en superficie tras el tratamiento con butirato sódico, a pesar de que dichas diferencias no son estadísticamente significativas para todas las líneas celulares.

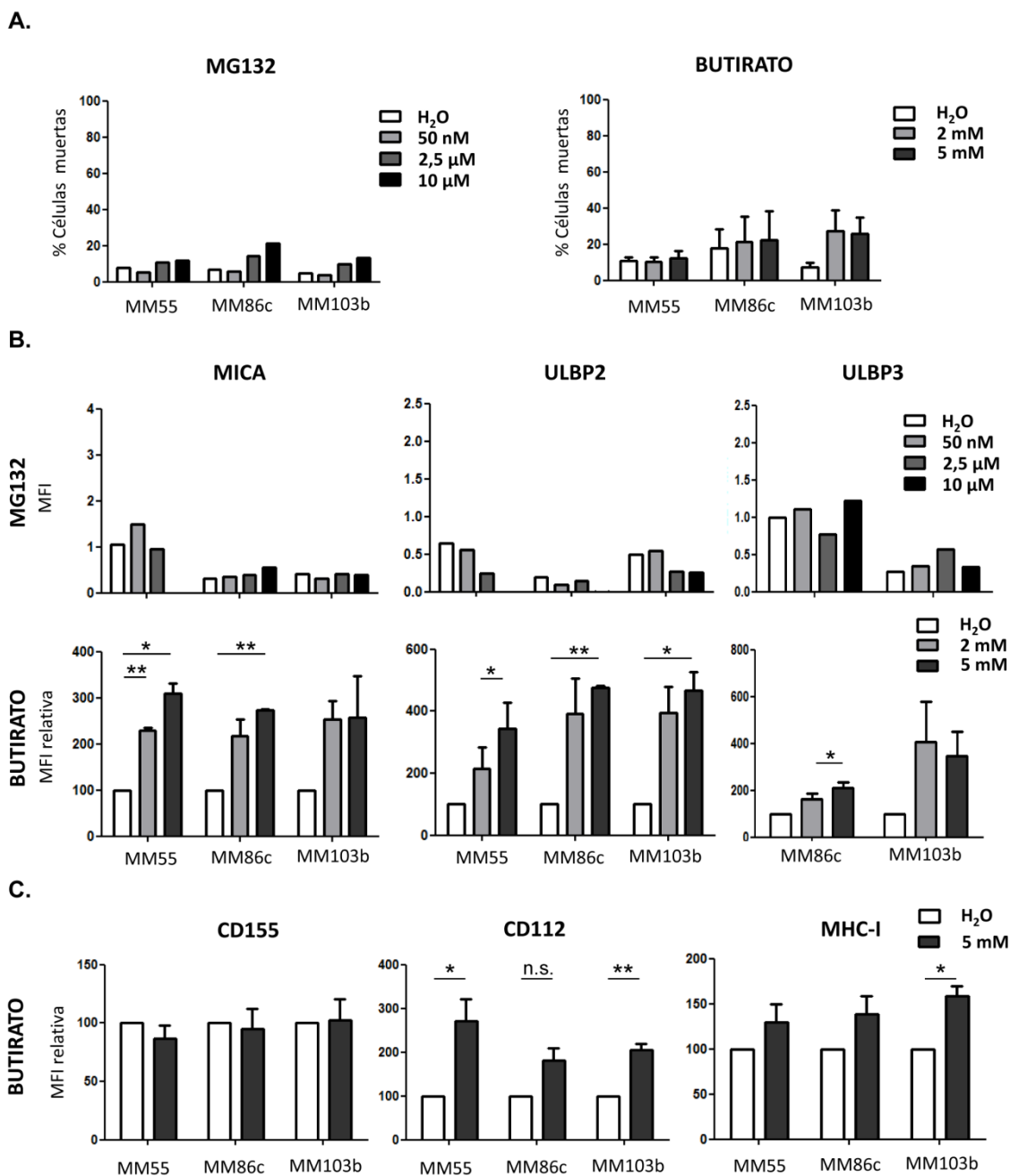


Figura 37. Titulación del tratamiento con MG132 y butirato sódico en células de melanoma. Las líneas de melanoma Ma-Mel-55 (MM55), Ma-Mel-86c (MM86c) y Ma-Mel-103b (MM103b) se trataron con MG132 o butirato sódico durante 18 horas a las concentraciones indicadas. Se utilizó agua como control negativo de tratamiento. **(A)** Viabilidad de las células medida por citometría de flujo como % de células positivas para 7-AAD. **(B)** MFI analizada por citometría de flujo de MICA, ULBP2 y ULBP3 tras los tratamientos. En el caso del tratamiento con butirato se representa la MFI relativizada al nivel del agua. **(C)** Nivel de expresión de CD155, CD112 y MHC-I tras el tratamiento con butirato medido por la MFI. **(A,B)** Se muestra un experimento representativo, para MG132; la media y la SEM, en el caso del butirato. La MFI del control de isotipo se restó. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student para muestras pareadas, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, n.s. no significativo. ($n=2$ en tratamientos con MG132; $n \geq 3$ en tratamientos con butirato).

Debido a que el aumento en los NKG2D-L era más evidente con butirato sódico a una concentración de 5 mM, y no parecía afectar a la viabilidad celular, se continuó con este tratamiento

para probar su combinación con vemurafenib y estudiar si se compensaban los efectos de éste. La combinación de ambos fármacos se mantuvo durante 24 horas, ya que se observó que era muy tóxico para las células si se mantenía durante 48 horas (datos no mostrados).

Primero, se estudió el efecto que tenía la combinación de tratamientos en la actividad metabólica de las células mediante ensayos MTT. Para ello, se trataron las líneas de melanoma con los diluyentes de ambos tratamientos (DMSO y agua) como control negativo o blanco, con PLX, con butirato sódico y con la combinación de ambos tratamientos (Figura 38A). Se observó que el tratamiento con PLX durante 24 horas disminuía la actividad metabólica en las líneas mutantes para BRAF como ocurría tras 48 horas de tratamiento (Figura 29A), mientras que el tratamiento con butirato sódico durante 24 horas sólo bajaba la actividad metabólica en la línea Ma-Mel-55, la aumentaba en la línea no mutante de BRAF, o la mantenía igual que en el control para las demás líneas. Además, el tratamiento con la combinación de inhibidores también afectó a la actividad metabólica dependiendo de la línea celular: Ma-Mel-55 y Ma-Mel-86c, mostraron una disminución en la actividad metabólica, incluso mayor que con PLX; Ma-Mel-86f presentó una reducción similar a la provocada con el tratamiento con PLX; por el contrario, en la línea Ma-Mel-103b, el efecto se pareció al inducido con butirato. Estos datos sugieren que el mantenimiento de una actividad metabólica disminuida en las células de melanoma mutantes para BRAF tratadas con la combinación de inhibidores podría favorecer el control del crecimiento tumoral.

Los niveles de expresión de NKG2D-L aumentaron cuando se trataban con la combinación de inhibidores (Figura 38B). Aunque el aumento de los ligandos con la combinación de tratamientos se observa de manera clara, no es estadísticamente significativo para todos los ligandos en todas las líneas de melanoma. También se analizó la intensidad de fluorescencia de los ligandos de DNAM-1, CD155 y CD112, la cual aumentaba con la combinación en ambos ligandos de DNAM-1, pese a que en tratamientos cortos no se veían diferencias tratando con butirato sódico (Figura 38C). Por otra parte, no se observaron cambios en la intensidad de fluorescencia de MHC-I con estos tratamientos (Figura 38C). Estos resultados indican que, por lo general, se detecta un aumento en los ligandos activadores de las células NK estudiados cuando se trata con la combinación de inhibidores, demostrando así que el efecto del tratamiento con butirato es capaz de revertir la disminución en el nivel de estos ligandos provocada por el tratamiento con PLX.

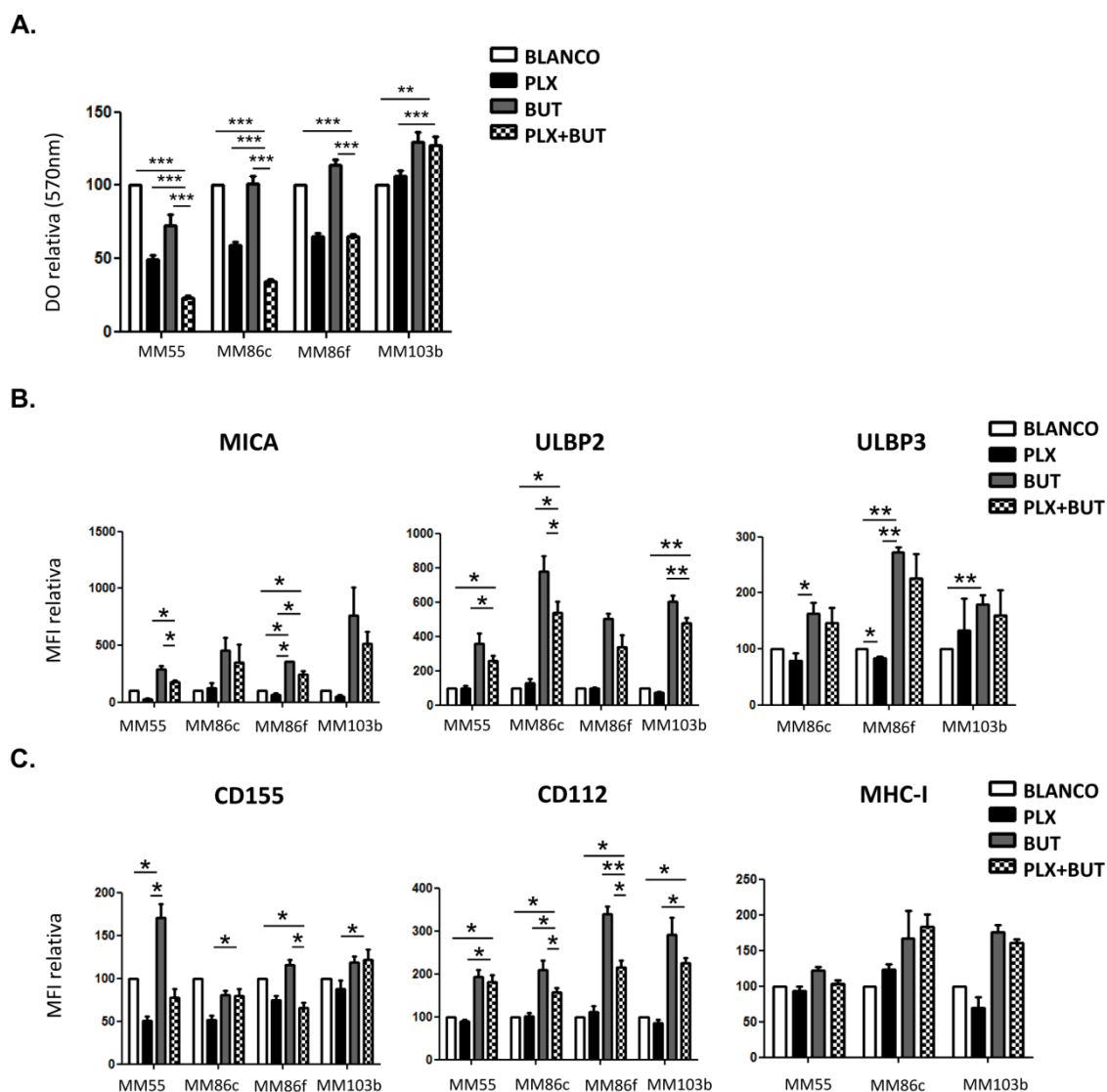


Figura 38. Efecto de la combinación de tratamientos PLX 1 μ M y butirato sódico 5 mM durante 24 horas en células de melanoma. Las líneas de melanoma Ma-Mel-55 (MM55), Ma-Mel-86c (MM86c), Ma-Mel-86f (MM86f) y Ma-Mel-103b (MM103b) se trataron con agua y DMSO, como control negativo (BLANCO), PLX 1 μ M, Butirato sódico 5 mM (BUT) o con la combinación de ambos (PLX+BUT) durante 24 horas. **(A)** Ensayo MTT para medir actividad metabólica. Se representa la media y la SEM de la lectura a una densidad óptica (DO) de 570 nm y relativizada a los niveles del blanco de dos experimentos con cuatro réplicas. **(B)** Se representa la media y la SEM del nivel de expresión medido por la MFI relativizada al nivel del blanco de MICA, ULBP2, ULBP3 y **(C)** los ligandos de DNAM-1, CD155 Y CD112, y MHC-I tras los tratamientos. La MFI del control de isotipo se restó. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student para muestras pareadas, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ ($n \geq 3$) En (A) y (C) sólo se representan los p-valores relacionados con el tratamiento de la combinación

Una vez observado el efecto del tratamiento con la combinación de ambos inhibidores, se estudió si este aumento de ligandos de receptores activadores de células NK se traducían en un aumento de su respuesta frente a las células de melanoma tratadas con la combinación de butirato sódico y PLX. Para ello, se realizaron experimentos funcionales analizando la liberación de gránulos líticos, utilizando células NK heterólogas activadas *in vitro*, como células efectoras y como células diana, las diferentes líneas de melanoma, sin tratar o tratadas con PLX y butirato sódico de manera individual o en combinación durante 24 horas. Se bloqueó MHC-I para evitar la variación de las

respuestas entre donantes. Como se observa en la Figura 39, el porcentaje de células NK positivas para LAMP1 aumentó frente a las células tratadas con la combinación de inhibidores, tanto en células con la forma silvestre de BRAF, como con la forma mutada. Sin embargo, estas diferencias no son estadísticamente significativas para la línea Ma-Mel-86f, posiblemente debido a los altos niveles de activación que se observan frente a esta línea celular.

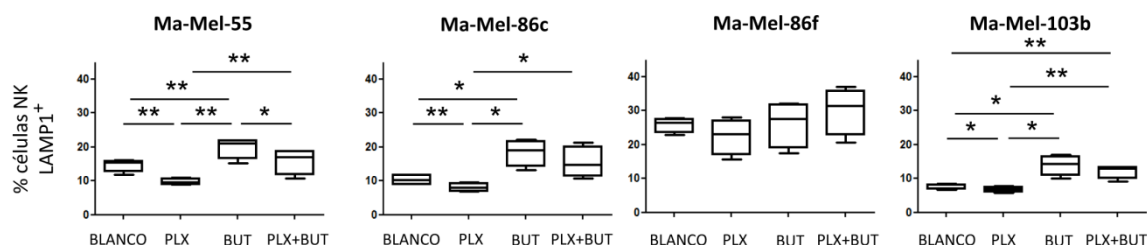


Figura 39. Liberación de gránulos líticos de células NK frente a células de melanoma tratadas con la combinación de inhibidores. Se realizaron experimentos de liberación de gránulos líticos co-incubando células de melanoma tratadas con agua y DMSO, como control negativo (BLANCO), PLX 1 μ M, butirato sódico 5 mM (BUT) o la combinación de ambos (PLX+BUT) con células NK de donantes sano a una ratio 1:2 (efectora:diana) durante 2 horas. Se representa el porcentaje de células NK que están liberando gránulos como % LAMP1⁺ en la región de linfocitos CD3⁻CD56⁺ por citometría de flujo en gráfico de cajas y bigotes. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student para muestras pareadas, *p<0,05, **p<0,01, n.s. no significativo. (n=4).

Estos datos indican que la combinación del tratamiento de PLX con butirato sódico es capaz de recuperar el equilibrio de señales necesarias para la activación de las células NK. Esta terapia combinada podría utilizarse para combatir el posible mecanismo de evasión a la acción de las células NK observado tras el tratamiento con vemurafenib

3.3 Efecto del tratamiento con vemurafenib en la liberación de los ligandos de NKG2D

Una vez analizado el efecto del tratamiento con PLX en los ligandos de NKG2D en las células de melanoma, se podría pensar que la bajada de estas moléculas se debiera a su liberación al medio extracelular. Como ya se ha descrito anteriormente, los NKG2D-L pueden ser liberados mediante dos mecanismos: reclutados en exosomas, o liberados como moléculas solubles por la acción de metaloproteasas. Ambas opciones pueden ocasionar el bloqueo del receptor NKG2D o su internalización, modulando, de esta manera, la función de las células NK, y constituyendo un mecanismo de evasión inmunológica tumoral.

3.3.1 Los exosomas derivados de células de melanoma expresan MICA y antígenos de melanoma

En primer lugar, para estudiar los ligandos que podrían ser liberados por las células de melanoma, se caracterizaron los exosomas liberados por estas líneas celulares. Los exosomas se purificaron de

los sobrenadantes de los cultivos celulares de Ma-Mel-86c, mediante ultracentrifugación, y se visualizaron por microscopía electrónica de transmisión (Figura 40A). Las vesículas purificadas mostraron la típica forma redondeada y un tamaño de alrededor de 50-200 nm de diámetro. El tamaño de los exosomas también se midió utilizando Nanosight, basado en tecnología NTA (*Nanoparticle Tracking Analysis*), siendo el tamaño medio de los exosomas de cada línea celular: de Ma-Mel-55 $169,5 \pm 0,4$ nm, Ma-Mel-86c $193,1 \pm 11,6$ nm, Ma-Mel-86f $202,3 \pm 21,5$ nm y Ma-Mel-103 b $191 \pm 4,6$ nm.

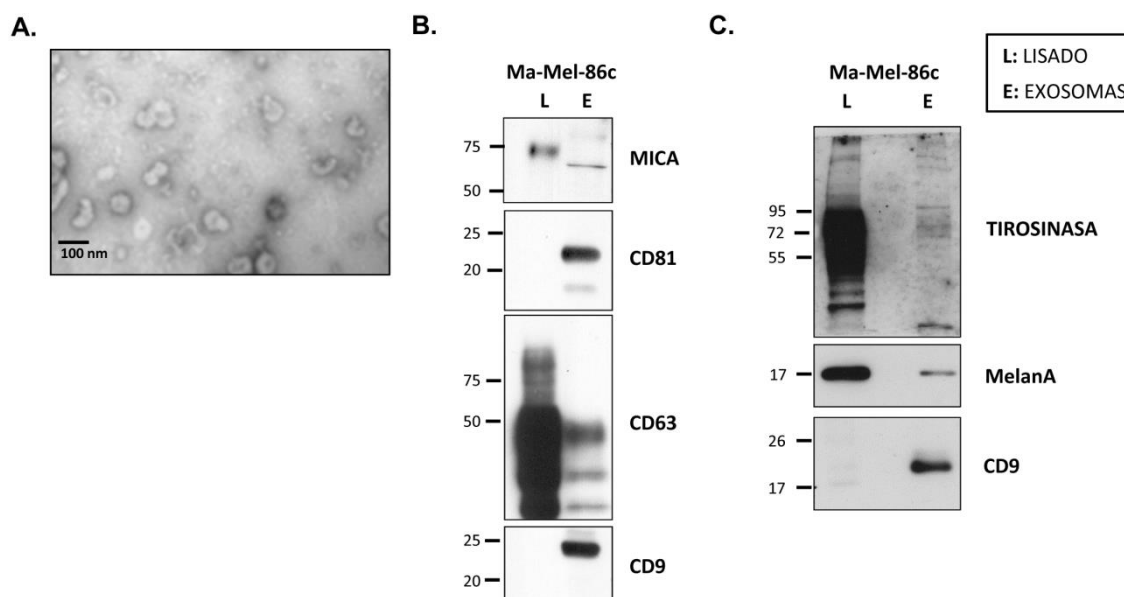


Figura 40. Caracterización de exosomas derivados de Ma-Mel-86c. Los exosomas se purificaron por ultracentrifugación de los sobrenadantes de los cultivos celulares. (A) Imagen representativa tomada por microscopía electrónica de transmisión. Se indica referencia de tamaño de 100 nm (extremo inferior izquierdo). (B, C) Análisis por *Western blot* de lisados (L) y exosomas (E) de Ma-Mel-86c. (B) Se muestran las incubaciones con anticuerpos anti-MICA, anti-CD81, anti-CD63 y anti-CD9. (C) Se muestran las incubaciones con anticuerpos anti-tirosinasa, anti-MelanA, anti-CD9 (como control positivo de exosomas). Se muestra un experimento representativo de tres. Se indica el peso de los marcadores de peso molecular en kDa.

A continuación, se analizó la composición de los exosomas mediante *Western blot*, comenzando por la presencia de marcadores típicos de exosomas, como son las tetraspaninas CD9, CD81 y CD63 (Figura 40B). Se observó que los exosomas derivados de Ma-Mel-86c expresaban todas ellas, aunque claramente estaban enriquecidos en CD81 y CD9, al compararlos con los lisados. La expresión de estas moléculas también se comprobó en las demás líneas celulares (datos no mostrados). Además, se demostró la expresión del NKG2D-L, MICA, en los exosomas. Por último, se estudió la presencia de antígenos propios de melanoma, como GP100, MelanA y Tirosinasa. A pesar de que no se observó expresión de GP100 (datos no mostrados), los exosomas de Ma-Mel-86c expresaban MelanA y Tirosinasa, aunque en menor cantidad que los lisados de las mismas células (Figura 40C).

En conjunto, estos datos demuestran que los exosomas derivados de la línea de melanoma Ma-Mel-86c presentan las características propias de los exosomas, como tamaño, forma y expresión de tetraspaninas, además de MICA y antígenos de melanoma.

