

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

Tesis doctoral:

**PAPEL DE LA PODOCALICINA EN EL SISTEMA INMUNITARIO:
mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria en células
tumoraes de cáncer de mama**

Laura Amo Herrero

Marzo, 2016

Directora: Susana Larrucea Bilbao

Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología.

Universidad del País Vasco (UPV/EHU)

Agradecimientos

Considero que la realización de la tesis no es sólo un aprendizaje profesional, también es un crecimiento como persona. En el transcurso de esta etapa se han cruzado por mi camino muchas personas. Todas y cada una de ellas han formado parte de lo que soy ahora y de lo que quiero llegar a ser.

En los tiempos que vivimos parece difícil ser feliz trabajando en el mundo de la investigación. En mi caso, volviendo la vista atrás, considero que he sido feliz gracias a las personas que han ido a mi lado en este camino. En primer lugar, este trabajo no hubiera sido posible sin mi directora de tesis, Susana Larrucea. Agradezco los conocimientos que me ha transmitido, enseñándome a cuestionar las cosas, pero sobre todo agradezco la confianza que ha puesto en mí desde el principio. Mi compañera en esta andadura, Estibaliz Tamayo, que no solo ha tenido un peso científico en este trabajo, ha estado ahí para escuchar y apoyarme. A Rafael Pulido, por enseñarme a desarrollar otra visión de la ciencia y permitirme trabajar en su grupo durante los últimos pasos de la tesis. A mi referente, impulsor de la inmunología, Francisco Borrego, gracias por su apoyo y por sacar siempre lo mejor de mí. A la persona que me alegra cada día, Estbaliz Ruiz, por cuidarme y estar ahí sin perder la sonrisa. Andrea, por ser mi apoyo cuando lo he necesitado y ser el mejor ejemplo de trabajo y sacrificio. Naiara, por su cariñosa ayuda e ilusión. A “PTP power:” Lorena, Janire, Olaia, Sandra y Caroline, por aguantarme en los momentos difíciles y hacer que trabaje con una sonrisa. Y a muchos otros compañeros que forman parte de Biocruces: Arantza, Miren, Aitziber, Bego, Unai, Erika, Virginia, Iker, Raquel, Susana, Eva, Garbiñe, Sorkunde, Teba, Ibai, Asier, etc. que me han ayudado en todo lo posible y con los que he compartido momentos irrepetibles.

Quisiera agradecer especialmente a las personas que forman parte del equipo de Inmunología del Hospital Universitario Cruces, por su ayuda incondicional y por el cariño que me han transmitido durante todo este tiempo: Arantza Arrieta, Natalia, Marta Riñón, Arantza Pacho, Nerea, Lourdes, Begoña, Marta Gonzalez, Mariasun, Ascen, Miguel Ángel, Montse, Paloma, Loli y Garbiñe. Admirables por sus conocimientos y por el trabajo que sacan adelante día a día.

En el transcurso de todo este trabajo, lleno de esfuerzo y sacrificio, a veces se olvida la gran ilusión con la que se comienza esta andadura. Gracias a mis estrellas de la licenciatura, amigos con los que siempre comparto momentos especiales, que me recuerdan por qué estamos en todo esto. A mi familia, por confiar a ciegas en todo lo que hago y hacer que me sienta orgullosa de lo que he conseguido. Y a mi gran compañero, gracias por todo el apoyo, por escuchar y aconsejarme, pero sobre todo por creer en mí.

Por último, en un futuro me gustaría poder ser un ejemplo para alguien como lo han sido todos ellos para mí. Espero que la situación actual de la investigación cambie para que muchas personas como yo podamos dedicarnos de forma digna a lo que nos hace felices: la ciencia.

*Gracias por calmar todas mis preguntas
y compartir todas mis respuestas.*

Abreviaturas

7-AAD	7- Aminoactinomicina D
ADCC	Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIRC	Agencia Internacional de Investigación del Cancer
Akt	Proteína quinasa B
APC	Aloficocianina
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BCA	Ácido bicinconínico
Bcl-2	Oncogén de un linfoma de linfocitos B
Bp	Pares de bases
BSA	Seroalbúmina bovina
CCR	Receptor de quimiocina CC
CD	Grupo de diferenciación
CDP	Progenitor común de células dendríticas
CFSE	Carboxi-fluorescein-succinilmidil éster
CLP	Progenitor linfoide común
CMP	Progenitor mielóide común
CMTMR	5-(-6)-(((4-clorometil) Benzoil)amino) tetrametilrodamina
CTL	Linfocito T citotóxico
CTLA-4	Antígeno 4 del linfocito T citotóxico
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DC	Célula dendrítica
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNAM-1	Molécula accesoria 1 de DNAX
DTHL	Ácido aspártico-treonina-histidina-leucina
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMT	Transición epitelial-mesenquimal
ER	Receptor de estrógenos
ErbB2	Oncogén de eritroblastosis B o HER-2/neu
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
ERM	Ezrina-Radixina-Moesina

FBS	Suero fetal bovino
Fc	Fracción constante de las inmunoglobulinas
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMO	Flouescencia menos uno
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
G418	Geneticina®
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GFP	Proteína verde fluorescente
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos
Grb2	Proteína de unión al receptor del factor de crecimiento 2
HDP70	Elementos transcripcionales de choque térmico o heat shock protein 70
HER-2	Receptor 2 humano del factor de crecimiento epidérmico
HEV	Vénulas del endotelio alto
HLA	Antígeno leucocitario humano
HRP	Peroxidasa de rábano
HSC	Célula madre hematopoiética
ICAM	Molécula de adhesión intercelular
ICOS	Coestimulador inducible
iDC	Célula dendrítica inmadura
IDO	Indoleamina 2,3-dioxigenasa
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
ITAM	Estructura tirosínica de activación del receptor inmunitario
ITIM	Estructura tirosínica de inhibición del receptor inmunitario
Jak	Quinasa de Janus
JNK	Quinasas c-Jun N-terminal
KDa	Kilo Dalton
KIR	Receptor del tipo inmunoglobulina del linfocito citolítico
LFA-1	Antígeno asociado a la función linfocitaria tipo 1
LIR	Receptor leucocitario del tipo inmunoglobulina
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
Mb	Megabases
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
mDC	Célula dendrítica madura

MDP	Progenitor macrófago-dendrítico
MEP	Progenitor transformado de Myb-Ets 21
MFI	Mediana de la intensidad de fluorescencia
MHC	Complejo principal de histo-compatibilidad
MIC-AB	Cadena A/B relacionada con el MHC de clase I
MMP	Metaloproteinasas de matriz extracelular
MoDC	Célula dendrítica derivada de monocito
MSC	Célula madre mesenquimal
MUC	Mucina
NCR	Receptor de citotoxicidad natural
NHERF	Factor regulador del intercambiador Na^+/H^+
NK	Linfocitos citolíticos naturales o <i>Natural killers</i>
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Tampón fosfato salino
PCLP1	Proteína 1 similar a podocalicina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PD-1	Proteína de muerte programada
PDZ	Dominios de interacción proteína-proteína
PE	Ficoeritrina
PGE2	Prostaglandina E2
PHA	Fitohemaglutinina
PI3K	Fosfoinositol 3-quinasa
PI-9	Inhibidor de proteasa 9
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PODXL	Gen de la proteína podocalicina
Poli I:C	Ácido poliinosínico-policitidílico
PR	Receptor de progesterona
Pre-DC	Célula dendrítica precursora
PSA	Antígeno prostático específico
PTS	Prolina-treonina-serina
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción reversa
SDS	Dodecilsulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SLeX	Complejo sialilado relacionado con la familia de Lewis X

SMAC	Grupo de activación supramolecular
Sp1	Proteína de especificidad 1
SPI-6	Inhibidor de serina proteasa 6
STAT	Proteína transductora de señales y activadora de la transcripción
TAA	Antígenos asociados a tumores
TATA	Antígenos asociados a trasplante o inducidos por virus
TCR	Receptor del linfocito T
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β
Th	Linfocito T <i>helper</i> o cooperador
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRAIL	Ligando de inducción de apoptosis relacionado con TNF
TRAILR	Receptor del ligando de inducción de apoptosis relacionado con TNF
Treg	Linfocito T regulador
TSA	Antígenos específicos de tumores
ULPB	Proteína de unión a UL16
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WT1	Proteína del tumor de Wilms 1

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1. Proteína PCLP1	1
1.1. Estructura proteica de PCLP1 y organización genómica	1
1.2. Regulación de la expresión de PCLP1	3
1.3. Función de PCLP1	3
1.3.1. PCLP1 en células epiteliales.....	3
1.3.2. PCLP1 en células del sistema nervioso.....	5
1.3.3. PCLP1 en células hematopoyéticas.....	5
1.3.4. PCLP1 en células madre mesenquimales	6
1.4. Proteína PCLP1 y cáncer	7
1.5. PCLP1 en cáncer de mama	8
2. Sistema Inmunitario	11
2.1. Células dendríticas.....	13
2.2. Linfocitos T	15
2.3. Células NK.....	16
3. Sistema inmunitario y cáncer	17
3.1. Inmunovigilancia e inmunoección tumoral	17
4. Células NK y cáncer	20
4.1. Reconocimiento tumoral	20
4.1.1. Receptores de inhibición	22
4.1.2. Receptores de activación	23
4.1.3. Otros receptores	25
4.2. Sinapsis inmunológica.....	25
4.3. Respuesta antitumoral.....	26
4.3.1. Secreción de gránulos citotóxicos	27
4.3.2. Ligandos de receptores de muerte	27
4.3.3. Secreción de citocinas: IFN- γ y TNF- α	28
4.3.4. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos	28
5. Mecanismos de evasión inmunitaria	29
5.1. Mecanismos de evasión de la respuesta de células citotóxicas	29
5.1.1. Ignorancia inmunológica	29
5.1.2. Resistencia a la apoptosis.....	30
5.2. Mecanismos de alteración del desarrollo de células inmunitarias	31
5.2.1. Alteración de las células NK.....	31
5.2.3. Alteración del desarrollo de linfocitos T	32
5.2.4. Alteración del desarrollo de células dendríticas	33
5.2.5. Citocinas inflamatorias: TGF- β 1 e IL-4	33

II. OBJETIVOS.....	39
III. MATERIAL Y MÉTODOS	39
1. Obtención y cultivo de células.....	39
1.1. Células primarias	39
1.1.1. Monocitos.....	39
1.1.2 Células dendríticas de sangre periférica	40
1.1.3. Células NK	40
1.1.4. Linfocitos T.....	40
1.2. Líneas celulares	41
1.2.1. Transfección de la línea celular MCF-7	42
2. Técnicas utilizadas	43
2.1. Citometría de flujo.....	43
2.1.1. Detección de moléculas de superficie celular	43
2.1.2. Detección de moléculas intracelulares	44
2.1.3. Anticuerpos empleados	44
2.1.4. Estrategia de análisis.....	46
2.2. <i>Western blot</i>	47
2.3. RT-qPCR.....	48
2.4. Microscopía de fluorescencia	50
3. Ensayos funcionales	51
3.1. Estudio de la citotoxicidad tumoral mediada por las células NK	51
3.2. Análisis de la regulación de la expresión de receptores de células NK	52
3.3. Determinación de la desgranulación de las células NK	52
3.4. Detección de citocinas secretadas por las células NK	53
3.5. Determinación de la formación de conjugados	53
3.6. Estudio de PCLP1 durante la formación de conjugados.....	53
3.7. Análisis de la proliferación linfocitaria y generación de Tregs	54
3.8. Estudio de la maduración y activación de células dendríticas.....	55
3.9. Determinación de la expresión de PCLP1 inducida por moléculas inmunomoduladoras	55
3.10. Análisis estadístico.....	56
IV. RESULTADOS	57
1. Papel de PCLP1 en células inmunitarias	57
1.1. Expresión de PCLP1 en células del sistema inmunitario	57
1.2. Efecto de PCLP1 en la maduración de células dendríticas derivadas de monocitos	59
2. PCLP1 en células de cáncer de mama	61
2.1. Generación de células MCF-7 que sobreexpresan PCLP1	61

2.2. Efecto de PCLP1 sobreexpresada en células MCF-7 en la citotoxicidad mediada por las células NK	62
2.3. Efecto de PCLP1 en la expresión de receptores activadores en las células NK	66
2.4. Efecto de PCLP1 en la expresión de moléculas de adhesión y otros receptores de células NK.....	68
2.5. Efecto de PCLP1 en la expresión de ligandos para receptores de células NK	71
2.6. Efecto de PCLP1 en la desgranulación de células NK	73
2.7. Efecto de PCLP1 en la secreción de citocinas por células NK	75
2.8. Formación de conjugados entre células NK y células MCF-7 que sobreexpresan PCLP1	76
2.8.1. Localización de PCLP1 en los conjugados celulares.....	77
2.8.2. Transferencia de PCLP1 en los conjugados celulares	78
2.9. Efecto de PCLP1 en la maduración de las células dendríticas	81
2.10. Efecto de PCLP1 en la proliferación linfocitaria	82
2.10.1. Proliferación de linfocitos T.....	83
2.10.2. Proliferación de células NK.....	84
2.10.3. Inducción de linfocitos T reguladores	85
V. DISCUSIÓN	91
1. PCLP1 se expresa en células dendríticas y participa en el mantenimiento del fenotipo inmaduro	91
2. PCLP1 funciona como molécula inmunosupresora en células de cáncer de mama ..	95
2.1. PCLP1 confiere resistencia tumoral a la citotoxicidad mediada por células NK	96
2.2. PCLP1 expresada en células tumorales inhibe la proliferación de linfocitos T.....	101
3. La expresión de PCLP1 es inducida por TGF- β 1 e IL-4	103
4. Consideraciones finales.....	104
VI. CONCLUSIONES	107
VII. BIBLIOGRAFÍA	109
VIII. ANEXOS.....	135
Publicaciones relacionadas.....	135

I. INTRODUCCIÓN

1. PROTEÍNA PCLP1

La podocalicina, también denominada proteína 1 similar a podocalicina (PCLP1), trombosucina, PODXL, progenitor transformado de Myb-Ets (MEP) 21, o gp135, es una proteína transmembrana de tipo I altamente glicosilada perteneciente a la familia de sialomucinas CD34. Inicialmente identificada en la superficie de los podocitos glomerulares de rata por Kerjaschki y colaboradores en 1984,¹ se ha detectado su presencia en la superficie de otros tipos celulares, como células epiteliales, endotelio vascular, células hematopoyéticas, células mesenquimales, células del sistema nervioso y células tumorales. La importancia de esta proteína reside en su estructura rica en sulfatos y ácidos siálicos y en su capacidad para interactuar con el citoesqueleto celular. Estas características otorgan a PCLP1 un papel fundamental en la adhesión y morfología celulares, tanto en homeostasis como en condiciones de malignidad.

1.1. Estructura proteica de PCLP1 y organización genómica

PCLP1 es una proteína cuyo gen (*PODXL*) se encuentra en la región cromosómica 7q32–q33² y comprende un total de 1,1 Mb organizadas en 8 exones que codifican para una proteína de 528 aminoácidos con un peso molecular calculado de 55,5 KDa. Como consecuencia de un proceso de glicosilación postraduccional, PCLP1 puede llegar a alcanzar un peso molecular de entre 145 y 200 KDa.^{3,4} PCLP1, al igual que la proteína CD34 y el endoglicano, pertenece a la familia de proteínas denominada CD34. Los miembros de esta familia comparten una estructura similar que consiste en tres dominios principales: un dominio extracelular altamente cargado, un tallo yuxtamembrana y un dominio citoplasmático de corta longitud que interactúa con proteínas intracelulares (Figura 1).^{5,6}

El extremo amino terminal extracelular de PCLP1 se compone de 406 aminoácidos y está formado por un dominio mucina unido a un dominio globular rico en aminoácidos cisteína. El dominio mucina se denomina PTS por su riqueza en prolina, treonina y serina, es de gran longitud (250 aminoácidos) y presenta lugares de

N-glicosilación, O-glicosilación, sialilación y sulfatación, lo que confiere una gran carga negativa a esta proteína. Por otro lado, el dominio intracelular de PCLP1 es de menor longitud (75 aminoácidos) y presenta lugares de fosforilación y de interacción con proteínas intracelulares. Los cuatro aminoácidos carboxilo-terminales, que incluyen el aspartato, treonina, histidina y leucina, forman un motivo llamado DTHL que interacciona con dominios de señalización de moléculas intracelulares denominados dominios PDZ.⁷ El dominio intracelular de PCLP1 se encuentra ampliamente conservado entre especies (95%), a diferencia del dominio extracelular (<33%). Este alto grado de conservación indica que el dominio intracelular juega un papel fundamental en la función de PCLP1.

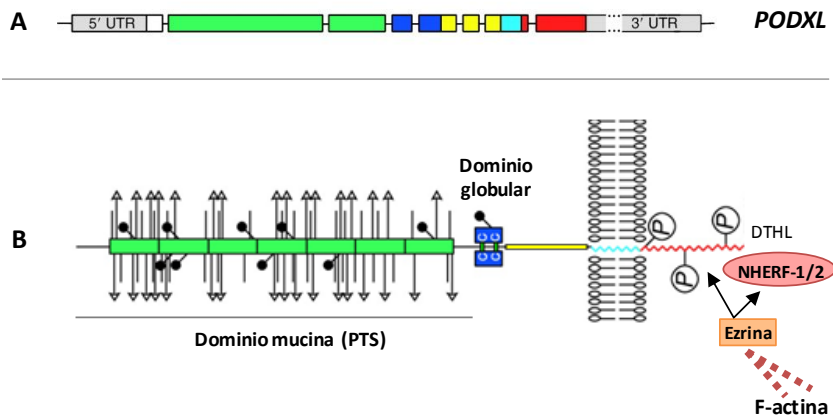


Figura 1. Estructura proteica y organización genómica de PCLP1. A) Estructura del gen *PODXL*, donde se muestran los 8 exones que dan lugar a los correspondientes dominios proteicos. B) Estructura proteica donde aparece en verde el dominio mucina con las zonas de O-glicosilación (líneas verticales), sialilación (flechas) y sulfatación (líneas con punto). En azul se muestra el dominio globular seguido del tallo yuxtamembrana (amarillo), dominio transmembrana (azul) y la cola citoplásmica (rojo) con sus zonas fosforiladas y el motivo DTHL. Adaptada de (Nielsen y McNaghy, 2008)⁶.

A través de la cola citoplásmica, PCLP1 se asocia a proteínas de unión a actina tales como la ezrina, el factor regulador del intercambiador Na^+/H^+ (NHERF) o la cortactina.⁷⁻⁹ La ezrina pertenece a la familia de proteínas denominada ezrina-radixina-moesina (ERM) y se une a PCLP1 de forma directa o a través de la proteína adaptadora NHERF formando el complejo PCLP1-NHERF-ezrina.¹⁰ Este complejo

interacciona con proteínas del citoesqueleto de actina participando en importantes procesos celulares como la morfogénesis, adhesión, tráfico de membrana, transporte y señalización celular. Asimismo, la formación del complejo PCLP1-NHERF-ezrina se encuentra implicada en el desarrollo de extensiones de membrana, modulando positivamente la movilidad celular.^{11,12}

1.2. Regulación de la expresión de PCLP1

La transcripción de PCLP1 se encuentra regulada por varios factores, entre los que destaca la proteína del tumor de Wilms (WT1), un potente activador de la transcripción de varios genes implicados en el crecimiento, metabolismo celular y diferenciación renal. La unión de WT1 a zonas conservadas del promotor del gen *PODXL* activa su transcripción favoreciendo el establecimiento y mantenimiento de las características funcionales de los podocitos.¹³ Además de en podocitos, WT1 se expresa en el sistema nervioso central y en tejidos hematopoyéticos y se sobreexpresa en una gran variedad de cánceres de adultos.¹⁴ Asimismo, la expresión de PCLP1 también puede ser inducida por el factor de transcripción Sp1 (proteína de especificidad 1),¹⁵ o regulada negativamente por el factor de transcripción supresor de tumores p53, contribuyendo a la tumorigénesis en los tumores de Wilms.¹⁶

1.3. Función de PCLP1

1.3.1. PCLP1 en células epiteliales

Los estudios iniciados por Kerjaschki y colaboradores en 1984 atribuyeron un papel esencial de PCLP1 en la organización y funcionamiento del riñón, lo que posteriormente fue demostrado al observar que ratones carentes del gen *PODXL* presentaban una permeabilidad glomerular reducida que tenía como consecuencia la muerte por anuria.¹⁷ Esto es debido a que la riqueza en ácidos siálicos del dominio extracelular de PCLP1 confiere a esta proteína la carga negativa necesaria para crear fuerzas de repulsión que mantienen abiertos los espacios intercelulares a través de los cuales se filtra la orina.^{1,18,19}

Dependiendo de su nivel de expresión y localización celular se pueden observar efectos opuestos de PCLP1 en la adhesión celular. Por este motivo, varios trabajos han atribuido a PCLP1 una función antiadhesiva tanto en podocitos *in vivo*,^{1,17,20} como en líneas celulares de riñón y de ovario.²¹ Por el contrario, otros autores han demostrado el papel proadhesivo de PCLP1 en líneas celulares epiteliales de ovario y endoteliales.^{22,23} Se ha demostrado que en células que presentan niveles moderados de expresión de PCLP1, esta proteína se dirige hacia zonas apicales permitiendo el movimiento de integrinas hacia zonas basolaterales, lo cual incrementa la adhesión celular en la zona basal.^{12,24,25} Por el contrario, altos niveles de expresión de PCLP1 tienen como consecuencia una mayor expansión de los dominios apicales dejando a los dominios basolaterales con insuficiente área para adherirse a otras células (Figura 2).²⁶ De hecho, un estudio realizado en líneas celulares de riñón (MDCK) y de cáncer de mama (MCF-7) muestra que la sobreexpresión de PCLP1 induce la formación de microvellosidades ricas en actina en el dominio apical, disminuyendo la actina basolateral e interrumpiendo la adhesión mediada por integrinas.²⁷

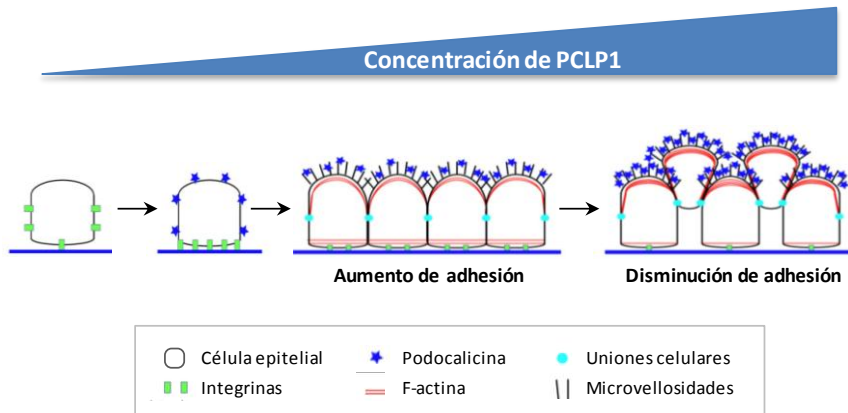


Figura 2. Función de PCLP1 en la adhesión celular. Niveles moderados de PCLP1 establecen dominios apicales de PCLP1 y localización basolateral de integrinas. El aumento de expresión de PCLP1 induce su apicalización y formación de microvellosidades, lo cual interrumpe la adhesión mediada por integrinas. Adaptada de (Nielsen y McNagny, 2008)⁶.

A su vez, PCLP1 se expresa en las células endoteliales de las vénulas de endotelio alto (HEV) presentes en los órganos linfáticos secundarios,^{28,29} donde presenta una función proadhesiva debido a la unión a su ligando extracelular. Las células de HEV ejercen un papel fundamental en la migración de los linfocitos hacia órganos linfáticos secundarios. Dicha migración se encuentra mediada por la interacción con las moléculas de adhesión celular leucocitaria denominadas selectinas con moléculas presentes en la superficie de las células de HEV. En las células de HEV, PCLP1 exhibe un patrón de glicosilación inusual constituido por grupos glucídicos complejos sialilados relacionados con la familia de Lewis X (SLeX) que le permiten interactuar con su ligando presente en los linfocitos, la selectina L. Esta interacción entre PCLP1 y selectina L promueve el reclutamiento linfocitario a los órganos linfáticos secundarios, ejerciendo una función proadhesiva.³⁰

1.3.2. PCLP1 en células del sistema nervioso

En los últimos años, varios trabajos han descrito la expresión de la proteína PCLP1 durante el desarrollo del sistema nervioso central y en el cerebro adulto. Los mayores niveles de expresión de PCLP1 se producen en los estadios postnatales, especialmente en la placa cortical, hipocampo, cerebelo y prosencéfalo.^{31,32} Aunque la función específica de esta proteína durante el desarrollo neuronal aun se desconoce, se sabe que participa en la morfogénesis neuronal regulando negativamente el crecimiento y ramificación de las neuritas. Recientemente se ha demostrado que PCLP1 es requerida para la correcta la formación y el mantenimiento de las sinapsis neuronales, puesto que contribuye a la estabilización de los contactos sinápticos tanto en el sistema nervioso central como en el sistema nervioso periférico.³³

1.3.3. PCLP1 en células hematopoyéticas

Al igual que otros componentes de la familia CD34, la proteína PCLP1 se expresa durante el desarrollo embrionario en progenitores hematopoyéticos tempranos, hemangioblastos y eritroblastos.³⁴⁻³⁶ Los niveles de expresión de PCLP1 en

estas células son inferiores a los presentes en podocitos y van disminuyendo progresivamente durante la maduración celular. Pese a que su función en este tipo celular es aún desconocida, se ha sugerido que tanto CD34 como PCLP1 participan en la migración y diferenciación de las células hematopoyéticas durante el desarrollo.³⁴ En la fase adulta su expresión permanece restringida a células del linaje megacariocítico y a una subpoblación de células madre hematopoyéticas presente en médula ósea, la cual se encuentra relacionada con el linaje mieloide y linfoide. Asimismo, se ha detectado expresión de PCLP1 en la membrana citoplásmica de monocitos activados con factor estimulador de colonias de monocitos.³⁷⁻⁴⁰

1.3.4. PCLP1 en células madre mesenquimales

La estructura glicosilada de PCLP1 participa en el mantenimiento de la morfología de las células madre. Esta proteína ha sido descrita como marcador de células madre mesenquimales (MSCs), de células madre pluripotentes y se expresa de forma elevada en células madre humanas embrionarias.⁴¹⁻⁴³ El estudio en MSCs ha revelado que PCLP1, junto con otras proteínas, regula la diferenciación y la agregación celulares y participa en la proliferación clonal y en la migración de estas células.^{44,45} Asimismo, las MSCs presentan una función inmunomoduladora, ya que contribuyen al mantenimiento de la tolerancia periférica, feto-materna y de trasplante, así como en la autoinmunidad y evasión tumoral.⁴⁶ Un estudio reciente desarrollado en una subpoblación de MSCs, constituida por células progenitoras cardíacas, ha demostrado que la expresión de PCLP1 promueve la activación, adhesión y migración celulares y favorece el estado inmaduro o no diferenciado. De hecho, la expresión de PCLP1 modula la capacidad inmunoreguladora local de las MSCs mediante la inhibición de la proliferación de linfocitos T.⁴⁷

1.4. Proteína PCLP1 y cáncer

Son muchos los estudios que implican a PCLP1 en la malignidad tumoral. Así, se han detectado polimorfismos o alteraciones en la expresión de PCLP1 en varios cánceres humanos, incluyendo cáncer de mama,⁴⁸ próstata,⁴⁹ páncreas,⁵⁰ carcinoma hepatocelular,⁵¹ testicular,⁵² embrionario,⁴² ovárico,²⁶ colorrectal,⁵³ renal,⁵⁴ tiroideo,⁵⁵ pulmonar,⁵⁶ tumores cerebrales⁵⁷ y leucemias.^{37,58} Además, niveles elevados de expresión de PCLP1 en células tumorales se asocian con tumores de alto grado, agresivos, con mayor riesgo de metástasis y pronóstico negativo. Este vínculo entre PCLP1 y metástasis se ha visto reforzado por estudios que muestran un aumento del potencial invasivo en células tumorales que sobreexpresan ectópicamente PCLP1.^{26,48,49,53,54,59-64}

En cuanto a los mecanismos que subyacen a la metástasis inducida por PCLP1, la capacidad para promover la malignidad tumoral se ha atribuido tanto a su propiedad antiadhesiva como a la proadhesiva. Diversos estudios *in vitro*, han demostrado que la capacidad antiadhesiva de esta proteína interrumpe el contacto célula-célula, incrementa la migración y altera la morfología celular, dando lugar a un fenotipo metastásico.^{21,27,48,59} Por otro lado, se ha descrito que PCLP1 induce la adhesión celular a proteínas de la matriz extracelular, la migración y la interacción intercelular de manera dependiente de integrinas, unas moléculas de adhesión implicadas en la progresión del cáncer. En la misma línea, se ha demostrado que PCLP1 expresada en células tumorales pancreáticas estimula la adhesión a la selectina E y selectina L presentes en el endotelio vascular y en los linfocitos, respectivamente, contribuyendo a la metástasis de las células cancerosas.^{65,66} Asimismo, la región cromosómica 7q32-q33, donde se localiza el gen *PODXL* se haya ligada a formas agresivas de cáncer de próstata.^{67,68}

El incremento de la migración e invasividad mediado por PCLP1 es dependiente de su ligando intracelular, la ezrina, que participa en la interacción de PCLP1 con el citoesqueleto e induce la activación de las rutas de señalización fosfoinositol 3-quinasa (PI3K) y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK).⁵⁹ Dichas rutas

afectan a funciones celulares relacionadas con la tumorigénesis y metástasis, y se encuentran implicadas en la inducción de metaloproteinasas que degradan la matriz extracelular (MMP) facilitando la migración e invasión tumorales.^{69,70} Cabe destacar que los ligandos intracelulares de PCLP1, la ezrina y NHERF, se encuentran asociadas a varios tipos de cáncer contribuyendo al fenotipo maligno.⁷¹⁻⁷⁴

Por otra parte, se ha atribuido a PCLP1 un importante papel regulador en la transición epitelial-mesenquimal (EMT) inducida por el factor de crecimiento transformador β 1 (TGF- β 1).⁷⁵ Durante el proceso de EMT las células epiteliales pierden su polarización apical-basal y el contacto entre células adoptando una morfología mesenquimal y un comportamiento invasivo y migratorio.⁷⁶

1.5. PCLP1 y cáncer de mama

El cáncer de mama representa el tipo de cáncer más frecuente en mujeres con una incidencia anual de 1,68 millones de casos diagnosticados en la población femenina mundial y más de 25.000 casos en España, suponiendo el 29% de los tumores femeninos (Agencia Internacional de Investigación del Cáncer o AIRC, 2012). Además, el cáncer de mama es la principal causa de mortalidad por cáncer en mujeres, siendo la propagación metastásica a órganos distantes la causa predominante de la muerte de estas pacientes.

Los tumores mamarios se distinguen en función de la localización, fase del tumor y perfil molecular. Habitualmente, se utilizan los términos ductal y lobulillar para distinguir los tumores que se encuentran en el conducto lácteo o en el lóbulo mamario, respectivamente. Por otra parte, los tumores mamarios son clasificados según su tamaño, extensión tumoral, grado histológico e invasión a ganglios linfáticos. A su vez, los tumores mamarios se clasifican en base a la expresión de tres moléculas principales: receptor de estrógenos (ER), receptor de progesterona (PR) y receptor 2 humano del factor de crecimiento epidérmico (HER-2), también denominado ErbB2. Los tumores positivos para ER son de bajo grado y se dividen en luminal A y luminal B en función de la expresión de la molécula HER-2. El subtipo luminal A es el más común

(50-60%), es negativo para HER-2 y presenta mejor pronóstico. Por el contrario, el subtipo luminal B (10-20%) expresa HER-2 y presenta un fenotipo más agresivo y peor pronóstico.⁷⁷ Los tumores clasificados dentro del subtipo HER-2, engloban entre el 15 y el 20% de los cánceres de mama. Estos tumores son negativos para ER y PR y se encuentran asociados a la malignidad y al pronóstico desfavorable. Por último, los cánceres del subgrupo basal (a veces denominado como triple negativo) se caracterizan por la ausencia de ER⁻, PR⁻ y HER-2, son de alto grado y presentan un rápido crecimiento.⁷⁸ Relacionado con el subtipo basal, recientemente se ha descrito el subtipo *claudin-low*, con bajos niveles de claudina y otras moléculas implicadas en el proceso EMT y con características asociadas a células madre mamarias.⁷⁹ En la tabla presentada a continuación (Tabla 1) se muestran los tipos de carcinomas mamarios y las correspondientes líneas celulares desarrolladas.

Tabla 1. Clasificación de carcinomas mamarios y sus correspondientes líneas celulares.⁸⁰

Clasificación	Perfil	Líneas celulares
Luminal A	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁻	MCF-7, T47D, SUM185
Luminal B	ER ⁺ , PR ^{+/-} , HER2 ⁺	BT474, ZR-75
Basal	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	MDA-MB-468, SUM190
<i>Claudin-low K</i>	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁻	BT549, MDA-MB-231, Hs578T, SUM1315
HER2	ER ⁻ , PR ⁻ , HER2 ⁺	SKBR3, MDA-MB-453

Los tumores mamarios malignos habitualmente sufren metástasis a lugares como hueso, pulmón, hígado y cerebro. Pese a que aún no se conoce con claridad, se ha observado que los tumores ER⁺ tienen predilección por hueso, mientras que los tumores de tipo lobulillar invasivo migran al tracto gastrointestinal y a ovarios.^{81,82} Para predecir el pronóstico de pacientes con tumores mamarios se tienen en cuenta características como el tamaño tumoral, la invasión de ganglios linfáticos y la pérdida de diferenciación histopatológica, cuyos valores se utilizan en clínica como marcadores de malignidad o de pronóstico desfavorable. Sin embargo, muchos

tumores agresivos no presentan estas características, encontrándose tumores metastásicos sin diseminación a ganglios linfáticos. Por esta razón es necesaria la identificación de marcadores de malignidad adecuados.

Los tumores positivos para PCLP1 se asocian con carcinomas mamarios de tipo basal (ER⁻, PR⁻ y HER-2⁻), son de grado avanzado y se relacionan con factores de pronóstico desfavorable como expresión anormal de p53.⁸³ Varios estudios realizados en carcinomas mamarios demuestran que los altos niveles de expresión de PCLP1 se restringen a una subpoblación de carcinomas invasivos que incluyen tumores agresivos sin diseminación a ganglios linfáticos axilares y que se correlacionan con un pronóstico desfavorable. De hecho, el tiempo medio de supervivencia en pacientes con tumores que presentan niveles de expresión de PCLP1 muy elevados es 8 veces menor (9 años) que el observado en pacientes con baja o nula expresión de esta proteína (15 años).⁴⁸ Por otro lado, estudios *in vitro* de sobreexpresión y silenciamiento de PCLP1 en líneas celulares mamarias MCF-7 y MDA-MB-231, respectivamente, han determinado que PCLP1 incrementa la migración, invasión, formación de invadopodios, así como la expresión de las metaloproteinasas MMP1 y MMP9 y la actividad de MAPK y PI3K en células de cáncer de mama.^{59,84} Otro trabajo reciente muestra que la supresión de PCLP1 en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 inhibe profundamente la formación de tumores primarios y metástasis secundarias al transplantarlas en ratones.⁸⁵ Por todo ello, se ha señalado a PCLP1 como marcador pronóstico en pacientes con cáncer de mama.^{48,59,83}

2. SISTEMA INMUNITARIO

El sistema inmunitario está constituido por un conjunto de moléculas, células, tejidos y órganos que trabajan de forma coordinada en el mantenimiento de la homeostasis. Se trata de un sistema altamente especializado cuya función es reconocer y reaccionar frente a sustancias extrañas tales como virus, microorganismos patógenos, células transformadas y células dañadas, neutralizándolas a la vez que mantienen intactas las células sanas. Las células del sistema inmunitario se encuentran distribuidas en la sangre y la linfa, en órganos linfáticos y dispersas en prácticamente todos los tejidos. Su organización anatómica y capacidad de circular entre la sangre, la linfa y los tejidos son dos características de vital importancia para la generación de la respuesta inmunitaria. Cuando las células inmunitarias detectan un antígeno desencadenan una serie de procesos fisiológicos, moleculares y celulares para eliminarlo. En función del tipo de respuesta, históricamente se han distinguido dos tipos de inmunidad, «innata o propia» y «adaptativa o específica», cuyos componentes se interrelacionan entre sí y se regulan para obtener una respuesta rápida y específica.

Las células que forman parte del sistema inmunitario provienen de un precursor hematopoyético común (HSC) presente en la médula ósea que da lugar a dos linajes diferentes en función de las citocinas y factores de crecimiento producidos en la zona. El linaje linfoide se diferencia para dar lugar a células linfocitarias, tales como linfocitos T, linfocitos B, células NK y células dendríticas (DCs).⁸⁶ Por otro lado, el linaje mieloide da lugar a los glóbulos rojos, plaquetas, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos), monocitos y DCs. Las células NK, DCs, macrófagos, granulocitos y mastocitos se engloban como células del sistema inmunitario innato y representan la primera línea de defensa frente a patógenos o a agentes extraños. Por el contrario, los linfocitos T, B y sus mediadores humorales (citocinas y anticuerpos) generan una respuesta específica de antígeno o adaptativa (Figura 3).

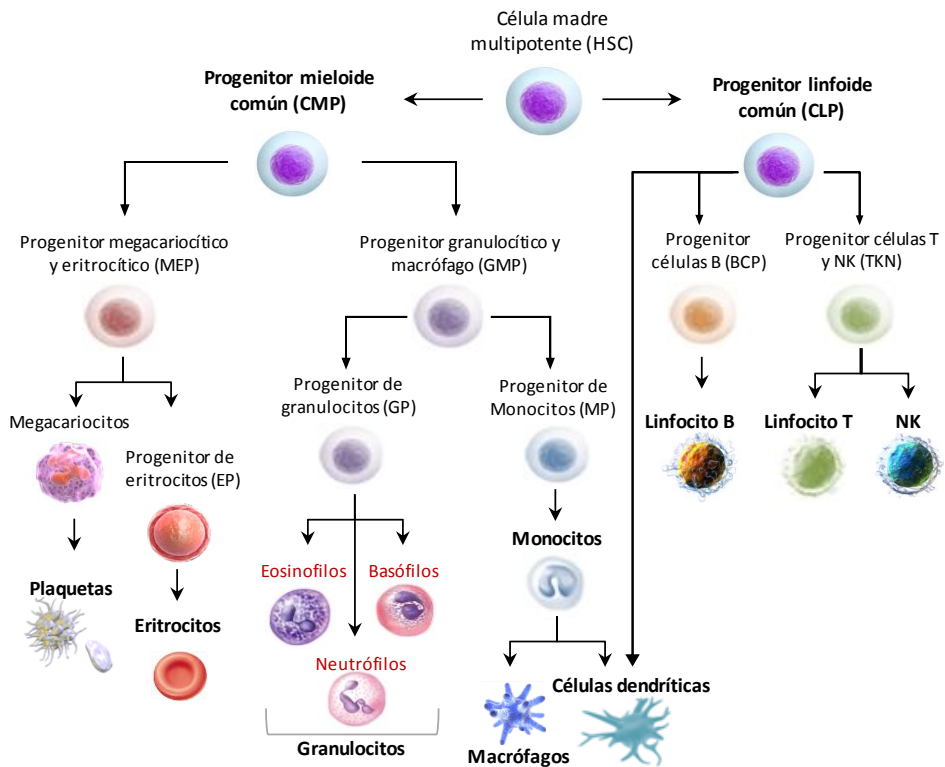


Figura 3. Hematopoyesis. En la médula ósea, la célula madre pluripotente da lugar a dos linajes denominados mieloide y linfoide. El linaje mieloide da lugar a los megacariocitos y plaquetas, eritrocitos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos) y monocitos. Los monocitos se diferencian finalmente a macrófagos y células dendríticas. Por otro lado, el linaje linfoide da lugar a los linfocitos B, T, células NK y a las células dendríticas.

A continuación se describen las células inmunitarias implicadas en mayor medida en la respuesta antitumoral, tales como las DCs, linfocitos T y células NK.

2.1. Células dendríticas

Las DCs son consideradas las células presentadoras de antígeno más potentes de la respuesta inmunitaria innata. Su principal función es la captura, procesamiento y posterior presentación antigénica a linfocitos T y B promoviendo su activación o tolerancia. Simultáneamente, las DCs producen citocinas y otras proteínas a través de las cuales modulan la respuesta inmunitaria y a su vez reconocen y eliminan de forma directa patógenos y células anormales.⁸⁷ Estas células se caracterizan por la ausencia de marcadores de linaje como CD14 (monocitos), CD3 (linfocitos T), CD19, CD20 y CD24 (linfocitos B), CD56 (células NK), por su elevada expresión en superficie de moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y por su morfología característica, la cual exhibe largas proyecciones membranosas y altas concentraciones de estructuras intracelulares relacionadas con el procesamiento antigénico.

Este tipo celular se encuentra ampliamente distribuido en tejidos y órganos linfáticos y no linfáticos formando un grupo heterogéneo que se clasifica en función de su localización, función y fenotipo. En la circulación sanguínea las células dendríticas representan del 0,5 al 2% de las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs). Estudios recientes afirman que las células dendríticas surgen tanto de progenitores mieloides como linfoides, distinguiéndose tres grupos principales: células dendríticas mieloides, células dendríticas plasmacitoides y células dendríticas derivadas de monocitos (MoDC).^{88,89} Las DCs mieloides son las más abundantes, representan el 80% de las DCs sanguíneas y se caracterizan por la expresión de CD11c. Esta subpoblación celular forma parte de las denominadas DCs convencionales, a las cuales se les atribuyen las funciones y estructura descritas anteriormente. Por otro lado, las DCs plasmacitoides aparecen en menor proporción y se designan por su morfología similar a células plasmáticas. Forman parte de las denominadas DCs no convencionales ya que sus funciones difieren de las habituales, son las principales células productoras de interferón (IFN) de tipo I, no son fagocíticas y son ineficientes

en la presentación antigénica. Las DCs plasmacitoides humanas se caracterizan por la expresión de CD123 (cadena- α del receptor IL-3) y no expresan CD11c.⁹⁰

Para desarrollar su función como presentadoras de antígeno, las DCs presentan dos estados funcionales: inmaduras (iDCs) o especializadas en capturar antígenos y maduras (mDCs) o especializadas en presentar antígenos. Habitualmente, las DCs permanecen en los tejidos periféricos en estado inmaduro, donde funcionan como centinelas que capturan antígenos y mantienen la tolerancia periférica. Para ello expresan moléculas de adhesión y receptores de quimiocinas como CCR1 y CCR5, presentan altos niveles de actividad endocítica, baja expresión de moléculas MHC en su superficie y capacidad inmunoestimuladora disminuida. La presencia de antígenos y estímulos patogénicos, inflamatorios o de daño tisular como IFN- α , CD40L, TNF- α , IL-1 o IL-6 o lipopolisacáridos (LPS) de bacteria o virus, activan a las iDCs finalizando la captura e iniciando la presentación antigénica. Este proceso conlleva la reorganización del citoesqueleto para expresar moléculas MHC unidas al péptido antigénico y receptores implicados en la migración a tejidos linfáticos (disminución de CCR1 y CCR5 y aumento de CCR7). Por último, la estimulación de las DCs incrementa la expresión de marcadores de superficie asociados a la maduración y activación de estas células, como las moléculas de adhesión CD54 y CD58 y las moléculas CD40, CD80, CD86 y CD83, implicadas en la estimulación de la respuesta inmunitaria (Tabla 2).⁹¹⁻⁹³

Tabla 2. Fenotipo de las DCs en función del estado de maduración.

	Marcadores	Localización	Función
iDC	<p>↑CCR1 y CCR3</p> <p>↓MHC, CD40, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86</p>	Migración hacia tejidos periféricos como piel, bazo, hígado, pulmón, corazón, riñón y mucosas	Captura antigénica
mDC	<p>↓CCR1 y CCR5</p> <p>↑MHC, CD40, CD54, CD58, CD80, CD83, CD86 y CCR7</p>	Migración hacia órganos linfáticos secundarios	Presentación antigénica

2.2. Linfocitos T

Los linfocitos T son los mediadores de la inmunidad celular. Sus precursores migran y maduran en el timo donde pueden permanecer, circular en sangre o residir en órganos linfáticos. Se caracterizan por la expresión en membrana del receptor de reconocimiento de antígenos (TCR), a través del cual reconocen fragmentos peptídicos derivados de antígenos extraños unidos a moléculas MHC o HLA (antígeno leucocitario humano), induciendo su activación y el inicio de la respuesta inmunitaria.⁹⁴

Los linfocitos T se definen por la expresión de la molécula de señalización CD3 y se clasifican principalmente en dos subtipos, en base a la expresión de las moléculas correceptoras de membrana CD4 y CD8. Los linfocitos CD4⁺, denominados linfocitos T cooperadores (Th), reconocen péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC de clase II. En cambio, los linfocitos T CD8⁺, o linfocitos T citotóxicos (CTLs), reconocen péptidos antigénicos presentados por moléculas MHC de clase I.⁹⁵ Los linfocitos T citotóxicos, como su nombre indica, son capaces de eliminar de forma directa las células tumorales mediante mecanismos de citotoxicidad. Por otro lado, los linfocitos T cooperadores tienen como función principal la modulación o amplificación de la respuesta inmunitaria a través de la secreción de citocinas. En función del estímulo los linfocitos Th pueden desarrollar subpoblaciones de linfocitos T que amplifiquen o regulen la respuesta inmunitaria. Los denominados linfocitos T reguladores (Tregs) componen una de las subpoblaciones de vital importancia en la respuesta antitumoral. Su desarrollo es esencial en la regulación de la respuesta inmunitaria y en la tolerancia ante antígenos propios. Actúan produciendo un exceso de citocinas supresoras, como TGF- β 1, que regulan la activación y función de linfocitos T y B. Las células Treg representan entre un 10 y un 15% del total de linfocitos CD4⁺ en humanos y se caracterizan por la expresión de CD4, CD25 y CD127 en su superficie y el factor de transcripción denominado FOXP3 que participa de forma directa en el desarrollo y función de esta subpoblación Treg.⁹⁶

2.3. Células NK

Los linfocitos citolíticos naturales o *Natural killer*, denominadas células NK, fueron identificadas en 1975 como linfocitos granulares capaces de lisar células tumorales y células infectadas en ausencia de sensibilización previa.⁹⁷ Representan menos del 1% de las células sanguíneas periféricas y entre un 5 y un 15% de los linfocitos totales. Se definen fenotípicamente como células $CD56^+CD3^-$ y se distribuyen mayoritariamente en sangre, tejidos linfáticos y bazo, y en menor medida en el hígado, cavidad peritoneal y placenta. Participan en la defensa frente a tumores e infecciones víricas mediante citotoxicidad directa o indirecta a través de la producción de citocinas y quimiocinas que modulan la respuesta inmunitaria.

Las células NK se desarrollan a partir de un precursor común a linfocitos T, que sufre diferenciación hacia un linaje T o NK en función del microambiente (Figura 2).⁹⁸ Dentro de las células NK sanguíneas, han sido identificadas dos subpoblaciones funcionales en base a los niveles de expresión de CD16 y CD56 en su superficie. Las células con altos niveles de expresión de CD56 y expresión baja o nula de CD16 se denominan NK $CD56^{\text{bright}}CD16^{\text{dim}}$ y representan entre el 10 y 20% de las células NK sanguíneas. Se caracterizan por ser una gran fuente de citocinas, pero muestran una menor capacidad citotóxica. El 80-90% restante pertenece a las células NK con una expresión moderada de CD56 y altos niveles de CD16 en su superficie, denominadas $CD56^{\text{dim}}CD16^{\text{bright}}$. Esta subpoblación desempeña un papel opuesto, es decir, una gran actividad citolítica y menor producción de moléculas inmunomoduladoras. Sin embargo, recientemente se ha descrito que después del reconocimiento tumoral son capaces de liberar grandes cantidades de citocinas y quimiocinas. Las células NK $CD56^{\text{bright}}$ prevalecen en tejidos linfáticos secundarios y se cree que dan lugar a las $CD56^{\text{dim}}$, que predominan en sangre periférica.^{99,100}

3. SISTEMA INMUNITARIO Y CÁNCER

Las células transformadas presentan ciertas alteraciones que son reconocidas por las células del sistema inmunitario. Los antígenos tumorales identificados se han clasificado en tres grupos principales en base a su patrón de expresión: específicos de tumores (TSA), asociados a tumores (TAA) y asociados a trasplante o inducidos por virus (TATA). Los antígenos exclusivos de tumores o TSA, surgen de mutaciones o translocaciones genéticas y están implicados directamente en la carcinogénesis. Los antígenos denominados TAA se expresan en células sanas, pero desencadenan respuesta inmunitaria por su expresión aberrante, regulación anómala o expresión en tejido o tiempo erróneos. Estos antígenos TAA incluyen antígenos de testículos y tejido placentario que se expresan en tumores epiteliales, proteínas sobreexpresadas como p53, ErbB2 y antígenos de diferenciación como el antígeno prostático específico (PSA).

3.1. Inmunovigilancia e immunoedición tumoral

En 1909, Paul Ehrlich fue el primero en introducir el concepto de inmunovigilancia,¹⁰¹ sugiriendo el papel del sistema inmunitario en el control del cáncer. Varios años después, Lewis Thomas y Frank Macfarlane Burnet demostraron que las células efectoras inmunitarias, principalmente las células NK y los linfocitos T, son capaces de monitorizar, reconocer y eliminar células transformadas o evitar su desarrollo inicial.^{102,103} Prueba de ello es que los ratones inmunodeficientes se encuentran más predispuestos a desarrollar tumores que los ratones inmunocompetentes, obteniendo unos tumores más inmunogénicos.¹⁰⁴ Estas evidencias ponen de manifiesto la capacidad del sistema inmunitario no sólo para proteger al huésped de la formación y desarrollo tumoral, sino también para modular la inmunogenicidad del tumor.¹⁰⁵ De aquí surgió el concepto de immunoedición introducido por Dunn y colaboradores, el cual sostiene que el sistema inmunitario participa en la formación y crecimiento del tumor mediante la selección de las variantes menos inmunogénicas, permitiendo la supervivencia tumoral en un

ambiente inmunológico intacto.¹⁰⁶

El proceso de inmunoección, en el que se encuentran implicadas células inmunitarias, células tumorales y células del microambiente tumoral, consta de tres fases: eliminación, equilibrio y escape (Figura 4). En primer lugar se desarrolla la fase de eliminación, donde el sistema inmunitario detecta la presencia de tumores y trata de eliminarlos. Esta fase se completa cuando todas las células tumorales han sido suprimidas. De no ser así, comienza la fase de equilibrio, donde el sistema inmunitario contiene la extensión tumoral sin erradicarla. En esta etapa se alcanza un balance dinámico entre las células tumorales y el sistema inmunitario, que puede ser de larga duración. Durante esta fase de equilibrio, la presión ejercida por el sistema inmunitario aumenta la heterogenicidad tumoral, surgiendo nuevas células tumorales con diferentes mutaciones o características que les proporcionan a estas células una mayor resistencia al ataque inmunitario. Esta adquisición de nuevas variantes tumorales podría favorecer el escape tumoral, donde las células tumorales comenzarían a crecer sin ninguna restricción inmunológica.¹⁰⁷ Recientemente se ha propuesto la “teoría de la inmunidad discontinua”,¹⁰⁸ la cual puntualiza que las células NK responden a las alteraciones tumorales iniciales pero se vuelven tolerantes a la exposición continua, mostrando una respuesta citotóxica reducida. En este sentido, varios estudios han demostrado que las células NK aisladas del infiltrado tumoral o de sangre periférica de pacientes con cáncer presentan una citotoxicidad significativamente reducida y que la exposición antigénica crónica puede tener como consecuencia una citotoxicidad defectuosa de las células NK.^{109,110}

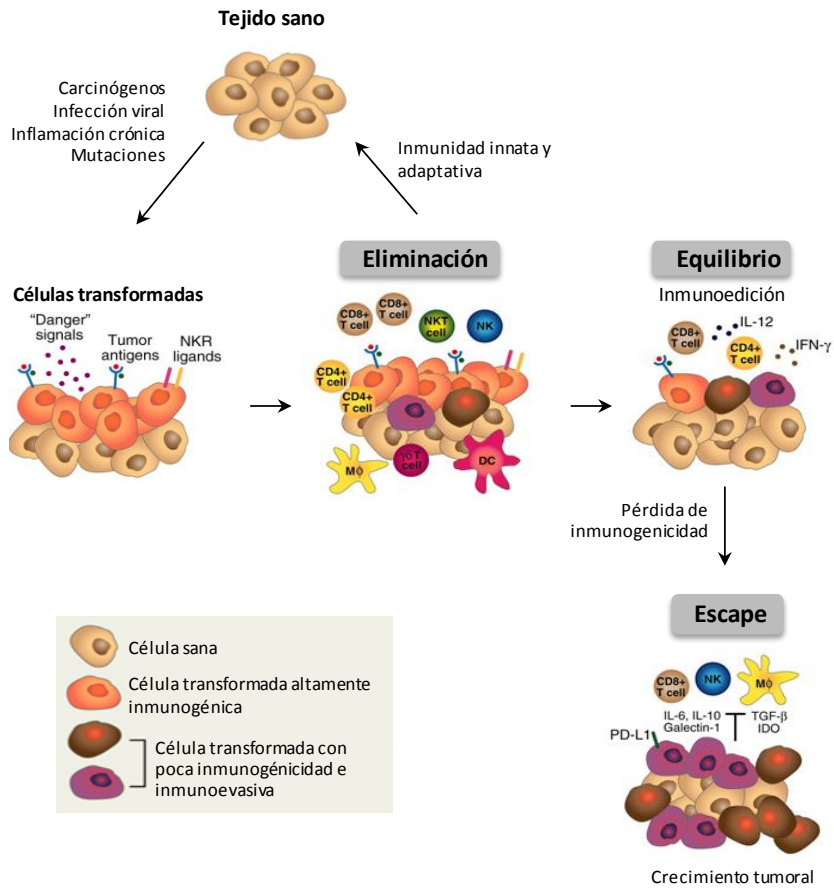


Figura 4. Proceso de immuoeedición del cáncer por las células inmunitarias efectoras. Fases que componen el proceso de immuoeedición tumoral: eliminación, equilibrio y escape. Adaptada de (Schreiber R.D y cols., 2011)¹⁰⁷.

4. CÉLULAS NK Y CÁNCER

Varios estudios han atribuido a las células NK un papel esencial en la protección frente a tumores.¹¹¹⁻¹¹³ Uno de ellos muestra que ratones carentes de células NK presentan mayor incidencia de cánceres espontáneos, metástasis y defectos en la citotoxicidad.

4.1. Reconocimiento tumoral

A diferencia de otros linfocitos, las células NK utilizan un sistema de reconocimiento altamente específico arbitrado por multitud de receptores que inducen señales de activación e inhibición celular.¹¹⁴ Los receptores inhibidores reconocen moléculas presentes en células sanas previniendo la respuesta frente a estas células. Por otro lado, los receptores de activación reconocen moléculas inducidas por estrés celular que se encuentran en la superficie de células transformadas. El estado de activación de la célula NK se encuentra determinado por la integración de las señales generadas por los receptores activadores e inhibidores, de forma que, si las señales de activación superan a las de inhibición, se iniciará la respuesta citotóxica. De esta manera, las células NK son capaces de reconocer variaciones en moléculas de superficie promovidas por la transformación celular, como la pérdida de marcadores propios o el aumento o aparición de antígenos tumorales. En células sanas, la expresión de MHC de clase I induce la transmisión de señales inhibitoras al interior de la célula NK y, por tanto, resistencia a la lisis por las células NK, lo que evita su destrucción (Figura 5a).¹¹⁵ En cambio, la reducción o ausencia de MHC propio como consecuencia de la transformación maligna provoca la lisis de las células tumorales por las células NK al no recibir señales inhibitoras (Figura 5b). Este mecanismo de reconocimiento fue originalmente propuesto por Kärre y colaboradores y se conoce como la hipótesis de la pérdida de lo propio (*missing self hypothesis*).¹¹⁶ Asimismo, la activación de las células NK inducida por el reconocimiento de moléculas sobreexpresadas en las células tumorales se designó como la hipótesis de la inducción de lo propio (*induced-self hypothesis*) (Figura 5c).¹¹⁷

Adicionalmente, la presencia de citocinas como IL-1, IL-2, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21 y IFN- γ tipo I y quimiocinas es esencial para la estimulación de la respuesta antitumoral por parte de las células NK.¹¹⁸

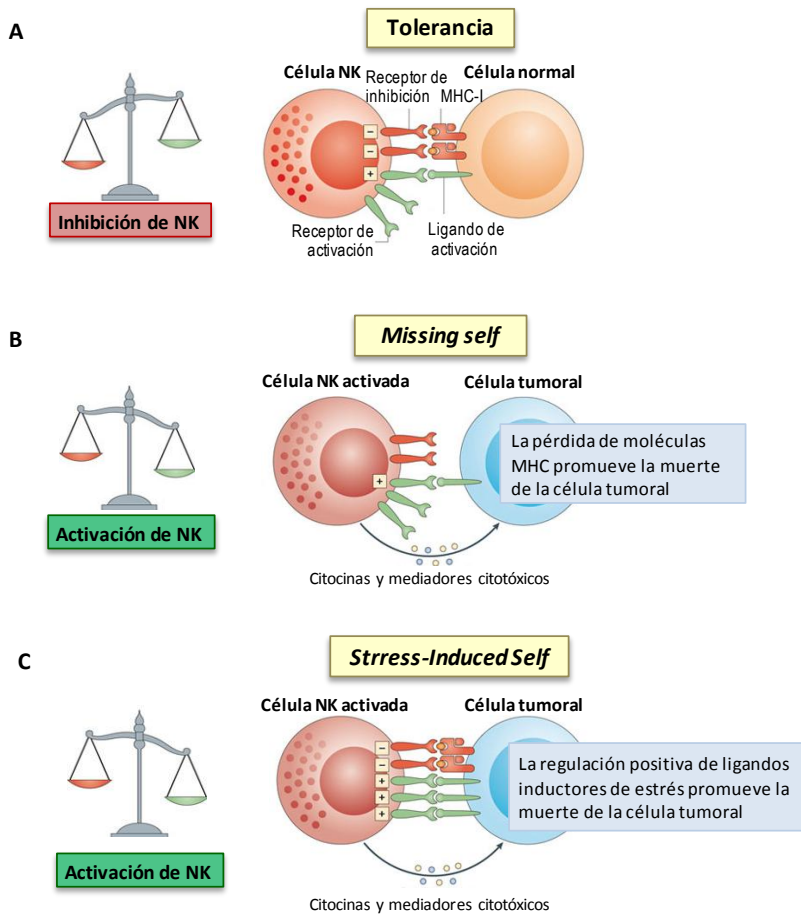


Figura 5. Sistema de reconocimiento de las células NK. Los receptores expresados por las células NK son capaces de activar o inhibir la respuesta de las células NK después de interactuar con sus ligandos específicos en la célula diana. **A)** Tolerancia: La célula sana presenta ligandos propios que inhiben a la célula NK. **B)** Hipótesis de *Missing Self* o pérdida de lo propio: activación de la célula NK debido a la pérdida de marcadores propios en la célula diana transformada. **C)** Hipótesis de *Stress-induced Self* o inducción de lo propio: el proceso de transformación induce la expresión de moléculas antigénicas en la superficie de células diana, lo que promueve la señal activadora en la célula NK. Adaptada de (Vivier E y cols., 2012)¹¹⁷.