3.3.2 El tratamiento con vemurafenib reduce los niveles de MICA en los exosomas derivados de las células de melanoma

Para estudiar el efecto que podría tener el tratamiento con vemurafenib en los NKG2D-L liberados en exosomas, éstos se purificaron de sobrenadantes de células que habían sido tratadas con DMSO o PLX durante 48 horas. En primer lugar, se analizaron los cambios en su cantidad o tamaño. Debido a que el número de células en el cultivo tras el tratamiento con PLX podía verse afectado, se expresó la cantidad de exosomas en función del número de células presente en el cultivo cuando se recogieron los sobrenadantes. Como se observa en la Figura 41, no había cambios significativos, ni en el diámetro ni en la producción de exosomas, cuando las células se trataron con el inhibidor. Sin embargo, puede observarse como las líneas celulares Ma-Mel-86c y Ma-Mel-103b producen menos exosomas por célula, tanto tratadas como sin tratar.

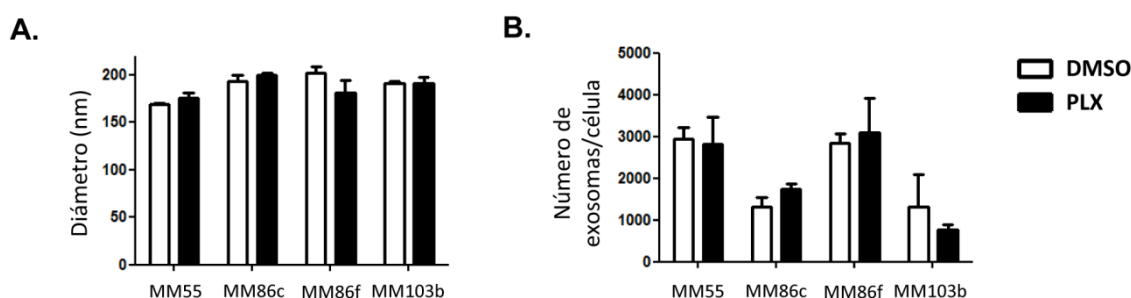


Figura 41. Tamaño y cantidad de exosomas liberados por líneas de melanoma tratadas con PLX. Los exosomas se purificaron por ultracentrifugación de los sobrenadantes de los cultivos celulares de Ma-Mel-55 (MM55), Ma-Mel-86c (MM86c), Ma-Mel-86f (MM86f) y Ma-Mel-103b (MM103b) tratadas con DMSO o PLX durante 48 horas. **(A)** Se representa la media y SEM del diámetro medio (nm) medido con Nanosight. **(B)** Se representa la media y SEM del número de exosomas dividido entre el número de células (recuperadas de los cultivos de los que se obtuvo los sobrenadantes). El número de exosomas se calculó con Nanosight. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student para muestras pareadas, ninguna de las diferencias entre DMSO y PLX fueron estadísticamente significativas (n=3).

A continuación, se estudió si había diferencias en la composición de los exosomas con el tratamiento. Se analizó la expresión de MICA por *Western blot* en exosomas derivados de células de melanoma tratadas durante 48 horas con DMSO o PLX (Figura 42A). Al igual que ocurría en los lisados de las células tratadas con PLX (Figura 31A), se detecta una disminución en la cantidad de MICA, en los exosomas derivados de estas células. Este cambio es menos evidente en los exosomas de la línea Ma-Mel-86f. Sin embargo, los exosomas de la línea Ma-Mel-103b tienen menos cantidad de MICA, por lo que no se pueden apreciar bien los cambios con el tratamiento. También se

analizaron por *Western blot* los niveles de ULBP2 y ULBP3 en exosomas pero no se detectó ninguna banda específica para dichas proteínas (datos no mostrados).

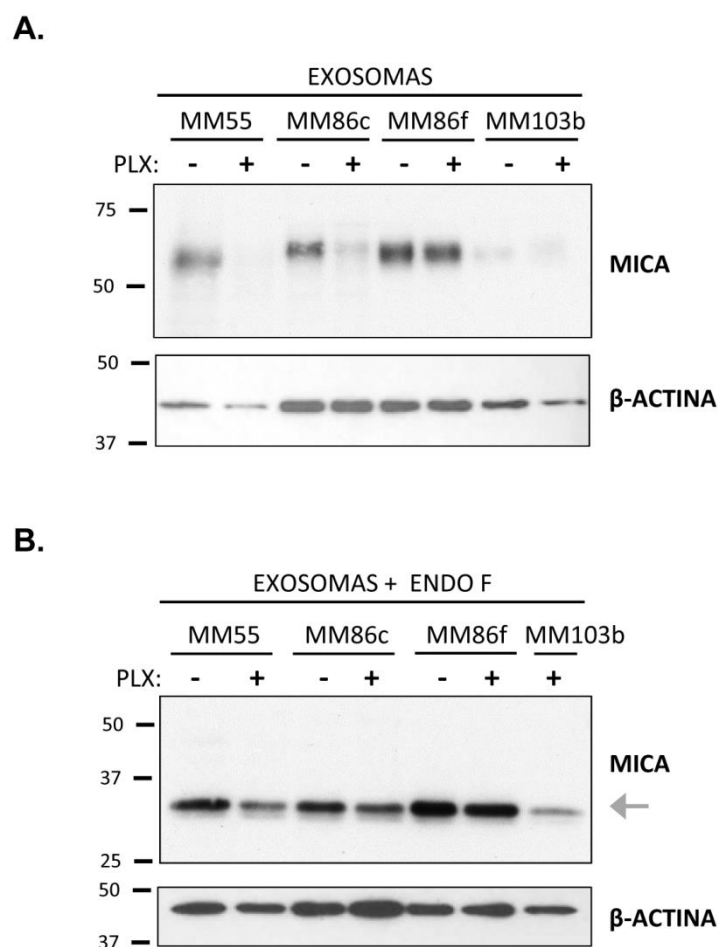


Figura 42. Nivel de expresión de los alelos de MICA en exosomas derivados de células de melanoma tratadas con PLX (A) Análisis por *Western blot* de exosomas tratados o no con endoglicosidasa F **(B)** derivados de células Ma-Mel55 (MM55), Ma-Mel-86c (MM86c), Ma-Mel-86f (MM86f) o Ma-Mel103b (MM103b) incubadas en presencia de DMSO (-) o PLX 1 μ M (+) durante 48 horas. Se muestran las incubaciones con anticuerpos anti-MICA y anti- β -actina como control de carga. Estos experimentos se repitieron cuatro veces. La banda de MICA perteneciente al grupo A5.1 anclado a membrana se representa con flecha gris. Se indica el peso de los marcadores de peso molecular en kDa.

Como ya se explicó anteriormente, las distintas líneas de melanoma presentaban diferentes alelos de MICA (Tabla 1) y, gracias al tratamiento con endoglicosidasa F, se pudieron distinguir los productos de los diferentes alelos de MICA en los lisados de estas células de melanoma por *Western blot* (Figura 31B). Para comprobar qué alelos se encontraban en los exosomas derivados de las líneas de melanoma, se trataron con endoglicosidasa F (Figura 42B). De nuevo, se observa que la banda que se detecta en los exosomas se corresponde con la proteína anclada a membrana del alelo correspondiente al grupo A5.1. Como era de esperar, en aquellas células heterocigotas para los alelos de MICA, Ma-Mel-86f y Ma-Mel-103b, no se observó en los exosomas ninguna banda correspondiente al alelo del grupo A5. Además, se observa la disminución en los niveles de MICA

en las células tratadas con PLX, al igual que en los exosomas sin desglicosilar. El hecho de que la cantidad de estas proteínas disminuya en los exosomas derivados de células tratadas con PLX, podría ser un reflejo de lo que ocurre a nivel celular, ya que, al bajar el nivel de expresión de MICA en las células, podría provocar un menor reclutamiento a exosomas.

Para comprobar si alguno de los datos anteriores podría extrapolarse a la clínica, se inició un estudio en una cohorte pequeña de pacientes de melanoma metastásico con la mutación BRAF y tratados con vemurafenib. Se obtuvieron muestras de suero de cuatro pacientes antes del tratamiento, 3 meses post-tratamiento y, para dos de los pacientes, también al final del tratamiento. Se purificaron los exosomas de las muestras de suero mediante ultracentrifugación y se midió la concentración y el diámetro de las vesículas con Zetaview (tecnología NTA). Aunque no se detectaron cambios evidentes en el tamaño de los exosomas durante el tratamiento, la concentración de exosomas sí mostró patrones diferentes, dependiendo del paciente (Figura 43). El paciente 1 mantuvo una concentración estable de exosomas, mientras que los pacientes 2 y 3 aumentaron su concentración de exosomas durante el tratamiento, y el paciente 4 siguió el patrón contrario.

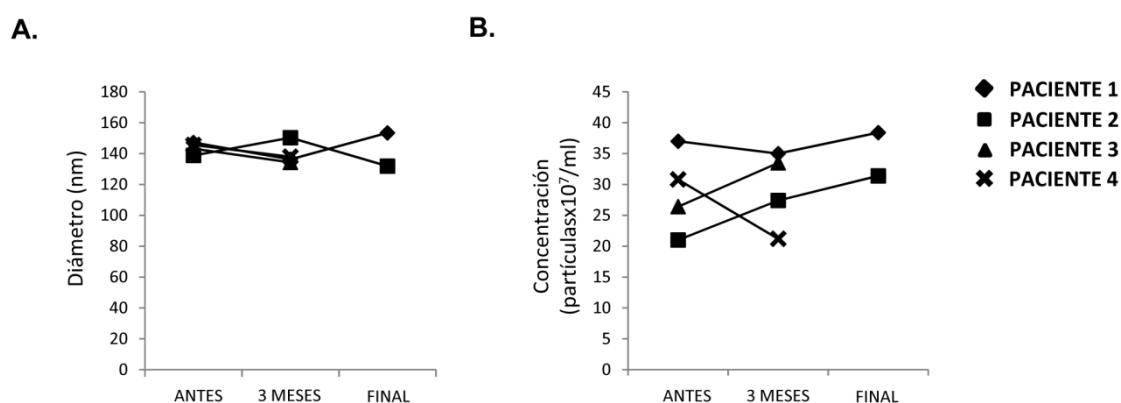


Figura 43. Tamaño y concentración de exosomas purificados de suero de pacientes tratados con vemurafenib. Los exosomas se purificaron por ultracentrifugación de sueros de cuatro pacientes, antes del tratamiento con vemurafenib, tras 3 meses de tratamiento y al final del tratamiento (Pacientes 1 y 2). Cada punto representa la muestra de un paciente. Cada símbolo unido por líneas representa un paciente a lo largo del tratamiento. (A) Se representa el diámetro medio (nm) medido con Zetaview. (B) Se representa la concentración de exosomas medido con Zetaview.

3.3.3 El tratamiento con vemurafenib reduce la liberación de ligandos de ULBP2 solubles

Como ya se ha mencionado anteriormente, los NKG2D-L pueden ser liberados al medio extracelular incluidos en exosomas, o como consecuencia de la acción de metaloproteasas, siendo secretados como proteínas solubles. Por esta razón, a continuación, se estudió el nivel de estos ligandos solubles tras el tratamiento con PLX. Para ello, se recogieron los sobrenadantes resultantes de la ultracentrifugación de exosomas, procedentes de los cultivos de las líneas de melanoma tras 48 horas de tratamiento con DMSO o PLX, y se analizó la presencia de MICA, ULBP2 y ULBP3

mediante ELISA. Pese a que todos ellos se detectaron en los controles positivos (sobrenadantes de células CHO transfectadas para estas proteínas) (datos no mostrados), en los sobrenadantes de los cultivos de melanoma sólo se detectó ULBP2. Debido a que el número de células en el cultivo tras el tratamiento con PLX puede verse afectado, se corrigió el dato de concentración de ULBP2 soluble, dividiendo por el número de células presente en el cultivo. Como muestra la Figura 44, la concentración de ULBP2 soluble sólo disminuían en la línea Ma-Mel86f, lo cual reflejaría los cambios que ocurren a nivel de superficie celular (Figura 30).

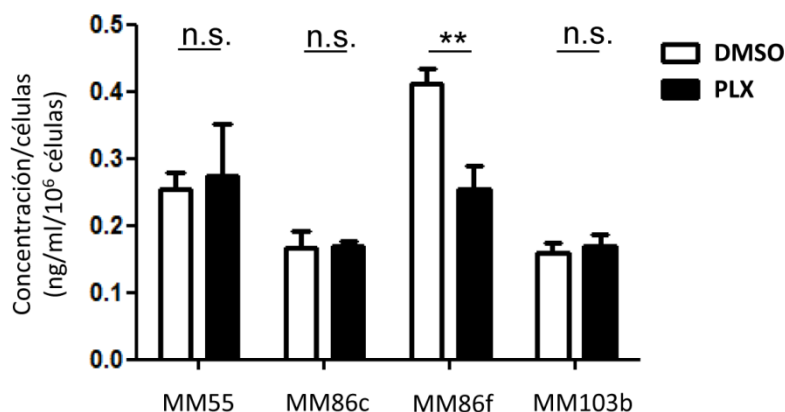


Figura 44. Niveles de ULBP2 soluble liberado por líneas de melanoma tratadas con PLX. Se analizó la concentración de ULBP2 por ELISA utilizando los sobrenadantes resultantes de la ultracentrifugación de exosomas de los cultivos celulares de Ma-Mel-55 (MM55), Ma-Mel-86c (MM86c), Ma-Mel-86f (MM86f) y Ma-Mel-103b (MM103b) tratadas con DMSO o PLX durante 48 horas. Se representa la media y SEM de la concentración (ng/ml) por cada millón de células. Para el análisis estadístico, se aplicó el test t de Student para muestras pareadas, **p<0,01, n.s. no significativo (n=3).

En conjunto, estos datos indican que el efecto del tratamiento con vemurafenib en la liberación de ligandos, como MICA en exosomas y ULBP2 de manera soluble, va ligada a los efectos del tratamiento sobre la expresión de estos ligandos en la propia célula.

Discusión

Con el fin de conocer la modulación de la respuesta mediada por los NKG2D-L, y comprender los distintos niveles de regulación de estas proteínas, en esta tesis se ha estudiado: 1) la implicación de las propiedades bioquímicas de uno de los NKG2D-L en su liberación en exosomas; 2) la transferencia de NKG2D-L a células NK tras la sinapsis inmunológica y sus implicaciones funcionales; y 3) la modulación de la expresión de NKG2D-L por terapias dirigidas para el tratamiento del melanoma que afectan a la actividad NK, así como la liberación de los NKG2D-L al medio extracelular.

1. Estudio bioquímico del ligando MICA*008 y su reclutamiento a exosomas

MICA*008 pertenece al grupo de alelos de MICA más frecuente en todas las poblaciones humanas estudiadas. En este trabajo, se ha demostrado que se ancla a la membrana celular a través de GPI y que este anclaje es necesario para su reclutamiento a regiones de membrana específicas, llamadas DRM, y a exosomas. Este estudio bioquímico de MICA*008 demuestra, además, que este ligando puede presentar **dos formas** en la célula, ya que tras la digestión con endoglicosidasa F, se observan dos bandas que se identifican con: una forma anclada a membrana mediante GPI, y una forma no anclada a membrana. El procesamiento de las proteínas GPI implica el corte de la región transmembrana, con la que se sintetizan inicialmente, y su unión al GPI preformado dentro del retículo endoplasmático (Paladino et al., 2015). En el procesamiento de MICA*008 este proceso es muy lento, y parte de la proteína permanece soluble en el lumen del orgánulo, pudiendo ser secretada al entrar en una ruta de exocitosis (Ashiru et al., 2013). Se ha demostrado que MICA*008 se ancla mediante GPI analizando la expresión de esta proteína en células CHO deficientes en enzimas para la síntesis de GPI (Figura 5), y tratando células que expresan MICA*008 de manera endógena, o transfectantes, con la enzima PI-PLC (Figura 6). Es importante destacar que los niveles de MICA*008 en la superficie celular tras el tratamiento con PI-PLC se reducen un 60%. El hecho de que un 40% de MICA*008 permanezca en la superficie celular tras la digestión con PI-PLC, podría sugerir un anclaje a la membrana plasmática alternativo. En cambio, hay trabajos que describen varios ejemplos de proteínas GPI que son resistentes al corte mediado por PI-PLC, y suele ser debido a modificaciones en los ácidos grasos del grupo inositol, aunque la presencia de estos no ha sido estudiada en este trabajo. Por ejemplo, estas modificaciones se han descrito en proteínas GPI como: DAF (del inglés, *Decay-accelerating factor*, también conocido como CD55) (Walter et al., 1990), acetilcolinesterasa (Roberts et al., 1988) y CD59 (Ratnoff et al., 1992).

MICA*008 es el primer miembro de la familia MIC que se ha descrito como **proteína GPI**, ya que hasta el momento, todos los ligandos pertenecientes a MIC se consideraban proteínas transmembrana, por la presencia de una región hidrofóbica al final de la región extracelular (Figura 45). Sin embargo, la corta región hidrofóbica en MICA*008 es consistente con su anclaje a la

membrana del retículo endoplasmático, para su procesamiento por el complejo enzimático que ancla el GPI. Es interesante observar que existen proteínas transmembrana y GPI tanto en la familia de los ULBP, como en los ligandos de ratón (Nausch y Cerwenka, 2008). ¿Qué consecuencias puede tener para la biología de los NKG2D-L estar anclados a la membrana mediante GPI? Los NKG2D-L humanos no muestran grandes diferencias en la afinidad al receptor dependiendo del tipo de anclaje (Strong y McFarland, 2004). Sin embargo, una de las características comunes de los ligandos GPI, parece ser su reclutamiento a regiones DRM. Se ha descrito que los ligandos GPI, ULBP1, 2 y 3 se localizan en DRM (Fernández-Messina et al., 2010), y nuestros datos indican que MICA*008 requiere GPI para su reclutamiento a estas regiones específicas de membrana (Figura 7). Debido a que en la sinapsis inmunológica hay una acumulación de DRM (Lou et al., 2000), la presencia de ligandos en estas regiones podría relacionarse con su polarización en la sinapsis inmunológica, favoreciendo la interacción con el receptor y la respuesta NK. Para estudiar este efecto, Martínez y colaboradores modificaron ULBP1 acoplándole la región transmembrana de CD45, demostrando que ULBP1 perdía su capacidad de reclutamiento a DRM y disminuía su reconocimiento (Martinez et al., 2011); en cambio, otros datos indican que las formas transmembrana y GPI de ULBP2 no presentan diferencias en su capacidad para activar la respuesta NK (Fernandez-Messina et al., 2011) y tampoco ocurre con una forma de MICA, en la que se modificaron los residuos implicados en el reclutamiento a DRM (Agüera-González et al., 2011), por lo que es plausible que el anclaje GPI facilite el tráfico a la sinapsis. Sin embargo, no se ha demostrado que las células efectoras respondan con mayor intensidad frente a células que poseen NKG2D-L con anclaje GPI. Por otro lado, algunos mecanismos de evasión virales también parecen afectar de manera diferencial a los NKG2D-L con distintos tipos de anclaje. En este sentido, se ha observado que, mientras la proteína UL142 de HCMV reduce los niveles de MICA transmembrana pero no MICA*008 (Ashiru et al., 2009), US9 está implicado en la disminución de los niveles de MICA*008 (Seidel et al., 2015). El hecho de que existan proteínas implicadas en la evasión de la respuesta inmunológica específicas para los distintos tipos de ligandos, parece indicar que ambos tipos de anclaje ejercieron una presión evolutiva sobre los patógenos.

Las diferentes características bioquímicas de MICA*008 implican también **diferencias funcionales**. A pesar de que MICA*008 es muy similar a otros alelos de MICA en su región extracelular, como MICA*019, su secuencia en la región transmembrana se ve truncada por una mutación que da lugar a un codón de parada, dando lugar a una proteína truncada. Resultados previos indicaban que la diferencia en su región C-terminal afectaban a su reclutamiento a DRM y a exosomas (Ashiru et al., 2010). Los resultados mostrados en este trabajo indican que el anclaje GPI de MICA*008 es responsable de este reclutamiento a regiones ricas en esfingolípidos (Figura 7). Esto es consistente con el reclutamiento a exosomas de otras proteínas GPI, como CD55, CD59 o la

proteína priónica (revisado en (López-Cobo et al., 2016). A nivel funcional, la liberación de MICA*008 en exosomas, de manera multimérica, puede afectar a la respuesta inmunológica, ya que se ha observado, en experimentos *in vitro*, que ligandos liberados en exosomas son más potentes disminuyendo los niveles de NKG2D que los ligandos liberados de manera monomérica (Fernández-Messina et al., 2010). Además, también se ha descrito, en el contexto de trasplantes, que los alelos pertenecientes al grupo de MICA*008, A5.1, son más inmunogénicos (Tonnerre et al., 2013).