Los receptores de células NK estudiados hasta la fecha pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas o de las lectinas tipo C (Ig), cuyos ligandos sólo se conocen parcialmente. Para ejercer su efecto inhibitorio o activador, estos receptores desencadenan una señalización intracelular basada en la fosforilación de quinasas tirosina que se agrupan formando unos dominios conocidos como estructuras tirosínicas de inhibición o activación del receptor inmunitario (ITIMs o ITAMs). Estas estructuras son necesarias para el progreso o contención de la respuesta antitumoral y se localizan en la cola citoplásmica de los receptores de inhibición o en proteínas adaptadoras unidas a receptores de activación (Figura 5).

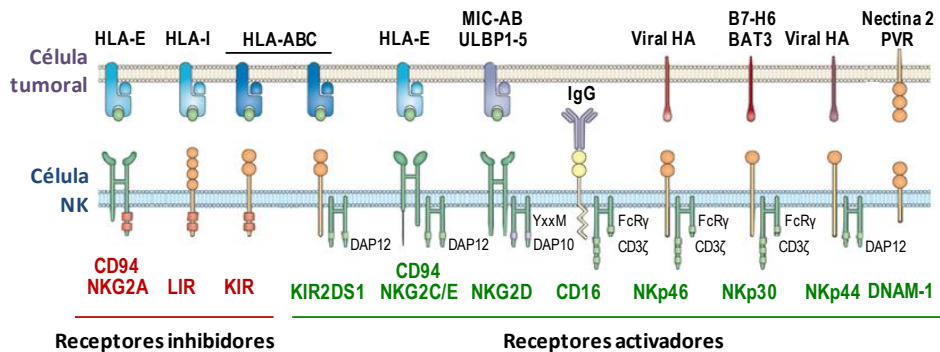


Figura 6. Receptores activadores e inhibidores expresados en la superficie de células NK y sus respectivos ligandos expresados en las células diana.

4.1.1. Receptores de inhibición

Los receptores de inhibición son moléculas altamente polimórficas que reconocen moléculas MHC de clase I y se expresan de forma dominante respecto a los receptores de activación para prevenir la destrucción de las células sanas autólogas.¹¹⁹ Estos receptores actúan inhibiendo la citotoxicidad y la producción de citocinas mediante el reclutamiento de fosfatasas de tirosina intracelulares.^{120,121} Los receptores inhibidores se componen de un amplio rango de moléculas cuyo mecanismo de acción no se ha establecido de forma clara. No obstante, se han definido tres grupos principales implicados en la inhibición de las células NK: los

receptores del tipo inmunoglobulina del linfocito citolítico (KIRs), los receptores leucocitarios del tipo inmunoglobulina (LIR) y el heterodímero denominado CD94/NKG2A.

Los receptores KIR son glicoproteínas de superficie celular muy diversas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas y que tienen como ligandos moléculas de MHC de clase I o HLA de clase I en humanos, como HLA-A, -B, -C y -G.¹²² Recientemente se ha determinado que algunos KIR carecen de motivo ITIM y generan señalización activadora a través de DAP12 y que otros subtipos KIR son capaces de desempeñar ambas funciones.¹²³ Por otro lado, los receptores LIR reconocen distintas moléculas de HLA clase I y el heterodímero CD94/NKG2A, perteneciente a la familia de las lectinas tipo C, se une a la molécula HLA-E.¹²⁴

4.1.2. Receptores de activación

Las células NK expresan un amplio rango de receptores de activación que han sido intensamente estudiados por su papel en la respuesta antitumoral. En su mayoría estas moléculas transmembrana presentan un corto dominio intracelular incapaz de desencadenar una señalización intracelular, por lo que se acoplan a moléculas adaptadoras como FcεRγ, CD3ζ, DAP10 o DAP12 en la región transmembrana. La fosforilación de estas proteínas adaptadoras promueve la asociación a proteínas intracelulares que inducen la estimulación de la función efectora de las células NK.¹²⁵ De entre los numerosos receptores activadores cabe destacar los siguientes: la molécula NKG2D, los receptores de citotoxicidad natural (NCR), el receptor CD16 y la molécula accesoria de la molécula DNAX1 (DNAM-1).

NKG2D es una glicoproteína transmembrana de tipo II que genera respuestas citotóxicas a través de la unión a la proteína adaptadora DAP10. La fosforilación de DAP10 recluta varias moléculas de señalización que inducen la polimerización del citoesqueleto de actina, la maduración de la sinapsis citolítica y la lisis de la célula diana.¹²⁶ La importancia de NKG2D en la eliminación y prevención de la progresión tumoral ha sido considerada en estudios *in vivo*, donde se ha descrito que la

neutralización de este receptor aumenta la incidencia de tumores en ratones y que su señalización a través de DAP10 es suficiente para la inducción de la citotoxicidad aunque deficiente para la producción de citocinas como IFN- γ .^{127,128}

Los ligandos de NKG2D conocidos hasta la actualidad en humanos son proteínas transmembrana de tipo I altamente polimórficas pertenecientes al grupo de moléculas MHC no clásicas. De entre ellos cabe destacar la secuencia polipeptídica A/B relacionada con MHC de clase I (MIC-AB) y las proteínas de unión a la proteína UL-16 (ULBPs).^{129,130} Pese a que dichos ligandos presentan una expresión tisular restringida a ciertos tipos de células normales, su expresión puede ser inducida por señales de estrés celular como estrés oxidativo¹³¹ y elementos transcripcionales de choque térmico (HSP70, *heat shock protein 70*)¹³² o moléculas que causan daño al ADN como es el caso de la radiación ionizante, el cisplatino, la afidicolina, la mitomicina C o la hidroxiurea.¹³³

Los receptores NCR constituyen un grupo de proteínas estructuralmente diferentes pero todas ellas pertenecientes a la superfamilia de inmunoglobulinas. Los receptores NKp46 (NCR1 o CD335) y NKp30 (NCR3 o CD337) actúan a través de las moléculas adaptadoras CD3 ζ o Fc ϵ R γ I y el receptor NKp44 (NCR2 o CD336) se asocia a la molécula adaptadora DAP12 para transmitir la señal activadora.¹³⁴⁻¹³⁶ Estos receptores cooperan entre sí induciendo la citotoxicidad frente a una gran variedad de células diana, siendo el receptor NKp46 el que mayor respuesta citotóxica genera.¹³⁷ Los ligandos tumorales reconocidos hasta la fecha comprenden los heparan sulfatos, el transcrito 3 asociado a HLA-B (BAT3) y el miembro de la familia B7 denominado B7-H6, ambos presentes en la superficie de las células tumorales.¹³⁸⁻¹⁴⁰

Fc γ RIIIa o CD16 se trata de un receptor ampliamente conocido por su papel en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).¹⁴¹ Dicho receptor reconoce la región Fc (fragmento constante de las inmunoglobulinas), de forma que permite detectar células diana recubiertas por anticuerpos. Cuando esto ocurre, el CD16 desencadena la señalización intracelular a través de cadenas CD3 ζ y Fc ϵ R γ I resultando en la activación de las células NK. De hecho, se ha observado que las

diferencias en los niveles de expresión de CD16 tienen consecuencias funcionales para la ADCC de las células NK.^{142,143}

DNAM-1 o CD226, es una molécula transmembrana que promueve la adhesión celular, la secreción de citocinas y la apoptosis de células diana. Presenta una cola citoplásmica con lugares de fosforilación a través de la cual lleva a cabo dichas funciones. Sus ligandos, la nectina 2 (CD112) y el receptor de poliovirus (PVR) o CD155, se encuentran altamente expresados en células tumorales.¹⁴⁴⁻¹⁴⁶

4.1.3. Otros receptores

Se han descrito otros receptores que participan en la respuesta de las células NK, sin embargo aun no está claro su papel en la respuesta inmunitaria. Un ejemplo de ello son los receptores CD94/NKG2C,E,¹⁴⁷ NTB-A¹⁴⁸ y 2B4 O CD244,¹⁴⁹ los cuales pueden presentar una función activadora e inhibidora. Además, si bien los receptores descritos son suficientes para llevar a cabo la señal de activación, su actividad puede ser regulada de manera positiva por la acción de otros receptores como CD54 (ICAM-1),¹⁵⁰ CD69,¹⁵¹ CD49f,¹⁵² CD18 y CD11b.¹⁵³ Aunque el modo de acción de dichos receptores en las células NK no ha sido determinado en profundidad, se cree que actúan como co-estimuladores de la respuesta inmunitaria de las células NK.

4.2. Sinapsis inmunológica

El reconocimiento de la célula tumoral por parte de la célula NK requiere una unión estable que permita la interacción entre ambos tipos celulares. La sinapsis inmunológica es una estructura micrométrica compleja que favorece la unión de los receptores a sus ligandos, permitiendo la comunicación entre células NK y células tumorales. La formación de la sinapsis inmunológica es un proceso secuencial que conlleva la adhesión, reorganización del citoesqueleto y segregación de receptores de membrana hacia la zona de la sinapsis. Inmediatamente después de la reorganización, los receptores se concentran formando grupos de activación supramolecular (SMACs), de forma que los receptores activadores, inhibidores y co-estimuladores se aglutinan

en un SMAC central y las moléculas de adhesión e integrinas se concentran en un SMAC periférico favoreciendo una unión estable entre ambos tipos celulares. Una de las principales moléculas implicadas en el ensamblaje y formación de la sinapsis es el antígeno asociado a la función linfocitaria tipo 1 (LFA-1 o CD11a), que media la polimerización de F-actina. Posteriormente, la señalización generada por los receptores de activación e inhibición determinará la respuesta final llevada a cabo por la célula NK. De este modo, si la respuesta es inhibidora la señalización de LFA-1 queda reprimida y si la respuesta es activadora se estimula la polimerización de los microtúbulos.¹⁵⁴ Esta polimerización favorece el tráfico de vesículas hacia diferentes zonas: las vesículas que contienen gránulos citotóxicos son dirigidas hacia la zona de sinapsis y las vesículas que contienen citocinas se distribuyen a cualquier punto de la membrana celular.¹⁵⁵

Durante la sinapsis inmunológica se produce una transferencia bidireccional de moléculas y fragmentos de membrana entre las células NK y células diana.^{156,157} Este proceso, denominado trogocitosis, ocurre poco después de la formación de conjugados y se cree que puede contribuir al mantenimiento de la sinapsis inmunológica con el objetivo de recuperar la membrana perdida durante la exocitosis.¹⁵⁸ Pese a que aún no se han establecido con detalle las consecuencias de este intercambio de fragmentos, recientemente se ha descrito la trogocitosis como un mecanismo de control de la respuesta inmunitaria a través de la modificación de las características funcionales de la célula receptora.¹⁵⁹⁻¹⁶²

4.3. Respuesta antitumoral

La capacidad de las células NK para eliminar las células transformadas se encuentra determinada por cuatro vías principales 1) la exocitosis de gránulos citotóxicos que inducen la necrosis y apoptosis tumoral; 2) la expresión de ligandos de receptores de muerte que culminan en la apoptosis tumoral; 3) la liberación de citocinas que estimulan la respuesta antitumoral de las propias células NK y de otros

componentes del sistema inmunitario; 4) la ADCC mediada por el receptor CD16/Fc γ R1IIa.

4.3.1. Secreción de gránulos citotóxicos

El mecanismo más potente de lisis tumoral utilizado por las células NK es la secreción de gránulos citotóxicos que contienen proteínas citotóxicas como perforina y granzimas hacia la célula tumoral. La perforina forma un poro en la célula tumoral que permite el paso de las granzimas al citoplasma de la célula diana. Por un lado, en respuesta al calcio, la perforina polimeriza y forma poros acuosos, que pueden provocar la pérdida de estabilidad osmótica y muerte de la célula tumoral.^{163,164} Por otro lado, las granzimas inducen la apoptosis en la célula tumoral mediante la activación de caspasas o a través de una ruta independiente de ellas.¹⁶⁵

4.3.2. Ligandos de receptores de muerte

En la superficie de las células NK se expresan ligandos de receptores de muerte que, al reconocer el receptor específico en la célula tumoral, desencadenan la cascada apoptótica que induce la muerte tumoral. Estos ligandos pertenecen a la superfamilia de receptores para el factor de necrosis tumoral (TNF), de entre los que destacan el ligando de inducción de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL) y el ligando de Fas (FasL o CD95L).^{166,167} TRAIL se expresa en células NK tras estimulación con IL-2, IL-15 o IFN- γ ,¹⁶⁸ y FasL en respuesta a IFN- γ .¹⁶⁹ Por otro lado, los receptores de muerte pueden estar presentes tanto en las células tumorales como en las células inmunitarias, donde actúan regulando negativamente la respuesta inmunitaria. Es importante mencionar que no todos los receptores expresados en la célula tumoral son capaces de inducir apoptosis. Ciertos receptores denominados *decoy* o cebo actúan como reguladores al carecer del dominio funcional de muerte necesario para desencadenar la apoptosis y actúan inhibiendo esta vía por unión competitiva o formando hetero-complejos con los receptores funcionales.^{170,171}

La apoptosis inducida tanto por las granzimas como por los complejos de receptores de muerte comienza con la activación o escisión de las caspasas 8 y 10, que pueden desencadenar la apoptosis a través de la vía intrínseca o extrínseca. La vía extrínseca escinde de forma directa las caspasas efectoras 3, 6 y 7 que conducen a la fragmentación del ADN. La vía intrínseca o mitocondrial activa las caspasas efectoras a través del daño a la mitocondria, donde participan proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas de la familia del Bcl-2 (oncogén de un linfoma de linfocitos B).¹⁷²

4.3.3. Secreción de citocinas: IFN- γ y TNF- α

Las principales citocinas producidas por las células NK en respuesta a células tumorales son el interferon de tipo I γ (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α). La activación de las células NK induce la secreción de estas moléculas que participan en la eliminación de las células tumorales de forma directa o a través de la modulación de la respuesta inmunitaria.^{173,174} Las células NK producen grandes cantidades de IFN- γ , lo cual regula positivamente la expresión de quimiocinas que atraen células inmunitarias a la zona, activa a los macrófagos, promueve la maduración de las DCs y la diferenciación de los linfocitos Th o CD4⁺.¹⁷⁵⁻¹⁷⁷ Asimismo, las propias células NK son estimuladas por el IFN- γ secretado, induciendo la expresión de moléculas de adhesión y receptores de muerte como TRAIL que potencian la respuesta antitumoral.^{178,179} Al igual que IFN- γ , la molécula TNF- α es un regulador de la señalización inmunitaria que participa en el reclutamiento de células NK, aunque principalmente induce la muerte tumoral a través de la apoptosis mediada por caspasas.¹⁸⁰⁻¹⁸²

4.3.4. Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos

Tal y como se ha explicado en el apartado 4.1.2, la interacción del receptor CD16 con la región Fc de las inmunoglobulinas presentes en la superficie de células tumorales, desencadena la respuesta citotóxica de las células NK frente a las células tumorales.

5. MECANISMOS DE EVASIÓN INMUNITARIA

Los tumores han desarrollado numerosos mecanismos para eludir su reconocimiento y eliminación por las células del sistema inmunitario. Estos mecanismos pueden surgir de mutaciones y/o factores ambientales como citocinas, moléculas de estrés o agentes quimioterapéuticos, así como debido a la presión ejercida sobre el tumor durante el proceso de inmunovigilancia. La supresión activa de la respuesta inmunitaria por las células tumorales ha sido confirmada mediante estudios tanto *in vitro* como *in vivo*.¹⁸³⁻¹⁸⁶ A continuación, se describen las estrategias más destacadas desarrolladas por varios tipos de tumores, incluido el cáncer de mama, para eludir la respuesta de las células NK, linfocitos T citotóxicos y DCs.

5.1. Mecanismos de evasión de la respuesta de células citotóxicas

Las células tumorales presentan la habilidad de pasar desapercibidas ante las células inmunitarias citotóxicas modificando la expresión de moléculas en superficie o de resistir al ataque ejercido por estas células.

5.1.1. Ignorancia inmunológica

Durante el proceso de inmunoección actúan de forma complementaria las células NK, que forman parte de la respuesta innata, y los CTLs, que forman parte de la respuesta adaptativa. Como se ha mencionado anteriormente, ambos tipos celulares comparten receptores de activación como NKG2D y DNAM-1 pero difieren en el mecanismo de reconocimiento tumoral. Mientras que los CTLs reconocen el péptido antigénico presentado por las moléculas HLA de clase I (alteración de lo propio), los receptores activadores e inhibidores de las células NK permiten a éstas células reconocer la pérdida de moléculas HLA clase I inducida por la transformación celular de forma independiente al antígeno presentado (pérdida de lo propio). Este reconocimiento diferencial permite controlar el desarrollo tumoral a través de dos vías, la adaptativa y la innata. No obstante, las células tumorales son capaces de evitar

el reconocimiento por parte de estas células modificando la expresión de moléculas presentes en su superficie.

Por un lado, la alteración de la expresión de moléculas HLA clase I ha sido referida como un mecanismo de evasión tumoral en variedad de cánceres. En cáncer de mama la disminución de la expresión de HLA clase I favorece el escape tumoral a la respuesta mediada por CTLs.¹⁸⁷ De forma opuesta, el aumento de HLA clase I favorece el escape tumoral a la respuesta mediada por las células NK, ya que actúa como ligando de receptores inhibidores como KIR.¹⁸⁸⁻¹⁹¹ Por otro lado, la modulación de la expresión de ligandos de los receptores activadores NKG2D y DNAM-1 contribuye al escape tumoral frente a las células NK y está ampliamente descrita en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de mama.¹⁹² La disminución de los niveles de expresión en superficie de ligandos como MIC y/o ULBP puede ser debido a una regulación negativa,¹⁹³⁻¹⁹⁵ a una liberación mediante exosomas^{196,197} o a un proceso de solubilización mediado por proteasas.^{198,199} En este sentido, la liberación de ligandos como MIC y ULBP2 se ha detectado en el suero de pacientes con cáncer y se considera un factor de pronóstico desfavorable.^{200,201} La unión de ligandos solubles o presentes en exosomas a sus receptores activadores presentes en células citotóxicas contribuye al bloqueo de estos receptores y enmascaramiento del tumor. De hecho, se ha observado que esta unión puede tener como consecuencia una disminución en la expresión de NKG2D en las células NK y CTLs del infiltrado tumoral.²⁰²⁻²⁰⁵ Por lo tanto, estos mecanismos generan una deficiente activación y maduración de las células NK, que tiene como resultado una menor respuesta citotóxica frente a las células tumorales.²⁰⁶

5.1.2. Resistencia a la apoptosis

Las células tumorales tienen la habilidad de evitar la muerte inducida por las células citotóxicas a través del bloqueo de la respuesta antitumoral mediada por gránulos citotóxicos, por receptores de muerte y/o ADCC.¹⁷⁰ Diversos estudios muestran una amplia variedad de mecanismos, desde la obstaculización de la unión de la perforina a la membrana celular,²⁰⁷ la sobreexpresión de moléculas inhibitoras

de granzima B y perforina como PI-9 o SPI-6 (inhibidor de proteasa 9 o de serina proteasa 6),²⁰⁸ la inhibición de la ADCC mediada por la expresión de la mucina MUC1 en el tumor,^{209,210} hasta la modulación de la expresión de receptores de muerte. La resistencia a la apoptosis mediada por receptores de muerte es una característica muy común en tumores y se manifiesta mediante varias alteraciones, tales como la modulación en la expresión, solubilización y generación de exosomas ricos en receptores de muerte o la expresión tumoral de formas mutadas inactivas de receptores de muerte como TRAIL-R1 y TRAIL-R2, o receptores que no inducen señalización de muerte como TRAIL-R3 y TRAIL-R4, también denominados receptores decoy, DcR1 y DcR2, respectivamente. Estas variaciones pueden interferir en el grado de respuesta citotóxica contribuyendo al escape tumoral.²¹¹⁻²¹⁴

Por otro lado, las células tumorales han desarrollado la capacidad de resistir de manera intrínseca a la apoptosis mediante mutaciones o expresión reducida de moléculas proapoptóticas,²¹⁵⁻²¹⁷ aumento de la expresión de moléculas antiapoptóticas²¹⁸⁻²²² o a través de la interrupción de la interacción y formación de sinapsis entre la célula citotóxica y la célula tumoral,²²³ entre otros. Estas modificaciones tienen como consecuencia una respuesta limitada a la quimioterapia y una menor supervivencia de pacientes con cáncer.²²⁴

5.2. Mecanismos de alteración del desarrollo de células inmunitarias

Tanto los cambios fenotípicos de las células tumorales como las moléculas presentes en el microambiente tumoral, entre las que se incluyen IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, TNF- α , TGF, indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), prostaglandina E2 (PGE2), metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs) o el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), pueden alterar el desarrollo de linfocitos T, células NK y DCs.^{225,226}

5.2.1. Alteración de las células NK

Al igual que en otras malignidades, en pacientes con cáncer de mama metastásico se ha descrito un deterioro importante en el número, maduración y

función citotóxica de células NK.¹⁹² Las células NK del microambiente tumoral presentan una expresión de receptores de superficie modificados con una función y maduración disminuidas comparadas con las células NK circulantes. Ciertos estudios revelan que durante la progresión del cáncer se regula de manera negativa la expresión de receptores activadores y de manera positiva la expresión de inhibidores en células NK, teniendo como consecuencia una alteración de las funciones antitumorales.²²⁷⁻²³¹ Como se ha mencionado anteriormente, esta regulación puede ser inducida por moléculas expresadas en la superficie de tumores, como ligandos tumorales, o por cambios en la expresión de glucolípidos y glucoproteínas.²³² Por otro lado, la secreción de moléculas inmunomoduladoras por parte del tumor puede alterar el fenotipo y función de las células NK, participando en la progresión tumoral en pacientes con cáncer de mama. Un claro ejemplo es el TGF- β , que afecta de forma específica a la función antitumoral de las células NK a través de la regulación negativa de la expresión de receptores de como NKp30 y NKG2D, FasL, CD16, moléculas adhesión, así como la producción de granzimas e IFN- γ .²³³⁻²³⁵ Por último, ciertas publicaciones sugieren que la activación tumoral de las células NK conlleva una posterior fatiga y regulación negativa de receptores citotóxicos.^{109,236}

5.2.3. Alteración del desarrollo de linfocitos T

Una gran variedad de tumores presentan mecanismos capaces de alterar el desarrollo y proliferación de las diferentes subpoblaciones linfocitarias. Las moléculas más importantes involucradas en la inhibición del desarrollo de la respuesta de linfocitos T pertenecen a la familia de CD28 e incluyen a la proteína de muerte programada (PD-1), el antígeno 4 del linfocito T citotóxico (CTLA-4) y el coestimulador inducible (ICOS).²³⁷ Actualmente estas moléculas están siendo objeto de numerosos estudios, ya que la unión de estos receptores con sus ligandos presentes en la célula tumoral conduce a la apoptosis de linfocitos T y a la estimulación de señales antiapoptóticas en las células tumorales. Asimismo, la expresión de sialoglucanos como GD1A en la superficie tumoral modula negativamente la activación y maduración de linfocitos T.^{238,239}

Por otra parte, algunos tumores favorecen el desarrollo de subpoblaciones inmunosupresoras, como los linfocitos Tregs. La presencia de esta subpoblación se ha relacionado con la progresión del cáncer y la metástasis dado que suprime la activación, proliferación y funciones efectoras de un amplio rango de células inmunitarias, incluidos los linfocitos Th, CTLs, células NK y DCs.²⁴⁰⁻²⁴² Varios trabajos han puesto de manifiesto el incremento de Tregs en sangre periférica y en el microambiente tumoral con capacidad para inhibir de manera específica la respuesta antitumoral, lo que se ha asociado a un peor pronóstico en pacientes con cáncer, incluido el carcinoma mamario.²⁴³⁻²⁴⁵

5.2.4. Alteración del desarrollo de células dendríticas

Uno de los mecanismos críticos de escape tumoral de la inmunovigilancia consiste en la inducción de la disfunción de DCs por parte del tumor. Las células malignas producen un exceso de factores inmunosupresores capaces de afectar a las DCs, ejerciendo efectos sistémicos en la función inmunitaria.²⁴⁶ En pacientes con cáncer, incluido el de mama, se han detectado alteraciones tanto en el número de DCs presentes en sangre y en el microambiente tumoral como en el estado madurativo de estas DCs.²⁴⁷⁻²⁵⁰ Además de estas moléculas, se ha determinado que los gangliósidos y mucinas presentes en la membrana de células tumorales pueden contribuir a la inmunosupresión mediante la alteración de la proliferación y diferenciación de DCs.²⁵¹⁻²⁵³

5.2.5. Citocinas inflamatorias: TGF- β 1 e IL-4

Las citocinas inflamatorias presentes en el microambiente tumoral juegan un papel importante en la patogénesis del cáncer de mama, dado que su expresión aumentada está relacionada con el mayor grado tumoral y el potencial metastásico. Estas citocinas pueden ser liberadas tanto por las células tumorales como por los linfocitos T o células NK infiltrantes. Dentro de las citocinas inflamatorias destacan el TGF- β 1 y la IL-4, que participan en la progresión tumoral presentando funciones opuestas dependiendo del contexto o de la fase en la que se encuentre el tumor.

Durante las fases tempranas del desarrollo tumoral el TGF- β puede actuar como una molécula supresora de tumores, mediante el control de la proliferación, diferenciación, apoptosis, adhesión, invasión y microambiente celular. Sin embargo, TGF- β es expresado en elevados niveles en cánceres metastásicos, donde incrementa la movilidad e invasión celulares, induce el proceso invasivo de EMT y estimula la evasión inmunitaria de las células tumorales.²⁵⁴ Como se ha mencionado anteriormente, TGF- β ejerce su efecto inmunosupresor en el desarrollo, maduración y función de varias células inmunológicas como DCs, linfocitos T y células NK contribuyendo al escape tumoral. Asimismo, se ha descrito que altas concentraciones de TGF- β promueven la expansión de Tregs a partir de Th (CD4⁺).²⁵⁵ Estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran que la expresión de TGF- β 1 en la zona tumoral se asocia a un pronóstico desfavorable en varios cánceres, entre los que se encuentra el de mama.²⁵⁶⁻²⁵⁸

La molécula TGF- β puede presentar tres isoformas TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, que inducen la señalización celular a través de los receptores tipo I y tipo II (TGF β -RI y TGF β -RII) presentes en la membrana de las células tumorales, siendo TGF- β 1 la forma comunmente sobreexpresada en células tumorales. La señalización desencadenada por la unión de TGF- β 1 a sus receptores puede darse a través de rutas dependientes o independientes de las proteínas denominadas Smad. En los últimos años se ha tratado de averiguar cuáles son las vías de señalización implicadas en la progresión tumoral y, pese a que aún no se han esclarecido, varios indicios apuntan a que se encuentran involucradas rutas independientes de Smad.²⁵⁹ En células de cáncer de mama MCF-7, se ha observado una activación sostenida de rutas independientes de Smad en respuesta a TGF- β 1,²⁶⁰ las cuales participan en la progresión metastásica mediante la inducción de EMT y la migración celular.^{259,261}

Se han descrito varias rutas independientes de Smad (Figura 7): 1) una vía que implica la activación de PI3K y la proteína quinasa B (Akt), que activa las respuestas de transducción mediante mTOR; 2) la ruta ERK1/2, que es activada a través de las proteínas Grb2, Ras y Raf; 3) y la vía JNK/p38, que incluye la quinasa N-terminal c-Jun

y p38.²⁶² Estas dos últimas vías, tanto la ruta ERK como la JNK/p38, activan MAPK, regulan la apoptosis, contribuyen a la EMT y pueden participar en la fosforilación de las moléculas de la ruta SMAD.²⁶³⁻²⁶⁵ Por el contrario, la ruta PI3K/Akt puede inhibir la ruta Smad y participa en la reorganización de actina y en el proceso de EMT.²⁶¹ En células de cáncer de mama MDA-MB-231, MAPK regula la expresión de metaloproteinasas de matriz MMP contribuyendo a la invasión.²⁶⁶

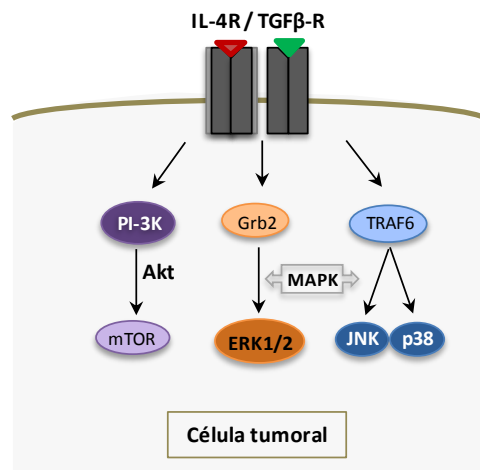


Figura 7. Cascadas de señalización implicadas en la progresión tumoral inducidas por TGF-β1 e IL-4. En color morado se muestra la ruta PI3k y Akt que se inicia posiblemente por la subunidad p85 de PI3K y controla las respuestas de transducción mediante mTOR. En color naranja se presenta la ruta ERK1/2 que se activa mediante el reclutamiento de proteínas como Grb2, entre otras. En azul se muestra la ruta de activación de las moléculas JNK y p38 mediada por TRAF6.

Por otro lado, la citocina IL-4 puede ser producida por las propias células cancerígenas y actuar de forma autocrina o puede ser secretada por los linfocitos T y B, monocitos, basófilos, mastocitos y células NK.²⁶⁷ Pese a que varios estudios atribuyen una función antitumoral a esta molécula,²⁶⁸⁻²⁷⁰ existen numerosos trabajos que exponen la participación de IL-4 en la progresión tumoral.²⁷¹⁻²⁷⁵ De hecho, se ha descrito que IL-4 favorece el escape inmunitario a través de la alteración del desarrollo y función de los linfocitos T, disminuyendo la citotoxicidad de los CTLs o promoviendo la resistencia a la apoptosis mediada por CD95.²⁷⁶⁻²⁷⁹ La señalización intracelular inducida por IL-4 incluye la ruta que implica a las proteínas STAT y ciertas rutas de señalización involucradas en la progresión tumoral y compartidas con TGF-β1, como ERK1/2, PI3K y p38 MAPK (Figura 7).^{273,280-282}

II. OBJETIVOS

Los antecedentes descritos sugieren que PCLP1 podría expresarse y desempeñar una función en células del sistema inmunitario, a la vez que ponen en evidencia el papel crucial de esta proteína en la progresión del cáncer. La expresión de PCLP1 en los tipos de cáncer más agresivos y su posible función inmunomoduladora en células mesenquimales sugieren que esta proteína podría participar en la evasión tumoral de la vigilancia inmunológica a través de la inhibición de la respuesta inmunitaria y promover de este modo la progresión del cáncer metastásico. Por esta razón, se hace necesario comprender la función de PCLP1 tanto en homeostasis como en situaciones de malignidad.

El objetivo general del presente trabajo es determinar el papel de PCLP1 en el desarrollo de la respuesta inmunitaria celular tanto en condiciones no patológicas como en condiciones de malignidad. En este marco, los objetivos específicos son:

1. Determinar la expresión y función de PCLP1 en células del sistema inmunitario en condiciones no patológicas.
2. Analizar el papel de PCLP1 expresada en células de cáncer de mama sobre la respuesta inmunitaria mediada por células NK, así como por DCs y linfocitos T.
3. Identificar los factores que participan en la regulación de la expresión de PCLP1 en células de cáncer de mama.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS

1.1. Células primarias

Las células inmunitarias utilizadas en este estudio fueron obtenidas a partir de muestras de sangre periférica de donantes sanos que leyeron y firmaron el consentimiento correspondiente autorizado por el Comité Ético de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital-Universitario Cruces. Las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) fueron separadas mediante centrifugación en gradiente de densidad (Lymphoprep™, Axis-Shield, Noruega) y cultivadas en un incubador saturado de humedad a 37°C y 5% de CO₂. Para la conservación de las células durante largos periodos de tiempo se almacenaron en nitrógeno líquido en medio de cultivo RPMI-1640 GlutaMAX™ (Lonza, Basilea, Suiza) suplementado con 10% (v/v) de suero bovino fetal (FBS, Lonza), 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomina (Lonza) y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich, San Luis, EUA). Una vez descongeladas las PBMC, se aislaron las siguientes poblaciones:

1.1.1. Monocitos

Los monocitos se aislaron mediante separación inmunomagnética por selección negativa con el kit *Dynabeads® Untouched™ Human Monocytes* (Thermo Fisher, Madrid, España), según las indicaciones del fabricante. La pureza de los monocitos aislados se midió por citometría de flujo analizando el porcentaje de células positivas para el receptor CD14 (CD14⁺), obteniéndose valores superiores al 95%. Para la obtención de MoDCs, se cultivaron los monocitos purificados durante 6 días (2x10⁶ monocitos en placas de 24 pocillos) en medio de cultivo AIM-V (Thermo Fisher) libre de suero, suplementado con 800 U/ml de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) y 400 U/ml de IL-4 humana recombinante (ambos de Preprotech, Nueva Jersey, EUA). Al finalizar los 6 días de incubación se obtuvieron DCs inmaduras (iDCs) definidas como CD14⁻DR^{low}. La maduración de las iDCs se indujo añadiendo al medio de cultivo 100 ng/ml de LPS de *Escherichia coli*

(Sigma), ácido poliinosínico-policitídílico (poli I:C) (Sigma) o un cóctel de citocinas que incluye TNF- α , IL-6, IL-1 β a una concentración de 20 ng/ml cada una de ellas (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemania) y PGE2 1 μ M (Sigma). Tras 24 horas de incubación, se obtuvieron células dendríticas maduras (mDCs) definidas como CD14⁻ DR^{high}CD83⁺.

1.1.2 Células dendríticas de sangre periférica

Se aislaron mediante separación inmunomagnética por selección negativa usando el kit *Dynabeads® Human DC Enrichment Kit* (Thermo Fisher), según las recomendaciones del fabricante. La pureza de la población se determinó por citometría de flujo empleando el cóctel de linaje (Lin1, BD Biosciences, San José, EUA) y determinando el porcentaje de células CD19⁻CD14⁻CD16⁻CD20⁻CD56⁻HLADR⁺ para el cual se obtuvo un valor superior al 90%. Con el objeto de distinguir las subpoblaciones sanguíneas se analizó la expresión de CD11c y CD123 presentes en DCs mieloides y DCs plasmacitoides respectivamente.

1.1.3. Células NK

Las células NK se obtuvieron mediante separación inmunomagnética por selección negativa con el kit de aislamiento *Dynabeads® Untouched™ Human NK Cells* (Thermo Fisher), siendo el porcentaje de células NK (CD3⁻CD56⁺) obtenidas superior al 95%. La activación de las células NK se llevó a cabo cultivando 4x10⁶ células en 1 ml de RPMI completo suplementado con 200 U/ml de IL-2 humana recombinante (Miltenyi Biotec) durante 4 días en placas de 24 pocillos.

1.1.4. Linfocitos T

Se aislaron mediante separación inmunomagnética por selección negativa utilizando el kit *Dynabeads® Untouched™ Human T Cells* (Thermo Fisher). La pureza obtenida mediante el marcaje con el anticuerpo anti-CD3 fue superior al 98%.

1.2. Líneas celulares

Para el estudio de la función de PCLP1 en el cáncer de mama se emplearon las líneas celulares MCF-7 (HTB-22TM) y MDA-MB-231 (HTB-26TM). La línea celular MCF-7 proviene de un carcinoma ductal invasivo metastásico originario de una efusión pleural de una mujer de 69 años de edad. MCF-7 expresa marcadores de fenotipo epitelial luminal A (PR⁺, ER⁺ y HER2⁻) y suele utilizarse como modelo de cáncer de mama ER⁺. Esta línea celular expresa niveles bajos-moderados de PCLP1. Por el contrario, la línea celular MDA-MB-231 expresa altos niveles de PCLP1 endógena, proviene de una efusión pleural de adenocarcinoma metastásico de mama humano y presenta un fenotipo basal (ER⁻, PR⁻ y HER2⁻) altamente invasivo tanto en ensayos *in vitro* como en modelos *in vivo*. Se utiliza como modelo de cánceres negativos para ER y HER2.

Ambas líneas celulares fueron obtenidas de *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, EUA) y cultivadas en medio DMEM completo, compuesto por DMEM (*Dulbecco's Modified Eagles' Medium*, Gibco[®], Thermo Fisher) suplementado con 1% de la solución de aminoácidos no esenciales (MEM-NEAA, Gibco[®]), 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina. Estas líneas celulares adherentes se cultivaron de forma rutinaria en frascos ventilados de poliestireno de 25 cm² (Corning, Nueva York, EUA) en un incubador saturado de humedad a 37°C y 5% de CO₂. Para despegar las células del frasco durante el subcultivo se utilizó una solución con 0,25% de tripsina y 0,2% de ácido etildiaminotetraacético (EDTA, Sigma). No obstante, previo al co-cultivo con células linfocitarias, las células tumorales se levantaron empleando la solución AccutaseTM (BD Biosciences), que presenta menor toxicidad celular.

1.2.1. Transfección de la línea celular MCF-7

Las células MCF-7 fueron transfectadas con el vector eucariótico de expresión pEGFP-N1 nativo que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) o con el vector que porta una secuencia de ADN que codifica la proteína PCLP1 humana fusionada con GFP (PCLP1-GFP) (cedidos por el Dr. R. Parrilla, del Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC). Ambos vectores de expresión co-expresan un marcador de selección que confiere resistencia a la geneticina (G418, Sigma).

La transfección estable de la línea celular MCF-7 se realizó mediante nucleofección, empleando el aparato Nucleofector® y el kit de Nucleofección™ de líneas celulares de Amaxa® (Lonza), siguiendo las indicaciones del proveedor. Para ello, se resuspendieron 2×10^6 células en 100 μ l de la solución de nucleofección (Nucleofector® Solution V), se añadieron 2 μ g del ADN plasmídico y se sometieron al programa predeterminado P-20 del Nucleofector. Después de un lavado para eliminar los restos celulares, las células transfectadas se cultivaron en medio de cultivo DMEM completo. Transcurridas 24 horas tras el inicio de la transfección, se adicionó el antibiótico geneticina a una concentración de 800 μ g/ml para la selección de clones estables. Una vez aislados los clones, se expandieron y finalmente se verificó la expresión de la proteína de fusión PCLP1-GFP o de GFP mediante citometría de flujo, *Western Blot*, RT-qPCR y microscopía de fluorescencia, tal y como se detalla en la sección 2 de *Material y métodos*.

Los clones obtenidos, denominados MCF7-Ctrl y MCF7-PCLP1, fueron cultivados y congelados de forma rutinaria en medio DMEM completo con 400 μ g/ml de G418. Sin embargo, en ensayos funcionales que requirieron la co-incubación de las células MCF7 con células inmunitarias el medio selectivo fue sustituido por medio DMEM completo sin G418.

2. TÉCNICAS UTILIZADAS

2.1. Citometría de flujo

2.1.1. Detección de moléculas de superficie celular

Para la determinación de moléculas de superficie celular mediante citometría de flujo se llevaron a cabo los siguientes pasos. En primer lugar se lavaron las células por centrifugación a 437g para el estudio de células vivas y a 778 g para el estudio de células muertas con tampón fosfato salino (PBS, Gibco) durante 5 minutos. Posteriormente se incubaron entre 100.000 y 200.000 células resuspendidas en un volumen de 100 µl de una solución compuesta por PBS, 0,1% de albúmina de suero bovino (BSA, Roche, Basilea, Suiza) y 0,01% de azida sódica (Merck, Nueva Jersey, EUA) (PBS-BSA-Az) con 20 µg/ml de IgG humana (Sigma) durante 15 minutos a temperatura ambiente para bloquear las uniones inespecíficas de los anticuerpos a los receptores Fc de membrana. Inmediatamente después del bloqueo, se incubaron las células con concentraciones saturantes de anticuerpos específicos marcados con fluorocromos (Tabla 3) durante 30 minutos a 4°C, se lavaron con PBS y se fijaron con 1% de formaldehído en PBS durante 30 minutos a 4°C. Una vez lavadas las células, se resuspendieron en 400-600 µl de PBS para el análisis citofluorimétrico.

Para la detección de las moléculas indicadas en cada caso, se realizó un marcaje indirecto doble o triple para amplificar la señal. Para el marcaje indirecto doble, las células se incubaron con un anticuerpo primario sin marcar seguido de un anticuerpo secundario conjugado con un fluorocromo. En el marcaje indirecto triple, las células se incubaron con un anticuerpo primario sin marcar seguido de un anticuerpo secundario conjugado con biotina y, finalmente, con estreptavidina conjugada con un fluorocromo.

2.1.2. Detección de moléculas intracelulares

La determinación de proteínas intracelulares se realizó fijando y permeabilizando las células con anterioridad al marcaje con anticuerpos. Las células se fijaron con 1% de paraformaldehído (Sigma) en PBS durante 15 minutos y, después de un lavado con PBS, se permeabilizaron con 0,1% de saponina (Sigma) y 0,1% de BSA en PBS durante 15 minutos. Después de dos lavados con PBS, las células se marcaron como se ha descrito anteriormente.

2.1.3. Anticuerpos empleados

Tabla 3. Anticuerpos y fluorocromos empleados en los ensayos de citometría de flujo.

Anticuerpo	Fluorocromo conjugado	Clon	Compañía	Concentración (v/v)
Anti-CD3	PE, APC	SK7	BD Biosciences	0,2 µl/ml
Anti-CD4	APC	SK3	BD Biosciences	0,2 µl/ml
Anti-CD8	PE/Cy7	SK1	BD Biosciences	0,2 µl/ml
Anti-CD11b	PE	ICRF44	BioLegend	0,3 µl/ml
Anti-CD11c	PE/Cy7	3.9	BioLegend	0,5 µl/ml
Anti-CD123	PE/Cy7	6H6	BioLegend	0,5 µl/ml
Anti-CD14	FITC	MφP9	BD Biosciences	0,5 µl/ml
Anti-CD16	PE, PE/Cy7	3G8	BD Biosciences	0,5 µl/ml
Anti-CD18	PE	TS1/18	BioLegend	0,3 µl/ml
Anti-CD19	FITC	SJ25C1	BD Biosciences	
Anti-CD20	FITC	L27	BD Biosciences	
Anti-CD25	PE/Cy7	2A3	BD Biosciences	0,5 µl/ml
Anti-CD40	PE	SC3	BioLegend	0,5 µl/ml
Anti-CD45	PE, APC, APC-H7	HI30, HI30, 2D1	BD Biosciences	0,15 µl/ml
Anti-CD49f	PE	GoH3	BioLegend	0,5 µl/ml
Anti-CD54	PE	HCD54	BioLegend	0,5 µl/ml
Anti-CD56	FITC, APC, PerCP-Cy5.5	NCAM 16.2, HCD56	BioLegend	0,25 µl/ml
Anti-CD69	PE	L78	BD Biosciences	0,3 µl/ml
Anti-CD80	PE	2D10	BioLegend	0, 5µl/ml
Anti-CD83	PE	HB15e	BioLegend	0,5 µl/ml
Anti-CD86	PE	IT2.2	BioLegend	0,5 µl/ml
Anti-CD95 (Fas)	APC	DX2	BD Biosciences	0,3 µl/ml
Anti-CD112 (Nectina 2)	PE	TX31	BioLegend	0,3 µl/ml

Anti-CD155 (PVR)	PE	SKII.4	BioLegend	0,3 µl/ml
Anti-CD206	PE	C068C2	BioLegend	0,5 µl/ml
Anti-CD226 (DNAM-1)	PE	TX25	BioLegend	0,3 µl/ml
Anti-CD253 (TRAIL)	PE	RIK-2	BioLegend	0,3 µl/ml
Anti-CD314 (NKG2D)	PE	1D11	BioLegend	0,3 µl/ml
Anti-CD337 (NKp30)	PE	P30-15	BioLegend	0,3 µl/ml
Anti-CD335 (NKp46)	PE	9E2	BioLegend	0,3 µl/ml
Anti-CD336 (NKp44)	PE	P44-8	BioLegend	0,3 µl/ml
Anti-FOXP3	PE	206D	eBiosciences	1 µl/ml
Anti-HLA-ABC	PE	G46-2.6	BD Biosciences	0,5 µl/ml
Anti-HLA-DR	PerCP	L243	BioLegend	0,25 µl/ml
Anti-HLA-E	PE	3D12	Inmunostep	0,25 µl/ml
Anti-HLA-G	PE	87G	Inmunostep	0,25 µl/ml
Anti-IFN-γ	PE-Vio770™	45-15	Milteny Biotec	0,2 µl/ml
Anti-MIC-AB	PE	6D4	BD Biosciences	0,2 mg/ml
Anti-mouse IgG (Goat)	PE		BioLegend	Control
Anti-mouse IgG1	PE	MOPC-21	BioLegend	Control
Anti-mouse IgG2a	-	MG2a-53	BioLegend	Control
Anti-PCLP1	(-)/ PE	222328	R&D Systems	0,25 µg/ml
Anti-PCLP1	PE	53D11	MBL	0,1 µl/ml
Anti-PCLP1	Biotina	Policlonal	R&D Systems	0,5 µg/ml
Anti-Perforina	PE	dG9	BioLegend	0,3 µl/ml
Anti-TNF-α	APC	cA2	Milteny Biotec	0,2 µl/ml
Anti-ULBP1	-	170818	R&D Systems	0,25 µl/ml
Anti-ULBP3	-	166510	R&D Systems	0,25 µl/ml
Anti-ULBP4 (RAET1E)	-	709116	R&D Systems	0,25 µl/ml
Anti-ULBP2/5/6	-	165903	R&D Systems	0,1 µl/ml

Fluorocromo	Compañía	Dilución final
7-AAD (7 Aminocinomicina D, Via-Probe™)	BD Biosciences	0,3 µl/ml
CFSE (carboxi-fluorescein-succinilmidil éster)	Thermo Fisher	8,5 µM
CMTMR (5-(-6)-((4-clorometil) Benzoil)amino) tetrametilrodamina)	Thermo Fisher	10 µM

* Control: Se emplearon concentraciones equivalentes del anticuerpo específico y de su respectivo control isotópico.

*BioLegend, San Diego, EUA. Immunostep, Salamanca, España. R&D Systems, Mineapolis, EUA. MBL, Nagoya Aichi, Japón. eBioscience, San Diego, EUA.

2.1.4. Estrategia de análisis

La adquisición y el análisis de las muestras se realizó en los citómetros de flujo digitales Cytomics FC500 y Navios (ambos de Beckman Coulter, Barcelona, España) utilizando sus respectivos softwares y el software de análisis FlowJo (Tree Star, Ashland, EUA). Por cada muestra se adquirió un mínimo de 10.000 eventos y las células muertas se excluyeron mediante marcaje con 7-AAD.

La población de interés se separó en función del tamaño, rugosidad, presencia de marcadores propios y ausencia de marcadores específicos de otras células. Una vez seleccionada la población se analizaron los datos como porcentaje de células que expresan una determinada molécula o como mediana de fluorescencia (MFI) del anticuerpo unido a la molécula de interés. La fluorescencia negativa se determinó analizando la expresión del control isotópico del anticuerpo para la molécula de estudio en presencia de todos los fluorocromos excepto el de interés, lo que se denomina control de fluorescencia menos uno (FMO).

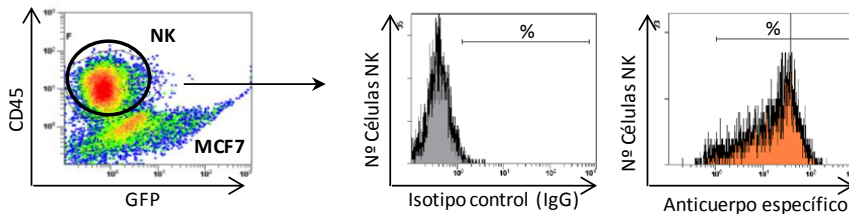


Figura 8. Estrategia de análisis para la detección de moléculas presentes en las células NK. Selección de la población de interés, células NK, en base al marcaje GFP⁺CD45⁺ y análisis de la expresión de receptores con anticuerpos específicos. Los datos se muestran como la mediana de la fluorescencia (MFI) del anticuerpo objeto de estudio corrigiéndola con la expresión de su respectivo control isotópico.

2.2. Western blot

Para la detección de proteínas mediante *Western blot*, en primer lugar se procedió a la obtención del extracto proteico mediante la incubación de 2×10^6 células en 100 μ l de tampón de lisis compuesto por 1% de IGEPAL® CA-630 (Sigma), Tris-HCL 20 mM, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, ajustado a un pH 7,4, al que se adicionó un cóctel inhibidor de proteasas al 5% (v/v) (Sigma) y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, Sigma) 1 mM. El extracto celular de cada muestra se incubó con el tampón de lisis durante 30 minutos a 4°C y el lisado celular resultante se centrifugó a 13.000 g durante 20 minutos a 4°C. Esta centrifugación permite eliminar los restos celulares particulados y obtener un sobrenadante con el lisado celular, que se almacenó a -80°C para su posterior uso. La concentración proteica de cada muestra se cuantificó por triplicado empleando el kit *Pierce™ BCA Protein Assay* (Thermo Fisher) basado en el método del ácido bicinconínico o BCA. Mediante concentraciones conocidas de BSA se estableció la recta de calibrado que permite calcular la absorbancia correspondiente a la concentración proteica de la muestra. La absorbancia se midió en un espectrofotómetro POLARstar® Omega (BMG Labtech, Alemania).

En segundo lugar, se sometieron cantidades equivalentes de muestra (20-70 μ g) a electroforesis en geles de poliacrilamida NuPAGE Bis-Tris al 10% o 4-12% (Invitrogen™, Thermo Fisher) en condiciones desnaturalizantes y reductoras a un voltaje continuo de 180 V durante 1 hora, usando una cubeta *X Cell SureLock®* (Thermo Fisher) e incluyendo un marcador de peso molecular (*Novex Protein Standard*, Thermo Fisher). A continuación, las proteínas del gel fueron transferidas a una membrana de PVDF mediante el sistema de transferencia en seco *iBlot® Dry Blotting System* (Thermo Fisher).

Una vez realizada la transferencia de proteínas, se bloqueó la membrana con 1% de BSA en tampón TBST (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM y 0,1% (v/v) de Tween 20) durante 1 hora a temperatura ambiente y a continuación se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-PCLP1 3D3 (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) diluido en tampón de bloqueo a una concentración de 1 μ g/ml durante

toda la noche a 4°C. Después de varios lavados se incubaron las membranas con un anticuerpo secundario anti-IgG (H+L) de ratón conjugado con peroxidasa de rábano (Bio-Rad, Madrid, España) diluido 1/5000 en tampón TBST con 5% de leche desnatada (Sveltesse, Nestlé) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, y tras sucesivos lavados, la inmunoreacción se detectó por quimioluminiscencia con el kit *Supersignal West Femto* (Thermo Fisher) y se visualizó con el sistema de imagen G:BOX y su programa de análisis Gene Snap (Syngene, Cambridge, Reino Unido). Como control de carga proteica, se analizó la expresión de GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) con un anticuerpo específico (clon 6C5, Ambion®, Thermo Fisher) a una concentración de 10 ng/ml.

2.3. RT-qPCR

Para el análisis del nivel de expresión de ARN mensajero (ARNm), se extrajo el ARN total correspondiente a 10⁶ células utilizando el sistema de aislamiento de NucleoSpin® miRNA (Macherey-Nagel, Düren, Alemania). La concentración y calidad del ARN extraído se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific, Wilmington, EUA). Los niveles de ARNm se calcularon mediante RT-PCR cuantitativa en un solo paso utilizando el sistema *Platinum Quantitative RT-PCR ThermoScript One-step System* (Thermo Fisher) según las instrucciones del fabricante. Los ensayos se realizaron por triplicado en placas de 96 pocillos, en un volumen final de 10µl y con la proporción de reactivos que se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4. Reactivos incluidos en cada reacción de RTq-PCR (Thermo Fisher Scientific).

Reactivos	Descripción	Volumen (µl)
ARN	Muestra a 100 ng/µl	2
Polimerasas	<i>ThermoScript™ Plus Reverse Transcriptase</i> (RT) <i>Platinum® Taq DNA Polymerase</i>	0,2
Tampón de reacción	<i>ThermoScript™ Reaction Mix</i> que incluye: - MgSO4 6 mM - dNTPs 0,4 mM	5
Sonda RPLPO	Fluorescencia VIC®	0,5
Sonda de interés	Fluorescencia FAM™	0,5
ROX	Fluorescencia interna de referencia	0,2
H ₂ O		1,6

En este ensayo se utilizaron sondas de hibridación TaqMan® específicas de secuencia con una señal fluorescente concreta. La sonda específica para el gen de la proteína ribosomal RPLP0 utilizado como control endógeno se encuentra marcada con un fluorocromo VIC® y la sonda específica para el gen de interés con 6-FAM™ (6-carboxi-fluoresceína) como fluorocromo, tal y como se detalla en la Tabla 5.

Tabla 5. Sondas específicas utilizadas para la técnica de RTq-PCR (IDT, San José, EUA).

ARN	ID	Secuencia (5'-3')	KDa
PCLP1	NM_001018111	Sonda: 56-FAM/CCGCTGCTG/ZEN/GTCCTTCCTCT/3IABkFQ	7,409
		Cebador 1: CATCATCACCATCGTCTGCAT	6,302
		Cebador 2: AACCATCTCCACTGTCTGC	5,988
HLA-A	NM_002116	Sonda: 56-FAM/CTCTCCCA/ZEN/CGCTGACCTGTGCC/3IABkFQ	8,02
		Cebador 1: CTCAGCCACCTCTCT	5,002
		Cebador 2: ACCTGCATGTGTCTGTGTTT	6,09
HLA-B	NM_005514	Sonda: 56-FAM/TCAGCATGG/ZEN/GAACAGGGGTAC/3IABkFQ	8,231
		Cebador 1: AAAGATGACTGGGAGGAAC	6,577
		Cebador 2: CAAAGGCACCTGAATGTGTC	6,126
HLA-C	NM_002117	Sonda: 56-FAM/TGAGAGACT/ZEN/CATCAGAGCCCTGGG/3IABkFQ	8,825
		Cebador 1: CATCTCAGTCCCACACAGG	5,717
		Cebador 2: AGGAAGACTCAGGTGGAA	5,95
HLA-E	NM_005516	Sonda: 56-FAM/TCCTCCATA/ZEN/TCACAGCAGCAACCAC/3IABkFQ	8,92
		Cebador 1: TCCCTCCTTTCCACCTGA	5,625
		Cebador 2: GTCACCCTGAGATGGAAGC	5,837
HLA-G	NM_003960994	Sonda: 56-FAM/CGGAATGAA/ZEN/GACGCCAAGGATGGT/3IABkFQ	8,898
		Cebador 1: CGCTGAAATACCTCATGGAGT	6,43
		Cebador 2: GGAATCACACGAAACTTAGG	6,464
MIC-A	NM_001177519	Sonda: 56-FAM/AAGACTGTG/ZEN/GGGCTCAGCAGC/3IABkFQ	7,918
		Cebador 1: GAAACCTGACTGCACAGAT	6,095
		Cebador 2: CATCTCCCTTTTGCACCT	5,929
MIC-B	NM_005931	Sonda: 56-FAM/CCGCTGAGC/ZEN/CCCACAGTCT/3IABkFQ	7,131
		Cebador 1: GAAACCTGACTGCACAGAT	6,095
		Cebador 2: TCGCCTTCCCTTTTGCAC	5,352
ULBP1	NM_025218	Sonda: 56-FAM/AAGCGGGAG/ZEN/GCACAGAAGGAA/3IABkFQ	8,009
		Cebador 1: CATGATGAAGTCATAGCAAAGACA	7,442
		Cebador 2: GCTCCAGGTCTACAATGGC	5,788
ULBP2	NM_025217	Sonda: 56-FAM/ACAGCCACC/ZEN/ACCCTCATCCTTTG/3IABkFQ	8,286
		Cebador 1: TCCTCAGATGCCAGGGA	5,185
		Cebador 2: ATGGACAGCACCTGGA	5,204

Las reacciones de RTq-PCR se llevaron a cabo en un termociclador ABI PRISM 7900 HT (Applied Biosystems, Madrid, España) usando el programa SDS 2.4. Las condiciones térmicas de la amplificación incluyeron una incubación inicial a 50°C, seguida por 10 minutos a 95°C y 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. El análisis cuantitativo se realizó a través del método $\Delta\Delta C_t$ utilizando el programa de análisis RQ Manager v.1.2 (Applied Biosystems).