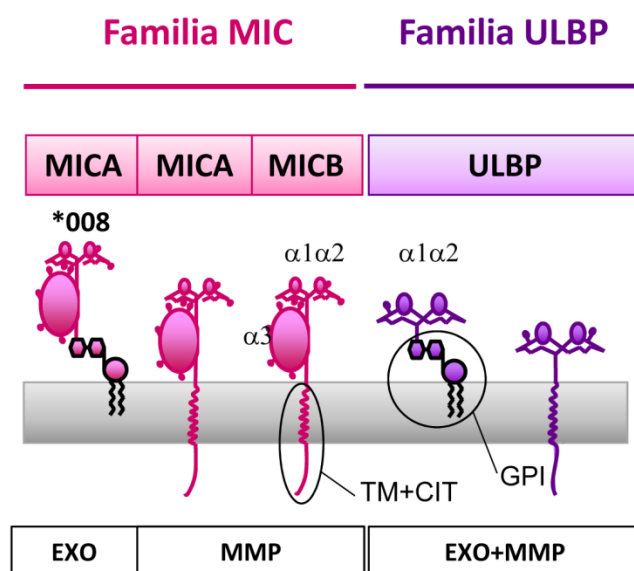


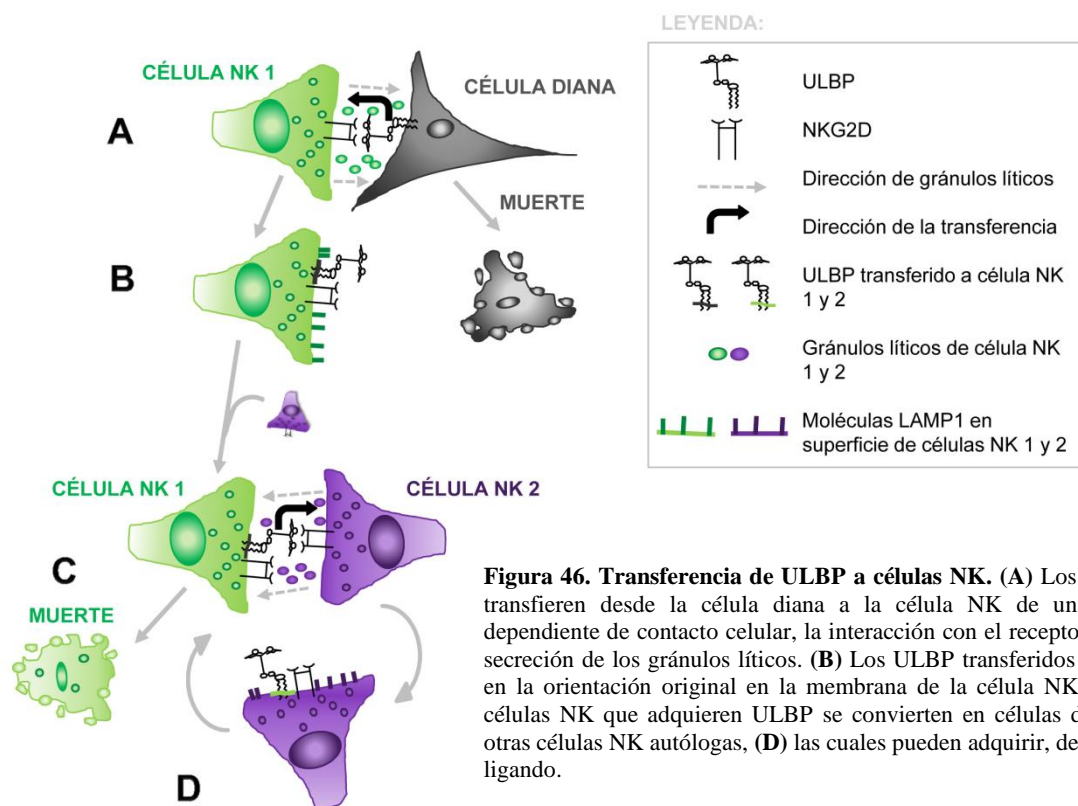
Figura 45. MICA*008 se ancla a la membrana mediante GPI y este anclaje es necesario para su reclutamiento a exosomas. En las dos familias de NKG2D-L, MIC y ULBP, se han descrito proteínas con una región transmembrana (TM) y citoplasmática (CIT) o ancladas mediante Glicosil-fosfatidil-inositol (GPI), y se liberan al medio extracelular formando parte de exosomas (EXO) o por la acción de metaloproteasas de matriz (MMP). Adaptado de López-Cobo et al., 2016.

El descubrimiento del anclaje GPI de MICA*008, no sólo tiene gran relevancia para entender su biología, sino también para interpretar los datos sobre NKG2D-L en asociación al avance de distintas patologías. Se trata de un ejemplo más que demuestra que no se pueden considerar los NKG2D-L, ni tan siquiera todos los alelos de MICA, como equivalentes, evidenciando la importancia de estudiar la biología de cada ligando de manera individual. Estas diferencias bioquímicas entre los distintos NKG2D-L, demuestran la relevancia de caracterizar no sólo la presencia de NKG2D-L en diferentes patologías (por ejemplo, en suero de pacientes de cáncer), sino también el genotipo de MICA, ya que de ello va a depender que MICA se libere de manera monomérica o formando parte de exosomas, y esto puede estar relacionados con diferentes formas de modular la respuesta inmunológica (Valés-Gómez, 2015).

2. Transferencia de los ULBP desde la célula diana a la célula NK

Los resultados de esta tesis doctoral demuestran que varios NKG2D-L se transfieren desde las células diana a células efectoras que expresan NKG2D. Este fenómeno parece corresponder con mecanismos de trogocitosis y requiere la interacción entre ambas células a través del receptor. La eficiencia de este proceso depende tanto del ligando transferido, como de su abundancia en la célula diana y de la actividad citotóxica de la célula NK. Las células NK adquieren los ligandos en su

conformación funcional, por lo que pueden ser células diana para otras células NK autólogas y, además, retransferir el ligando (Figura 46).



Los datos presentados en este trabajo demuestran que los NKG2D-L anclados mediante **GPI** a la membrana plasmática, ULBP1, ULBP2 y ULBP3, se transfieren desde las células diana, tanto transfectantes como células tumorales con expresión endógena, a las células NK. El tipo de anclaje a membrana de los distintos ligandos no parece regular su transferencia a células NK, tanto por los resultados obtenidos en esta tesis (Figura 14, 15), como por los datos en otros trabajos que también han definido la transferencia de otros NKG2D-L. Datos previos habían demostrado la transferencia de los ligandos humanos transmembrana MICA (McCann et al., 2007) y MICB (Roda-Navarro et al., 2006); en estos dos casos, también se observaba la transferencia de NKG2D a la células diana. Además, durante la preparación de los resultados de esta tesis para su publicación, Nakamura y colaboradores definieron la transferencia de los NKG2D-L murinos anclados por GPI, Rae-1 δ y ϵ (Nakamura et al., 2013a). En este último trabajo, también se demostró la transferencia *in vivo* al inyectar células que expresaban estos ligandos en ratones.

El mecanismo por el cual ocurre la transferencia de los ULBP a las células NK se corresponde con el denominado **trogocitosis**. Este fenómeno se define como la transferencia de fragmentos

intactos de membrana plasmática y sus proteínas asociadas de una célula a otra (Joly y Hudrisier, 2003). Los resultados mostrados cumplen con varias de sus características:

- La transferencia podría ocurrir a través de intercambio de membranas, ya que los ULBP se encuentran en su orientación original y se anclan a la membrana de las células NK mediante un anclaje GPI (Figura 12A). Además, a continuación pueden ser reconocidos por otras células NK (Figura 26).
- Se requiere el **contacto celular**, ya que el uso de membranas semi-permeables impide la transferencia (Figura 11).
- La transferencia de ULBP sigue una **cinética rápida**, ya que se observa un 10% de células NK con ULBP en su superficie tras solo 5 minutos de co-cultivo (Figura 13).

Como los NKG2D-L se pueden liberar al medio extracelular, mediante el corte por metaloproteasas o incluidos en exosomas, cabía pensar que el proceso de trogocitosis pudiera modularse por la acción de estos mecanismos de liberación. Sin embargo, la generación de ULBP soluble no parece ser el mecanismo de transferencia que observamos aquí, ya que se ha demostrado que los ULBP transferidos se encuentran anclados a la membrana de la célula NK mediante GPI, y que un tratamiento ácido, que podría liberar ligandos solubles unidos al receptor, no varía los porcentajes de células NK que son positivas para ULBP. En cuanto a la transferencia mediada por exosomas, en principio, no parece ser el mecanismo que regula la transferencia de los ULBP a las células NK estudiada aquí, ya que para que los exosomas se generen, se suelen requerir tiempos más largos. No se puede descartar, sin embargo, que la transferencia de ULBP mediada por exosomas ocurriera en co-incubaciones durante más tiempo. De hecho, se ha descrito que otras moléculas, como MHC, se pueden transferir tanto a través de trogocitosis como en exosomas (Nakayama, 2014). Sin embargo, la transferencia de proteínas mediada por exosomas suele relacionarse con procesos que no necesitan interacción entre células, aunque esto no siempre es así, ya que también se ha descrito que puede ocurrir durante la sinapsis inmunológica (Mittelbrunn et al., 2011).

Una duda que podría surgir al observar la expresión de NKG2D-L en las células NK, es la posibilidad de que estuviera ocurriendo **síntesis de novo**. Recientemente se ha publicado que las células NK primarias también pueden expresar ULBP2 en su superficie como consecuencia de la activación y proliferación con altas dosis de IL-2. Esta expresión de ULBP2 no es dependiente de la interacción con NKG2D y no implica la activación de otras células NK (Brennan et al., 2016). En cambio, se puede afirmar que la expresión de ULBP que se observa en las células NK en los resultados de esta tesis no procede de *síntesis de novo*, debido a varias evidencias: 1) las células NK sin estar co-cultivadas, o co-cultivadas con células diana que no expresan ULBP, no expresan ligandos (Figura 8, 9); 2) no se detecta señal de ULBP en células NK cuando se utilizan anticuerpos dirigidos frente a un ULBP distinto del expresado por la célula diana (Figura 10 A); 3) se pueden

detectar ULBP en la membrana de las células NK con anticuerpos dirigidos frente al epítipo FLAG que se encuentra en las construcciones de las transfecciones, demostrando que los ULBP adquiridos proceden de las células diana (Figura 10B, C); y 4) las células NK adquieren ULBP tras 5 minutos de co-cultivo (Figura 13), siendo un tiempo muy limitado para explicar la síntesis *de novo* de estas proteínas.

La **eficiencia** de la transferencia de los NKG2D-L depende del ligando transferido, del nivel de expresión del ligando en la célula donadora y del estado de activación de las células NK. La interacción entre el receptor y el ligando es necesaria para la transferencia de ligandos a las células NK, como se demuestra tanto en datos publicados (McCann et al., 2007; Nakamura et al., 2013a; Roda-Navarro et al., 2006), como en experimentos aquí mostrados: 1) la transferencia bloqueando el receptor (Figura 20); 2) usando quimeras que, en lugar de tener la parte extracelular de los ULBP, presentan GFP (Figura 22); o 3) la transferencia de ULBP a linfocitos T que expresan NKG2D (Figura 21). Además, también es necesario el contacto celular para la transferencia de los ligandos a las células NK (Figura 11). La necesidad de interacción entre ambas células, con interacción receptor-ligando, y la condición de activación de la célula NK (Figura 18), sugieren la necesidad de la formación de una sinapsis inmunológica citotóxica para la transferencia de ligandos. Asimismo, esta actividad citotóxica se demuestra con la relación entre la liberación de gránulos líticos y la transferencia (Figura 19): las células NK que no adquieren ULBP, no liberan gránulos; mientras que aquellas que adquieren ULBP pueden haberlos liberado o no, siendo estas últimas, las células que adquieren menos ULBP. El hecho de que haya células NK que adquieren ULBP pero no liberen gránulos podría deberse a que, aunque hayan interactuado, las células NK no han activado aún la maquinaria lítica, no obstante, no se puede descartar que se hayan activado otros mecanismos como la secreción de citoquinas, o a que LAMP1 se haya internalizado y sea indetectable.

La eficiencia de la transferencia también puede asociarse con los niveles de expresión de los ligandos en la célula donadora. Así, cuando las células diana tienen expresión endógena más baja (Figura 15), o células transfectadas con menores niveles de expresión, como MICB, el porcentaje de células NK que adquieren ligandos es menor (Figura 14).

Pese a ser reconocidos por el mismo receptor, los NKG2D-L tienen diferentes propiedades bioquímicas, que afectan a su tráfico celular y liberación al medio extracelular (Fernández-Messina et al., 2012). La eficiencia en la transferencia también varía entre los distintos ligandos. Como ya se ha visto con proteínas que se transfieren a células T o B, la habilidad de su transferencia depende de la identidad de cada proteína (Daubeuf et al., 2010a). En varios de los experimentos presentados, se observa que el porcentaje de células NK que adquiere ULBP2 siempre es menor que ULBP3 y ULBP1, aunque la expresión en la célula diana sea mayor, como ocurre con las células U373 que expresan más ULBP2 pero transfieren más ULBP3 (Figura 15). Este resultado no depende de la

afinidad de los distintos anticuerpos, ya que se observa tanto utilizando anticuerpos dirigidos frente a los ULBP (Figura 9), como frente al epítipo FLAG, presente en las construcciones utilizadas para la transfección de las células diana (Figura 10C). Además, ULBP2 presenta una cinética distinta en su transferencia, alcanzando el máximo a tiempos más cortos (Figura 13). Esta menor eficiencia se debe a la mayor susceptibilidad de ULBP2 al corte proteolítico mediado por metaloproteasas (Fernández-Messina et al., 2010), ya que cuando se inhibe la acción de estas enzimas, aumenta el porcentaje de células NK que adquieren ULBP2 (Figura 16). En cambio, los inhibidores de proteasas no parecen afectar a los niveles de ULBP2 en la célula diana. No se puede descartar que la acción de las metaloproteasas se produzca una vez que las células NK adquieren los ligandos. Una evidencia más de que ULBP2 se comporta de manera diferente se observa en los experimentos de bloqueo de NKG2D, el cual supone una reducción en los niveles de transferencia de ULBP2 menor en comparación con los otros ULBP (Figura 20), sugiriendo que otros mecanismos de transferencia independientes de NKG2D podrían estar implicados en la transferencia de ULBP2.

Un resultado interesante es la **co-inmunoprecipitación** de ULBP3 con NKG2D (Figura 23) tras su transferencia a la célula NK. Este dato indica, que tras la lisis con detergente de las células NK recogidas de los co-cultivos, el ligando y el receptor se encuentran en la misma micela, por lo que deben estar próximos en la membrana de la célula NK. Este resultado, junto con la dependencia de la interacción con el receptor, podría sugerir que ambas proteínas estén asociadas en la célula NK y la interacción ocurra por su sitio de reconocimiento. Sin embargo, varios resultados demuestran que los ULBP transferidos no están unidos a NKG2D: 1) los anticuerpos utilizados para inmunoprecipitar NKG2D pueden bloquear al receptor por su sitio de unión (Bauer et al., 1999) de tal manera que, si estuviera unido a ULBP no podría inmunoprecipitarse; 2) el tratamiento con pH ácido es capaz de provocar el desensamblaje del receptor y, por lo tanto, si el ligando estuviera interaccionando con el receptor, aumentarían los niveles de ULBP detectables en la célula NK (Figura 12B, C); y 3) hay ligandos que se encuentran libres, ya que pueden ser reconocidos por otras células NK (Figura 26). Pese a que todos estos argumentos indican que los ULBP transferidos se encuentran libres y próximos al receptor en la membrana de la célula NK, se observan niveles muy bajos cuando la transferencia de ULBP se analiza con la construcción NKG2D-Fc. No obstante, la comparación cuantitativa es compleja, ya que la afinidad de los anticuerpos monoclonales por los ULBP es mayor que la de NKG2D-Fc (Figura 24). Sin embargo, no se puede descartar totalmente que pueda haber otros ligandos que interaccionen con NKG2D en la membrana de la célula NK. Por ejemplo, se ha descrito que este tipo de interacción en cis podría ocurrir con complejos MHC que se transfieren desde APCs a linfocitos T murinos y permanecen unidos al TCR activando las rutas de señalización (Osborne y Wetzel, 2012).

Las **consecuencias funcionales** derivadas de la transferencia de proteínas suelen asociarse a la naturaleza de la proteína transferida, de tal manera que ligandos inhibidores adquiridos pueden inhibir a otras células, y el efecto contrario se encuentra si se trata de ligandos activadores. En el fenómeno aquí descrito, las células NK que adquieren ULBP aumentan su susceptibilidad de ser lisadas por otras células NK (Figura 26), convirtiéndose en nuevas células diana. La lisis de estas células explicaría algunos resultados como la disminución del porcentaje de células NK positivas para ULBP a tiempos largos (Figura 25A), o la bajada temprana de la intensidad de ULBP tras los co-cultivos (Figura 25B), la cual puede deberse a una eliminación de las células NK que tengan más ULBP en su membrana. En otros estudios, la transferencia de NKG2D-L también implica consecuencias funcionales: por ejemplo, las células NK que adquieren MICB reducen su actividad citolítica (Roda-Navarro et al., 2006); McCann y colaboradores describieron que cuándo MICA se transfiere a las células NK, éstas provocan la disminución de los niveles de NKG2D en otras células NK, así como su respuesta citotóxica (McCann et al., 2007), y en ratones, las células NK que adquieren NKG2D-L en su superficie se convierten en células diana frente a otras células NK *in vitro* e *in vivo*, y, además, esta respuesta también depende de la interacción con NKG2D (Nakamura et al., 2013a). Nakamura y colaboradores denominaron “fratricidio” a la respuesta citotóxica de las células NK hacia otras células NK que contienen NKG2D-L (Nakamura et al., 2013b), y este fenómeno podría constituir un mecanismo de evasión de células tumorales, provocando la muerte de células NK, o un mecanismo de homeostasis de la respuesta inmunológica, haciendo desaparecer células NK activadas. Este efecto también se observó en linfocitos T citotóxicos que adquirirían complejos MHC, y podían ser lisados por la acción de otros linfocitos (Huang et al., 1999), y en linfocitos T que adquirirían MICA, cuando se enfrentaban a células NK (Domaica et al., 2009).

Una vez que la célula NK ha adquirido el ULBP, no sólo se convierte en diana potencial para otras células NK, sino que, además, vuelve a transferir el ligando (Figura 27). Este mecanismo explica otros datos como es el aumento en el porcentaje de células NK ULBP positivas tras separarlas de las células diana (Figura 25A), o la estabilidad de la intensidad de ULBP incluso después de 24 horas de los co-cultivos (Figura 25B), demostrando la redistribución de los ligandos entre las células NK. Esta retransferencia ya ha sido descrita en monocitos que podían adquirir, por trogocitosis, fragmentos de membrana de diferentes células tumorales y, posteriormente, transferirlo de nuevo a otras células del sistema inmunitario, siendo denominada como “trogocitosis múltiple en serie” (Alegre et al., 2010). Aunque en esta tesis no se ha estudiado el mecanismo implicado en la retransferencia de los ligandos a otras células NK, sería de esperar que requiera el reconocimiento a través del receptor, así como la formación de una sinapsis citotóxica.

3. Efecto de vemurafenib en los ligandos de NKG2D en melanoma

Los datos mostrados en este trabajo demuestran que el tratamiento con vemurafenib induce una disminución de ligandos de NKG2D y DNAM-1 y un aumento de MHC-I en células metastásicas de melanoma que presentan la mutación BRAF^{V600E}. La variación en la expresión de estas proteínas se relaciona con una disminución en la actividad citotóxica de las células NK frente a las células mutantes tratadas con vemurafenib. Se demuestra, además, que esta inhibición de la respuesta de las células NK se revierte con el inhibidor de desacetilasas de histonas, butirato sódico, el cual es capaz de aumentar los niveles de los NKG2D-L. Además de afectar a los niveles superficiales de los NKG2D-L, vemurafenib también provoca una variación similar en la cantidad de MICA que se recluta a exosomas y en la liberación de ULBP2 soluble.

El **efecto más sorprendente** del tratamiento con vemurafenib de líneas metastásicas de melanoma mutadas en BRAF es la reducción en los niveles de MICA, ULBP3 y CD155, y el aumento de MHC-I, mientras que se observa el efecto contrario en las células no mutantes. Sin embargo, otro ligando de DNAM-1, CD112, no presenta variaciones, y el NKG2D-L, ULBP2, sólo lo hace en la línea Ma-Mel-86f (Figura 30). La cinética de los cambios en MICA parece estar ligada a los efectos en proliferación (Figura 33 y 32), ya que, por ejemplo, en la línea Ma-Mel-55 los efectos en proliferación a las 24 horas de tratamiento coinciden con la reducción en sus niveles de MICA. ¿Cuál podría ser el mecanismo responsable que relaciona la proliferación con la regulación de los NKG2D-L? Venkatamaran y colaboradores relacionaron la regulación de la expresión de NKG2D-L con la proliferación celular (Venkataraman et al., 2007). En concreto, la expresión del ligando murino RAE-1 ϵ , puede regularse por el factor de transcripción E2F (factor E2), implicado en regular la entrada en ciclo celular (Jung et al., 2012). Además, se ha visto que E2F tiene un papel importante en la progresión tumoral en melanoma (Alla et al., 2010). De esta forma, el efecto anti-proliferativo de vemurafenib podría estar relacionado con la disminución de los niveles de los NKG2D-L debidos al tratamiento. Otro aspecto a tener en cuenta es que se ha asociado el bloqueo de la ruta de las MAPK, en concreto de MEK, con una reducción en los NKG2D-L, en el contexto de su sobreexpresión mediada por Ras (Liu et al., 2012). Este dato demuestra nuevamente que existe una conexión entre la ruta de las MAPK con la expresión de los NKG2D-L. Así, la reducción en los niveles de los NKG2D-L en líneas mutantes, pero no en las no mutantes, puede deberse al bloqueo de la ruta de las MAPK provocado por vemurafenib, además de poder estar relacionado con su efecto anti-proliferativo. Además, ambas vías podrían estar relacionadas ya que se conoce que la ruta de las MAPK también está implicada en proliferación.