2.4. Microscopía de fluorescencia

Con el objeto de analizar la expresión de PCLP1 en MoDCs, se prepararon cubreobjetos de cristal recubiertos con fibronectina (Sigma) a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ en placas de 24 pocillos. Sobre los cubreobjetos se añadieron 10^5 células en 1 ml de medio AIMV y se incubaron a 37°C durante 15 minutos para promover la adherencia celular al sustrato. A continuación, se fijaron las células con 3,7% de paraformaldehído en PBS durante 15 minutos a 4°C. Después de un lavado con PBS, se permeabilizaron las células con 0,5% de saponina en PBS durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras bloquear las células con 1% de BSA en PBS durante 1 hora a 37°C, se incubaron con un anticuerpo policlonal anti-PCLP1 hecho en cabra (R&D Systems) a una concentración de 4 $\mu\text{g/ml}$ en 0,1% de BSA en PBS durante 2 horas a 4°C. Una vez lavadas con PBS, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-IgG de cabra marcado con Cy2 (cianina-2, Jackson Immunoresearch, Pensilvania, EUA) a una dilución 1:300 en 0,1% de BSA en PBS durante 1 hora a 37°C. Finalmente, se tiñeron los núcleos con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) a una dilución 1:3000 en PBS y se montaron las muestras sobre un portaobjetos con medio de montaje para fluorescencia (*Fluorescence Mounting Medium*, Dako, Barcelona, España).

El análisis de las muestras se realizó en un microscopio de fluorescencia invertido Nikon Eclipse TE2000-E empleando un objetivo 60X de inmersión en aceite. Las imágenes fueron capturadas con una cámara digital CCD ORCA-ER (Hamamatsu, Shizuoka, Japón) y el programa de adquisición NIS-Elements (Nikon, Tokio, Japón).

3. ENSAYOS FUNCIONALES

Las co-incubaciones entre células tumorales y células inmunitarias se realizaron a 37°C y 5% de CO₂ en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% (v/v) de FBS, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

3.1. Estudio de la citotoxicidad tumoral mediada por las células NK

Las células NK activadas con 200 U/ml de IL-2 se sometieron a un gradiente de ficoll para eliminar las células muertas. Por otro lado, las células tumorales se marcaron con CFSE 1 µM durante 10 minutos, seguido de un lavado con medio de cultivo RPMI completo durante 45 minutos para eliminar el exceso de fluorocromo. A continuación se mezclaron 10⁵ células tumorales en 500 µl de medio RPMI completo con las células NK en una relación célula efectora: célula tumoral (E:T) de 2:1 o 3:1. Para favorecer el contacto celular, se realizó una centrifugación a 300 g durante 1 minuto y se co-incubaron durante 4 horas. Al finalizar la incubación, se marcaron las células con 7-AAD para determinar las células muertas y con el anticuerpo anti-CD45 conjugado con PE como marcador de células NK.

Mediante citometría de flujo se seleccionaron las células tumorales en función del tamaño, rugosidad y fenotipo CD45⁻GFP⁺. Se determinó el porcentaje de células tumorales muertas o 7-AAD⁺ tanto en ausencia (muerte espontánea, Me) como en presencia (M) de células NK. La muerte celular mediada por las células NK (muerte por lisis, ML) se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ML} = \frac{(\% \text{ M} - \% \text{ Me})}{(100 - \% \text{ Me})} \times 100$$

3.2. Análisis de la regulación de la expresión de receptores de células NK

Las células NK previamente activadas con IL-2 se incubaron con las células MCF7-Ctrl o MCF7-PCLP1. La co-incubación se efectuó en placas de 24 pocillos en medio RPMI completo en presencia o ausencia de una cámara Transwell® (Corning®) que contiene una membrana semipermeable con poros de un tamaño de 0,4 micrómetros. Esta membrana evita el contacto directo entre las células tumorales dispuestas en el compartimento inferior de la cámara y las células NK depositadas en el compartimento superior, a la vez que permite el paso de factores solubles secretados por ambos tipos celulares. Una vez finalizada la incubación, se marcaron las células con 7-AAD, anti-CD45 conjugado con APC-H7 y anticuerpos conjugados con PE frente a los siguientes receptores: NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, DNAM-1, CD16, CD11b, CD18, CD56, CD49f, CD54, CD69. Por último, mediante citometría de flujo se determinó la expresión de cada uno de los receptores en la superficie de las células NK.

3.3. Determinación de la desgranulación de las células NK

La desgranulación de las células NK se determinó mediante el análisis de la expresión del marcador de desgranulación CD107a en la superficie celular por citometría de flujo. Para ello, se incubaron las células NK con las células tumorales en condiciones similares a las del ensayo de citotoxicidad, añadiendo los siguientes compuestos durante las 4 horas de incubación. Una vez alcanzada la primera hora de incubación se adicionaron 0,8 µl/ml del inhibidor del transporte de proteínas BD GolgiStpo™ (BD Biosciences), que contiene monensina para prevenir la acidificación de las vesículas endocíticas y la degradación o reinternalización de CD107a de la superficie celular. En la tercera hora de incubación se adicionó el anticuerpo anti-CD107a conjugado con PE o su respectivo IgG conjugado en PE. Al finalizar la incubación las células se marcaron las células con el anticuerpo anti-CD45 conjugado con APC-H7 y con 7-AAD. Además, se determinó la expresión intracelular de perforina empleando un anticuerpo específico conjugado con PE tras la permeabilización de la membrana celular (detallado en el apartado 2.1.2 de *Material y métodos*).

3.4. Detección de citocinas secretadas por las células NK

Para la determinación de las citocinas secretadas por las células NK durante el ensayo de citotoxicidad, se añadió el anticuerpo anti-CD107a conjugado con PE y el inhibidor de transporte de proteínas BD GolgiStpo™ dos horas antes de finalizar la incubación. Tras las 4 horas de incubación, se marcaron las células con 7-AAD y con los anticuerpos conjugados anti-CD56 FITC y anti-CD45 APC-H7. Después de la permeabilización celular con saponina (detallado en el apartado 2.1.2 de *Material y métodos*), se marcaron con los anticuerpos anti-TNF- α APC y anti-IFN- γ PE-Vio770™ para su determinación por citometría de flujo.

3.5. Determinación de la formación de conjugados

Las células NK recién aisladas se marcaron con el fluorocromo CMTMR a 10 μ M durante 45 minutos. Después de un lavado, se incubaron durante 30 minutos en medio RPMI completo para eliminar el exceso de fluorocromo. Posteriormente se mezclaron con las células MCF7-Ctrl y MCF7-PCLP1 en una relación de 3:1, se centrifugaron a 300 g durante 1 minuto para favorecer el contacto celular y se co-incubaron durante diferentes periodos de tiempo. Después de fijar las células, se determinó mediante citometría de flujo el porcentaje de conjugados expresado como el porcentaje de eventos doblemente positivos para CMTMR y GFP con respecto al total de eventos positivos para GFP.

3.6. Estudio de PCLP1 durante la formación de conjugados

La determinación de la expresión y localización de la proteína de fusión PCLP1-GFP en los conjugados formados por células MCF7 y células NK se realizó mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo. Para ello se incubaron ambos tipos celulares en una relación (E:T) de 2:1 durante diferentes periodos de tiempo. Para su visualización por microscopía de fluorescencia, las incubaciones se realizaron durante 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos sobre cubreobjetos de cristal recubiertos con 0,1 mg/ml de poli-D-lisina (Sigma). Tras un lavado con PBS, las células se fijaron con

3,7% de paraformaldehído en PBS durante 10 minutos a 4°C. Después de un lavado con PBS, se tiñeron con DAPI diluido 1:3000 en PBS durante 10 minutos. Para el análisis por citometría de flujo, las incubaciones se realizaron durante 1, 2, 4 y 8 horas y, posteriormente, se marcaron las células con 7-AAD y con los anticuerpos anti-CD56 PE y anti-CD45 APC-H7. Asimismo, el ensayo citofluorimétrico se llevó a cabo en presencia o ausencia de una cámara Transwel® durante 1 hora de incubación.

3.7. Análisis de la proliferación linfocitaria y generación de Tregs

La proliferación de las poblaciones linfocitarias se determinó mediante el ensayo de dilución del fluorocromo carboxi-fluorescein-succinilimidil éster (CFSE), que se distribuye de manera equitativa a las células descendientes en el proceso de división celular. Para ello, se incubó una suspensión de PBMCs con CFSE 8,5µM durante 10 minutos en medio RPMI 1640 suplementado con 5% de FBS, 50 U/ml de penicilina y 50 U/ml de estreptomicina. Posteriormente, se incubaron en RPMI completo durante 30 minutos, se lavaron 2 veces para eliminar el exceso de CFSE y se sembraron en placas de 96 pocillos a una concentración de 2×10^5 células por pocillo en medio de cultivo RPMI completo. Para estimular la proliferación de linfocitos T, se incubaron las células con 10 µg/ml de fitohemaglutinina (PHA, Sigma) durante 4 días. Como estímulo mitogénico de las células NK y de los linfocitos T reguladores, se adicionó IL-2 al medio de cultivo a una concentración de 1.000 U/ml y se cultivaron las células durante 7 días.

Las células tumorales MCF7-Ctrl y MCF7-PCLP1 fueron tratadas previamente con 6 µg/ml del compuesto citostático mitomicina C (Abcam, Cambridge, Reino Unido) durante 2,5 horas para inhibir la proliferación de las células tumorales, las cuales se añadieron al cultivo de PBMCs en una relación E:T de 2:1. En los ensayos de proliferación de linfocitos T, las células tumorales se añadieron al cultivo al inicio de la estimulación linfocitaria y se determinó la proliferación a los 4 días de incubación. En cambio, tanto las células NK como los linfocitos Tregs se co-incubaron con las células tumorales durante las últimas 24 horas del ensayo de proliferación. Una vez transcurrido el periodo de cultivo, las células fueron despegadas con EDTA 0,5 mM

(Sigma) y lavadas con PBS. Finalmente, se marcaron las células con 7-AAD y las siguientes combinaciones de anticuerpos específicos frente a linfocitos T (anti-CD3-PE, anti-CD4-APC y anti-CD8-PE/Cy7), células NK (anti-CD56-PE, anti-CD3-APC y anti-CD16-PE/Cy7), y linfocitos Treg (anti-FOXP3-PE, anti-CD4-APC y anti-CD25-PE/Cy7). Las condiciones de los experimentos se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 6. Condiciones del ensayo de proliferación linfocitaria mediante citometría de flujo.

Células	Estímulo	Concentración	Duración del cultivo	Adición de células tumorales	Anticuerpos
Linfocitos T	PHA	10 µg/ml	4 días	Día 0	Anti-CD3 PE Anti-CD4 APC Anti-CD8PE/Cy7
Células NK	IL-2	1000 U/ml	7 días	Día 5	Anti-CD56 PE Anti-CD3 APC Anti-CD16 PE/Cy7
Linfocitos Treg	IL-2	1000 U/ml	7 días	Día 5	Anti-FOXP3 PE Anti-CD4 APC Anti-CD25 PE/Cy7

3.8. Estudio de la maduración y activación de células dendríticas

Las MoDCs se incubaron en placas de 24 pocillos con las células tumorales MCF7-Ctrl o MCF7-PCLP1 en medio de cultivo RPMI completo a una relación de 1:2 durante 24 horas. Los experimentos se realizaron tanto en ausencia como en presencia de LPS a una concentración de 100 µg/ml. Posteriormente, para su análisis citométrico se marcaron las células con los siguientes anticuerpos: anti-CD80 PE, anti-CD83 PE, anti-CD86 PE, anti-CD40 PE, anti-CD206 PE, anti-CD54 PE y anti-HLA-DR PerCP. Como marcador de la población de células dendríticas se incluyó el anticuerpo anti-CD11c PE/Cy7 y para excluir las células muertas se marcaron con 7-AAD.

3.9. Determinación de la expresión de PCLP1 inducida por moléculas inmunomoduladoras

Tanto la línea tumoral MCF-7 como MDA-MB-231 fueron incubadas en placas de 6 pocillos a una concentración de 10^5 células MCF-7 y $2,5 \times 10^5$ células MDA-MB-231 en 3ml de medio de cultivo DMEM completo con concentraciones crecientes de

TGF- β (0,125, 0,25, 0,5, 1 y 2 ng/ml) (Miltenyi Biotec) e IL-4 (100, 200, 400 y 800 U/ml) y durante diferentes tiempos de incubación. Al finalizar el cultivo se determinó la expresión de PCLP1 mediante *Western blot* tal y como se ha descrito en el apartado 2.2 de *Material y métodos*.

En los casos indicados, se añadieron al medio de cultivo concentraciones crecientes (5, 10 y 20 μ M) de inhibidores de las siguientes rutas de señalización intracelular: p38MAPK (SB 202190, Sigma), MAPK/ERK (PD 098059, Sigma) y JAK3 (PF 956980, Sigma). Como control se incluyó DMSO, que se empleó como diluyente de cada uno de los inhibidores.

3.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando los programas GraphPad Prism 3.0 y SPSS. Para determinar si las diferencias entre los grupos eran significativas, se aplicó el estadístico T-student para los datos con una distribución normal y el test de Wilcoxon para los datos no paramétricos. Los valores de P menores que 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. La significancia se clasificó como * $p < 0,05$ (significativo); ** $p < 0,01$ (muy significativo) o *** $p < 0,001$ (altamente significativo).

IV. RESULTADOS

1. PAPEL DE PCLP1 EN CÉLULAS INMUNITARIAS

1.1. Expresión de PCLP1 en células del sistema inmunitario

La expresión de PCLP1 en células hematopoyéticas adultas se restringe a una subpoblación de células progenitoras, células del linaje megacariocítico y monocitos activados con factor estimulador de colonias de monocitos (M-CSF). La existencia de un trabajo reciente en el que se detecta ARN mensajero correspondiente a PCLP1 en linfocitos y monocitos,³⁹ sugiere una posible expresión de PCLP1 en células inmunitarias maduras. Por este motivo, decidimos examinar la expresión de PCLP1 en células inmunitarias procedentes de sangre periférica, entre las que se incluyen monocitos, linfocitos T, células NK, DCs circulantes y células dendríticas derivadas de monocitos (MoDCs). Se utilizó la técnica de RTq-PCR para la detección de ARNm, y *Western blot* y citometría de flujo para la determinación de la expresión proteica. A su vez, mediante citometría de flujo, se analizó la expresión de PCLP1 en la superficie de diferentes subpoblaciones, como linfocitos T CD4⁺ o CD8⁺, DCs mieloides CD11c⁺ y DCs plasmacitoides caracterizadas por presentar CD123 en su superficie. Asimismo, se cuantificaron los niveles de expresión de PCLP1 en MoDCs, tanto en DCs inmaduras (iDCs) y como en DCs maduras (mDCs) derivadas de iDCs tras estimulación con LPS, poli I:C (ácido poliinosínico-policitidílico) o un cóctel de citocinas que incluye TNF- α , IL-1, IL-6 y PGE2.

Los resultados obtenidos muestran una expresión diferencial de PCLP1 entre los tipos celulares estudiados. Los linfocitos T, las células NK y las DCs plasmacitoides no expresan PCLP1, a diferencia de las DCs mieloides y MoDCs, en las cuales se observan diferentes grados de expresión. Como se puede apreciar en la Figura 9, los monocitos y las DCs mieloides presentan bajos niveles de expresión de PCLP1. Cuando los monocitos se diferencian a iDCs la expresión se incrementa de forma pronunciada, tanto en los niveles de ARNm como en los niveles de proteína total y en superficie. Sin embargo, cuando se induce la maduración de estas células, los niveles de expresión decaen a valores equivalentes a los expresados en los monocitos, siendo la disminución más intensa cuando se utiliza LPS o poli I:C como estímulo madurativo.

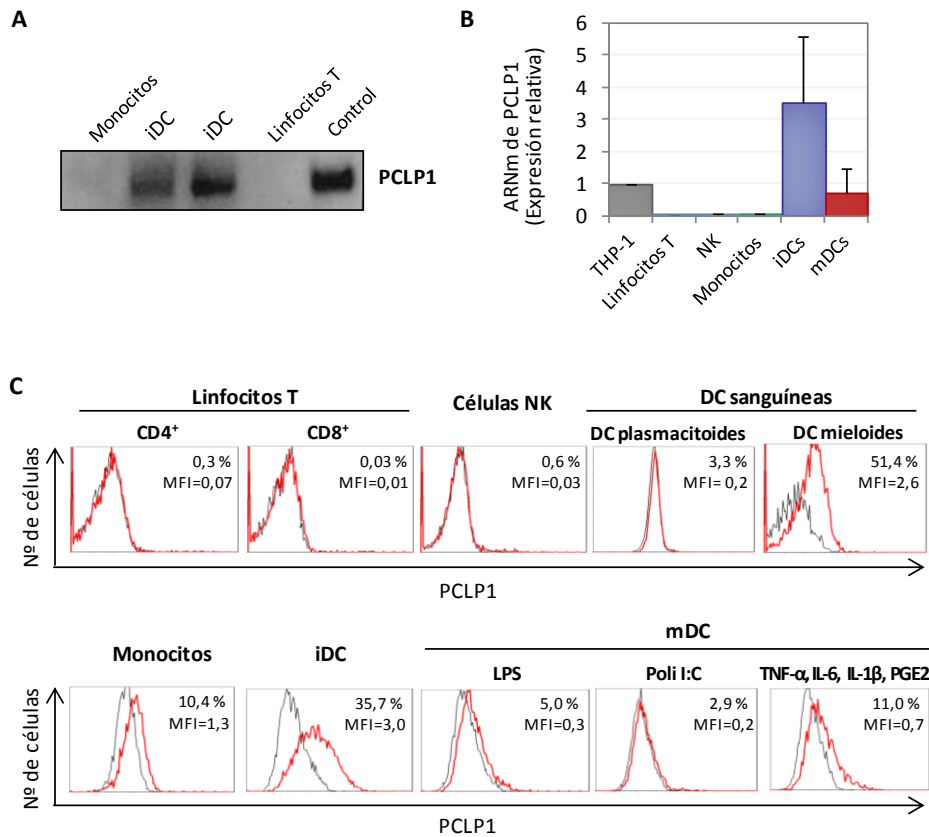


Figura 9. Expresión de PCLP1 en células del sistema inmunitario. **A)** Expresión de PCLP1 total en diferentes poblaciones leucocitarias mediante *Western blot* y empleando como control positivo las células MIA PaCA-2. **B)** Expresión de ARNm de PCLP1 mediante RT-qPCR. Los resultados se presentan como porcentaje relativo a la expresión en células THP-1 (línea celular mieloides) empleando el método $\Delta\Delta CT$. **C)** Histogramas representativos de la expresión de PCLP1 en superficie celular (rojo) y su control isotópico (gris) mediante la técnica de citometría de flujo. Los resultados se expresan como porcentaje de células positivas y mediana de fluorescencia (MFI).

La Figura 10 resume la determinación de los niveles de expresión de PCLP1 en MoDCs provenientes de 22 donantes sanos mediante citometría de flujo. Los resultados muestran que la expresión de PCLP1 en iDCs entre diferentes individuos es muy heterogénea y disminuye significativamente tras inducción de la maduración con LPS.

Asimismo, se analizó la localización subcelular de PCLP1 en iDCs adheridas a fibronectina mediante microscopía de fluorescencia. Los resultados muestran que PCLP1 se acumula en el extremo posterior de las iDCs polarizadas durante el proceso de migración celular.

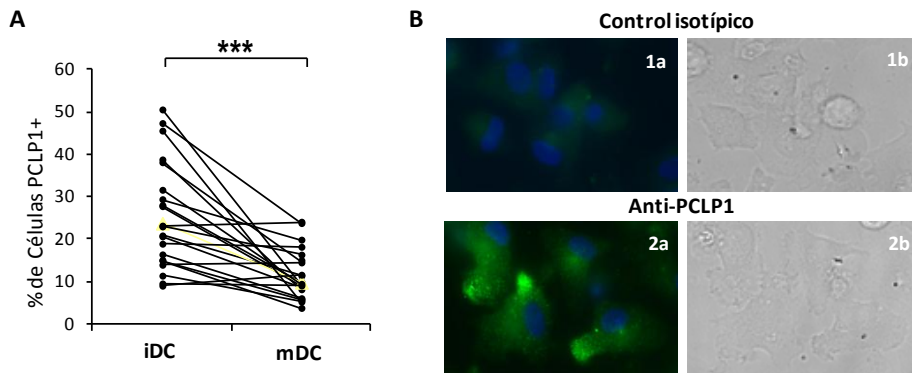


Figura 10. Expresión de PCLP1 en MoDCs. A) Porcentaje de células dendríticas inmaduras (iDCs) y maduras (mDCs) que expresan PCLP1, determinado mediante citometría de flujo utilizando muestras procedentes de 16 donantes sanos. * $p < 0.001$. B) Imágenes representativas de la localización celular de PCLP1 en iDCs adheridas a fibronectina. En color verde se muestra la expresión de PCLP1 marcada con un anticuerpo específico (2a) o su control isotópico (1a), y los núcleos celulares teñidos con DAPI en color azul. En las fotografías 1b y 2b aparecen las células en contraste de fases. * $p < 0,05$.

1.2. Efecto de PCLP1 en la maduración de células dendríticas derivadas de monocitos

Con el objeto de determinar el posible papel de PCLP1 en la maduración de las MoDCs, se incubaron las iDCs con un anticuerpo anti-PCLP1 durante el proceso de maduración con LPS para inducir el entrecruzamiento de PCLP1 y, como consecuencia, la activación de la vía de señalización intracelular mediada por esta proteína. El entrecruzamiento de receptores de membrana con anticuerpos específicos reproduce el desencadenado por sus ligandos naturales y permite determinar su funcionalidad. Posteriormente, se analizó la expresión de los marcadores de maduración CD83,

CD86 y HLA-DR mediante citometría de flujo. La Figura 11 muestra que la adición del anticuerpo anti-PCLP1 a las iDCs reduce la expresión de CD83, CD86 y HLA-DR, lo que sugiere que la activación de la vía de señalización de PCLP1 inhibe la maduración fenotípica de las iDCs.

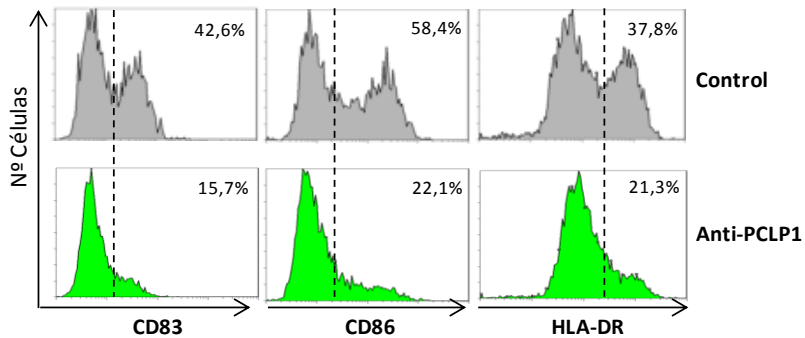


Figura 11. Expresión de marcadores de maduración en DCs en respuesta al entrecruzamiento de PCLP1. Histogramas que muestran la expresión de los receptores CD83, CD86 y HLA-DR en la superficie de iDCs estimuladas con LPS, en presencia de un anticuerpo control o un anticuerpo anti-PCLP1.

Por lo tanto, PCLP1 se expresa en células dendríticas inmaduras (iDC) donde participa en la migración celular y en el mantenimiento de del fenotipo inmaduro.

2. PCLP1 EN CÉLULAS DE CÁNCER DE MAMA

2.1. Generación de células MCF-7 que sobreexpresan PCLP1

Con el objetivo de estudiar el papel de PCLP1 expresada en células tumorales de cáncer de mama en la evasión del sistema inmunitario, en primer lugar se generaron líneas celulares que sobreexpresan PCLP1. Como línea celular para la realización de los experimentos se optó por la línea MCF-7 de cáncer de mama, en base a los bajos niveles de PCLP1 endógena que expresa. Dicha línea celular fue transfectada con el plásmido pEGFP que contiene ADN que codifica la proteína PCLP1 (pEGFP-PCLP1) o con el plásmido vacío como control (pEGFP), obteniéndose dos líneas MCF-7 estables, una con niveles elevados de PCLP1-GFP y su respectivo control que expresa GFP. Tal y como se refleja en la Figura 12a, las células MCF-7 que expresan la proteína de fusión PCLP1-GFP muestran una distribución de la fluorescencia polar en conformidad con la localización de PCLP1 previamente descrita en este tipo celular.^{27,37,48,59} En cambio, las células MCF-7 control que expresan únicamente GFP exhiben un patrón de fluorescencia homogéneo. La expresión de PCLP1 en las células MCF-7 transfectadas se confirmó posteriormente mediante la técnica de *Western blot*, que reveló una banda específica con un peso molecular de en torno a 160 kDa, correspondiente a PCLP1, en las células transfectadas con el plásmido pEGFP-PCLP1 (Figura 12b). Asimismo, en estas células se detectó la expresión de ARNm de PCLP1 mediante la técnica de RTq-PCR (Figura 12c).

Con el fin de facilitar la lectura de esta tesis, se denominará como células MCF7-PCLP1 a las células MCF-7 que expresan la proteína de fusión PCLP1-GFP, y células MCF7-Ctrl a las células que solamente expresan GFP.

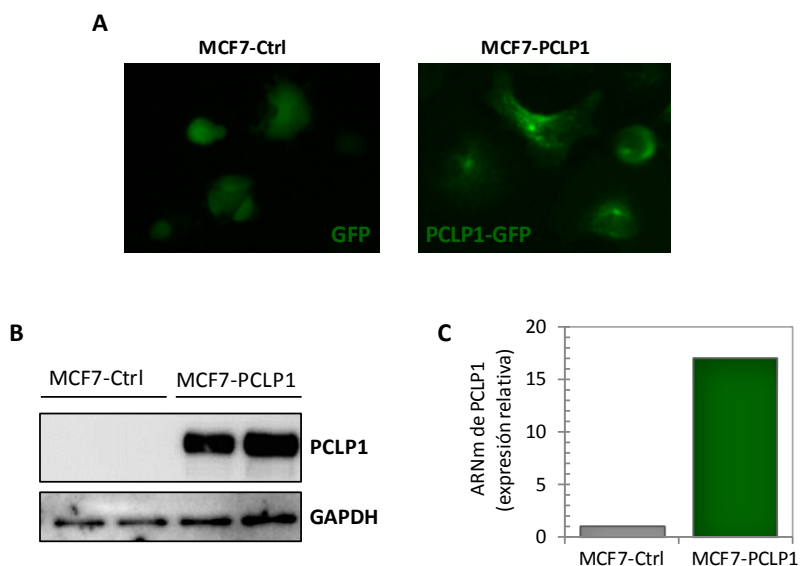


Figura 12. Expresión de PCLP1 en las células MCF-7 transfectadas. Comparación de la expresión de PCLP1 en células transfectadas con el plásmido pEGFPN1 nativo (denominadas MCF7-Ctrl) y transfectadas con el plásmido que contiene la secuencia que codifica para PCLP1-GFP (denominadas MCF7-PCLP1). **A)** Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia que muestran la expresión de GFP y PCLP1-GFP en las células MCF7-Ctrl y MCF7-PCLP1, respectivamente. **B)** Expresión proteica de PCLP1 en células MCF7-Ctrl y MCF7-PCLP1 mediante *Western blot*, incluyendo como control de carga la expresión de la proteína GAPDH. **C)** Expresión de ARNm de PCLP1 en células MCF7-PCLP1 (verde) relativizada a la expresión de las células MCF7-Ctrl (gris) mediante RTq-PCR.

2.2. Efecto de PCLP1 sobreexpresada en células MCF-7 en la citotoxicidad mediada por las células NK

Estudios previos han puesto de manifiesto la importancia de las células NK en la destrucción de las células de cáncer de mama.¹¹¹⁻¹¹³ Dado que los niveles de PCLP1 se encuentran aumentados en los carcinomas de mama más invasivos y con pronóstico desfavorable,^{48,83} nos propusimos evaluar si la expresión de PCLP1 en células MCF-7 confiere resistencia a la lisis mediada por las células NK. Para ello, se realizaron ensayos de citotoxicidad empleando células NK procedentes de donantes sanos activadas con IL-2 (células efectoras) y células MCF7-Ctrl o MCF7-PCLP1 (células diana). Ambos tipos celulares se cultivaron en una relación célula efectora:célula tumoral (E:T) de 2:1 o de 3:1 durante 4 horas. Tal y como se muestra en la Figura 13,

la selección de la población tumoral respecto a la población de células NK se realizó por citometría de flujo en función del tamaño y rugosidad y marcaje CFSE⁺CD45⁻. El porcentaje de células muertas se determinó mediante marcaje con 7-ADD.