Una observación curiosa de los resultados presentados en esta tesis es que vemurafenib tiene un efecto muy similar en la expresión de NKG2D-L y en el ligando de DNAM-1, CD155. Como se describió en la introducción, la regulación de los NKG2D-L también está relacionada con señales de

daño al ADN (Gasser et al., 2005) pero, además, Soriani y colaboradores describieron que el estrés genotóxico provocado por agentes quimioterapéuticos aumenta la expresión de NKG2D-L y CD155 en células de mieloma múltiple. Esta regulación depende de la actividad ATM (del inglés, *ataxia-telangiectasia mutated*) y ATR (del inglés, *ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein*) (Soriani et al., 2009), y se encuentra regulado a nivel transcripcional por E2F1 (Soriani et al., 2014). El factor de transcripción E2F1, podría ser el vínculo que relacione la expresión de NKG2D-L y CD155 bajo el tratamiento con vemurafenib, implicado en mecanismos de daño al ADN y proliferación celular. Además, recientemente también se ha publicado que agentes que provocan hiperploidía celular, inducen un aumento de NKG2D-L y CD155 en las células que son hiperploides, siendo, en el caso de MICA, dependiente de ATM (Acebes-Huerta et al., 2016).

Junto al descenso en ligandos activadores de células NK, también se observó que el tratamiento con vemurafenib en las líneas de melanoma mutantes para BRAF provoca un aumento en el ligando inhibidor MHC-I, y una disminución en la línea no mutante. El aumento en MHC-I inducido por vemurafenib, también se ha descrito en células de melanoma antes de hacerlas resistentes al fármaco (Sottile et al., 2016). Además, se ha publicado que el tratamiento con vemurafenib puede inducir la expresión de MHC-I a través de IFN α 2b e IFN γ (Sapkota et al., 2013).

Además de observar el efecto de vemurafenib en ligandos de células NK, también se confirmó el **efecto anti-proliferativo** en las líneas mutantes para *BRAF*, tanto en ensayos MTT, como en el análisis del índice celular medido mediante xCELLigence RTCATM (Figura 29A y 32). Sin embargo, los experimentos de muerte celular no relacionan el efecto en proliferación con una menor tasa de muerte celular (Figura 29B), observación que también ha sido descrita en modelos murinos (Hooijkaas et al., 2012). Además, en otro trabajo se ha descrito que, en células resistentes, vemurafenib ejerce efectos citostáticos, pero no citotóxicos (Søndergaard et al., 2010). Este argumento podría estar relacionado con la ausencia del efecto en la muerte celular de las células tratadas en este trabajo. Otra posibilidad para explicar los resultados de viabilidad en células tratadas con vemurafenib es que éste induzca muerte celular a tiempos más cortos y sea indetectable por citometría de flujo tras 48 horas de tratamiento, cuando las células muertas ya habrían desaparecido del cultivo. Otro dato relacionado con la viabilidad celular inducida por vemurafenib es el descenso en la curva del índice celular en algunas líneas (Figura 32). Este efecto podría asociarse con un menor número de células y, por lo tanto, una disminución en la viabilidad celular. En cambio, esta conclusión no sería objetiva ya que se trata de una medida indirecta y los cambios en la curva también pueden reflejar otros cambios que afecten a la impedancia. Por lo tanto, los datos presentados aquí demuestran que el tratamiento con vemurafenib durante 48 horas provoca una menor proliferación, aunque no permiten distinguir entre un efecto en viabilidad o en la actividad metabólica de las células.

La reducción en la expresión de ligandos activadores (NKG2D-L y CD155) y el aumento del ligando inhibidor, MHC-I, provocados por el tratamiento con vemurafenib en las células de melanoma BRAF^{V600E}, son responsables de un desequilibrio de señales, que se traduce en una menor **respuesta de las células NK** (Figura 36) (Figura 47). Un estudio que utilizaba diferentes líneas de melanoma encontró que CD155 y NKG2D-L, pertenecientes a la familia MIC, eran los ligandos activadores más expresados, y demostraba que el receptor NKG2D, está implicado en la respuesta de las células NK frente a células de melanoma (Casado et al., 2009), al igual que en otros sistemas tumorales. Otro trabajo describió que las células NK reconocen a las células de melanoma a través de los receptores NKp46 y DNAM-1 (Lakshmikanth et al., 2009). La necesidad de la cooperación de varios receptores es necesaria para la activación de las células NK frente a células de melanoma, y los datos presentados sugieren que tanto MHC-I, como CD155 y los NKG2D-L, pueden estar implicados en el reconocimiento de las células de melanoma utilizadas en estos ensayos, ya que la variación en sus niveles reducen la respuesta de las células NK. Sin embargo, es importante tener en cuenta que CD155, además de ser ligando de DNAM-1, también puede ser reconocido por los receptores inhibidores, TIGIT, con mayor afinidad (Stanietsky et al., 2009), y CD96 (Fuchs et al., 2004), el cual también se ha asociado con una inhibición de la respuesta de las células NK (Chan et al., 2014).

Los datos presentados en esta tesis demuestran que el tratamiento con vemurafenib en células NK no afecta a su actividad frente a células de melanoma (Figura 36B), demostrando que la reducción en la respuesta de las células NK se debe al efecto del fármaco en los ligandos de las células de melanoma. A pesar de que nuestros resultados parecen no afectar a la actividad de las células NK, datos procedentes de un modelo murino de melanoma indicaron que el efecto anti-metastásico observado con el tratamiento se debía al efecto sobre las células NK, y no sobre las células de melanoma (Ferrari de Andrade et al., 2014). Además, varios trabajos publicados estudian el efecto de vemurafenib en el número de células NK, así se ha descrito que: el número de células NK aumenta en sangre periférica en pacientes tratados con este fármaco (Schilling et al., 2014); cuando se analizan las células infiltradas en tumores de pacientes de melanoma se observa también un aumento en el número de células NK durante la respuesta al tratamiento con otro inhibidor de BRAF, dabrafenib, mientras que se reduce cuando la enfermedad progresa (Cooper et al., 2016). Si esta disminución en el número de células NK que se reclutan a las lesiones se suma con la menor actividad observada en este trabajo, se favorecería la evasión inmunitaria de las células de melanoma para su reconocimiento por parte de las células NK. Pese a que la mayoría de estudios sobre los mecanismos de resistencia se centran en procesos relacionados con las rutas de señalización y, en general, con la aparición de células resistentes a los fármacos, en este trabajo proponemos un nuevo mecanismo que implica a la respuesta de las células NK, en estadios previos a la resistencia al fármaco.

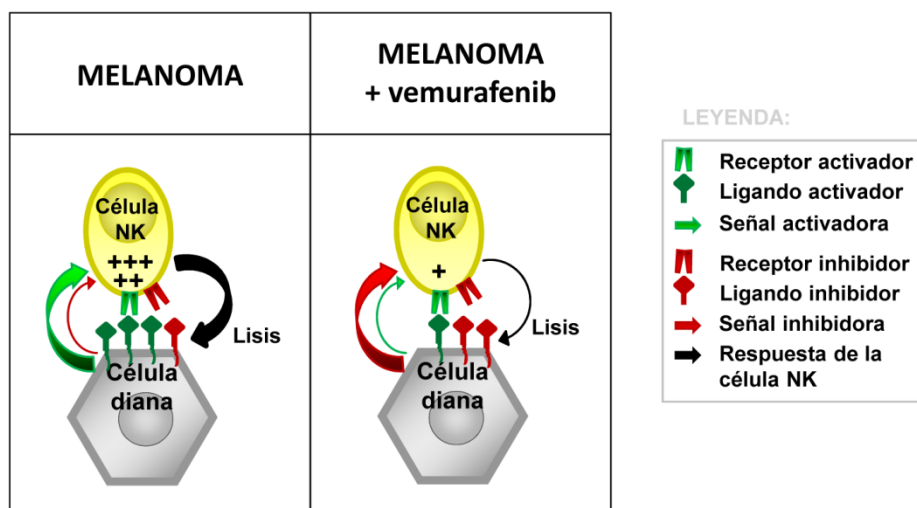


Figura 47. Ligandos de células NK en melanoma y efecto de vemurafenib. El tratamiento con vemurafenib en melanoma induce una reducción en la expresión de ligandos activadores y un aumento en ligandos inhibidores, lo cual se traduce en una menor respuesta de las células NK.

Debido a que en distintos trabajos se han descrito varios inhibidores de proteasoma y HDACi que son capaces de aumentar los niveles de NKG2D-L, nos planteamos si estos **tratamientos en combinación** con vemurafenib, podrían revertir la reducción de la respuesta NK. Por ejemplo, distintos HDACi aumentan los niveles de varios NKG2D-L (Valés-Gómez et al., 2008). El HDACi, ácido valproico, aumenta los niveles de NKG2D-L en células de hepatoma y en pacientes con leucemia mieloide aguda (Armeanu et al., 2005; Poggi et al., 2009) y se usa en clínica como inmunoterapia (West et al., 2014). Skov y colaboradores observaron que distintos HDACi, aumentan los niveles de MICA/B en células tumorales, siendo dependiente de un aumento en GSK3 (del inglés, *Glycogen synthase kinase 3*) (Skov et al., 2005). Sin embargo, existen datos contradictorios con respecto a este mecanismo, ya que también se ha visto que inhibidores de GSK3 aumentan los niveles de MICA en células de mieloma múltiple (Fionda et al., 2013). Otro HDACi, tricostatina A, aumenta los niveles de MICA y MICB en células de leucemia, gracias al aumento en la acetilación de la histona 3 y a una menor asociación de HDAC1 en sus promotores (Kato et al., 2007). Además, en otro artículo se relaciona el aumento en la expresión de MICA/B y ULBP2, provocado por el tratamiento con ácido valproico en células de mieloma, con una activación constitutiva de p-ERK (Wu et al., 2012), lo cual podría sugerir que éste sea el mecanismo implicado en el aumento de expresión de estos ligandos, volviendo a conectar la ruta de las MAPK con la regulación de los NKG2D-L.

Aquí, se utilizó MG132, como inhibidor de proteasoma, y butirato sódico, como HDACi. A pesar de que en otros sistemas celulares estaba descrito que MG132 aumentaba la expresión de NKG2D-L, en las células de melanoma estudiadas no provocó un aumento de los niveles de estas moléculas (Figura 37B). Sin embargo, este efecto sí se observó un aumento con el tratamiento con butirato. En

trabajos anteriores ya se comprobó que el tratamiento con MG132 no afectaba por igual a distintas líneas celulares (Valés-Gómez et al., 2008).

El tratamiento con butirato en las células de melanoma aumentaba la expresión en superficie de NKG2D-L, pero también de CD112 y MHC-I, permaneciendo invariable CD155, aunque estos cambios no son estadísticamente significativos en todas las líneas celulares (Figura 37C). Para utilizar este tratamiento en combinación con vemurafenib, se realizaron ensayos de 24 horas de tratamiento, ya que tras 48 horas el efecto tóxico era muy alto. Además en ensayos MTT se observó, que la actividad metabólica de las células tratadas con la combinación de inhibidores disminuye o se mantiene estable con respecto a la reducción debida al tratamiento con vemurafenib. Este efecto en la actividad metabólica apoyaría los efectos anti-tumorales de la combinación de inhibidores, en las líneas de melanoma con BRAF^{V600E}. Sin embargo, en la línea que no es mutante para *BRAF*, la actividad metabólica aumenta con la terapia combinada (Figura 38A). Este resultado es llamativo, ya que el efecto del butirato es independiente del estado mutacional de la célula.

La combinación de vemurafenib y butirato aumenta los niveles de los NKG2D-L, siendo más patente para ULBP2 (Figura 38B). Estos tratamientos también aumentaron los niveles de CD155 y no los de MHC-I (Figura 38C), a diferencia de lo observado en las titulaciones del tratamiento con butirato, lo cual podría deberse a que los tratamientos fueron más largos (24 horas) que para las titulaciones (16-18 horas). Mecanismos de respuesta de daño al ADN relacionan la regulación de los ligandos de NKG2D y de DNAM-1 (Carboni et al., 2014), sin embargo, el mecanismo responsable del aumento de ligandos de DNAM-1 por HDACi no se conoce todavía.

En general, los datos mostrados con la combinación de fármacos muestran un aumento en los niveles de ligandos activadores en las células de melanoma, lo cual se relaciona con una reversión en la actividad de las células NK (Figura 39). Otro trabajo utiliza la combinación de vemurafenib con un HDACi, SAHA, y muestra que líneas de melanoma resistentes a vemurafenib y a la acción lítica de linfocitos T citotóxicos y células NK, tras el tratamiento con SAHA, aumentan su sensibilidad a estas células mediante un mecanismo relacionado con apoptosis (Jazirehi et al., 2014). Los efectos del tratamiento con HDACi en melanoma se han relacionado con apoptosis, presentación antigénica, proliferación celular y parada del ciclo celular. Además, actualmente se están realizando ensayos clínicos con varios tratamientos con HDACi para pacientes con melanoma (revisado en Hornig et al., 2016).

El aumento de ligandos activadores en las células de melanoma tratadas con butirato, parece ser suficiente para recuperar la respuesta por parte de las células NK. En la actualidad encontrar combinaciones de tratamientos para mejorar los resultados de eficiencia de la terapias dirigidas es uno de los desafíos en la lucha contra el melanoma. Por ello, estos datos sugieren que el tratamiento con vemurafenib en combinación con butirato podría evitar la reducción de la actividad NK asociada a vemurafenib. Pese a que la idea de combinar inhibidores de BRAF^{V600E} con mecanismos que

aumenten la respuesta inmunológica ya ha sido explorada, los estudios se han centrado básicamente en la combinación con anticuerpos frente a PD1 como CTLA4, pero han resultado tener efectos tóxicos (Johnson et al., 2013; Ribas et al., 2013). En cambio, el mecanismo aquí propuesto se basa en una estrategia diferente que podría ser alternativa para el tratamiento de melanoma.

Además de los efectos observados a nivel celular, también se comprobó el efecto del tratamiento con vemurafenib en la **liberación de los NKG2D-L**. Los resultados obtenidos demuestran que las líneas de melanoma liberan exosomas, aunque la cantidad depende de la línea celular (Figura 41C). Estos exosomas contienen antígenos de melanoma como melanA y tirosinasa (Figura 40), aunque la expresión de estas proteínas en exosomas derivados de melanoma ya se había definido (Andre et al., 2002). Por primera vez, se muestra que los exosomas derivados de células de melanoma también contienen el NKG2D-L, MICA. En concreto, se encuentra la proteína MICA perteneciente al grupo A5.1 (Figura 42), tanto si la línea de melanoma era heterocigota u homocigota para este alelo, confirmando que es reclutada a exosomas de manera específica también en las líneas metastásicas de melanoma. La presencia de ligandos de DNAM-1 en exosomas no ha sido abordada en este trabajo, sin embargo, recientemente, se han encontrado ligandos de DNAM-1 en exosomas de cáncer de ovario, aunque no parecen encontrarse en la superficie de los exosomas y no modulan el receptor (Labani-Motlagh et al., 2016).

Una vez aislados los exosomas, se estudió la fracción soluble procedente de los cultivos celulares y se observó que las líneas de melanoma liberaban ULBP2 soluble. A pesar de que ULBP2 puede liberarse de ambas formas, incluido en exosomas o mediante corte proteolítico, es más común este último mecanismo. En cambio, cuando células que expresan ULBP2 se tratan con inhibidores de metaloproteasas, se observa un aumento de ULBP2 en la fracción de exosomas (Fernández-Messina et al., 2010). El modo de liberación de cada ligando va a depender de variaciones en la expresión, actividad o localización de metaloproteasas. También, Paschen y colaboradores demostraron que se podía encontrar MICA y ULBP2 soluble en sueros de pacientes de melanoma. Además, los niveles de ULBP2 soluble se relacionan con un peor pronóstico de los pacientes, aunque no se puede descartar que estas proteínas se encuentren en exosomas, ya que para el análisis no se eliminaba dicha fracción (Paschen et al., 2009). En los experimentos mostrados en esta tesis, no se detectó MICA en la fracción soluble, pese a que algunas de las líneas presentaban una copia del grupo A5, lo cual podría deberse a que no sea a un nivel suficiente para poder ser detectado. Tampoco se encontró ULBP3 soluble, y esto explicaría porque su liberación tiene una cinética más lenta que la de ULBP2 y suele liberarse en exosomas (Fernández-Messina et al., 2010).

El efecto del tratamiento con vemurafenib en los niveles de MICA en exosomas o ULBP2 soluble (Figuras 42 y 44) parece seguir un patrón muy similar al que ocurre a nivel celular (Figuras 30 y 31), por lo que podría ser consecuencia directa del efecto que tiene el fármaco en la expresión de estas

proteínas en las células. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, la liberación de los NKG2D-L tiene importantes consecuencias biológicas, como el bloqueo del receptor y su internalización, disminuyendo la capacidad citolítica de las células efectoras. El efecto de la variación de los niveles de los ligandos solubles liberados con vemurafenib sobre la actividad NK no ha sido abordado, aunque sería de esperar que una disminución de los ligandos solubles no estuviera ligada al bloqueo del receptor ni a la actividad de las células NK.

Finalmente, en este trabajo se comenzó un estudio de exosomas de suero de pacientes de melanoma bajo tratamiento con vemurafenib (Figura 43). Sin embargo, los resultados no son concluyentes debido a que se trataba a una cohorte muy pequeña. Sería interesante aumentar el número de pacientes y estudiar la composición de dichos exosomas para obtener más información sobre el papel de estos en la progresión de la enfermedad en estos pacientes y un posible uso como biomarcadores de la enfermedad o de la respuesta a vemurafenib.

En conjunto, en este trabajo se han estudiado diferentes mecanismos implicados en la expresión de los ligandos del receptor NKG2D, importantes en el control de la respuesta de las células NK. Desde la descripción de los mecanismos moleculares responsables de la liberación de MICA*008 en exosomas, hasta procesos celulares que conllevan la transferencia de ligandos a las células NK. Además, finalmente, se han englobado varios de estos aspectos en un modelo tumoral, como es el tratamiento con vemurafenib en melanoma. En los últimos años, se han desarrollado multitud de terapias relacionadas con el sistema inmunitario para el tratamiento del melanoma, sin embargo, la tasa de respuesta sigue sin tener niveles satisfactorios. En este trabajo, estudiamos uno de los tratamientos más exitosos y relacionamos la rápida aparición de resistencias con sus efectos en la expresión de NKG2D-L y la respuesta de las células NK. Finalmente, se estudió la reversión de este efecto gracias al tratamiento con butirato en combinación con vemurafenib, y se propone que la sinergia entre estos dos tipos de fármacos podrían tener un efecto beneficioso tanto sobre la proliferación de los tumores como sobre su vigilancia por el sistema inmunitario.

Todos estos datos muestran la complejidad del sistema NKG2D, tanto por la multitud de mecanismos implicados en la regulación de su expresión, como por la variabilidad de sus efectos en los diferentes NKG2D-L. Debido a la importancia que tiene este receptor en la respuesta inmunológica frente a tumores, este trabajo demuestra la relevancia del estudio detallado de este sistema por su utilidad en el desarrollo de estrategias antitumorales.

Conclusiones

1. El ligando de NKG2D, MICA*008, se ancla a la membrana mediante GPI. Este anclaje es necesario para su reclutamiento a exosomas y a regiones específicas de la membrana plasmática, conocidas como DRM.
2. Los ligandos de NKG2D anclados mediante GPI a la membrana plasmática, ULBP, se transfieren de la célula diana a la célula NK con características propias del fenómeno conocido como trogocitosis. Esta transferencia requiere la interacción con NKG2D y la activación citotóxica de las células NK.
3. La eficiencia de la transferencia depende de las características de cada ligando y de su abundancia en la célula diana.
4. Las células NK que adquieren ULBP se convierten en células diana para otras células NK autólogas que, a su vez, pueden adquirir estos ligandos.
5. El tratamiento con vemurafenib en células metastásicas de melanoma con la mutación V600E en BRAF, reduce la expresión de ligandos activadores de NKG2D y DNAM-1, y aumenta la expresión de moléculas de MHC de clase I. Estos efectos inducen una reducción en la capacidad citotóxica de las células NK frente a células de melanoma tratadas con vemurafenib.
6. La combinación de vemurafenib con el inhibidor de desacetilasas de histonas, butirato sódico, aumenta la expresión de los ligandos de NKG2D y DNAM-1 en la superficie de las células de melanoma, y es, así, capaz de recuperar la activación de las células NK frente a células de melanoma tratadas con vemurafenib,
7. El tratamiento con vemurafenib no afecta al tamaño, ni a la cantidad de exosomas producidos por las líneas de melanoma estudiadas. Sin embargo, el efecto de vemurafenib en la expresión de ligandos de NKG2D en la superficie celular se refleja en la cantidad de MICA en exosomas y ULBP2 soluble.