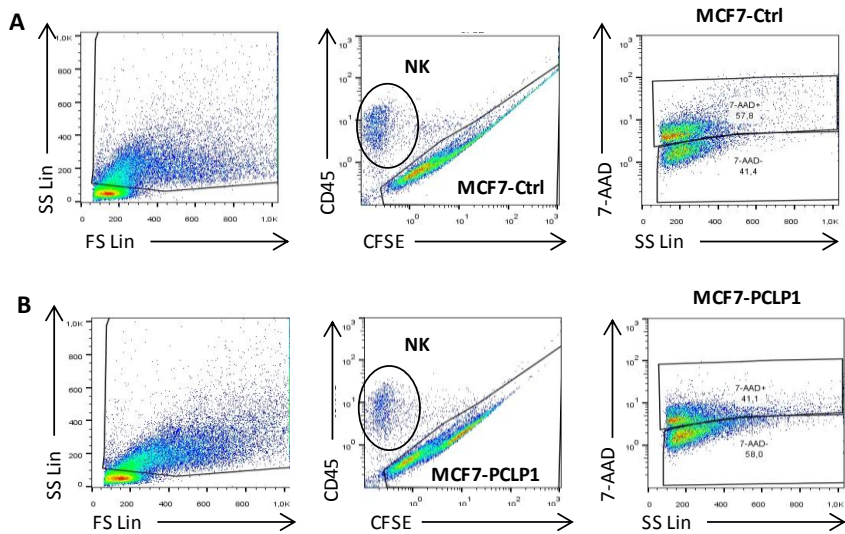


Figura 13. Estrategia de análisis para determinar la muerte tumoral. Selección de la población tumoral respecto a la población de células NK con el objetivo de analizar el porcentaje de células muertas (7-AAD+). La separación de las células tumorales se realizó en base a su mayor tamaño y rugosidad (primera columna), su expresión de CFSE y la ausencia de marcaje en CD45 (segunda columna). **A)** Análisis de células MCF7-Ctrl cultivadas con células NK. **B)** Análisis de células MCF7-PCLP1 cultivadas con células NK.

En la Figura 14 se muestra el porcentaje de células tumorales muertas a causa de la lisis mediada por las células NK en ambas relaciones E:T (2:1 y 3:1). Como cabe esperar, en la relación E:T de 3:1 se obtiene una mayor citotoxicidad tumoral mediada por células NK que en la relación 2:1. Por otra parte, los datos obtenidos muestran un rango amplio de susceptibilidad de las células tumorales a la lisis mediada por células NK (% lisis específica= 5%-60% para la relación 2:1 y 25%-70% para la relación 3:1), lo que refleja la gran variabilidad en la capacidad citotóxica de esta subpoblación linfocitaria entre diferentes donantes. Cuando se compara el porcentaje de lisis específica de las células MCF7-PCLP1 mediada por las células NK de cada donante con el de las células MCF7-Ctrl, los datos obtenidos muestran en todos los casos

analizados un porcentaje significativamente menor de células MCF7-PCLP1 muertas que el observado en células MCF7-Ctrl, siendo la disminución más pronunciada en la relación E:T de 3:1 ($p < 0,05$) que en la relación 2:1 ($p < 0,05$). Estos resultados indican que la expresión de PCLP1 aumenta la resistencia de las células MCF-7 a la citotoxicidad antitumoral mediada por las células NK.

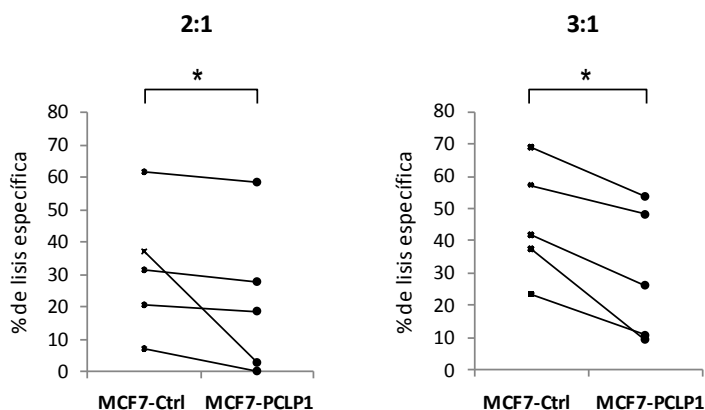


Figura 14. Efecto de PCLP1 expresada en células MCF-7 en la citotoxicidad mediada por células NK. Porcentaje de células MCF7-Ctrl o MCF7-PCLP1 muertas (7-AAD⁺) por la lisis mediada por células NK procedentes de 5 donantes sanos. Cada gráfico representa los resultados obtenidos después de 4 horas de co-cultivo de células NK con células tumorales en una relación E:T de 2:1 o 3:1 * $P < 0,05$.

A continuación, evaluamos si las células MCF7-PCLP1 resistentes al efecto citotóxico de las células NK expresaban mayores niveles de PCLP1. Para ello, las células MCF7-PCLP1 que habían sobrevivido a la lisis mediada por células NK durante el ensayo de citotoxicidad se cultivaron durante 24 horas en medio de cultivo y se analizó la expresión de PCLP1 por citometría de flujo, incluyendo como control células MCF7-PCLP1 incubadas en ausencia de células NK. Los resultados revelan que la población resistente a la lisis mediada por células NK expresan mayores niveles de PCLP1 que las células MCF7-PCLP1 que no han sido expuestas a las células NK (Figura 15). Estos datos son consistentes con los resultados obtenidos en los ensayos de citotoxicidad e indican que PCLP1 protege a las células MCF-7 de la lisis mediada por células NK.

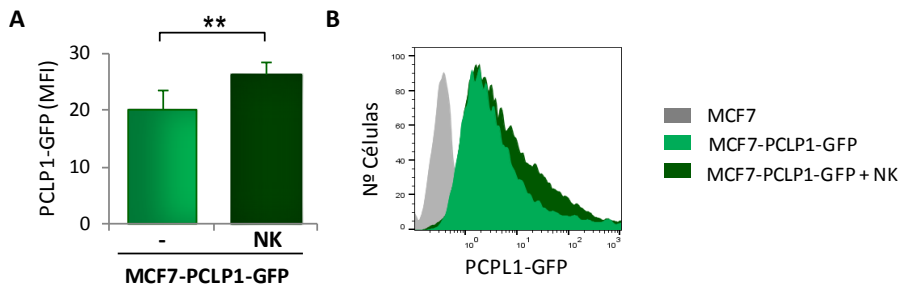


Figura 15. Expresión de PCLP1 en células MCF7-PCLP1 resistentes a la lisis mediada por células NK. **A)** Gráfico que muestra la mediana de fluorescencia (MFI) obtenida mediante el análisis por citometría de flujo de PCLP1-GFP expresada en células MCF7-PCLP1 incubadas en ausencia (verde suave) y en presencia de células NK (verde intenso). **B)** Histograma representativo de 5 experimentos donde se muestra la distribución de la expresión de PCLP1-GFP respecto al número de células, mostrando en color gris las células negativas para GFP (MCF-7 no transfectadas). ** $P < 0,01$.

Uno de los mecanismos de evasión de la respuesta inmunitaria desarrollado por las células tumorales consiste en la expresión de moléculas que inducen la eliminación de células NK, disminuyendo de ese modo su capacidad citotóxica.^{236,283} Para evaluar si la mayor resistencia de las células MCF7-PCLP1 a la lisis mediada por células NK se debía a un posible efecto negativo de PCLP1 sobre la viabilidad de las células NK, se determinó el porcentaje de células NK muertas (CFSE⁻CD45⁺7-AAD⁺) en los ensayos de citotoxicidad. Los resultados obtenidos en la Figura 16 muestran que no existen diferencias significativas entre la viabilidad de las células NK cultivadas con MCF7-PCLP1 y las cultivadas con MCF7-Ctrl, lo que indica que la expresión de PCLP1 en las células MCF7 no induce la muerte de las células NK.

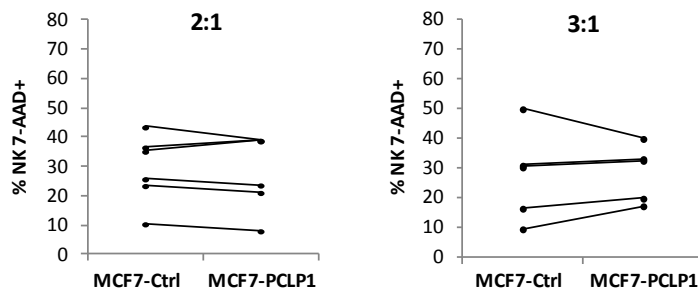


Figura 16. Efecto de PCLP1 expresada en células MCF-7 en la viabilidad de las células NK. Porcentaje de células NK muertas (7-AAD⁺) en presencia de células MCF7 o MCF7-PCLP1 en el cultivo. Cada gráfico representa los resultados obtenidos después de 4 horas de co-cultivo de células NK con células tumorales en relación E:T de 2:1 y 3:1. Datos procedentes de 6 donantes sanos.

2.3. Efecto de PCLP1 en la expresión de receptores activadores en las células NK

A continuación nos propusimos determinar el mecanismo a través del cual PCLP1 disminuye la citotoxicidad mediada por las células NK. Una de las estrategias que permiten a las células tumorales de mama evadir la respuesta citotóxica de las células NK consiste en la modulación de la expresión de receptores activadores presentes en la superficie de estas células. Basándonos en esta observación, decidimos determinar si PCLP1 expresada en células MCF-7 regula la expresión de los principales receptores activadores involucrados en la citotoxicidad antitumoral de las células NK. Con esta finalidad, se cultivaron células NK con células MCF7-PCLP1 o MCF7-Ctrl y se analizó la expresión de los receptores activadores NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, DNAM-1 y CD16 por citometría de flujo. Asimismo, se incluyeron como control células NK incubadas en ausencia de células tumorales. Paralelamente, para evaluar si los efectos observados eran dependientes del contacto entre las células NK y las células tumorales o de factores solubles, se co-cultivaron ambos tipos celulares en presencia o en ausencia de una membrana semipermeable con diámetro de poro de 0,4 μm para impedir el contacto intercelular directo.

La Figura 17 resume el análisis del porcentaje de variación de la expresión de cada uno de los receptores activadores en células NK incubadas con células MCF7-Ctrl o MCF7-PCLP1 con respecto a la observada en células NK incubadas en ausencia de células tumorales. Los resultados obtenidos muestran que tanto las células MCF7-Ctrl como las células MCF7-PCLP1 reducen notablemente la expresión de los receptores activadores estudiados, a excepción de NKp30. En cambio, en presencia de una membrana semipermeable separadora (Figura 17b) no se observa dicha disminución, excepto en el receptor DNAM-1.

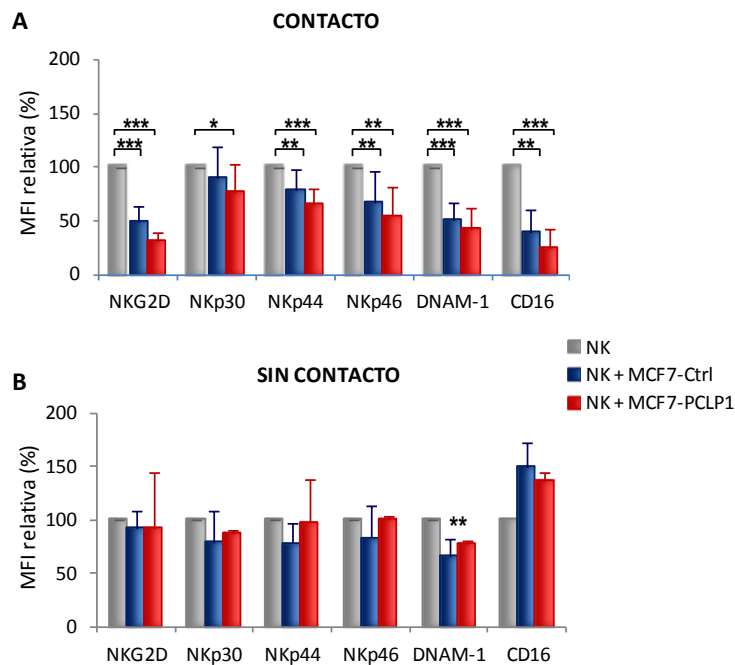


Figura 17. Efecto de las células tumorales en la expresión de los receptores activadores en la superficie de células NK. Gráficos que muestran la mediana de fluorescencia (MFI) obtenida mediante el análisis por citometría de flujo de la expresión en superficie de los receptores indicados en células NK incubadas en ausencia de células tumorales (gris), con MCF7-Ctrl (azul) o con MCF7-PCLP1 (rojo), separadas **(A)** o no **(B)** por una membrana semipermeable. Los datos expresan la media de 3 a 8 experimentos normalizados considerando como 100% la expresión de los receptores en células NK incubadas en ausencia de células MCF-7. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Para averiguar si la presencia de PCLP1 en las células MCF-7 ejerce algún efecto sobre la expresión de los receptores activadores en las células NK se compararon los datos de expresión obtenidos en células NK incubadas con MCF7-Ctrl y con MCF7-PCLP1 (Figura 18). Los datos reflejan una disminución significativa en la expresión de todos los receptores activadores estudiados en células NK incubadas en presencia de células MCF7-PCLP1 con respecto a la detectada en aquellas incubadas con células MCF-7 control, siendo más acusada en el caso de NKG2D y CD16 (Figura 18a). Cuando la incubación se realizó en ausencia de contacto celular no se observaron diferencias significativas en la expresión de dichos receptores (Figura 18b).

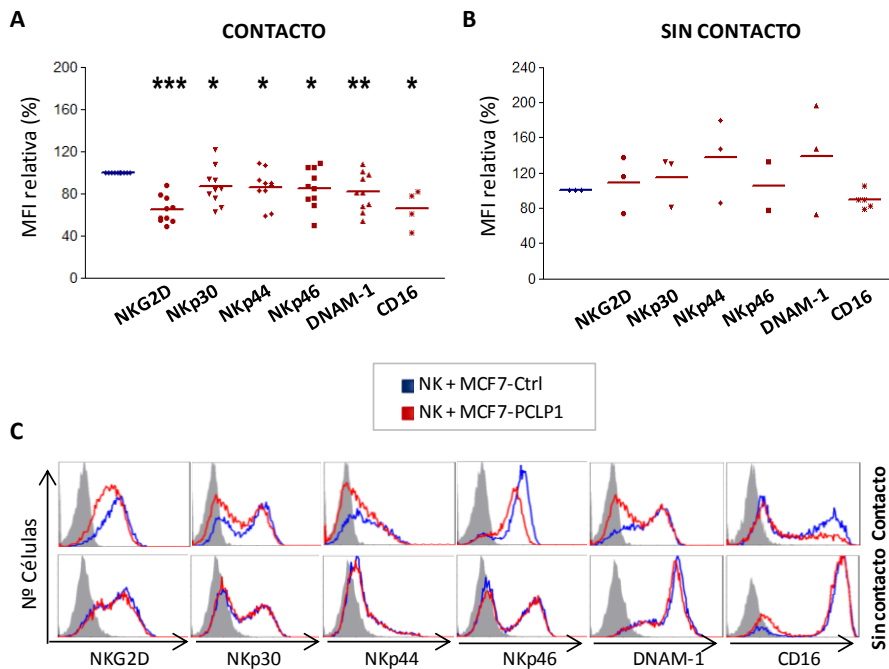


Figura 18. Efecto de PCLP1 en la expresión de receptores activadores en la superficie de células NK. Gráficos que muestran la mediana de fluorescencia (MFI) obtenida mediante el análisis por citometría de flujo de la expresión en superficie de los receptores indicados en células NK incubadas con células MCF7-Ctrl (azul) y con células MCF7-PCLP1 (rojo), separadas **(A)** o no **(B)** por una membrana semipermeable. **(C)** Histogramas representativos donde se muestra la distribución de la expresión de cada uno de los receptores respecto al número de células, mostrando en color gris el control isotípico. Los datos expresan la media de 3 a 8 experimentos normalizados considerando como 100% la expresión de los receptores en células NK incubadas con MCF7-Ctrl. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Estos resultados indican que la expresión de PCLP1 en células MCF-7 modula negativamente la expresión de los receptores activadores NKG2D, NKp30, NKP44, NKp46, DNAM-1 y CD16 en la superficie de las células NK a través de un mecanismo dependiente del contacto intercelular.

2.4. Efecto de PCLP1 en la expresión de moléculas de adhesión y otros receptores de células NK

Las moléculas de adhesión no solo median la interacción de las células NK con otras células, sino que además pueden transmitir señales activadoras que finalmente desatan la maquinaria citolítica de las células NK. Por esta razón, decidimos evaluar el

efecto de PCLP1 expresada en células MCF-7 sobre la expresión en membrana de varias moléculas de adhesión en células NK, incluyendo CD18, CD11b, CD54 y CD56, siguiendo el mismo procedimiento experimental que el empleado para la determinación de los receptores activadores. Entre las moléculas de adhesión analizadas cabe destacar la cadena beta de la integrina LFA-1 (Antígeno 1 asociado a la función linfocitaria) o CD18 que posee una función crítica en la secreción polarizada del contenido de los gránulos de las células NK. Por otro lado, evaluamos la expresión de CD69, un antígeno de diferenciación que se expresa en linfocitos activados, incluidas las células NK. Como se puede observar en las siguientes gráficas, la presencia de células tumorales aumenta significativamente la expresión de los receptores CD54 y CD69, y disminuye la expresión de CD56 de forma dependiente de contacto celular (Figura 19).

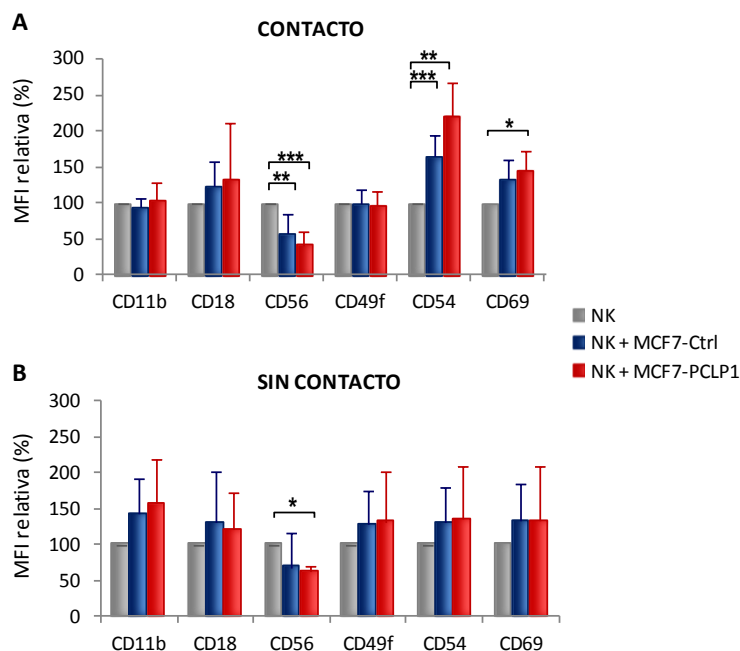


Figura 19. Efecto de las células tumorales en la expresión de moléculas de adhesión y otros receptores en la superficie de células NK Gráficos que muestran la mediana de fluorescencia (MFI) obtenida mediante el análisis por citometría de flujo de la expresión en superficie de las moléculas indicadas en células NK incubadas en ausencia de células tumorales (gris), con MCF7-Ctrl (azul) o con MCF7-PCLP1 (rojo), separadas **(A)** o no **(B)** por una membrana semipermeable. Los datos expresan la media de 3 a 8 experimentos normalizados considerando como 100% la expresión de las moléculas de adhesión en células NK incubadas en ausencia de células MCF-7. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001.

Con el objeto de determinar el efecto de PCLP1 en la expresión de las moléculas mencionadas, se compararon los datos obtenidos en células NK cultivadas con MCF7-Ctrl respecto a las cultivadas con MCF7-PCLP1, observándose que la sobreexpresión de PCLP1 en células MCF-7 induce la disminución de la expresión de CD56 y el aumento de CD54 en células NK de manera dependiente de contacto. (Figura 20).

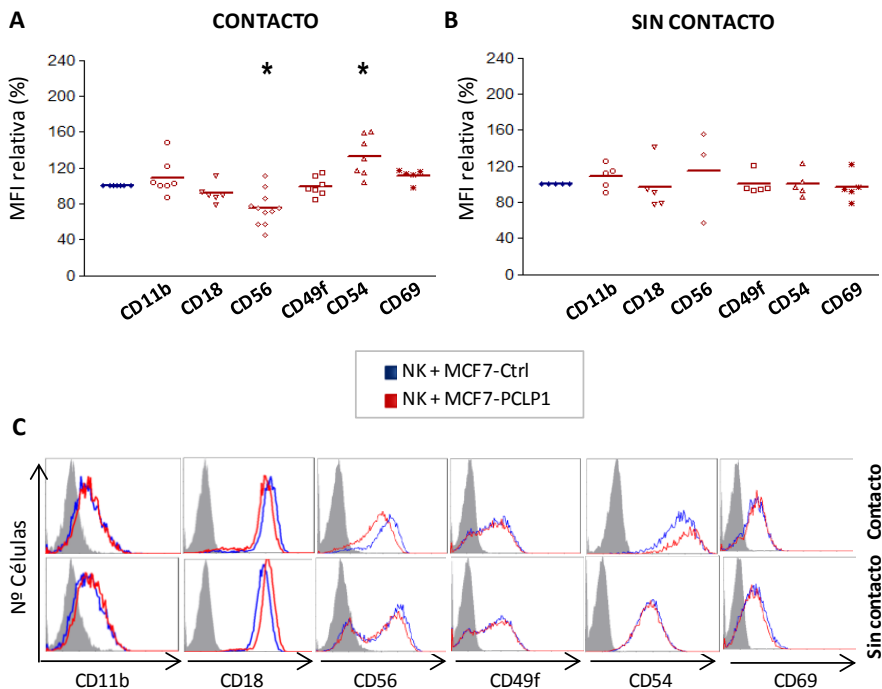


Figura 20. Efecto de PCLP1 en la expresión de moléculas de adhesión y otros receptores en la superficie de células NK. Gráficos que muestran la mediana de fluorescencia (MFI) obtenida mediante el análisis por citometría de flujo de la expresión en superficie de las moléculas indicadas en células NK incubadas con células MCF7-Ctrl (azul) y con células MCF7-PCLP1 (rojo), separadas **(A)** o no **(B)** por una membrana semipermeable. **(C)** Histogramas representativos donde se muestra la distribución de la expresión de cada una de las moléculas respecto al número de células, mostrando en color gris el control isotópico. Los datos expresan la media de 3 a 8 experimentos normalizados considerando como 100% la expresión de las moléculas de adhesión en células NK incubadas con MCF7-Ctrl. *P<0,05.

2.5. Efecto de PCLP1 en la expresión de ligandos para receptores de células NK

La interacción del receptor de activación NKG2D con las moléculas MIC-AB expresadas en células tumorales potencia la capacidad citotóxica de las células NK y la producción de citocinas. Por el contrario, la unión de los receptores inhibidores a las moléculas MHC de clase I (HLA-ABC) expresadas en células tumorales ejerce un efecto supresor sobre la actividad citotóxica de las células NK. Con el propósito de averiguar si PCLP1 modula la expresión de ligandos de receptores de células NK en células tumorales de mama, se comparó la expresión de estos ligandos en las células MCF7-Ctrl con la expresión en células MCF7-PCLP1. Para ello se marcaron con anticuerpos específicos varios ligandos implicados en la inhibición (HLA-ABC y HLA-E) y en la activación (MIC-AB, ULBPs, Nectina-2 y PVR) de la respuesta antitumoral mediada por las células NK y se analizó su expresión mediante citometría de flujo. Además, se analizó la expresión del receptor Fas (o CD95), uno de los receptores de muerte expresados en células tumorales que participa en la apoptosis mediada por células NK. Como se refleja en la Figura 21, los niveles de expresión de HLA-ABC se encuentran significativamente aumentados y los de MIC-AB y FAS disminuidos en la superficie de las células MCF-7 que sobreexpresan PCLP1 con respecto a los observados en células MCF-7 control. En cambio, la expresión del resto de los ligandos estudiados no se encuentra alterada por la sobreexpresión de PCLP1.

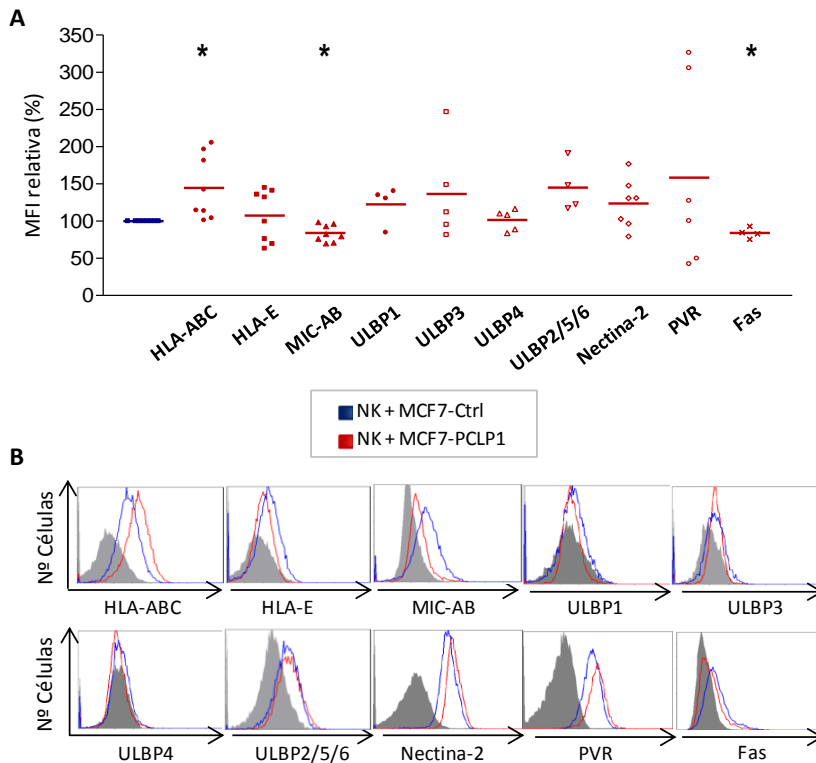


Figura 21. Efecto de PCLP1 en la expresión de ligandos en la superficie de células tumorales. Gráficos que muestran la mediana de fluorescencia (MFI) obtenida mediante el análisis por citometría de flujo de la expresión en superficie de los ligandos indicados y del receptor Fas en células MCF7-Ctrl (azul) y MCF7-PCLP1 (rojo). **A)** Gráficos que representan la media de 4 a 8 experimentos normalizada tomando como 100% la expresión en células MCF7-Ctrl. **B)** Histogramas representativos donde se muestra la distribución de la expresión de cada uno de los receptores respecto al número de células, señalando en color gris el control isotópico. *P<0,05.

Para determinar si la modificación en la expresión de los ligandos tiene lugar a nivel transcripcional o post-transcripcional se midió mediante RT-qPCR la expresión del ARN mensajero correspondiente a cada ligando. Los resultados obtenidos (Figura 22) sugieren que se trata de una regulación a nivel post-transcripcional, ya que la modulación en los niveles de expresión a nivel proteico (aumento de HLA-ABC y disminución de MIC-AB) no se corresponde con los niveles obtenidos en ARNm.

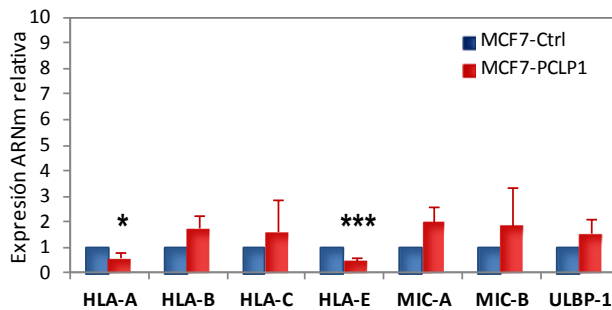


Figura 22. Expresión del ARNm de ciertos ligandos en células tumorales. Determinación de la expresión del ARNm mediante la técnica RT-qPCR utilizando como control endógeno RPL0. La expresión en células MCF7-Ctrl se muestra en color azul y la de las células MCF7-PCLP1 en color rojo. Los datos representan la media de 5 ensayos y se exponen de manera relativizada con respecto a la expresión en células MCF7-Ctrl mediante el método $\Delta\Delta CT$. * $P < 0,05$, *** $p < 0,001$.