Bibliografía

- Acebes-Huerta, A., Lorenzo-Herrero, S., Folgueras, A.R., Huergo-Zapico, L., Lopez-Larrea, C., López-Soto, A., Gonzalez, S., 2016. Drug-induced hyperploidy stimulates an antitumor NK cell response mediated by NKG2D and DNAM-1 receptors. *Oncoimmunology* 5, e1074378. doi:10.1080/2162402X.2015.1074378
- Aguera-Gonzalez, S., Boutet, P., Reyburn, H.T., Vales-Gomez, M., 2009. Brief Residence at the Plasma Membrane of the MHC Class I-Related Chain B Is Due to Clathrin-Mediated Cholesterol-Dependent Endocytosis and Shedding. *J. Immunol.* 182, 4800–4808. doi:10.4049/jimmunol.0800713
- Agüera-González, S., Gross, C.C., Fernández-Messina, L., Ashiru, O., Estes, G., Hang, H.C., Reyburn, H.T., Long, E.O., Valés-Gómez, M., 2011. Palmitoylation of MICA, a ligand for NKG2D, mediates its recruitment to membrane microdomains and promotes its shedding. *Eur. J. Immunol.* 41, 3667–3676. doi:10.1002/eji.201141645
- Alegre, E., Howangyin, K.-Y., Favier, B., Baudhuin, J., Lesport, E., Daouya, M., Gonzalez, A., Carosella, E.D., Lemaout, J., 2010. Membrane redistributions through multi-intercellular exchanges and serial trogocytosis. *Cell Res.* 20, 1239–51. doi:10.1038/cr.2010.136
- Ali, T.H., Pisanti, S., Ciaglia, E., Mortarini, R., Anichini, A., Garofalo, C., Talerico, R., Santinami, M., Gulletta, E., Ietto, C., Galgani, M., Matarese, G., Bifulco, M., Ferrone, S., Colucci, F., Moretta, A., Kärre, K., Carbone, E., 2014. Enrichment of CD56(dim)KIR + CD57 + highly cytotoxic NK cells in tumour-infiltrated lymph nodes of melanoma patients. *Nat. Commun.* 5, 5639. doi:10.1038/ncomms6639
- Alla, V., Engelmann, D., Niemetz, A., Pahnke, J., Schmidt, A., Kunz, M., Emmrich, S., Steder, M., Koczan, D., Putzer, B.M., 2010. E2F1 in Melanoma Progression and Metastasis. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 102, 127–133. doi:10.1093/jnci/djp458
- Allez, M., Tieng, V., Nakazawa, A., Treton, X., Pacault, V., Dulphy, N., Caillat-Zucman, S., Paul, P., Gornet, J., Douay, C., Ravet, S., Tamouza, R., Charron, D., Lémann, M., Mayer, L., Toubert, A., 2007. CD4+NKG2D+ T Cells in Crohn's Disease Mediate Inflammatory and Cytotoxic Responses Through MICA Interactions. *Gastroenterology* 132, 2346–2358. doi:10.1053/j.gastro.2007.03.025
- Andre, F., Scharz, N.E.C., Movassagh, M., Flament, C., Pautier, P., Morice, P., Pomel, C., Lhomme, C., Escudier, B., Le Chevalier, T., Tursz, T., Amigorena, S., Raposo, G., Angevin, E., Zitvogel, L., 2002. Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet (London, England)* 360, 295–305. doi:10.1016/S0140-6736(02)09552-1
- Antoun, A., Jobson, S., Cook, M., O'Callaghan, C.A., Moss, P., Briggs, D.C., 2010. Single nucleotide polymorphism analysis of the NKG2D ligand cluster on the long arm of chromosome 6: Extensive polymorphisms and evidence of diversity between human populations. *Hum. Immunol.* 71, 610–20. doi:10.1016/j.humimm.2010.02.018
- Armeanu, S., Bitzer, M., Lauer, U.M., Venturelli, S., Pathil, A., Krusch, M., Kaiser, S., Jobst, J., Smirnow, I., Wagner, A., Steinle, A., Salih, H.R., 2005. Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate. *Cancer Res.* 65, 6321–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-4252
- Arnon, T.I., Lev, M., Katz, G., Chernobrov, Y., Porgador, A., Mandelboim, O., 2001. Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30. *Eur. J. Immunol.* 31, 2680–9. doi:10.1002/1521-4141(200109)31:9<2680::AID-IMMU2680>3.0.CO;2-A
- Ashiru, O., Bennett, N.J., Boyle, L.H., Thomas, M., Trowsdale, J., Wills, M.R., 2009. NKG2D ligand MICA is retained in the cis-Golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. *J. Virol.* 83, 12345–54. doi:10.1128/JVI.01175-09
- Ashiru, O., Boutet, P., Fernández-Messina, L., Agüera-González, S., Skepper, J.N., Valés-Gómez, M., Reyburn, H.T., 2010. Natural killer cell cytotoxicity is suppressed by exposure

- to the human NKG2D ligand MICA*008 that is shed by tumor cells in exosomes. *Cancer Res.* 70, 481–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1688
- Ashiru, O., López-Cobo, S., Fernández-Messina, L., Pontes-Quero, S., Pandolfi, R., Reyburn, H.T., Valés-Gómez, M., 2013. A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA* 008. *Biochem. ...* 454, 295–302.
- Bacon, L., Eagle, R.A., Meyer, M., Easom, N., Young, N.T., Trowsdale, J., 2004. Two human ULBP/RAET1 molecules with transmembrane regions are ligands for NKG2D. *J. Immunol.* 173, 1078–84.
- Bahram, S., Inoko, H., Shiina, T., Radosavljevic, M., 2005. MIC and other NKG2D ligands: from none to too many. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 505–509. doi:10.1016/j.coi.2005.07.016
- Balsamo, M., Vermi, W., Parodi, M., Pietra, G., Manzini, C., Queirolo, P., Lonardi, S., Augugliaro, R., Moretta, A., Facchetti, F., Moretta, L., Mingari, M.C., Vitale, M., 2012. Melanoma cells become resistant to NK-cell-mediated killing when exposed to NK-cell numbers compatible with NK-cell infiltration in the tumor. *Eur. J. Immunol.* 42, 1833–1842. doi:10.1002/eji.201142179
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., Spies, T., 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727–9.
- Becker, A., Thakur, B.K., Weiss, J.M., Kim, H.S., Peinado, H., Lyden, D., 2016. Extracellular Vesicles in Cancer: Cell-to-Cell Mediators of Metastasis. *Cancer Cell* 30, 836–848. doi:10.1016/j.ccell.2016.10.009
- Benito-Martin, A., Di Giannatale, A., Ceder, S., Peinado, H., 2015. The new deal: a potential role for secreted vesicles in innate immunity and tumor progression. *Front. Immunol.* 6, 66. doi:10.3389/fimmu.2015.00066
- Benson, D.M., Bakan, C.E., Mishra, A., Hofmeister, C.C., Efebera, Y., Becknell, B., Baiocchi, R.A., Zhang, J., Yu, J., Smith, M.K., Greenfield, C.N., Porcu, P., Devine, S.M., Rotem-Yehudar, R., Lozanski, G., Byrd, J.C., Caligiuri, M.A., 2010. The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect: a therapeutic target for CT-011, a novel monoclonal anti-PD-1 antibody. *Blood* 116, 2286–94. doi:10.1182/blood-2010-02-271874
- Berger, M.F., Hodis, E., Heffernan, T.P., Deribe, Y.L., Lawrence, M.S., Protopopov, A., Ivanova, E., Watson, I.R., Nickerson, E., Ghosh, P., Zhang, H., Zeid, R., Ren, X., Cibulskis, K., Sivachenko, A.Y., Wagle, N., Sucker, A., Sougnez, C., Onofrio, R., Ambrogio, L., Auclair, D., Fennell, T., Carter, S.L., Drier, Y., Stojanov, P., Singer, M.A., Voet, D., Jing, R., Saksena, G., Barretina, J., Ramos, A.H., Pugh, T.J., Stransky, N., Parkin, M., Winckler, W., Mahan, S., Ardlie, K., Baldwin, J., Wargo, J., Schadendorf, D., Meyerson, M., Gabriel, S.B., Golub, T.R., Wagner, S.N., Lander, E.S., Getz, G., Chin, L., Garraway, L.A., 2012. Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* 485, 502. doi:10.1038/nature11071
- Beum, P. V., Peek, E.M., Lindorfer, M.A., Beurskens, F.J., Engelberts, P.J., Parren, P.W.H.I., van de Winkel, J.G.J., Taylor, R.P., 2011. Loss of CD20 and Bound CD20 Antibody from Opsonized B Cells Occurs More Rapidly Because of Trogocytosis Mediated by Fc Receptor-Expressing Effector Cells Than Direct Internalization by the B Cells. *J. Immunol.* 187, 3438–3447. doi:10.4049/jimmunol.1101189
- Bollag, G., Hirth, P., Tsai, J., Zhang, J., Ibrahim, P.N., Cho, H., Spevak, W., Zhang, C., Zhang, Y., Habets, G., Burton, E.A., Wong, B., Tsang, G., West, B.L., Powell, B., Shelloe, R., Marimuthu, A., Nguyen, H., Zhang, K.Y.J., Artis, D.R., Schlessinger, J., Su, F., Higgins, B., Iyer, R., D'Andrea, K., Koehler, A., Stumm, M., Lin, P.S., Lee, R.J., Grippo, J., Puzanov, I., Kim, K.B., Ribas, A., McArthur, G.A., Sosman, J.A., Chapman, P.B., Flaherty, K.T., Xu, X., Nathanson, K.L., Nolop, K., 2010. Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 467, 596–9. doi:10.1038/nature09454

- Bollag, G., Tsai, J., Zhang, J., Zhang, C., Ibrahim, P., Nolop, K., Hirth, P., 2012. Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer. *Nat. Rev. Drug Discov.* 11, 873–886. doi:10.1038/nrd3847
- Boni, A., Cogdill, A.P., Dang, P., Udayakumar, D., Njauw, C.-N.J., Sloss, C.M., Ferrone, C.R., Flaherty, K.T., Lawrence, D.P., Fisher, D.E., Tsao, H., Wargo, J.A., 2010. Selective BRAFV600E inhibition enhances T-cell recognition of melanoma without affecting lymphocyte function. *Cancer Res.* 70, 5213–9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0118
- Bottino, C., Castriconi, R., Pende, D., Rivera, P., Nanni, M., Carnemolla, B., Cantoni, C., Grassi, J., Marcenaro, S., Reymond, N., Vitale, M., Moretta, L., Lopez, M., Moretta, A., 2003. Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule. *J. Exp. Med.* 198, 557–567. doi:10.1084/jem.20030788
- Bourbié-Vaudaine, S., Blanchard, N., Hivroz, C., Roméo, P.-H., 2006. Dendritic cells can turn CD4+ T lymphocytes into vascular endothelial growth factor-carrying cells by intercellular neuropilin-1 transfer. *J. Immunol.* 177, 1460–9.
- Boutet, P., Agüera-González, S., Atkinson, S., Pennington, C.J., Edwards, D.R., Murphy, G., Reyburn, H.T., Valés-Gómez, M., 2009. Cutting edge: the metalloproteinase ADAM17/TNF-alpha-converting enzyme regulates proteolytic shedding of the MHC class I-related chain B protein. *J. Immunol.* 182, 49–53.
- Brandt, C.S., Baratin, M., Yi, E.C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C.D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E., Levin, S.D., 2009. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKP30 in humans. *J. Exp. Med.* 206, 1495–1503. doi:10.1084/jem.20090681
- Brennan, K., McSharry, B.P., Keating, S., Petrasca, A., O'Reilly, V.P., Keane, J., Doherty, D.G., Gardiner, C.M., 2016. Human Natural Killer cell expression of ULBP2 is associated with a mature functional phenotype. *Hum. Immunol.* 77, 876–85. doi:10.1016/j.humimm.2016.06.018
- Brown, M.H., Boles, K., van der Merwe, P.A., Kumar, V., Mathew, P.A., Barclay, A.N., 1998. 2B4, the natural killer and T cell immunoglobulin superfamily surface protein, is a ligand for CD48. *J. Exp. Med.* 188, 2083–90.
- Brown, R., Kabani, K., Favaloro, J., Yang, S., Ho, P.J., Gibson, J., Fromm, P., Suen, H., Woodland, N., Nassif, N., Hart, D., Joshua, D., 2012. CD86+ or HLA-G+ can be transferred via trogocytosis from myeloma cells to T cells and are associated with poor prognosis. *Blood* 120, 2055–2063. doi:10.1182/blood-2012-03-416792
- Burgess, S.J., Maasho, K., Masilamani, M., Narayanan, S., Borrego, F., Coligan, J.E., 2008. The NKG2D receptor: immunobiology and clinical implications. *Immunol. Res.* 40, 18–34. doi:10.1007/s12026-007-0060-9
- Butler, J.E., Moore, M.B., Presnell, S.R., Chan, H.-W., Chalupny, N.J., Lutz, C.T., 2009. Proteasome regulation of ULBP1 transcription. *J. Immunol.* 182, 6600–9. doi:10.4049/jimmunol.0801214
- Caligiuri, M.A., 2008. Human natural killer cells. *Blood* 112, 461–469. doi:10.1182/blood-2007-09-077438
- Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., Pessino, A., Cilli, M., Conte, R., Pende, D., Ponte, M., Mikaelsson, M.S., Moretta, L., Biassoni, R., 1998. p49, a putative HLA class I-specific inhibitory NK receptor belonging to the immunoglobulin superfamily. *Eur. J. Immunol.* 28, 1980–90. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199806)28:06<1980::AID-IMMU1980>3.0.CO;2-F
- Cao, W., Xi, X., Hao, Z., Li, W., Kong, Y., Cui, L., Ma, C., Ba, D., He, W., 2007. RAET1E2, a Soluble Isoform of the UL16-binding Protein RAET1E Produced by Tumor Cells, Inhibits

- NKG2D-mediated NK Cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* 282, 18922–18928. doi:10.1074/jbc.M702504200
- Capraru, D., Müller, A., Csernok, E., Gross, W.L., Holl-Ulrich, K., Northfield, J., Klenerman, P., Herlyn, K., Holle, J., Gottschlich, S., Voswinkel, J., Spies, T., Fagin, U., Jabs, W.J., Lamprecht, P., 2008. Expansion of circulating NKG2D+ effector memory T-cells and expression of NKG2D-ligand MIC in granulomatous lesions in Wegener's granulomatosis. *Clin. Immunol.* 127, 144–150. doi:10.1016/j.clim.2007.12.004
- Carlin, L.M., Eleme, K., McCann, F.E., Davis, D.M., 2001. Intercellular transfer and supramolecular organization of human leukocyte antigen C at inhibitory natural killer cell immune synapses. *J. Exp. Med.* 194, 1507–17.
- Carlsten, M., Korde, N., Kotecha, R., Reger, R., Bor, S., Kazandjian, D., Landgren, O., Childs, R.W., 2016. Checkpoint Inhibition of KIR2D with the Monoclonal Antibody IPH2101 Induces Contraction and Hyporesponsiveness of NK Cells in Patients with Myeloma. *Clin. Cancer Res.* 22, 5211–5222. doi:10.1158/1078-0432.CCR-16-1108
- Carretero, M., Cantoni, C., Bellón, T., Bottino, C., Biassoni, R., Rodríguez, A., Pérez-Villar, J.J., Moretta, L., Moretta, A., López-Botet, M., 1997. The CD94 and NKG2-A C-type lectins covalently assemble to form a natural killer cell inhibitory receptor for HLA class I molecules. *Eur. J. Immunol.* 27, 563–7. doi:10.1002/eji.1830270230
- Casado, J.G., Pawelec, G., Morgado, S., Sanchez-Correa, B., Delgado, E., Gayoso, I., Duran, E., Solana, R., Tarazona, R., 2009. Expression of adhesion molecules and ligands for activating and costimulatory receptors involved in cell-mediated cytotoxicity in a large panel of human melanoma cell lines. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 1517–26. doi:10.1007/s00262-009-0682-y
- Caumartin, J., Favier, B., Daouya, M., Guillard, C., Moreau, P., Carosella, E.D., LeMaout, J., 2007. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *EMBO J.* 26, 1423–33. doi:10.1038/sj.emboj.7601570
- Carboni, C., Fionda, C., Soriani, A., Zingoni, A., Doria, M., Cippitelli, M., Santoni, A., 2014. The DNA Damage Response: A Common Pathway in the Regulation of NKG2D and DNAM-1 Ligand Expression in Normal, Infected, and Cancer Cells. *Front. Immunol.* 4, 508. doi:10.3389/fimmu.2013.00508
- Cerwenka, A., Lanier, L.L., 2001. Natural killer cells, viruses and cancer. *Nat. Rev. Immunol.* 1, 41–49. doi:10.1038/35095564
- Chalupny, N.J., Sutherland, C.L., Lawrence, W.A., Rein-Weston, A., Cosman, D., 2003. ULBP4 is a novel ligand for human NKG2D. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 305, 129–35.
- Chan, C.J., Martinet, L., Gilfillan, S., Souza-Fonseca-Guimaraes, F., Chow, M.T., Town, L., Ritchie, D.S., Colonna, M., Andrews, D.M., Smyth, M.J., 2014. The receptors CD96 and CD226 oppose each other in the regulation of natural killer cell functions. *Nat. Immunol.* 15, 431–438. doi:10.1038/ni.2850
- Cho, F.-N., Chang, T.-H., Shu, C.-W., Ko, M.-C., Liao, S.-K., Wu, K.-H., Yu, M.-S., Lin, S.-J., Hong, Y.-C., Chen, C.-H., Hung, C.-H., Chang, Y.-H., 2014. Enhanced Cytotoxicity of Natural Killer Cells following the Acquisition of Chimeric Antigen Receptors through Trogocytosis. *PLoS One* 9, e109352. doi:10.1371/journal.pone.0109352
- Coca, S., Perez-Piqueras, J., Martinez, D., Colmenarejo, A., Saez, M.A., Vallejo, C., Martos, J.A., Moreno, M., 1997. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 79, 2320–8.
- Colonna, M., Samaridis, J., 1995. Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells. *Science* 268, 405–8.
- Cooper, M.A., Fehniger, T.A., Caligiuri, M.A., 2001. The biology of human natural killer-cell

- subsets. *Trends Immunol.* 22, 633–40.
- Cooper, Z.A., Reuben, A., Spencer, C.N., Prieto, P.A., Austin-Breneman, J.L., Jiang, H., Haymaker, C., Gopalakrishnan, V., Tetzlaff, M.T., Frederick, D.T., Sullivan, R.J., Amaria, R.N., Patel, S.P., Hwu, P., Woodman, S.E., Glitza, I.C., Diab, A., Vence, L.M., Rodriguez-Canales, J., Parra, E.R., Wistuba, I.I., Coussens, L.M., Sharpe, A.H., Flaherty, K.T., Gershenwald, J.E., Chin, L., Davies, M.A., Clise-Dwyer, K., Allison, J.P., Sharma, P., Wargo, J.A., 2016. Distinct clinical patterns and immune infiltrates are observed at time of progression on targeted therapy versus immune checkpoint blockade for melanoma. *Oncoimmunology* 5, e1136044. doi:10.1080/2162402X.2015.1136044
- Cosman, D., Müllberg, J., Sutherland, C.L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M., Chalupny, N.J., 2001. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 14, 123–33.
- Daubeuf, S., Aucher, A., Bordier, C., Salles, A., Serre, L., Gaibelet, G., Faye, J.-C., Favre, G., Joly, E., Hudrisier, D., 2010a. Preferential transfer of certain plasma membrane proteins onto T and B cells by trogocytosis. *PLoS One* 5, e8716. doi:10.1371/journal.pone.0008716
- Daubeuf, S., Lindorfer, M.A., Taylor, R.P., Joly, E., Hudrisier, D., 2010b. The direction of plasma membrane exchange between lymphocytes and accessory cells by trogocytosis is influenced by the nature of the accessory cell. *J. Immunol.* 184, 1897–908. doi:10.4049/jimmunol.0901570
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B.A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J.W.C., Leung, S.Y., Yuen, S.T., Weber, B.L., Seigler, H.F., Darrow, T.L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C.J., Wooster, R., Stratton, M.R., Futreal, P.A., 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417, 949–54. doi:10.1038/nature00766
- Davis, D.M., 2007. Intercellular transfer of cell-surface proteins is common and can affect many stages of an immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 238–43. doi:10.1038/nri2020
- Dhainaut, M., Moser, M., 2014. Regulation of Immune Reactivity by Intercellular Transfer. *Front. Immunol.* 5, 112. doi:10.3389/fimmu.2014.00112
- Domaica, C.I., Fuertes, M.B., Rossi, L.E., Girart, M. V, Ávila, D.E., Rabinovich, G.A., Zwirner, N.W., 2009. Tumour-experienced T cells promote NK cell activity through trogocytosis of NKG2D and NKP46 ligands. *EMBO Rep.* 10, 908–915. doi:10.1038/embor.2009.92
- Dobrovina, E.S., Dobrovin, M.M., Vider, E., Sisson, R.B., O'Reilly, R.J., Dupont, B., Vyas, Y.M., 2003. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J. Immunol.* 171, 6891–9.
- Eagle, R.A., Flack, G., Warford, A., Martínez-Borra, J., Jafferji, I., Traherne, J.A., Ohashi, M., Boyle, L.H., Barrow, A.D., Caillat-Zucman, S., Young, N.T., Trowsdale, J., 2009a. Cellular Expression, Trafficking, and Function of Two Isoforms of Human ULBP5/RAET1G. *PLoS One* 4, e4503. doi:10.1371/journal.pone.0004503
- Eagle, R.A., Traherne, J.A., Hair, J.R., Jafferji, I., Trowsdale, J., 2009b. ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand. *Eur. J. Immunol.* 39, 3207–3216. doi:10.1002/eji.200939502
- Eisenberg, G., Uzana, R., Pato, A., Frankenburg, S., Merims, S., Yefenof, E., Ferrone, S., Peretz, T., Machlenkin, A., Lotem, M., 2013. Imprinting of Lymphocytes with Melanoma Antigens Acquired by Trogocytosis Facilitates Identification of Tumor-Reactive T Cells. *J. Immunol.*

- 190, 5856–5865. doi:10.4049/jimmunol.1202879
- Eriksson, M., Leitz, G., Fällman, E., Axner, O., Ryan, J.C., Nakamura, M.C., Sentman, C.L., 1999. Inhibitory receptors alter natural killer cell interactions with target cells yet allow simultaneous killing of susceptible targets. *J. Exp. Med.* 190, 1005–12.
- Eroglu, Z., Ribas, A., 2016. Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 8, 48–56. doi:10.1177/1758834015616934
- Falchook, G.S., Long, G. V, Kurzrock, R., Kim, K.B., Arkenau, T.H., Brown, M.P., Hamid, O., Infante, J.R., Millward, M., Pavlick, A.C., O'Day, S.J., Blackman, S.C., Curtis, C.M., Lebowitz, P., Ma, B., Ouellet, D., Kefford, R.F., 2012. Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial. *Lancet (London, England)* 379, 1893–901. doi:10.1016/S0140-6736(12)60398-5
- Farag, S.S., Caligiuri, M.A., 2006. Human natural killer cell development and biology. *Blood Rev.* 20, 123–37. doi:10.1016/j.blre.2005.10.001
- Fernandez-Messina, L., Ashiru, O., Aguera-Gonzalez, S., Reyburn, H.T., Vales-Gomez, M., 2011. The human NKG2D ligand ULBP2 can be expressed at the cell surface with or without a GPI anchor and both forms can activate NK cells. *J. Cell Sci.* 124, 321–327. doi:10.1242/jcs.076042
- Fernández-Messina, L., Ashiru, O., Boutet, P., Agüera-González, S., Skepper, J.N., Reyburn, H.T., Valés-Gómez, M., 2010. Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *J. Biol. Chem.* 285, 8543–51. doi:10.1074/jbc.M109.045906
- Fernández-Messina, L., Reyburn, H.T., Valés-Gómez, M., 2016. A short half-life of ULBP1 at the cell surface due to internalization and proteosomal degradation. *Immunol. Cell Biol.* 94, 479–85. doi:10.1038/icb.2016.2
- Fernández-Messina, L., Reyburn, H.T., Valés-Gómez, M., 2012. Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. *Front. Immunol.* 3, 299. doi:10.3389/fimmu.2012.00299
- Fernandez, N.C., Lozier, A., Flament, C., Ricciardi-Castagnoli, P., Bellet, D., Suter, M., Perricaudet, M., Tursz, T., Maraskovsky, E., Zitvogel, L., 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* 5, 405–11. doi:10.1038/7403
- Ferrari de Andrade, L., Ngiow, S.F., Stannard, K., Rusakiewicz, S., Kalimutho, M., Khanna, K.K., Tey, S.-K., Takeda, K., Zitvogel, L., Martinet, L., Smyth, M.J., 2014. Natural killer cells are essential for the ability of BRAF inhibitors to control BRAFV600E-mutant metastatic melanoma. *Cancer Res.* 74, 7298–308. doi:10.1158/0008-5472.CAN-14-1339
- Fionda, C., Malgarini, G., Soriani, A., Zingoni, A., Cecere, F., Iannitto, M.L., Ricciardi, M.R., Federico, V., Petrucci, M.T., Santoni, A., Cippitelli, M., 2013. Inhibition of Glycogen Synthase Kinase-3 Increases NKG2D Ligand MICA Expression and Sensitivity to NK Cell-Mediated Cytotoxicity in Multiple Myeloma Cells: Role of STAT3. *J. Immunol.* 190, 6662–6672. doi:10.4049/jimmunol.1201426
- Fiskus, W., Mitsiades, N., 2016. B-Raf Inhibition in the Clinic: Present and Future. *Annu. Rev. Med.* 67, 29–43. doi:10.1146/annurev-med-090514-030732
- Flaherty, K.T., 2006. Chemotherapy and Targeted Therapy Combinations in Advanced Melanoma. *Clin. Cancer Res.* 12, 2366s–2370s. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2505
- Flaherty, K.T., Yasothan, U., Kirkpatrick, P., 2011. Vemurafenib. *Nat. Rev. Drug Discov.* 10, 811–812. doi:10.1038/nrd3579
- Franklin, C., Livingstone, E., Roesch, A., Schilling, B., Schadendorf, D., 2016. Immunotherapy

- in melanoma: Recent advances and future directions. *Eur. J. Surg. Oncol.* doi:10.1016/j.ejso.2016.07.145
- Frederick, D.T., Piris, A., Cogdill, A.P., Cooper, Z.A., Lezcano, C., Ferrone, C.R., Mitra, D., Boni, A., Newton, L.P., Liu, C., Peng, W., Sullivan, R.J., Lawrence, D.P., Hodi, F.S., Overwijk, W.W., Lizée, G., Murphy, G.F., Hwu, P., Flaherty, K.T., Fisher, D.E., Wargo, J.A., 2013. BRAF inhibition is associated with enhanced melanoma antigen expression and a more favorable tumor microenvironment in patients with metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* 19, 1225–31. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1630
- Friese, M.A., Wischhusen, J., Wick, W., Weiler, M., Eisele, G., Steinle, A., Weller, M., 2004. RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo. *Cancer Res.* 64, 7596–603. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1627
- Fuchs, A., Cella, M., Giurisato, E., Shaw, A.S., Colonna, M., 2004. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). *J. Immunol.* 172, 3994–8.
- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Picconi, O., Boyle, P., Melchi, C.F., 2005. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur. J. Cancer* 41, 45–60. doi:10.1016/j.ejca.2004.10.016
- Garbe, C., Leiter, U., 2009. Melanoma epidemiology and trends. *Clin. Dermatol.* 27, 3–9. doi:10.1016/j.clindermatol.2008.09.001
- Garrido, F., Algarra, I., García-Lora, A.M., 2010. The escape of cancer from T lymphocytes: immunoselection of MHC class I loss variants harboring structural-irreversible "hard" lesions. *Cancer Immunol. Immunother.* 59, 1601–6. doi:10.1007/s00262-010-0893-2
- Garrity, D., Call, M.E., Feng, J., Wucherpfennig, K.W., 2005. The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 7641–6. doi:10.1073/pnas.0502439102
- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J., Raulet, D.H., 2005. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436, 1186–1190. doi:10.1038/nature03884
- Gerosa, F., Baldani-Guerra, B., Nisii, C., Marchesini, V., Carra, G., Trinchieri, G., 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195, 327–33.
- Gray-Schopfer, V., Wellbrock, C., Marais, R., 2007. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 445, 851–857. doi:10.1038/nature05661
- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., Spies, T., 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 12445–12450. doi:10.1073/pnas.93.22.12445
- Groh, V., Bruhl, A., El-Gabalawy, H., Nelson, J.L., Spies, T., 2003. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 9452–7. doi:10.1073/pnas.1632807100
- Groh, V., Wu, J., Yee, C., Spies, T., 2002. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 419, 734–738. doi:10.1038/nature01112
- Helander, T.S., Timonen, T., 1998. Adhesion in NK cell function. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 230, 89–99.
- Herberman, R.B., Nunn, M.E., Holden, H.T., Lavrin, D.H., 1975. Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int. J. cancer* 16, 230–9.

- Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., Akerley, W., van den Eertwegh, A.J.M., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J.M., Linette, G.P., Hogg, D., Ottensmeier, C.H., Lebbé, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J.I., Wolchok, J.D., Weber, J.S., Tian, J., Yellin, M.J., Nichol, G.M., Hoos, A., Urba, W.J., 2010. Improved Survival with Ipilimumab in Patients with Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 363, 711–723. doi:10.1056/NEJMoa1003466
- Hooijkaas, A., Gadiot, J., Morrow, M., Stewart, R., Schumacher, T., Blank, C.U., 2012. Selective BRAF inhibition decreases tumor-resident lymphocyte frequencies in a mouse model of human melanoma. *Oncoimmunology* 1, 609–617. doi:10.4161/onci.20226
- Horng, T., Bezradica, J.S., Medzhitov, R., 2007. NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway. *Nat. Immunol.* 8, 1345–52. doi:10.1038/ni1524
- Hornig, E., Heppt, M. V., Graf, S.A., Ruzicka, T., Berking, C., 2016. Inhibition of histone deacetylases in melanoma—a perspective from bench to bedside. *Exp. Dermatol.* 25, 831–838. doi:10.1111/exd.13089
- Hoshino, A., Costa-Silva, B., Shen, T.-L., Rodrigues, G., Hashimoto, A., Tesic Mark, M., Molina, H., Kohsaka, S., Di Giannatale, A., Ceder, S., Singh, S., Williams, C., Soplod, N., Uryu, K., Pharmed, L., King, T., Bojmar, L., Davies, A.E., Ararso, Y., Zhang, T., Zhang, H., Hernandez, J., Weiss, J.M., Dumont-Cole, V.D., Kramer, K., Wexler, L.H., Narendran, A., Schwartz, G.K., Healey, J.H., Sandstrom, P., Jørgen Labori, K., Kure, E.H., Grandgenett, P.M., Hollingsworth, M.A., de Sousa, M., Kaur, S., Jain, M., Mallya, K., Batra, S.K., Jarnagin, W.R., Brady, M.S., Fodstad, O., Muller, V., Pantel, K., Minn, A.J., Bissell, M.J., Garcia, B.A., Kang, Y., Rajasekhar, V.K., Ghajar, C.M., Matei, I., Peinado, H., Bromberg, J., Lyden, D., 2015. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 527, 329–335. doi:10.1038/nature15756
- Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C., Bach, F.H., 1991. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J. Exp. Med.* 173, 1017–20.
- Huang, J.F., Yang, Y., Sepulveda, H., Shi, W., Hwang, I., Peterson, P.A., Jackson, M.R., Sprent, J., Cai, Z., 1999. TCR-Mediated internalization of peptide-MHC complexes acquired by T cells. *Science* 286, 952–4.
- Hudrisier, D., Riond, J., Mazarguil, H., Gairin, J.E., Joly, E., 2001. Cutting edge: CTLs rapidly capture membrane fragments from target cells in a TCR signaling-dependent manner. *J. Immunol.* 166, 3645–9.
- Huergo-Zapico, L., Acebes-Huerta, A., López-Soto, A., Villa-Álvarez, M., Gonzalez-Rodriguez, A.P., Gonzalez, S., 2014. Molecular Bases for the Regulation of NKG2D Ligands in Cancer. *Front. Immunol.* 5, 106. doi:10.3389/fimmu.2014.00106
- Hwang, I., Huang, J.F., Kishimoto, H., Brunmark, A., Peterson, P.A., Jackson, M.R., Surh, C.D., Cai, Z., Sprent, J., 2000. T cells can use either T cell receptor or CD28 receptors to absorb and internalize cell surface molecules derived from antigen-presenting cells. *J. Exp. Med.* 191, 1137–48.
- Ikawa, S., Fukui, M., Ueyama, Y., Tamaoki, N., Yamamoto, T., Toyoshima, K., 1988. B-raf, a new member of the raf family, is activated by DNA rearrangement. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2651–4.
- Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K., Nakachi, K., 2000. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet* 356, 1795–1799. doi:10.1016/S0140-6736(00)03231-1
- Inngjerdigen, M., Damaj, B., Maghazachi, A.A., 2001. Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells. *Blood* 97, 367–75.
- Ishigami, S., Natsugoe, S., Tokuda, K., Nakajo, A., Che, X., Iwashige, H., Aridome, K., Hokita,

- S., Aikou, T., 2000. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer* 88, 577–83.
- Ito, M., Maruyama, T., Saito, N., Koganei, S., Yamamoto, K., Matsumoto, N., 2006. Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 203, 289–95. doi:10.1084/jem.20051986
- Jazirehi, A.R., Nazarian, R., Torres-Collado, A.X., Economou, J.S., 2014. Aberrant apoptotic machinery confers melanoma dual resistance to BRAF(V600E) inhibitor and immune effector cells: immunosensitization by a histone deacetylase inhibitor. *Am. J. Clin. Exp. Immunol.* 3, 43–56.
- Jerant, A.F., Johnson, J.T., Sheridan, C.D., Caffrey, T.J., 2000. Early detection and treatment of skin cancer. *Am. Fam. Physician* 62, 357–68, 375–6, 381–2.
- Johnson, D.B., Wallender, E.K., Cohen, D.N., Likhari, S.S., Zwerner, J.P., Powers, J.G., Shinn, L., Kelley, M.C., Joseph, R.W., Sosman, J.A., 2013. Severe cutaneous and neurologic toxicity in melanoma patients during vemurafenib administration following anti-PD-1 therapy. *Cancer Immunol. Res.* 1, 373–7. doi:10.1158/2326-6066.CIR-13-0092
- Joly, E., Hudrisier, D., 2003. What is trogocytosis and what is its purpose? *Nat. Immunol.* 4, 815. doi:10.1038/ni0903-815
- Joseph, E.W., Pratilas, C.A., Poulikakos, P.I., Tadi, M., Wang, W., Taylor, B.S., Halilovic, E., Persaud, Y., Xing, F., Viale, A., Tsai, J., Chapman, P.B., Bollag, G., Solit, D.B., Rosen, N., 2010. The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 14903–8. doi:10.1073/pnas.1008990107
- Jung, H., Hsiung, B., Pestal, K., Procyk, E., Raulet, D.H., 2012. RAE-1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by E2F transcription factors, which control cell cycle entry. *J. Exp. Med.* 209, 2409–22. doi:10.1084/jem.20120565
- Kaiser, B.K., Yim, D., Chow, I.-T., Gonzalez, S., Dai, Z., Mann, H.H., Strong, R.K., Groh, V., Spies, T., 2007. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* 447, 482–486. doi:10.1038/nature05768
- Kammula, U.S., White, D.E., Rosenberg, S.A., 1998. Trends in the safety of high dose bolus interleukin-2 administration in patients with metastatic cancer. *Cancer* 83, 797–805.
- Kato, N., Tanaka, J., Sugita, J., Toubai, T., Miura, Y., Ibata, M., Syono, Y., Ota, S., Kondo, T., Asaka, M., Imamura, M., 2007. Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia* 21, 2103–2108. doi:10.1038/sj.leu.2404862
- Kiessling, R., Klein, E., Wigzell, H., 1975. „Natural” killer cells in the mouse. I. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.* 5, 112–117. doi:10.1002/eji.1830050208
- Kohlhapp, F.J., Kaufman, H.L., 2016. Molecular Pathways: Mechanism of Action for Talimogene Laherparepvec, a New Oncolytic Virus Immunotherapy. *Clin. Cancer Res.* 22, 1048–54. doi:10.1158/1078-0432.CCR-15-2667
- Konjević, G., Mirjacić Martinović, K., Jurisić, V., Babović, N., Spuzić, I., 2009. Biomarkers of suppressed natural killer (NK) cell function in metastatic melanoma: decreased NKG2D and increased CD158a receptors on CD3-CD16+ NK cells. *Biomarkers* 14, 258–70. doi:10.1080/13547500902814658
- Kono, M., Dunn, I.S., Durda, P.J., Butera, D., Rose, L.B., Haggerty, T.J., Benson, E.M., Kurnick, J.T., 2006. Role of the Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathway in the Regulation of Human Melanocytic Antigen Expression. *Mol. Cancer Res.* 4, 779–792.

doi:10.1158/1541-7786.MCR-06-0077

- Krzywinska, E., Allende-Vega, N., Cornillon, A., Vo, D.-N., Cayrefourcq, L., Panabieres, C., Vilches, C., Déchanet-Merville, J., Hicheri, Y., Rossi, J.-F., Cartron, G., Villalba, M., 2015. Identification of Anti-tumor Cells Carrying Natural Killer (NK) Cell Antigens in Patients With Hematological Cancers. *EBioMedicine* 2, 1364–1376. doi:10.1016/j.ebiom.2015.08.021
- Labani-Motlagh, A., Israelsson, P., Ottander, U., Lundin, E., Nagaev, I., Nagaeva, O., Dehlin, E., Baranov, V., Mincheva-Nilsson, L., 2016. Differential expression of ligands for NKG2D and DNAM-1 receptors by epithelial ovarian cancer-derived exosomes and its influence on NK cell cytotoxicity. *Tumor Biol.* 37, 5455–5466. doi:10.1007/s13277-015-4313-2
- Lakshmikanth, T., Burke, S., Ali, T.H., Kimpfler, S., Ursini, F., Ruggeri, L., Capanni, M., Umansky, V., Paschen, A., Sucker, A., Pende, D., Groh, V., Biassoni, R., Höglund, P., Kato, M., Shibuya, K., Schadendorf, D., Anichini, A., Ferrone, S., Velardi, A., Kärre, K., Shibuya, A., Carbone, E., Colucci, F., 2009. NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo. *J. Clin. Invest.* 119, 1251–63. doi:10.1172/JCI36022
- Lanier, L.L., 2008. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* 9, 495–502. doi:10.1038/ni1581
- Larkin, J., Chiarion-Sileni, V., Gonzalez, R., Grob, J.J., Cowey, C.L., Lao, C.D., Schadendorf, D., Dummer, R., Smylie, M., Rutkowski, P., Ferrucci, P.F., Hill, A., Wagstaff, J., Carlino, M.S., Haanen, J.B., Maio, M., Marquez-Rodas, I., McArthur, G.A., Ascierto, P.A., Long, G. V., Callahan, M.K., Postow, M.A., Grossmann, K., Sznol, M., Dreno, B., Bastholt, L., Yang, A., Rollin, L.M., Horak, C., Hodi, F.S., Wolchok, J.D., 2015. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 373, 23–34. doi:10.1056/NEJMoa1504030
- Lee, N., Llano, M., Carretero, M., Ishitani, A., Navarro, F., López-Botet, M., Geraghty, D.E., 1998. HLA-E is a major ligand for the natural killer inhibitory receptor CD94/NKG2A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 5199–204.
- LeMaoult, J., Caumartin, J., Daouya, M., Switala, M., Rebmann, V., Arnulf, B., Carosella, E.D., 2015. Trogocytic intercellular membrane exchanges among hematological tumors. *J. Hematol. Oncol.* 8, 24. doi:10.1186/s13045-015-0114-8
- Lepin, E.J., Bastin, J.M., Allan, D.S., Roncador, G., Braud, V.M., Mason, D.Y., van der Merwe, P.A., McMichael, A.J., Bell, J.I., Powis, S.H., O’Callaghan, C.A., 2000. Functional characterization of HLA-F and binding of HLA-F tetramers to ILT2 and ILT4 receptors. *Eur. J. Immunol.* 30, 3552–61. doi:10.1002/1521-4141(200012)30:12<3552::AID-IMMU3552>3.0.CO;2-L
- Liu, X. V, Ho, S.S.W., Tan, J.J., Kamran, N., Gasser, S., 2012. Ras activation induces expression of Rhet1 family NK receptor ligands. *J. Immunol.* 189, 1826–34. doi:10.4049/jimmunol.1200965
- Ljunggren, H.G., Kärre, K., 1990. In search of the “missing self”: MHC molecules and NK cell recognition. *Immunol. Today* 11, 237–44.
- Logozzi, M., De Milito, A., Lugini, L., Borghi, M., Calabrò, L., Spada, M., Perdicchio, M., Marino, M.L., Federici, C., Iessi, E., Brambilla, D., Venturi, G., Lozupone, F., Santinami, M., Huber, V., Maio, M., Rivoltini, L., Fais, S., 2009. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS One* 4, e5219. doi:10.1371/journal.pone.0005219
- Long, E.O., Kim, H.S., Liu, D., Peterson, M.E., Rajagopalan, S., 2013. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 227–58. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-075005