2.6. Efecto de PCLP1 en la desgranulación de células NK

A tenor de los resultados anteriormente mostrados, el aumento de la resistencia de las células MCF7-PCLP1 a la citotoxicidad mediada por las células NK podría deberse a un efecto negativo de PCLP1 sobre la capacidad secretora de estas células. Con el objetivo de determinar la desgranulación de las células NK, se marcaron con el anticuerpo anti-CD107a (LAMP-1) durante el proceso citotóxico. La molécula CD107a se localiza en la membrana de los gránulos de secreción y sus niveles de expresión se correlacionan con la capacidad desgranuladora de las células NK. Como se refleja en la Figura 23, y en consonancia con la heterogeneidad interindividual en la capacidad citotóxica de las células NK, la desgranulación varía en función del donante estudiado. Sin embargo, no se observan diferencias significativas en el porcentaje de desgranulación de las células NK en respuesta a la co-incubación con células MCF7-PCLP1 respecto al control. Estos resultados indican que la expresión de PCLP1 en células MCF-7 no altera la capacidad de desgranulación de las células NK.

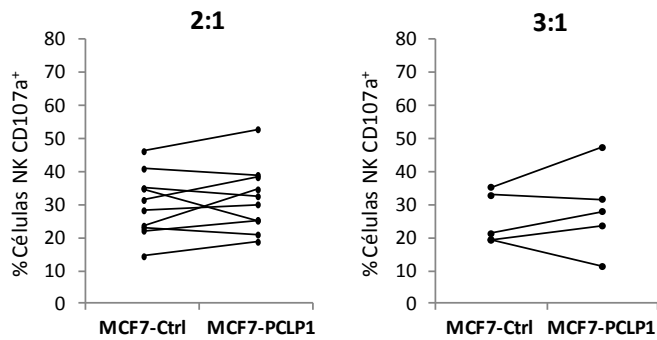


Figura 23. Efecto de la expresión de PCLP1 en la desgranulación de las células NK. Porcentaje de células NK con capacidad desgranulatoria (determinadas mediante citometría de flujo como CD107a⁺) después de ser cultivadas durante 4 horas con las células MCF7-Ctrl o MCF7-PCLP1 en relación E:T de 2:1 y 3:1. Datos procedentes de 5 a 12 donantes sanos.

Dado que el incremento de la resistencia de las células MCF7-PCLP1 a la actividad lítica de las células NK no se explicaba por una reducción en la desgranulación, nos preguntamos si dicho aumento se debía a la alteración del contenido de los gránulos citotóxicos. Por ello, al finalizar el ensayo de citotoxicidad se determinó la expresión de perforina, una proteína presente en los gránulos y esencial para la actividad citolítica de las células NK. Los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas ni en el porcentaje de células NK que expresan perforina ni en la expresión total de perforina en respuesta a las células MCF7-PCLP1 respecto a las células MCF7-Ctrl (Figura 24).

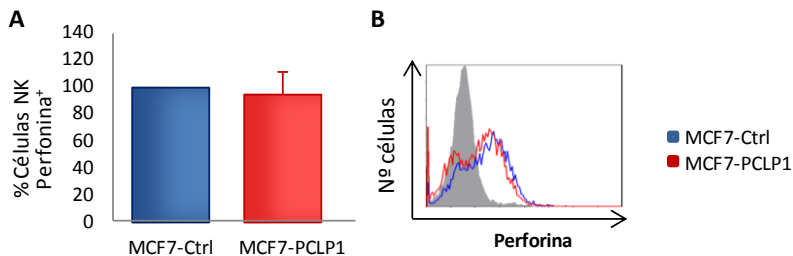


Figura 24. Efecto de PCLP1 en la producción de perforina por parte de las células NK. Detección de la perforina intracelular en células NK mediante citometría de flujo. **A)** Porcentaje de células NK que expresan perforina tras incubación con MCF7-Ctrl (azul) o con MCF7-PCLP1 (rojo). Los datos se expresan normalizados considerando como 100% la expresión en células NK incubadas con MCF7-Ctrl. **B)** Histograma representativo de 5 donantes sanos donde se muestra la distribución de la expresión de la perforina respecto al número de células, señalando en color gris el control isotópico.

2.7. Efecto de PCLP1 en la secreción de citocinas por células NK

Las citocinas IFN- γ y TNF- α producidas por las células NK inducen sinérgicamente la citólisis de las células tumorales, a la vez que activan otras células implicadas en la respuesta inmunitaria. Se ha descrito que ciertas moléculas expresadas por las células tumorales pueden modular los niveles de expresión de estas citocinas.^{173,284} Por ello, tratamos de determinar si el aumento de la resistencia a la lisis de las células MCF-7 inducido por la expresión de PCLP1 podría deberse a un efecto de esta proteína sobre la producción de IFN- γ y TNF- α por las células NK. Con ese objetivo, tras el co-cultivo de ambos tipos celulares, se determinó mediante citometría de flujo el contenido intracelular de estas citocinas en las células NK.

Como se muestra en la Figura 25, la presencia de células tumorales en el cultivo incrementa la expresión de citocinas en las células NK. Sin embargo, no se observan variaciones ni en el porcentaje de células NK secretoras de citocinas ni en la cantidad total de citocinas secretadas en células NK cultivadas en presencia de MCF7-PCLP1 respecto al control. Asimismo, evaluamos la proporción de las células NK denominadas multifuncionales, es decir, células NK que presentan la capacidad tanto para liberar gránulos citotóxicos como para producir citocinas. Para ello, determinamos los niveles de expresión de IFN- γ y/o TNF- α en células positivas para CD107a. Como se desprende de la Figura 25, y al contrario de lo esperado, el análisis del porcentaje de células NK multifuncionales (CD107a⁺IFN- γ ⁺, CD107a⁺TNF- α ⁺ o CD107a⁺IFN- γ ⁺TNF- α ⁺) no mostró diferencias significativas entre aquellas incubadas con MCF7-PCLP1 y las incubadas con MCF7-Ctrl. Estos resultados indican que PCLP1 expresada en las células MCF7 no regula la producción de citocinas por parte de las células NK.

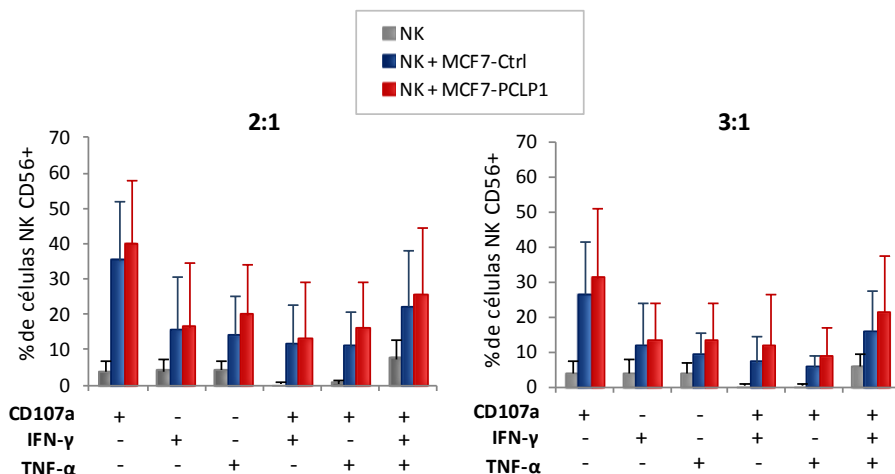


Figura 25. Efecto de PCLP1 en la producción de citocinas por las células NK. Detección de las citocinas IFN-γ y TNF-α intracelulares producidas por las células NK mediante citometría de flujo. Gráficos que muestran el porcentaje de células NK CD56⁺ positivas para CD107a, IFN-γ y/o TNF-α incubadas en ausencia de células tumorales (gris) o en presencia de células MCF7-Ctrl (azul) o MCF7-PCLP1 (rojo) durante 4 horas en una relación E:T de 2:1 y 3:1. Latos muestran la media de 5 a 6 donantes sanos.

2.8. Formación de conjugados entre células NK y células MCF-7 que sobreexpresan PCLP1

La citotoxicidad mediada por células NK requiere el contacto directo entre la célula efectora y la célula diana, dando lugar a la formación de la sinapsis inmunológica y a la liberación de proteínas citolíticas sobre la célula tumoral. Varios estudios han descrito en la superficie de las células tumorales la presencia de moléculas antiadhesivas que impiden su interacción con las células NK. Por lo tanto, tratamos de evaluar si PCLP1 expresada en células tumorales interfiere en la interacción entre células efectoras y células tumorales diana. Con este propósito, se co-cultivaron las células NK previamente marcadas con CMTMR con las células MCF7-PCLP1 o MCF7 control durante diferentes tiempos y se determinó la formación de conjugados mediante el análisis por citometría de flujo del número de eventos doblemente positivos (CMTMR⁺GFP⁺). Tal y como se observa en la Figura 26, no se observan variaciones estadísticamente significativas entre el porcentaje de células

MCF7-PCLP1 unidas a las células NK con respecto a las células control en ninguno de los tiempos estudiados. Estos resultados sugieren que PCLP1 no altera la interacción de células NK con células tumorales.

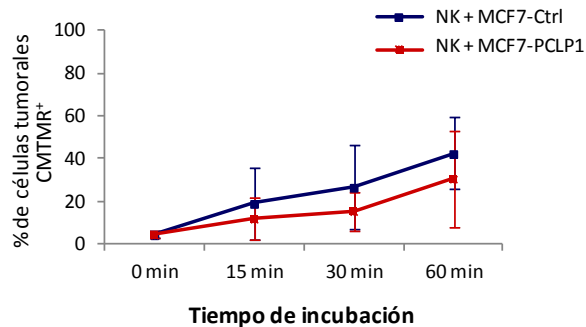


Figura 26. Efecto de PCLP1 en la formación de conjugados entre células NK y células tumorales. Para observar la formación de conjugados se marcaron las células NK con CMTMR y se determinó el porcentaje de células doblemente positivas (GFP^+CMTMR^+) mediante citometría de flujo. En el gráfico se muestra el porcentaje de células MCF7-Ctrl (azul) y MCF7-PCLP1 (rojo) positivas para CMTMR durante diferentes tiempos de co-incubación con las células NK. Datos expresados como media de 3 donantes sanos.

2.8.1. Localización de PCLP1 en los conjugados celulares

Posteriormente, para determinar la localización de PCLP1 durante el transcurso de la interacción entre células MCF7-PCLP1 y células NK, se co-incubaron ambos tipos celulares durante diferentes tiempos y se analizó la fluorescencia emitida por la proteína de fusión PCLP1-GFP mediante microscopía de fluorescencia. Como se muestra en la Figura 27, a los 15 minutos de incubación la proteína PCLP1 expresada en las células tumorales se polariza hacia la zona de contacto intercelular o sinapsis inmunológica. Transcurrida 1 hora de incubación, las células NK exhiben PCLP1 en su superficie, lo que indica que PCLP1 es transferida de las células tumorales a las células NK.

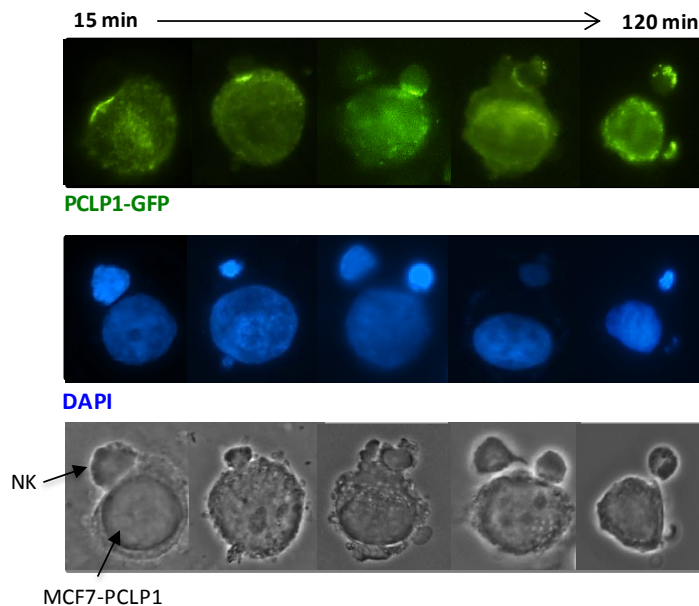


Figura 27. Localización de PCLP1 durante la interacción entre células MCF7-PCLP1 y células NK. Imágenes que muestran en color verde la proteína PCLP1-GFP (fila superior), en color azul los núcleos celulares teñidos con DAPI (fila intermedia) y en color gris las células visualizadas en contraste de fases (fila inferior). Las fotografías fueron obtenidas a diferentes tiempos de co-incubación de células MCF7-PCLP1 y células NK (indicadas con flechas), que se distinguen por su tamaño celular.

2.8.2. Transferencia de PCLP1 en los conjugados celulares

La transferencia de PCLP1 hacia la célula NK se confirmó mediante citometría de flujo (Figura 28). Los resultados obtenidos revelan la presencia de la proteína PCLP1-GFP en células NK co-incubadas con células MCF7-PCLP1, no detectándose GFP en células NK co-incubadas con células MCF7-Ctrl.

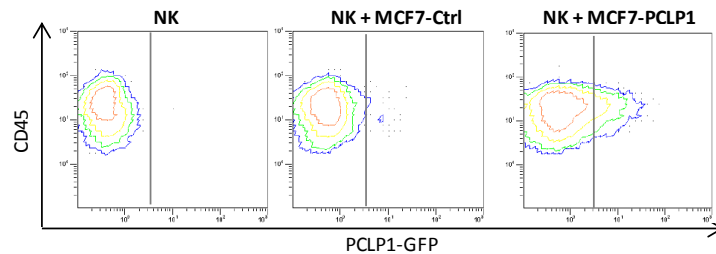


Figura 28. Análisis de la adquisición de PCLP1 expresada en células tumorales por las células NK. Diagramas de contornos que muestran la expresión de PCLP1-GFP en células NK incubadas en ausencia o en presencia de MCF7-Ctrl o MCF7-PCLP1. Los colores representan la densidad de células de menor a mayor: azul-verde-amarillo-naranja-rojo.

La presencia de PCLP1 en las células NK podría deberse a un proceso de transferencia de fragmentos de membrana y moléculas asociadas denominado trogocitosis. La trogocitosis tiene lugar tras la formación de la sinapsis inmunológica y debe cumplir ciertos requisitos, entre los que se incluyen presentar una cinética rápida, duración limitada y dependencia de contacto entre la célula donadora y la célula receptora. Por lo tanto, una vez confirmada la presencia de PCLP1 en la célula NK, se analizó la cinética de la transferencia de esta proteína marcada en GFP. Para ello, se co-incubaron células MCF7-PCLP1 con células NK a diferentes tiempos y se determinó el porcentaje de células NK ($CD45^+$) positivas para PCLP1-GFP (Figura 29). Los resultados obtenidos muestran que a los 10 minutos de incubación, alrededor del 17% de las células NK adquieren PCLP1-GFP, lo que refleja la rapidez del proceso de transferencia. Al cabo de 1 hora de incubación se alcanza el valor máximo de adquisición, con un porcentaje de células NK positivas para PCLP1 de aproximadamente el 25%, el cual posteriormente decae progresivamente hasta volver a los valores iniciales, sugiriendo que se trata de un proceso temporal.

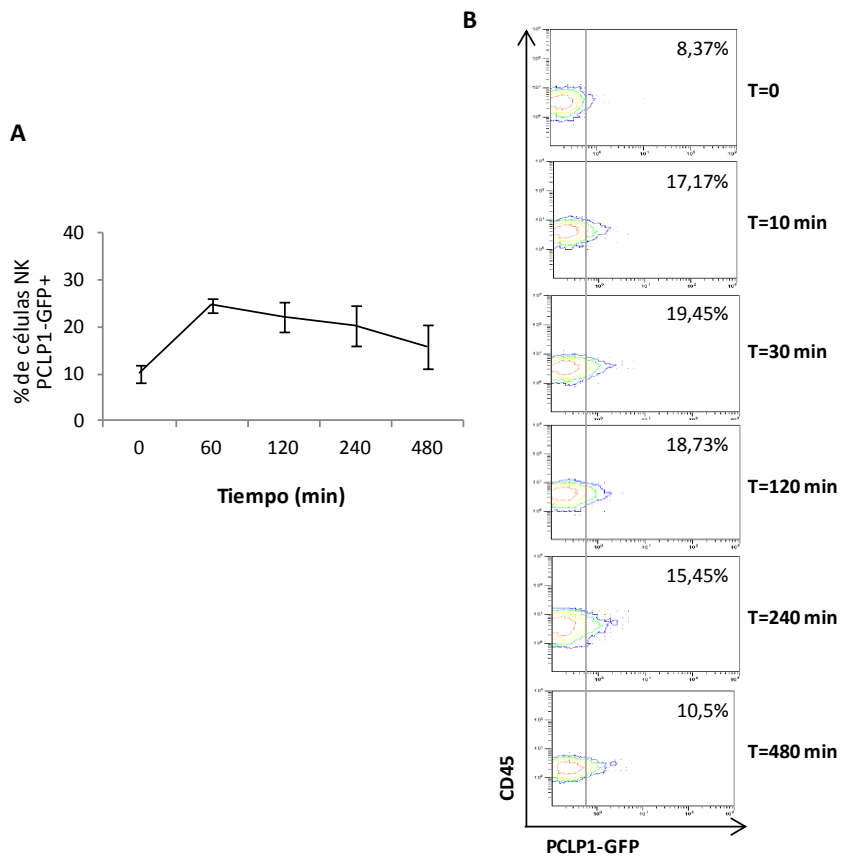


Figura 29. Cinética de transferencia de PCLP1 de las células tumorales a las células NK. **A)** Gráfico que representa la media del porcentaje de células NK positivas para PCLP1-GFP que han sido previamente incubadas con células MCF7-PCLP1 durante diferentes tiempos. **B)** Diagramas de contorno representativos de 3 donantes sanos donde se muestran los porcentajes de células NK que muestran expresión de PCLP1-GFP. Los colores representan la densidad de células de menor a mayor: azul-verde-amarillo-naranja-rojo.

A continuación, para averiguar si la transferencia de PCLP1 es dependiente de contacto intercelular o de la adquisición de fragmentos de membrana presentes en el medio de cultivo, se incubaron las células MCF7-Ctrlo MCF7-PCLP1 con las células NK durante 1 hora en presencia o ausencia de una membrana semipermeable con un diámetro de poro de 0,4 μm que impide el contacto intercelular. Como revela la Figura 30, en ausencia de contacto intercelular no se observa adquisición de PCLP1 por las células NK, lo que demuestra que el proceso de transferencia es dependiente de contacto celular.

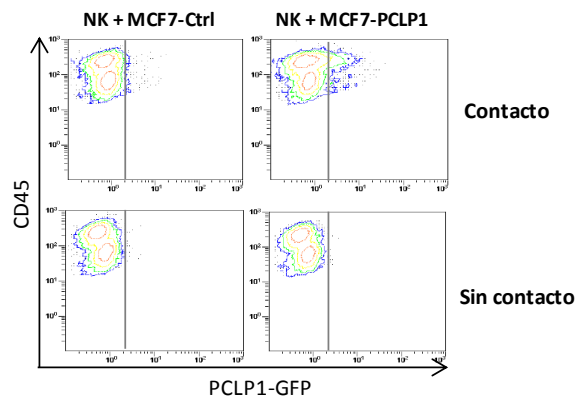


Figura 30. Análisis de la adquisición de PCLP1 expresada en células tumorales por las células NK. Diagramas de contorno que muestran la expresión de PCLP1-GFP en células NK incubadas con MCF7-Ctrl o MCF7-PCLP1 durante 1 hora en presencia o ausencia de una membrana semipermeable. Los colores representan la densidad de células de menor a mayor: azul-verde-amarillo-naranja-rojo.

En conjunto, los resultados obtenidos indican que la transferencia de PCLP1 de las células tumorales a las células NK reúne las características propias del mecanismo de trogocitosis.

2.9. Efecto de PCLP1 en la maduración de las células dendríticas

La maduración de las DCs en el microambiente tumoral se encuentra a menudo inhibida por moléculas expresadas por las células malignas, lo que da lugar a una acumulación de DCs inmaduras (iDCs) con reducida capacidad de presentación antigénica y baja expresión de moléculas co-estimuladoras, disminuyendo en última instancia la respuesta antitumoral adaptativa.^{247,250} Por esta razón, decidimos examinar el efecto de PCLP1 expresada en células tumorales durante el proceso de maduración de las DCs. Con este propósito, se estimuló la maduración de MoDCs con LPS en presencia de células MCF7-PCLP1 o MCF7-Ctrl y se determinó mediante citometría de flujo la expresión de marcadores de maduración y moléculas co-estimuladoras, incluyendo CD80, CD83, CD86, CD40, CD206, CD54 y HLA-DR.

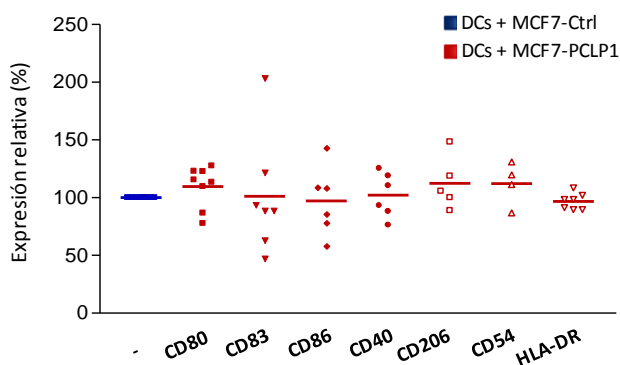


Figura 31. Efecto de PCLP1 en la expresión de marcadores de maduración en DCs. Análisis por citometría de flujo de la expresión en superficie de los marcadores de maduración indicados en DCs incubadas con MCF7-Ctrl (azul) o MCF7-PCLP1 (rojo) durante el proceso de maduración con LPS. La gráfica representa la media de 4 a 8 experimentos normalizados considerando 100% la expresión en DCs incubadas con MCF7-Ctrl.

Como se presenta en la Figura 31, los resultados obtenidos no muestran diferencias significativas entre DCs incubadas con MCF7-PCLP1 y aquellas incubadas con células MCF7-Ctrl en los niveles de expresión de ninguna de las moléculas estudiadas, lo que indica que PCLP1 expresada en células MCF-7 no modula la maduración de las DCs inducida por LPS.

2.10. Efecto de PCLP1 en la proliferación linfocitaria

La amplificación de la respuesta inmunitaria es esencial para la erradicación de las células tumorales y se produce en parte mediante la proliferación de linfocitos T y células NK. Sin embargo, algunos tipos de tumores han desarrollado la capacidad de inhibir la proliferación linfocitaria a través de la expresión de moléculas inmunosupresoras, evadiendo de este modo la inmunovigilancia. Por otro lado, PCLP1 ha sido implicada en la regulación de la proliferación linfocitaria por las células mesenquimales. Para averiguar si PCLP1 expresada en células tumorales de mama modula negativamente la proliferación linfocitaria, se estimuló la proliferación de PBMCs con diferentes estímulos en presencia de células tumorales. La proliferación linfocitaria se determinó mediante citometría de flujo en base a la disminución de la intensidad de fluorescencia emitida por CFSE.

2.10.1. Proliferación de linfocitos T

Para determinar el efecto de PCLP1 en la proliferación de linfocitos T, se incubaron las PBMCs con células MCF7-PCLP1 o MCF7-Ctrl en una relación E:T de 2:1 durante 4 días en presencia del mitógeno policlonal PHA. Como se advierte en la Figura 32, la proliferación de linfocitos T CD3⁺ inducida por PHA en ausencia de células tumorales varía en función del donante, con un amplio rango de valores que abarca desde el 20 al 90%. Los resultados muestran que en presencia de MCF-7 control, se observa una disminución estadísticamente significativa del porcentaje de linfocitos T CD3⁺ que han proliferado en respuesta a PHA. Cuando el cultivo se realiza en presencia de células MCF-7 que sobreexpresan PCLP1, la respuesta proliferativa de los linfocitos T CD3⁺ sufre una reducción significativamente mayor que la observada en presencia de células MCF-7 control.

A continuación, para evaluar si la inhibición de la proliferación de los linfocitos T totales se limitaba a una subpoblación determinada, se analizó la tasa de proliferación de linfocitos CD4⁺ (cooperadores) y linfocitos CD8⁺ (citotóxicos) mediante el uso de anticuerpos específicos. Los datos revelan una reducción significativa en la proliferación de ambos subtipos linfocitarios al cultivarlos en presencia de células MCF7-PCLP1 con respecto al control, siendo más pronunciada en la subpoblación de linfocitos CD8⁺.

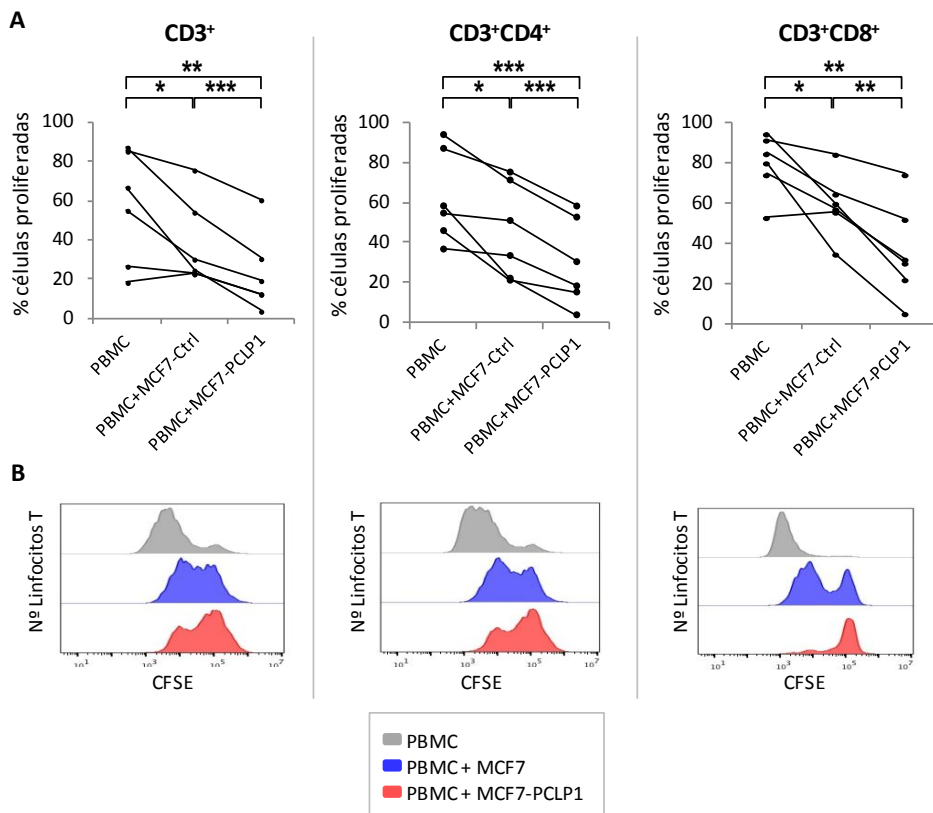


Figura 32. Efecto de PCLP1 en la proliferación de linfocitos T inducida por PHA. A) Porcentaje de linfocitos T provenientes de PBMCs que han proliferado en ausencia o presencia de células MCF7-Ctrl o MCF7-PCLP1, usando 10 µg/ml de PHA como estímulo proliferativo. **B)** Histograma representativo de la proliferación de los linfocitos T provenientes de 6 donantes sanos incubados en ausencia de células tumorales (gris), en presencia de células MCF7-Ctrl (azul) o de células MCF7-PCLP1 (rojo). Se representa la proliferación de los linfocitos T totales (CD3⁺, primera columna), linfocitos T cooperadores (CD3⁺CD4⁺, segunda columna) y linfocitos T citotóxicos (CD3⁺CD8⁺, tercera columna). *P<0,05; **p<0,01;*** p<0,001.

2.10.2. Proliferación de células NK

El estudio del efecto de PCLP1 en la proliferación de células NK se realizó incubando las PBMCs en presencia de IL-2 durante 7 días. Dado que la co-incubación de las células NK con las células tumorales desde el inicio del cultivo (durante los 7 días de estímulo) inhibe completamente la proliferación celular (datos no mostrados), impidiendo de ese modo la detección de un posible efecto inhibitorio adicional de PCLP1, las células tumorales se añadieron al cultivo el sexto día del ensayo. Los

resultados obtenidos muestran una proliferación similar de células NK ($CD3^-CD56^+$) cultivadas solas, en presencia de células MCF7-Ctrl en presencia de células MCF7-PCLP1. Se analizó en detalle cada una de las divisiones experimentadas por las células que habían proliferado y no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de células en cada una de las divisiones. (Figura 33).