- Long, G. V., Grob, J.-J., Nathan, P., Ribas, A., Robert, C., Schadendorf, D., Lane, S.R., Mak, C., Legenne, P., Flaherty, K.T., Davies, M.A., 2016. Factors predictive of response, disease progression, and overall survival after dabrafenib and trametinib combination treatment: a pooled analysis of individual patient data from randomised trials. *Lancet. Oncol.* 17, 1743–1754. doi:10.1016/S1470-2045(16)30578-2
- López-Cobo, S., Campos-Silva, C., Valés-Gómez, M., 2016. Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anchors and Metalloproteases: Their Roles in the Regulation of Exosome Composition and NKG2D-Mediated Immune Recognition. *Front. Cell Dev. Biol.* 4, 97. doi:10.3389/fcell.2016.00097
- Lou, Z., Jevremovic, D., Billadeau, D.D., Leibson, P.J., 2000. A balance between positive and negative signals in cytotoxic lymphocytes regulates the polarization of lipid rafts during the development of cell-mediated killing. *J. Exp. Med.* 191, 347–54.
- Maghazachi, A.A., 2010. Role of Chemokines in the Biology of Natural Killer Cells, in: *Current Topics in Microbiology and Immunology*. pp. 37–58. doi:10.1007/82_2010_20
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T.I., Bushkin, Y., Davis, D.M., Strominger, J.L., Yewdell, J.W., Porgador, A., 2001. Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* 409, 1055–1060. doi:10.1038/35059110
- Martín-Fontecha, A., Thomsen, L.L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A., Sallusto, F., 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for TH1 priming. *Nat. Immunol.* 5, 1260–1265. doi:10.1038/ni1138
- Martínez-Martín, N., Fernández-Arenas, E., Cemerski, S., Delgado, P., Turner, M., Heuser, J., Irvine, D.J., Huang, B., Bustelo, X.R., Shaw, A., Alarcón, B., 2011. T Cell Receptor Internalization from the Immunological Synapse Is Mediated by TC21 and RhoG GTPase-Dependent Phagocytosis. *Immunity* 35, 208–222. doi:10.1016/j.immuni.2011.06.003
- Martinez, E., Brzostowski, J.A., Long, E.O., Gross, C.C., 2011. Cutting edge: NKG2D-dependent cytotoxicity is controlled by ligand distribution in the target cell membrane. *J. Immunol.* 186, 5538–42. doi:10.4049/jimmunol.1002254
- McCann, F.E., Eissmann, P., Onfelt, B., Leung, R., Davis, D.M., 2007. The activating NKG2D ligand MHC class I-related chain A transfers from target cells to NK cells in a manner that allows functional consequences. *J. Immunol.* 178, 3418–26.
- McNerney, M.E., Kumar, V., 2006. The CD2 family of natural killer cell receptors. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 298, 91–120.
- Meinke, S., Watzl, C., 2013. NK cell cytotoxicity mediated by 2B4 and NTB-A is dependent on SAP acting downstream of receptor phosphorylation. *Front. Immunol.* 4. doi:10.3389/fimmu.2013.00003
- Mendez, R., Aptsiauri, N., Del Campo, A., Maleno, I., Cabrera, T., Ruiz-Cabello, F., Garrido, F., Garcia-Lora, A., 2009. HLA and melanoma: multiple alterations in HLA class I and II expression in human melanoma cell lines from ESTDAB cell bank. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 1507–15. doi:10.1007/s00262-009-0701-z
- Messaoudene, M., Fregni, G., Fourmentraux-Neves, E., Chanal, J., Maubec, E., Mazouz-Dorval, S., Couturaud, B., Girod, A., Sastre-Garau, X., Albert, S., Guédon, C., Deschamps, L., Mitilian, D., Cremer, I., Jacquelot, N., Rusakiewicz, S., Zitvogel, L., Avril, M.-F., Caignard, A., 2014. Mature cytotoxic CD56(bright)/CD16(+) natural killer cells can infiltrate lymph nodes adjacent to metastatic melanoma. *Cancer Res.* 74, 81–92. doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1303
- Miller, A.J., Mihm, M.C., 2006. Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 355, 51–65. doi:10.1056/NEJMra052166

- Mistry, A.R., O'Callaghan, C.A., 2007. Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology* 121, 439–447. doi:10.1111/j.1365-2567.2007.02652.x
- Mittelbrunn, M., Gutiérrez-Vázquez, C., Villarroya-Beltri, C., González, S., Sánchez-Cabo, F., González, M.Á., Bernad, A., Sánchez-Madrid, F., 2011. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat. Commun.* 2, 282. doi:10.1038/ncomms1285
- Moreau, P., Richardson, P.G., Cavo, M., Orlowski, R.Z., San Miguel, J.F., Palumbo, A., Harousseau, J.-L., 2012. Proteasome inhibitors in multiple myeloma: 10 years later. *Blood* 120, 947–59. doi:10.1182/blood-2012-04-403733
- Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C., Moretta, L., 2000. Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunol. Today* 21, 228–34.
- Morgado, S., Sanchez-Correa, B., Casado, J.G., Duran, E., Gayoso, I., Labella, F., Solana, R., Tarazona, R., 2011. NK Cell Recognition and Killing of Melanoma Cells Is Controlled by Multiple Activating Receptor-Ligand Interactions. *J. Innate Immun.* 3, 365–373. doi:10.1159/000328505
- Morvan, M.G., Lanier, L.L., 2015. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat. Rev. Cancer* 16, 7–19. doi:10.1038/nrc.2015.5
- Mostböck, S., Catalfamo, M., Tagaya, Y., Schlom, J., Sabzevari, H., 2007. Acquisition of antigen presentosome (APS), an MHC/costimulatory complex, is a checkpoint of memory T-cell homeostasis. *Blood* 109, 2488–95. doi:10.1182/blood-2006-09-047290
- Nagler, A., Lanier, L.L., Phillips, J.H., 1990. Constitutive expression of high affinity interleukin 2 receptors on human CD16-natural killer cells in vivo. *J. Exp. Med.* 171, 1527–33.
- Nakamura, K., Nakayama, M., Kawano, M., Amagai, R., Ishii, T., Harigae, H., Ogasawara, K., 2013a. Fratricide of natural killer cells dressed with tumor-derived NKG2D ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9421–6. doi:10.1073/pnas.1300140110
- Nakamura, K., Nakayama, M., Kawano, M., Ishii, T., Harigae, H., Ogasawara, K., 2013b. NK-cell fratricide: Dynamic crosstalk between NK and cancer cells. *Oncoimmunology* 2, e26529. doi:10.4161/onci.26529
- Nakayama, M., 2014. Antigen Presentation by MHC-Dressed Cells. *Front. Immunol.* 5, 672. doi:10.3389/fimmu.2014.00672
- Nausch, N., Cerwenka, A., 2008. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene* 27, 5944–5958. doi:10.1038/onc.2008.272
- Navarro, F., Llano, M., Bellón, T., Colonna, M., Geraghty, D.E., López-Botet, M., 1999. The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells. *Eur. J. Immunol.* 29, 277–83. doi:10.1002/(SICI)1521-4141(199901)29:01<277::AID-IMMU277>3.0.CO;2-4
- O'Brien, K., Rani, S., Corcoran, C., Wallace, R., Hughes, L., Friel, A.M., McDonnell, S., Crown, J., Radomski, M.W., O'Driscoll, L., 2013. Exosomes from triple-negative breast cancer cells can transfer phenotypic traits representing their cells of origin to secondary cells. *Eur. J. Cancer* 49, 1845–1859. doi:10.1016/j.ejca.2013.01.017
- Ohashi, M., Eagle, R.A., Trowsdale, J., 2010. Post-translational Modification of the NKG2D Ligand RAET1G Leads to Cell Surface Expression of a Glycosylphosphatidylinositol-linked Isoform. *J. Biol. Chem.* 285, 16408–16415. doi:10.1074/jbc.M109.077636
- Ojo, E., Wigzell, H., 1978. Natural killer cells may be the only cells in normal mouse lymphoid cell populations endowed with cytolytic ability for antibody-coated tumour target cells. *Scand. J. Immunol.* 7, 297–306.
- Onfelt, B., Nedvetzki, S., Yanagi, K., Davis, D.M., 2004. Cutting edge: Membrane nanotubes

- connect immune cells. *J. Immunol.* 173, 1511–3.
- Orange, J.S., Ballas, Z.K., 2006. Natural killer cells in human health and disease. *Clin. Immunol.* 118, 1–10. doi:10.1016/j.clim.2005.10.011
- Osborne, D.G., Wetzel, S.A., 2012. Trogocytosis results in sustained intracellular signaling in CD4(+) T cells. *J. Immunol.* 189, 4728–39. doi:10.4049/jimmunol.1201507
- Ota, M., Katsuyama, Y., Mizuki, N., Ando, H., Furihata, K., Ono, S., Pivetti-Pezzi, P., Tabbara, K.F., Palimeris, G.D., Nikbin, B., Davatchi, F., Chams, H., Geng, Z., Bahram, S., Inoko, H., 1997. Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. *Tissue Antigens* 49, 448–54.
- Page, D.B., Postow, M.A., Callahan, M.K., Allison, J.P., Wolchok, J.D., 2014. Immune Modulation in Cancer with Antibodies. *Annu. Rev. Med.* 65, 185–202. doi:10.1146/annurev-med-092012-112807
- Paladino, S., Lebreton, S., Zurzolo, C., 2015. Trafficking and Membrane Organization of GPI-Anchored Proteins in Health and Diseases. *Curr. Top. Membr.* 75, 269–303. doi:10.1016/bs.ctm.2015.03.006
- Paschen, A., Sucker, A., Hill, B., Moll, I., Zapatka, M., Nguyen, X.D., Sim, G.C., Gutmann, I., Hassel, J., Becker, J.C., Steinle, A., Schadendorf, D., Ugurel, S., 2009. Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. *Clin. Cancer Res.* 15, 5208–15. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-0886
- Patel, D.M., Arnold, P.Y., White, G.A., Nardella, J.P., Mannie, M.D., 1999. Class II MHC/peptide complexes are released from APC and are acquired by T cell responders during specific antigen recognition. *J. Immunol.* 163, 5201–10.
- Peinado, H., Alečković, M., Lavotshkin, S., Matei, I., Costa-Silva, B., Moreno-Bueno, G., Hergueta-Redondo, M., Williams, C., García-Santos, G., Ghajar, C.M., Nitadori-Hoshino, A., Hoffman, C., Badal, K., Garcia, B.A., Callahan, M.K., Yuan, J., Martins, V.R., Skog, J., Kaplan, R.N., Brady, M.S., Wolchok, J.D., Chapman, P.B., Kang, Y., Bromberg, J., Lyden, D., 2012. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* 18, 883–891. doi:10.1038/nm.2753
- Pende, D., Bottino, C., Castriconi, R., Cantoni, C., Marcenaro, S., Rivera, P., Spaggiari, G.M., Dondero, A., Carnemolla, B., Reymond, N., Mingari, M.C., Lopez, M., Moretta, L., Moretta, A., 2005. PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as ligands of the human DNAM-1 (CD226) activating receptor: involvement in tumor cell lysis. *Mol. Immunol.* 42, 463–469. doi:10.1016/j.molimm.2004.07.028
- Pérez-Villar, J.J., Melero, I., Navarro, F., Carretero, M., Bellón, T., Llano, M., Colonna, M., Geraghty, D.E., López-Botet, M., 1997. The CD94/NKG2-A inhibitory receptor complex is involved in natural killer cell-mediated recognition of cells expressing HLA-G1. *J. Immunol.* 158, 5736–43.
- Pham, T., Mero, P., Booth, J.W., 2011. Dynamics of Macrophage Trogocytosis of Rituximab-Coated B Cells. *PLoS One* 6, e14498. doi:10.1371/journal.pone.0014498
- Poggi, A., Catellani, S., Garuti, A., Pierri, I., Gobbi, M., Zocchi, M.R., 2009. Effective in vivo induction of NKG2D ligands in acute myeloid leukaemias by all-trans-retinoic acid or sodium valproate. *Leukemia* 23, 641–648. doi:10.1038/leu.2008.354
- Postow, M.A., Chesney, J., Pavlick, A.C., Robert, C., Grossmann, K., McDermott, D., Linette, G.P., Meyer, N., Giguere, J.K., Agarwala, S.S., Shaheen, M., Ernstoff, M.S., Minor, D., Salama, A.K., Taylor, M., Ott, P.A., Rollin, L.M., Horak, C., Gagnier, P., Wolchok, J.D., Hodi, F.S., 2015. Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma.

- N. Engl. J. Med. 372, 2006–2017. doi:10.1056/NEJMoa1414428
- Poulidakos, P.I., Zhang, C., Bollag, G., Shokat, K.M., Rosen, N., 2010. RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 464, 427–30. doi:10.1038/nature08902
- Rajagopalan, S., Fu, J., Long, E.O., 2001. Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells. *J. Immunol.* 167, 1877–81.
- Raposo, G., Stoorvogel, W., 2013. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J. Cell Biol.* 200, 373–383. doi:10.1083/jcb.201211138
- Ratnoff, W.D., Knez, J.J., Prince, G.M., Okada, H., Lachmann, P.J., Medof, M.E., 1992. Structural properties of the glycoplasmanylinositol anchor phospholipid of the complement membrane attack complex inhibitor CD59. *Clin. Exp. Immunol.* 87, 415–21.
- Raulet, D.H., 2003. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 781–790. doi:10.1038/nri1199
- Raulet, D.H., Gasser, S., Gowen, B.G., Deng, W., Jung, H., 2013. Regulation of Ligands for the NKG2D Activating Receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 31, 413–441. doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095951
- Rebmann, V., Wagner, S., Grosse-Wilde, H., 2007. HLA-G expression in malignant melanoma. *Semin. Cancer Biol.* 17, 422–429. doi:10.1016/j.semcancer.2007.06.010
- Ribas, A., Hodi, F.S., Callahan, M., Konto, C., Wolchok, J., 2013. Hepatotoxicity with combination of vemurafenib and ipilimumab. *N. Engl. J. Med.* 368, 1365–6. doi:10.1056/NEJMc1302338
- Riond, J., Elh mouzi, J., Hudrisier, D., Gairin, J.E., 2007. Capture of membrane components via trogocytosis occurs in vivo during both dendritic cells and target cells encounter by CD8(+) T cells. *Scand. J. Immunol.* 66, 441–50. doi:10.1111/j.1365-3083.2007.01996.x
- Robert, C., Schachter, J., Long, G. V., Arance, A., Grob, J.J., Mortier, L., Daud, A., Carlino, M.S., McNeil, C., Lotem, M., Larkin, J., Lorigan, P., Neyns, B., Blank, C.U., Hamid, O., Mateus, C., Shapira-Frommer, R., Kosh, M., Zhou, H., Ibrahim, N., Ebbinghaus, S., Ribas, A., KEYNOTE-006 investigators, 2015. Pembrolizumab versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 372, 2521–2532. doi:10.1056/NEJMoa1503093
- Robert, C., Thomas, L., Bondarenko, I., O'Day, S., Weber, J., Garbe, C., Lebbe, C., Baurain, J.-F., Testori, A., Grob, J.-J., Davidson, N., Richards, J., Maio, M., Hauschild, A., Miller, W.H., Gascon, P., Lotem, M., Harmanakaya, K., Ibrahim, R., Francis, S., Chen, T.-T., Humphrey, R., Hoos, A., Wolchok, J.D., 2011. Ipilimumab plus Dacarbazine for Previously Untreated Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 364, 2517–2526. doi:10.1056/NEJMoa1104621
- Roberts, W.L., Myher, J.J., Kuksis, A., Low, M.G., Rosenberry, T.L., 1988. Lipid analysis of the glycoinositol phospholipid membrane anchor of human erythrocyte acetylcholinesterase. Palmitoylation of inositol results in resistance to phosphatidylinositol-specific phospholipase C. *J. Biol. Chem.* 263, 18766–75.
- Robertson, M.J., 2002. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J. Leukoc. Biol.* 71, 173–83.
- Robertson, M.J., Ritz, J., 1990. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* 76, 2421–38.
- Roda-Navarro, P., Mittelbrunn, M., Ortega, M., Howie, D., Terhorst, C., Sánchez-Madrid, F., Fernández-Ruiz, E., 2004. Dynamic redistribution of the activating 2B4/SAP complex at the cytotoxic NK cell immune synapse. *J. Immunol.* 173, 3640–6.

- Roda-Navarro, P., Vales-Gomez, M., Chisholm, S.E., Reyburn, H.T., 2006. Transfer of NKG2D and MICB at the cytotoxic NK cell immune synapse correlates with a reduction in NK cell cytotoxic function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 11258–63. doi:10.1073/pnas.0600721103
- Romee, R., Schneider, S.E., Leong, J.W., Chase, J.M., Keppel, C.R., Sullivan, R.P., Cooper, M.A., Fehniger, T.A., 2012. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood* 120, 4751–4760. doi:10.1182/blood-2012-04-419283
- Romphruk, A. V, Naruse, T.K., Romphruk, A., Kawata, H., Puapairoj, C., Kulski, J.K., Leelayuwat, C., Inoko, H., 2001. Diversity of MICA (PERB11.1) and HLA haplotypes in Northeastern Thais. *Tissue Antigens* 58, 83–9.
- Rosenberg, S.A., Restifo, N.P., 2015. Adoptive cell transfer as personalized immunotherapy for human cancer. *Science* (80-.). 348, 62–68. doi:10.1126/science.aaa4967
- Rosenberg, S.A., Restifo, N.P., Yang, J.C., Morgan, R.A., Dudley, M.E., 2008. Adoptive cell transfer: a clinical path to effective cancer immunotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 8, 299–308. doi:10.1038/nrc2355
- Rossi, E.A., Goldenberg, D.M., Michel, R., Rossi, D.L., Wallace, D.J., Chang, C.-H., 2013. Trogocytosis of multiple B-cell surface markers by CD22 targeting with epratuzumab. *Blood* 122, 3020–3029. doi:10.1182/blood-2012-12-473744
- Sáez-Borderías, A., Gumá, M., Angulo, A., Bellosillo, B., Pende, D., López-Botet, M., 2006. Expression and function of NKG2D in CD4+ T cells specific for human cytomegalovirus. *Eur. J. Immunol.* 36, 3198–3206. doi:10.1002/eji.200636682
- Salih, H.R., Holdenrieder, S., Steinle, A., 2008. Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact. *Front. Biosci.* 13, 3448–56.
- Salih, H.R., Rammensee, H.-G., Steinle, A., 2002. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.* 169, 4098–102.
- Samuels, S., Ferns, D.M., Meijer, D., van Straalen, J.P., Buist, M.R., Zijlmans, H.J., Kenter, G.G., Jordanova, E.S., 2015. High levels of soluble MICA are significantly related to increased disease-free and disease-specific survival in patients with cervical adenocarcinoma. *Tissue Antigens* 85, 476–483. doi:10.1111/tan.12562
- Sapkota, B., Hill, C.E., Pollack, B.P., 2013. Vemurafenib enhances MHC induction in BRAF(V600E) homozygous melanoma cells. *Oncoimmunology* 2, e22890. doi:10.4161/onci.22890
- Schadendorf, D., Hodi, F.S., Robert, C., Weber, J.S., Margolin, K., Hamid, O., Patt, D., Chen, T.-T., Berman, D.M., Wolchok, J.D., 2015. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J. Clin. Oncol.* 33, 1889–1894. doi:10.1200/JCO.2014.56.2736
- Schilling, B., Sonderrmann, W., Zhao, F., Griewank, K.G., Livingstone, E., Sucker, A., Zelba, H., Weide, B., Trefzer, U., Wilhelm, T., Loquai, C., Berking, C., Hassel, J., Kahler, K.C., Utikal, J., Al Ghazal, P., Gutzmer, R., Goldinger, S.M., Zimmer, L., Paschen, A., Hillen, U., Schadendorf, D., DeCOG, 2014. Differential influence of vemurafenib and dabrafenib on patients' lymphocytes despite similar clinical efficacy in melanoma. *Ann. Oncol.* 25, 747–753. doi:10.1093/annonc/mdt587
- Schilling, B., Sucker, A., Griewank, K., Zhao, F., Weide, B., Görgens, A., Giebel, B., Schadendorf, D., Paschen, A., 2013. Vemurafenib reverses immunosuppression by myeloid derived suppressor cells. *Int. J. Cancer* 133, 1653–1663. doi:10.1002/ijc.28168
- Schwinn, N., Vokhminova, D., Sucker, A., Textor, S., Striegel, S., Moll, I., Nausch, N., Tuettenberg, J., Steinle, A., Cerwenka, A., Schadendorf, D., Paschen, A., 2009. Interferon- γ down-regulates NKG2D ligand expression and impairs the NKG2D-mediated cytotoxicity of

- MHC class I-deficient melanoma by natural killer cells. *Int. J. Cancer* 124, 1594–1604. doi:10.1002/ijc.24098
- Seidel, E., Le, V.T.K., Bar-On, Y., Tsukerman, P., Enk, J., Yamin, R., Stein, N., Schmiedel, D., Oiknine Djian, E., Weisblum, Y., Tirosh, B., Stastny, P., Wolf, D.G., Hengel, H., Mandelboim, O., 2015. Dynamic Co-evolution of Host and Pathogen: HCMV Downregulates the Prevalent Allele MICA*008 to Escape Elimination by NK Cells. *Cell Rep.* 10, 968–982. doi:10.1016/j.celrep.2015.01.029
- Serrano, A.E., Menares-Castillo, E., Garrido-Tapia, M., Ribeiro, C.H., Hernández, C.J., Mendoza-Naranjo, A., Gatica-Andrades, M., Valenzuela-Diaz, R., Zúñiga, R., López, M.N., Salazar-Onfray, F., Aguillón, J.-C., Molina, M.-C., 2011. Interleukin 10 decreases MICA expression on melanoma cell surface. *Immunol. Cell Biol.* 89, 447–57. doi:10.1038/icb.2010.100
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2016. Cancer statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* 66, 7–30. doi:10.3322/caac.21332
- Sivori, S., Carlomagno, S., Moretta, L., Moretta, A., 2006. Comparison of different CpG oligodeoxynucleotide classes for their capability to stimulate human NK cells. *Eur. J. Immunol.* 36, 961–967. doi:10.1002/eji.200535781
- Sjöström, A., Eriksson, M., Cerboni, C., Johansson, M.H., Sentman, C.L., Kärre, K., Höglund, P., 2001. Acquisition of external major histocompatibility complex class I molecules by natural killer cells expressing inhibitory Ly49 receptors. *J. Exp. Med.* 194, 1519–30.
- Skov, S., Pedersen, M.T., Andresen, L., Straten, P.T., Woetmann, A., Odum, N., 2005. Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B. *Cancer Res.* 65, 11136–45. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0599
- Smyth, M.J., Cretney, E., Kelly, J.M., Westwood, J.A., Street, S.E.A., Yagita, H., Takeda, K., Dommelen, S.L.H. van, Degli-Esposti, M.A., Hayakawa, Y., 2005. Activation of NK cell cytotoxicity. *Mol. Immunol.* 42, 501–510. doi:10.1016/j.molimm.2004.07.034
- Soengas, M.S., Lowe, S.W., 2003. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene* 22, 3138–3151. doi:10.1038/sj.onc.1206454
- Solit, D.B., Garraway, L.A., Pratilas, C.A., Sawai, A., Getz, G., Basso, A., Ye, Q., Lobo, J.M., She, Y., Osman, I., Golub, T.R., Sebolt-Leopold, J., Sellers, W.R., Rosen, N., 2006. BRAF mutation predicts sensitivity to MEK inhibition. *Nature* 439, 358–62. doi:10.1038/nature04304
- Somanchi, S.S., Somanchi, A., Cooper, L.J.N., Lee, D.A., 2012. Engineering lymph node homing of ex vivo-expanded human natural killer cells via trogocytosis of the chemokine receptor CCR7. *Blood* 119, 5164–5172. doi:10.1182/blood-2011-11-389924
- Søndergaard, J.N., Nazarian, R., Wang, Q., Guo, D., Hsueh, T., Mok, S., Sazegar, H., MacConaill, L.E., Barretina, J.G., Kehoe, S.M., Attar, N., von Eeuw, E., Zuckerman, J.E., Chmielowski, B., Comin-Anduix, B., Koya, R.C., Mischel, P.S., Lo, R.S., Ribas, A., 2010. Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAFV600E mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032. *J. Transl. Med.* 8, 39. doi:10.1186/1479-5876-8-39
- Soriani, A., Iannitto, M.L., Ricci, B., Fionda, C., Malgarini, G., Morrone, S., Peruzzi, G., Ricciardi, M.R., Petrucci, M.T., Cippitelli, M., Santoni, A., 2014. Reactive Oxygen Species- and DNA Damage Response-Dependent NK Cell Activating Ligand Upregulation Occurs at Transcriptional Levels and Requires the Transcriptional Factor E2F1. *J. Immunol.* 193, 950–960. doi:10.4049/jimmunol.1400271
- Soriani, A., Zingoni, A., Cerboni, C., Iannitto, M.L., Ricciardi, M.R., Di Gialleonardo, V., Cippitelli, M., Fionda, C., Petrucci, M.T., Guarini, A., Foà, R., Santoni, A., 2009. ATM-ATR-dependent up-regulation of DNAM-1 and NKG2D ligands on multiple myeloma cells

- by therapeutic agents results in enhanced NK-cell susceptibility and is associated with a senescent phenotype. *Blood* 113, 3503–11. doi:10.1182/blood-2008-08-173914
- Sosman, J.A., Kim, K.B., Schuchter, L., Gonzalez, R., Pavlick, A.C., Weber, J.S., McArthur, G.A., Hutson, T.E., Moschos, S.J., Flaherty, K.T., Hersey, P., Kefford, R., Lawrence, D., Puzanov, I., Lewis, K.D., Amaravadi, R.K., Chmielowski, B., Lawrence, H.J., Shyr, Y., Ye, F., Li, J., Nolop, K.B., Lee, R.J., Joe, A.K., Ribas, A., 2012. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N. Engl. J. Med.* 366, 707–14. doi:10.1056/NEJMoa1112302
- Sottile, R., Pangigadde, P.N., Tan, T., Anichini, A., Sabbatino, F., Trecroci, F., Favoino, E., Orgiano, L., Roberts, J., Ferrone, S., Kärre, K., Colucci, F., Carbone, E., 2016. HLA class I downregulation is associated with enhanced NK-cell killing of melanoma cells with acquired drug resistance to BRAF inhibitors. *Eur. J. Immunol.* 46, 409–19. doi:10.1002/eji.201445289
- Spreu, J., Kuttruff, S., Stejfova, V., Dennehy, K.M., Schitteck, B., Steinle, A., 2010. Interaction of C-type lectin-like receptors NKp65 and KACL facilitates dedicated immune recognition of human keratinocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 5100–5105. doi:10.1073/pnas.0913108107
- Stanietsky, N., Simic, H., Arapovic, J., Toporik, A., Levy, O., Novik, A., Levine, Z., Beiman, M., Dassa, L., Achdout, H., Stern-Ginossar, N., Tsukerman, P., Jonjic, S., Mandelboim, O., 2009. The interaction of TIGIT with PVR and PVRL2 inhibits human NK cell cytotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106, 17858–17863. doi:10.1073/pnas.0903474106
- Stevens, V.L., Zhang, H., Harreman, M., 1996. Isolation and characterization of a Chinese hamster ovary (CHO) mutant defective in the second step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis. *Biochem. J.* 253–8.
- Strong, R.K., McFarland, B.J., 2004. NKG2D and Related Immunoreceptors, in: *Advances in Protein Chemistry*. pp. 281–312. doi:10.1016/S0065-3233(04)68008-9
- Tabiasco, J., Espinosa, E., Hudrisier, D., Joly, E., Fournié, J.-J., Vercellone, A., 2002. Active trans-synaptic capture of membrane fragments by natural killer cells. *Eur. J. Immunol.* 32, 1502–8. doi:10.1002/1521-4141(200205)32:5<1502::AID-IMMU1502>3.0.CO;2-Y
- Takaki, R., Hayakawa, Y., Nelson, A., Sivakumar, P. V, Hughes, S., Smyth, M.J., Lanier, L.L., 2005. IL-21 enhances tumor rejection through a NKG2D-dependent mechanism. *J. Immunol.* 175, 2167–73.
- Tarazona, R., Duran, E., Solana, R., 2015. Natural Killer Cell Recognition of Melanoma: New Clues for a More Effective Immunotherapy. *Front. Immunol.* 6, 649. doi:10.3389/fimmu.2015.00649
- Taylor, R.P., 2013. Gnawing at Metchnikoff's paradigm. *Blood* 122, 2922–2924. doi:10.1182/blood-2013-07-514083
- Taylor, R.P., Lindorfer, M.A., 2015. Fc-receptor-mediated trogocytosis impacts mAb-based therapies: historical precedence and recent developments. *Blood* 125, 762–766. doi:10.1182/blood-2014-10-569244
- Tian, W., Boggs, D.A., Ding, W.Z., Chen, D.F., Fraser, P.A., 2001. MICA genetic polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B in 29 African-American families. *Immunogenetics* 53, 724–8. doi:10.1007/s00251-001-0392-x
- Tonnerre, P., Gérard, N., Chatelais, M., Poli, C., Allard, S., Cury, S., Bressollette, C., Cesbron-Gautier, A., Charreau, B., 2013. MICA variant promotes allosensitization after kidney transplantation. *J. Am. Soc. Nephrol.* 24, 954–66. doi:10.1681/ASN.2012080814
- Tran, K.A., Cheng, M.Y., Mitra, A., Ogawa, H., Shi, V.Y., Olney, L.P., Kloxin, A.M., Maverakis, E., 2016. MEK inhibitors and their potential in the treatment of advanced melanoma: the advantages of combination therapy. *Drug Des. Devel. Ther.* 10, 43–52.

doi:10.2147/DDDT.S93545

- Tsai, J., Lee, J.T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J., Haass, N.K., Sproesser, K., Li, L., Smalley, K.S.M., Fong, D., Zhu, Y.-L., Marimuthu, A., Nguyen, H., Lam, B., Liu, J., Cheung, I., Rice, J., Suzuki, Y., Luu, C., Settachatgul, C., Shellooe, R., Cantwell, J., Kim, S.-H., Schlessinger, J., Zhang, K.Y.J., West, B.L., Powell, B., Habets, G., Zhang, C., Ibrahim, P.N., Hirth, P., Artis, D.R., Herlyn, M., Bollag, G., 2008. Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 3041–6. doi:10.1073/pnas.0711741105
- Tsao, H., Atkins, M.B., Sober, A.J., 2004. Management of Cutaneous Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 351, 998–1012. doi:10.1056/NEJMra041245
- Valés-Gómez, M., 2015. The Impact of Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol Anchored MICA Alleles on Novel NKG2D-Based Therapies. *Front. Immunol.* 6, 193. doi:10.3389/fimmu.2015.00193
- Valés-Gómez, M., Browne, H., Reyburn, H.T., 2003. Expression of the UL16 glycoprotein of Human Cytomegalovirus protects the virus-infected cell from attack by natural killer cells. *BMC Immunol.* 4, 4.
- Valés-Gómez, M., Chisholm, S.E., Cassady-Cain, R.L., Roda-Navarro, P., Reyburn, H.T., 2008. Selective induction of expression of a ligand for the NKG2D receptor by proteasome inhibitors. *Cancer Res.* 68, 1546–54. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2973
- Valés-Gómez, M., Winterhalter, A., Roda-Navarro, P., Zimmermann, A., Boyle, L., Hengel, H., Brooks, A., Reyburn, H.T., 2006. The human cytomegalovirus glycoprotein UL16 traffics through the plasma membrane and the nuclear envelope. *Cell. Microbiol.* 8, 581–90. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00645.x
- Vanherberghen, B., Andersson, K., Carlin, L.M., Nolte-`t Hoen, E.N.M., Williams, G.S., Hoglund, P., Davis, D.M., 2004. Human and murine inhibitory natural killer cell receptors transfer from natural killer cells to target cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 16873–16878. doi:10.1073/pnas.0406240101
- Venkataraman, G.M., Suciú, D., Groh, V., Boss, J.M., Spies, T., 2007. Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D. *J. Immunol.* 178, 961–9.
- Villegas, F.R., Coca, S., Villarrubia, V.G., Jiménez, R., Chillón, M.J., Jareño, J., Zuñil, M., Callol, L., 2002. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer* 35, 23–8.
- Vivier, E., 2004. Natural Killer Cell Signaling Pathways. *Science (80-.)*. 306, 1517–1519. doi:10.1126/science.1103478
- Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M., Ugolini, S., 2011. Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science (80-.)*. 331, 44–49. doi:10.1126/science.1198687
- Wagtmann, N., Rajagopalan, S., Winter, C.C., Peruzzi, M., Long, E.O., 1995. Killer cell inhibitory receptors specific for HLA-C and HLA-B identified by direct binding and by functional transfer. *Immunity* 3, 801–9.
- Waldhauer, I., Goehlsdorf, D., Gieseke, F., Weinschenk, T., Wittenbrink, M., Ludwig, A., Stevanovic, S., Rammensee, H.-G., Steinle, A., 2008. Tumor-Associated MICA Is Shed by ADAM Proteases. *Cancer Res.* 68, 6368–6376. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-6768
- Walter, E.I., Roberts, W.L., Rosenberry, T.L., Ratnoff, W.D., Medof, M.E., 1990. Structural basis for variations in the sensitivity of human decay accelerating factor to phosphatidylinositol-specific phospholipase C cleavage. *J. Immunol.* 144, 1030–6.

- Welte, S., Kuttruff, S., Waldhauer, I., Steinle, A., 2006. Mutual activation of natural killer cells and monocytes mediated by NKp80-AICL interaction. *Nat. Immunol.* 7, 1334–1342. doi:10.1038/ni1402
- West, A.C., Smyth, M.J., Johnstone, R.W., 2014. The anticancer effects of HDAC inhibitors require the immune system. *Oncoimmunology* 3, e27414. doi:10.4161/onci.27414
- Whiteside, T.L., 2016. Exosomes and tumor-mediated immune suppression. *J. Clin. Invest.* 126, 1216–1223. doi:10.1172/JCI81136
- Williams, G.S., Collinson, L.M., Brzostek, J., Eissmann, P., Almeida, C.R., McCann, F.E., Burshtyn, D., Davis, D.M., 2007. Membranous structures transfer cell surface proteins across NK cell immune synapses. *Traffic* 8, 1190–204. doi:10.1111/j.1600-0854.2007.00603.x
- Wilmott, J.S., Long, G. V, Howle, J.R., Haydu, L.E., Sharma, R.N., Thompson, J.F., Kefford, R.F., Hersey, P., Scolyer, R.A., 2012. Selective BRAF inhibitors induce marked T-cell infiltration into human metastatic melanoma. *Clin. Cancer Res.* 18, 1386–94. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2479
- Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., Phillips, J.H., 1999. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285, 730–2.
- Wu, J.D., Higgins, L.M., Steinle, A., Cosman, D., Haugk, K., Plymate, S.R., 2004. Prevalent expression of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule is counteracted by shedding in prostate cancer. *J. Clin. Invest.* 114, 560–568. doi:10.1172/JCI22206
- Wu, X., Tao, Y., Hou, J., Meng, X., Shi, J., 2012. Valproic acid upregulates NKG2D ligand expression through an ERK-dependent mechanism and potentially enhances NK cell-mediated lysis of myeloma. *Neoplasia* 14, 1178–89.
- Xia, D., Hao, S., Xiang, J., 2006. CD8+ cytotoxic T-APC stimulate central memory CD8+ T cell responses via acquired peptide-MHC class I complexes and CD80 costimulation, and IL-2 secretion. *J. Immunol.* 177, 2976–84.
- Yang, H., Higgins, B., Kolinsky, K., Packman, K., Go, Z., Iyer, R., Kolis, S., Zhao, S., Lee, R., Grippo, J.F., Schostack, K., Simcox, M.E., Heimbrook, D., Bollag, G., Su, F., 2010. RG7204 (PLX4032), a selective BRAFV600E inhibitor, displays potent antitumor activity in preclinical melanoma models. *Cancer Res.* 70, 5518–27. doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0646
- Zhang, C., Niu, J., Zhang, J., Wang, Y., Zhou, Z., Zhang, J., Tian, Z., 2008a. Opposing effects of interferon- α and interferon- γ on the expression of major histocompatibility complex class I chain-related A in tumors. *Cancer Sci.* 99, 1279–1286. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00791.x
- Zhang, C., Zhang, J., Niu, J., Zhou, Z., Zhang, J., Tian, Z., 2008b. Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Hum. Immunol.* 69, 490–500. doi:10.1016/j.humimm.2008.06.004
- Zhang, C., Zhang, J., Sun, R., Feng, J., Wei, H., Tian, Z., 2005. Opposing effect of IFN γ and IFN α on expression of NKG2 receptors: Negative regulation of IFN γ on NK cells. *Int. Immunopharmacol.* 5, 1057–1067. doi:10.1016/j.intimp.2005.02.003
- Zhang, Y., Lazaro, A.M., Lavingia, B., Stastny, P., 2001. Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum. Immunol.* 62, 620–31.
- Zhang, Y., Lazaro, A.M., Zou, Y., Lavingia, B., Moraes, E.M., Moraes, R.J., Stastny, P., 2002. MICA polymorphism in South American Indians. *Immunogenetics* 53, 900–6. doi:10.1007/s00251-001-0426-4
- Zhao, F., Sucker, A., Horn, S., Heeke, C., Bielefeld, N., Schrörs, B., Bicker, A., Lindemann, M., Roesch, A., Gaudernack, G., Stiller, M., Becker, J.C., Lennerz, V., Wölfel, T., Schadendorf,

- D., Griewank, K., Paschen, A., 2016. Melanoma Lesions Independently Acquire T-cell Resistance during Metastatic Latency. *Cancer Res.* 76, 4347–58. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0008
- Zhou, G., Ding, Z.-C., Fu, J., Levitsky, H.I., 2011. Presentation of acquired peptide-MHC class II ligands by CD4+ regulatory T cells or helper cells differentially regulates antigen-specific CD4+ T cell response. *J. Immunol.* 186, 2148–55. doi:10.4049/jimmunol.1002917
- Zhou, J., Tagaya, Y., Tolouei-Semnani, R., Schlom, J., Sabzevari, H., 2005. Physiological relevance of antigen presentasome (APS), an acquired MHC/costimulatory complex, in the sustained activation of CD4+ T cells in the absence of APCs. *Blood* 105, 3238–46. doi:10.1182/blood-2004-08-3236
- Zhou, Q., Gil-Krzewska, A., Peruzzi, G., Borrego, F., 2013. Matrix metalloproteinases inhibition promotes the polyfunctionality of human natural killer cells in therapeutic antibody-based anti-tumour immunotherapy. *Clin. Exp. Immunol.* 173, 131–9. doi:10.1111/cei.12095
- Zhu, Z., Liu, W., Gotlieb, V., 2016. The rapidly evolving therapies for advanced melanoma--Towards immunotherapy, molecular targeted therapy, and beyond. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 99, 91–9. doi:10.1016/j.critrevonc.2015.12.002
- Zöller, M., 2009. Tetraspanins: push and pull in suppressing and promoting metastasis. *Nat. Rev. Cancer* 9, 40–55. doi:10.1038/nrc2543
- Zou, Y., Stastny, P., 2012. High Resolution MICA Genotyping by Sequence-Based Typing (SBT), in: *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.). pp. 183–195. doi:10.1007/978-1-61779-842-9_11
- Zwirner, N.W., Domaica, C.I., 2010. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors* 36, 274–88. doi:10.1002/biof.107

Anexos

Durante el transcurso de esta tesis doctoral he participado en distintos proyectos que han dado lugar a la publicación de los siguientes artículos:

Publicaciones relacionadas con la tesis doctoral:

- Ashiru O*, **López-Cobo S***, Fernández-Messina L, Pontes-Quero S, Pandolfi R, Reyburn HT, Valés-Gómez M. A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA*008. *Biochem J.* 2013 Sep 1;454(2):295-302.
*estos autores han contribuido de manera equitativa al trabajo
- **López-Cobo S**, Romera-Cárdenas G, García-Cuesta EM, Reyburn HT, Valés-Gómez M. Transfer of the human NKG2D ligands UL16 binding proteins (ULBP) 1-3 is related to lytic granule release and leads to ligand retransfer and killing of ULBP-recipient natural killer cells. *Immunology.* 2015 Sep;146(1):70-80.
- **López-Cobo S**, Campos-Silva C, Valés-Gómez M. Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anchors and Metalloproteases: Their Roles in the Regulation of Exosome Composition and NKG2D-Mediated Immune Recognition. *Front Cell Dev Biol.* 2016 Sep 12;4:97.
- **López-Cobo S**, Block N, Campos-Silva C, García-Cuesta EM, Reyburn HT, Paschen A, Valés-Gómez M. Decrease of NK recognition of BRAF inhibitor-treated human metastatic melanoma cells can be overcome by histone deacetylase inhibitors. En preparación.

Publicaciones relacionadas con otros proyectos:

- García-Cuesta EM, **López-Cobo S**, Álvarez-Maestro M, Esteso G, Romera-Cárdenas G, Rey M, Cassidy-Cain RL, Linares A, Valés-Gómez A, Reyburn HT, Martínez-Piñeiro L, Valés-Gómez M. NKG2D is a Key Receptor for Recognition of Bladder Cancer Cells by IL-2-Activated NK Cells and BCG Promotes NK Cell Activation. *Front Immunol.* 2015 Jun 8;6:284.
- Valés-Gómez M, Esteso G, Aydogmus C, Blázquez-Moreno A, Marín AV, Briones AC, Garcillán B, García-Cuesta EM, **López Cobo S**, Haskologlu S, Moraru M, Cipe F, Dobbs K, Dogu F, Parolini S, Notarangelo LD, Vilches C, Recio MJ, Regueiro JR, Ikinçiogullari A, Reyburn HT. Natural killer cell hyporesponsiveness and impaired development in a CD247-deficient patient. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Mar;137(3):942-5.e4.
- Romera-Cárdenas G, Thomas LM, **Lopez-Cobo S**, García-Cuesta EM, Long EO, Reyburn HT. Ionomycin Treatment Renders NK Cells Hyporesponsive. *PLoS One.* 2016 Mar 23;11(3):e0150998.
- Oliveira-Rodríguez M, **López-Cobo S**, Reyburn HT, Costa-García A, López-Martín S, Yáñez-Mó M, Cernuda-Morollón E, Paschen A, Valés-Gómez M, Blanco-López MC. Development of a rapid lateral flow immunoassay test for detection of exosomes previously enriched from cell culture medium and body fluids. *J Extracell Vesicles.* 2016 Aug 12;5:31803.
- García-Cuesta E, Esteso G, Ashiru O, **López-Cobo S**, Alvarez-Maestro M, Linares A, Ho MM, Martínez-Piñeiro L, Reyburn HT, Valés-Gómez M. Characterisation of a human anti-tumoral NK cell population expanded after BCG treatment of leukocytes. *Oncoimmunology.* Aceptado.