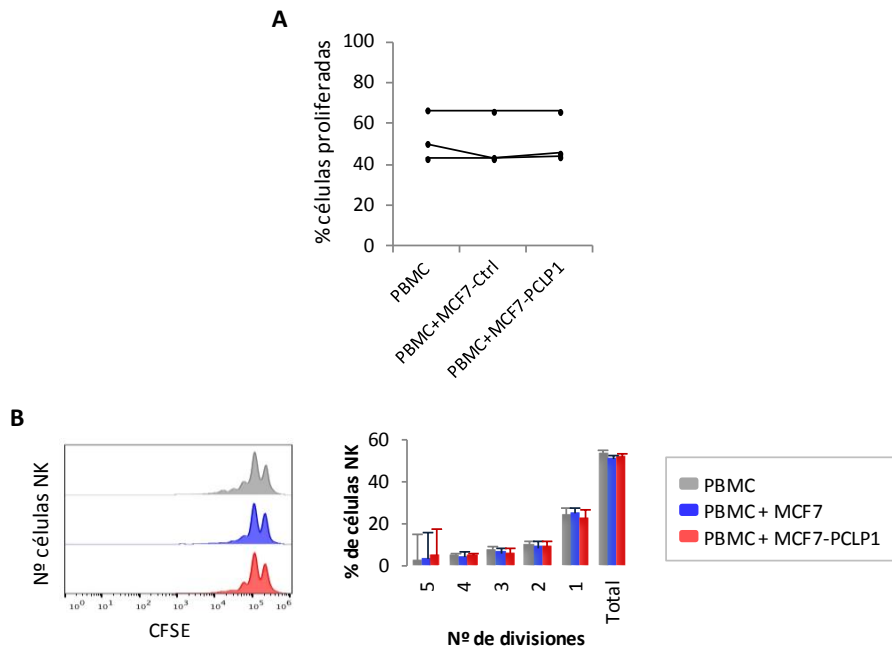


Figura 33. Efecto de PCLP1 en la proliferación de células NK inducida por IL-2. A) Porcentaje de células NK provenientes de PBMCs que han proliferado en ausencia o presencia de células MCF7-Ctrl o MCF7-PCLP1, utilizando 1000 U/ml de IL-2 como estímulo proliferativo. **B)** Histograma representativo de la proliferación de las células NK provenientes de 3 donantes sanos y gráfico que muestra el porcentaje de células NK en cada una de las divisiones. Donde se muestra la proliferación de células NK incubadas en ausencia de células tumorales (gris), en presencia de células MCF7-Ctrl (azul) o de células MCF7-PCLP1 (rojo).

2.10.3. Inducción de linfocitos T reguladores

Para determinar si PCLP1 modula la inducción de linfocitos T reguladores (Tregs), se estimularon las PBMCs con IL-2 durante 6 días y posteriormente se cultivaron en presencia de células MCF7-PCLP1 o MCF7-Ctrl durante 24 horas adicionales. Los resultados obtenidos en la Figura 34 no muestran diferencias

significativas entre el porcentaje de linfocitos Tregs ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$) inducidos en presencia de células MCF7-PCLP1 y el obtenido con células MCF7-Ctrl, lo que indica que PCLP1 no modifica la generación de linfocitos Tregs.

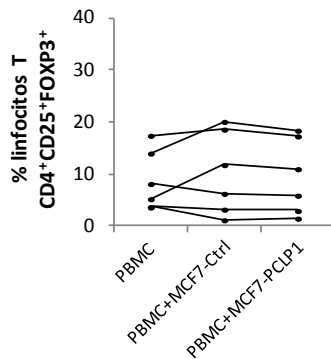


Figura 34. Efecto de PCLP1 en el desarrollo de linfocitos T reguladores (Tregs). A) Porcentaje de linfocitos Tregs $FOXP3^+$ del total de células $CD4^+CD25^+$ tras estimulación con 1000 U/ml de IL-2, incubadas en ausencia o presencia de células MCF7-Ctrl o células MCF7-PCLP1 Datos provenientes de 6 donantes sanos.

En resumen, los resultados obtenidos indican que PCLP1 expresada en células tumorales de mama inhibe significativamente la proliferación de los linfocitos T $CD4^+$ y linfocitos T $CD8^+$ inducida por PHA, pero no ejerce ningún efecto sobre la respuesta proliferativa de las células NK ni sobre la generación de Tregs inducida por IL-2.

2.11. Regulación de la expresión de PCLP1 por citocinas

Tanto las células tumorales como los linfocitos presentes en el microambiente tumoral producen citocinas inmunomoduladoras, incluyendo IL-4 y TGF- β 1, que a su vez inducen la expresión de moléculas involucradas en la progresión del cáncer y en la evasión de la inmunovigilancia.^{254,285} Estudios previos han descrito un incremento del ARNm de PCLP1 en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 tras tratamiento con TGF- β 1.⁷⁵ Por otra parte, se ha detectado un aumento de los niveles proteicos de PCLP1 en respuesta a esta citocina en la línea celular A459 de adenocarcinoma de pulmón.²⁸⁶ En cambio, el efecto de IL-4 en la regulación de la expresión de PCLP1 aún

se desconoce. Para averiguar si TGF- β 1 e IL-4 regulan la expresión proteica de PCLP1 en células de cáncer de mama, se cultivaron las líneas celulares MCF-7 y MDA-MB-231 en presencia de estas citocinas y se analizaron los niveles de expresión de PCLP1 mediante *Western Blot*.

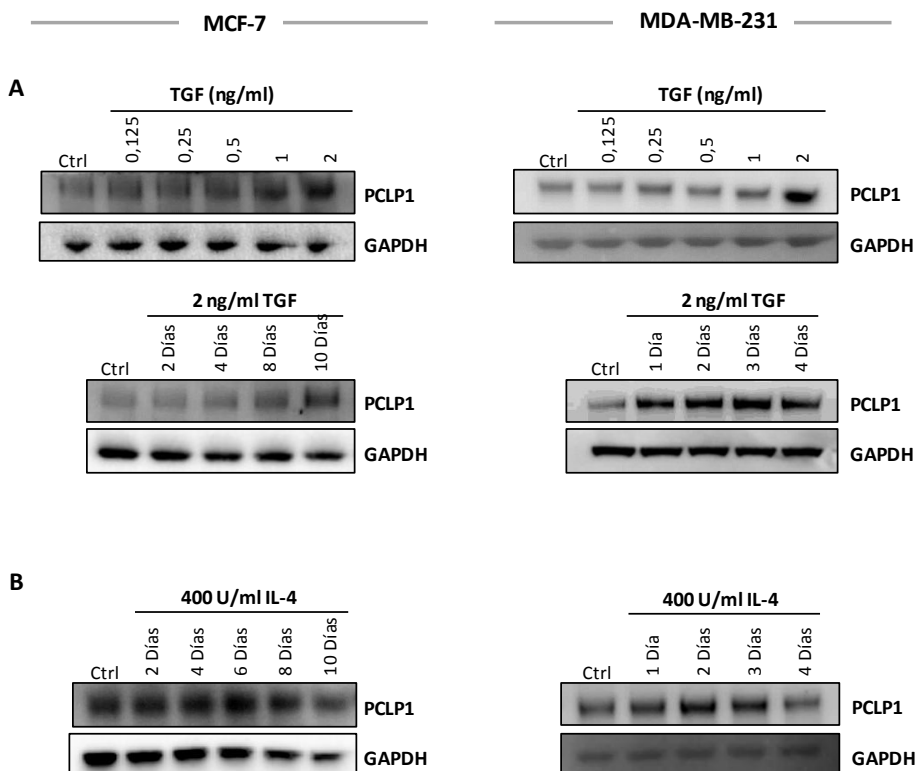


Figura 35. Estimulación de la expresión de PCLP1 por las citocinas TGF- β 1 e IL-4. Expresión de PCLP1 en las líneas celulares MCF-7 (izquierda) y MDA-MB-231 (derecha) determinada mediante *Western blot* con un anticuerpo anti-PCLP1. **A)** Expresión de PCLP1 inducida por concentraciones crecientes de TGF- β 1 y a diferentes tiempos. **B)** Expresión de PCLP1 inducida por 400 U/ml de IL-4 a diferentes tiempos en células MCF-7 y en células MDA-MB-231. Como control de carga, se muestra la expresión de GAPDH.

Los resultados mostrados en la Figura 35 revelan que la citocina TGF- β 1 induce la expresión de PCLP1 de forma dependiente de concentración y de tiempo de exposición. A la dosis más elevada de las ensayadas (2 ng/ml), se observa un incremento notable en la expresión de PCLP1 en ambas líneas celulares en respuesta

a TGF- β 1. Las células MDA-MB-231 alcanzan la máxima expresión de PCLP1 a los 3 días de incubación con 2 ng/ml de TGF- β 1, empezando a decaer a los 4 días. Sin embargo, las células MCF-7 requieren 10 días de incubación para lograr un nivel de expresión similar. Asimismo, la incubación de las líneas celulares de cáncer de mama en presencia de IL-4 induce un destacado incremento de PCLP1, alcanzando su nivel máximo de expresión a los 3 días en células MDA-MB-231 y a los 6-8 días en el caso de células MCF-7.

A continuación nos propusimos caracterizar las rutas de señalización involucradas en la inducción de la expresión de PCLP1 por TGF- β 1 e IL-4 mediante el uso de inhibidores específicos. Este ensayo se realizó en la línea celular MDA-MB-231, dado que el nivel de expresión de PCLP1 en estas células es más elevado que en las células MCF-7, lo que permite detectar con mayor claridad el efecto ejercido por los inhibidores. Con este fin, se incubaron las células MDA-MB-231 en condiciones de máxima expresión de PCLP1 para cada citocina (2ng/ml de TGF- β 1 o 400U/ml de IL-4 durante 3 días) en presencia de concentraciones crecientes de inhibidores específicos de las vías de señalización MEK/ERK (PD098059) y p38MAPK (SB202190), que se activan tras la interacción de dichas citocinas con su receptor. Asimismo, se analizó el efecto de la inhibición de la ruta JAK, que interviene en la transmisión de señales inducida por TGF- β 1, mediante el tratamiento de las células tumorales con el inhibidor específico PF956980.

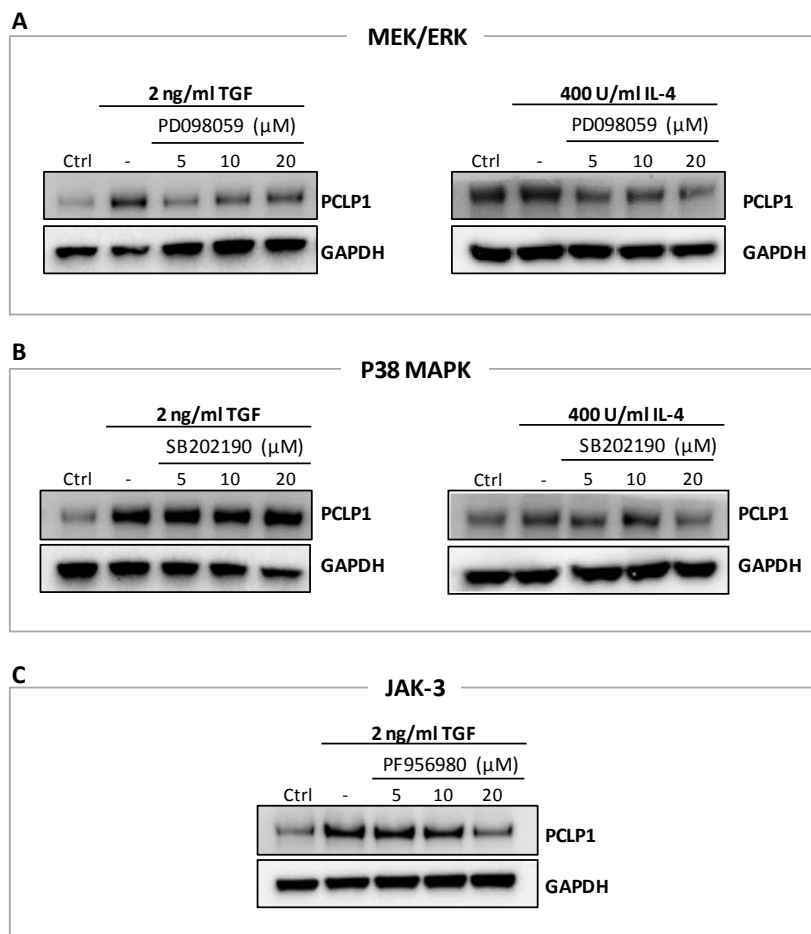


Figura 36. Análisis de las rutas involucradas en la inducción de la expresión de PCLP1 mediada por TGF- β 1 e IL-4. Detección mediante *Western blot* de la expresión de PCLP1 en la línea celular MDA-MB-231 con un anticuerpo anti-PCLP1. Estimulación de la expresión de PCLP1 inducida por TGF- β 1 (izquierda) o IL-4 (derecha) en presencia de concentraciones crecientes de los inhibidores de la de la ruta MEK/ERK (PB98059) (A), de la ruta p38 MAPK (SB202190) (B) y de la ruta JAK-3 (PF956980) (C). Como control de carga, se muestra la expresión de GAPDH.

Como refleja la Figura 36, la expresión de PCLP1 inducida por TGF- β 1 se inhibe tras tratamiento de las células tumorales con los inhibidores PD098059 y PF956980, específicos para las rutas MEK/ERK y JAK-3 respectivamente. A su vez, el incremento en la expresión de PCLP1 en respuesta a la estimulación con IL-4 es bloqueada por la adición del inhibidor PD098059, específico de la ruta MERK/ERK.

Estos resultados indican que TGF- β 1 induce la expresión de PCLP1 en las células MDA-MB-231 a través de la cascada de señalización MEK/ERK y JAK, mientras que IL-4 aumenta dicha expresión tras la activación de las rutas MEK/ERK y p38MAPK.

V. DISCUSIÓN

1. PCLP1 se expresa en células dendríticas y participa en el mantenimiento del fenotipo inmaduro

PCLP1 es conocida principalmente por su función relevante en el funcionamiento del riñón. Sin embargo, su papel en células hematopoyéticas aún no se conoce con claridad. Como miembro de la familia de proteínas CD34, PCLP1 se expresa en progenitores hematopoyéticos durante el desarrollo embrionario, donde contribuye en el proceso de migración y diferenciación celular.^{34,36} En la fase adulta la expresión de PCLP1 decae y se restringe a células del linaje megacariocítico y a una subpoblación de células madre hematopoyéticas relacionadas con el linaje mieloide y linfoide.³⁹ No obstante, varios estudios han descrito la presencia del ARNm de PCLP1 en linfocitos, monocitos y granulocitos humanos,³⁸ así como la forma proteica de PCLP1 en monocitos estimulados con M-CSF durante su diferenciación a macrófagos.³⁷

En el presente trabajo se ha detectado por primera vez la expresión de PCLP1 en células dendríticas (DCs) provenientes de adultos humanos, sin observarse expresión en otras células inmunitarias como células NK o linfocitos T. Concretamente, PCLP1 aparece en DCs mieloides y en DCs derivadas de monocitos (MoDCs), no detectándose niveles apreciables de esta proteína en la superficie de DCs plasmacitoides. Esta expresión heterogénea entre diferentes subpoblaciones de DCs podría estar relacionada con el origen de cada una de estas células. Aún no se conocen con exactitud las vías de diferenciación de las DCs a partir de células madre hematopoyéticas (HSCs) y su clasificación no está clara. Pese a ello, varios estudios apuntan a la existencia de un progenitor mieloide común (CMP) que da lugar al progenitor macrófago-dendrítico (MDP) y al progenitor común de DCs (CDP), los cuales se diferencian a monocitos y a DCs precursoras (pre-DCs) respectivamente. Ciertos estudios sugieren que tanto las DCs mieloides como las DCs plasmacitoides surgen del CDP. Sin embargo, trabajos realizados en ratón sugieren que las DCs plasmacitoides podrían surgir de un progenitor linfoide común (CLP), tal y como se plasma en la Figura 37.^{88,89,287}

Esta diferenciación a partir de CLP podría explicar la ausencia de PCLP1 en DCs plasmacitoides con respecto a DCs mieloides. De hecho, la morfología, función, expresión génica y migración de DCs plasmacitoides difieren del resto de subpoblaciones de DCs.^{90,287,288}

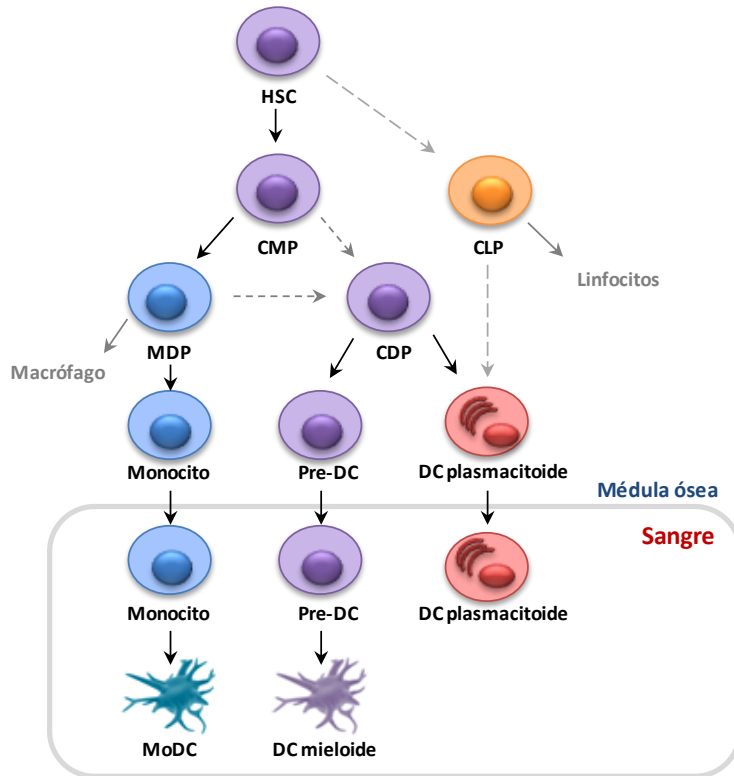


Figura 37. Origen de las diferentes subpoblaciones de DCs sanguíneas. HSC: célula madre hematopoyética, CMP: progenitor mieloide común, CLP: progenitor linfoide común, MDP: progenitor macrófago-dendrítico, CDP: progenitor común de las DCs; Pre-DC: DCs precursoras.

Las sialomucinas presentes en la membrana celular ejercen un papel determinante en la maduración de las DCs. Tal y como han señalado varios estudios, existe una relación negativa entre la expresión de ácidos siálicos y la maduración celular, de forma que, su eliminación de la superficie de las DCs tiene como resultado la inducción de la maduración, disminuyendo así la capacidad de captar antígenos y aumentando la capacidad de presentarlos a células inmunitarias.²⁸⁹⁻²⁹¹

Concretamente, el tratamiento con neuraminidasa, una enzima que elimina de manera no específica ácidos siálicos unidos a α -2,3 y α -2,6 de la superficie celular, induce la expresión tanto de moléculas MHC como de moléculas co-estimuladoras en la superficie de MoDC, altera la expresión de diferentes citocinas y aumenta la habilidad de las DCs para activar linfocitos T.²⁹²⁻²⁹⁴ Basándonos en estas observaciones, nos propusimos evaluar la expresión de PCLP1 en los diferentes estadios madurativos de las DCs provenientes de monocitos. Los resultados muestran que los niveles de expresión de PCLP1 en monocitos aislados de sangre periférica se ven incrementados tras la exposición de a estímulos que inducen la diferenciación a iDC, como GM-CSF e IL-4. Sin embargo, la maduración de estas células mediada por las moléculas estimuladoras LPS, poli I:C o el cóctel de citocinas proinflamatorias compuesto por TNF- α , IL-6, IL-1 β y PGE2, tiene como consecuencia la reducción de la expresión de PCLP1.

La presencia de PCLP1 en DCs el estado inmaduro de las DCs y su ausencia en células maduras sugería la participación de esta sialomucina en el proceso de maduración. Esta cuestión fue abordada induciendo la señalización intracelular de PCLP1 mediante la adición de un anticuerpo específico anti-PCLP1 durante la maduración de las iDCs y analizando su efecto sobre la expresión de marcadores de maduración. Los resultados revelaron que la señalización mediada a través de PCLP1 provoca una maduración ineficiente de las DCs, como refleja la reducida expresión de HLA-DR, del marcador de maduración CD83 y de la molécula co-estimuladora CD86 en la superficie de estas células. El aumento de expresión de las moléculas HLA-DR, CD83 y CD86 es necesario para la función presentadora de antígeno e inmunomoduladora llevadas a cabo por las mDCs. CD83 promueve la expresión de moléculas de MHC de clase II (como HLA-DR) y CD86, que participan en la activación y control de los linfocitos T.^{92,295,296} Por el contrario, se ha observado que la reducción de los niveles de expresión de la molécula CD83 genera unas DCs con menor capacidad para estimular a linfocitos T antígeno-específicos y promover el desarrollo de CD8⁺.⁹¹ Además, se ha descrito que la disminución de CD86 debilita las interacciones celulares entre células dendríticas y linfocitos T, atenuando la activación de linfocitos T y

promoviendo el desarrollo de Tregs.²⁹⁷⁻²⁹⁹ Estas observaciones sugieren que PCLP1 podría actuar en las DCs como una molécula inmunosupresora, alterando la presentación antigénica y la activación linfocitaria a través de la disminución de los receptores HLA-DR, CD83 y CD86.

Por otra parte, nuestros resultados muestran la localización de PCLP1 en el extremo posterior de iDCs que migran sobre una superficie cubierta de fibronectina. Durante el proceso de migración, los leucocitos adoptan una morfología polarizada, con la formación de dos polos funcionalmente diferentes: el frente de avance, rico en receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión al sustrato que inducen el movimiento direccional de la célula, y el urópodo en el polo posterior, donde se localizan las proteínas que participan en la activación y adhesión intercelular. Los urópodos son protuberancias celulares con capacidad para ejercer movimientos continuos que permiten la exploración del microambiente y el contacto recíproco con otras células, como la formación de la sinapsis inmunológica.^{300,301} Dichas estructuras, basadas en actina, se encuentran enriquecidas en microvellosidades y proteínas adaptadoras ERM (Ezrina-Radixina-Moesina). La ubicación de PCLP1 en los urópodos está en concordancia con resultados anteriores que sitúan a PCLP1 en las microvellosidades celulares y atribuyen a esta proteína la capacidad para inducir su formación.^{27,84} Asimismo, el hallazgo revelado en la presente tesis sobre la presencia de PCLP1 en la sinapsis inmunológica de células NK y células tumorales parece sugerir que PCLP1 podría localizarse en la sinapsis que se establece entre DCs y linfocitos, regulando de ese modo la respuesta linfocitaria.

2. PCLP1 funciona como molécula inmunosupresora en células de cáncer de mama

Hasta la fecha, se han concentrado muchos esfuerzos en tratar de analizar los mecanismos de escape tumoral a la inmunovigilancia y en entender las bases moleculares de la tolerancia tumoral. Con la finalidad de protegerse de la respuesta antitumoral, algunos tumores expresan moléculas propias de células normales cuya función fisiológica natural es proteger a los tejidos de la activación inmunitaria. La expresión de reguladores negativos del sistema inmunitario representa un mecanismo crucial de escape y progresión tumoral en pacientes con cáncer. Un claro ejemplo de ello es la molécula B7-H1/PD-L1, que se expresa tanto en DCs, células epiteliales, células mieloides y linfocitos T en respuesta a citocinas proinflamatorias, como en células tumorales.³⁰² Asimismo, se ha detectado la expresión de esta molécula en DCs, fibroblastos y linfocitos T presentes en el microambiente tumoral, donde actúa inhibiendo la respuesta inmunitaria antitumoral. La expresión de B7-H1/PD-L1 se considera como uno de los principales mecanismos evasión tumoral y su bloqueo representa actualmente el objetivo de numerosos ensayos clínicos.³⁰³

La función inmunomoduladora de PCLP1 en DCs determinada en el presente trabajo sugiere que esta proteína podría ejercer un papel similar en células tumorales. A pesar de la correlación observada entre la expresión de PCLP1 en células malignas y progresión tumoral, no existen evidencias del efecto de esta proteína en el desarrollo de la respuesta inmunitaria antitumoral. En el presente estudio describimos por primera vez la función inmunosupresora de PCLP1 expresada en células de cáncer de mama. Bajo condiciones *in vitro*, nuestro trabajo demuestra que PCLP1 expresada en células tumorales participa en la resistencia a la citotoxicidad mediada por las células NK, en la modulación del fenotipo de células NK y en la disminución de la proliferación linfocitaria inducida por agonistas.

2.1. PCLP1 confiere resistencia tumoral a la citotoxicidad mediada por células NK

Con el objetivo de determinar la posible implicación de PCLP1 expresada en células tumorales sobre la función y el fenotipo de las células NK durante la respuesta antitumoral, se transfectó la línea celular de cáncer de mama MCF-7 para obtener células con altos niveles de expresión de PCLP1. El co-cultivo *in vitro* de estas células tumorales con las células NK previamente activadas con IL-2 reveló que los niveles de expresión de PCLP1 se relacionan con la supervivencia tumoral.

PCLP1 expresada en células tumorales induce resistencia a la lisis mediada por las células NK. De hecho, la población resistente a la lisis presenta mayores niveles de expresión de PCLP1, sugiriendo que las células NK eliminan las células tumorales con menores niveles de expresión de PCLP1, seleccionando así las variantes más resistentes. Este mismo fenómeno se ha observado *in vivo* en neuroblastomas murinos sometidos a inmunoterapia con células NK, donde tras la respuesta antitumoral dependiente de células NK se desarrollaron tumores recurrentes con mayores niveles de expresión de moléculas MHC de clase I.³⁰⁴ La selección de una población celular con mayor expresión de PCLP1 contribuiría al escape inmunitario y al establecimiento de células tumorales con mayor agresividad. Dado que, tal y como se ha demostrado en varios estudios, un aumento de expresión de PCLP1 dota a las células tumorales de una morfología celular alterada con superior capacidad migratoria y fenotipo metastásico.^{59,84,85}

En cuanto a los mecanismos de resistencia de las células tumorales a la lisis mediada por las células NK, se han identificado varias moléculas tumorales con efecto negativo sobre la viabilidad de las células NK. Como ejemplo, estudios *in vitro* e *in vivo* han observado que la expresión de FasL en células tumorales es capaz de inducir la apoptosis de células NK.^{283,305-308} Sin embargo, en nuestro modelo experimental no observamos un incremento en la muerte de las células NK en presencia de células tumorales con altos niveles de PCLP1, sino una alteración de su fenotipo. Esta alteración de las células NK ha sido descrita en varios estudios realizados en tumores

de mama, donde se asocia al escape tumoral de la vigilancia inmunológica por una deficiente función de las células NK, considerándose un indicador de invasividad y pronóstico desfavorable.^{192,309-311} Recientemente se ha demostrado que las células NK de pacientes con cáncer de mama presentan una actividad alterada y una disminución de los receptores de activación NKG2D, NKp30, DNAM-1 y CD16, debido en parte a la liberación de factores solubles como TGF- β 1.³¹² Estas observaciones se encuentran en consonancia con los resultados obtenidos en este estudio, los cuales muestran que PCLP1 expresada en células tumorales de cáncer de mama regula negativamente la expresión de receptores de activación implicados en el desencadenamiento de la respuesta citotóxica de las células NK. Esta regulación es dependiente de contacto entre ambas células e incluye la disminución de los receptores NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, DNAM-1 y CD16, presentes en la superficie de las células NK. Asimismo, se observa una disminución del receptor CD56, que participa en la adhesión y activación de las células NK promoviendo la liberación de citocinas.³¹³ Estudios previos han revelado que la mucina MUC16 expresada en células tumorales induce la disminución de la expresión en superficie de CD16, reduciendo la citotoxicidad mediada por anticuerpos en células de pacientes con cáncer de ovario.^{223,314,315} Igualmente, PCLP1 podría suprimir la citotoxicidad mediada por anticuerpos a través de la inhibición de la expresión de CD16. Estas evidencias sugieren que PCLP1 podría contribuir en cierta medida a la disminución de los receptores de activación descrita en células NK de pacientes con cáncer de mama.

El aumento de la resistencia a la citotoxicidad mediada por células NK observada en células tumorales que sobreexpresan PCLP1 también podría explicarse por la alteración de la expresión de ligandos que interaccionan con receptores activadores e inhibidores. Las moléculas MHC de clase I actúan como ligandos de receptores inhibidores y su aumento en la superficie de células tumorales se ha descrito como un mecanismo de resistencia a células NK activadas con IL-2 en tumores de melanoma.^{309,316} Por otro lado, la disminución de los ligandos de NKG2D, MIC-A y MIC-B proporciona resistencia a la lisis mediada por células NK en células madre de cáncer de mama. De hecho, tanto la pérdida de ligandos de NKG2D y la expresión de

moléculas MHC de clase I se encuentran relacionadas con un pronóstico desfavorable en pacientes con cáncer de mama.^{192,201,312,317,318} En consonancia con estas observaciones, los resultados obtenidos en el presente trabajo indican que PCLP1 induce un incremento de la expresión de moléculas HLA-ABC y una disminución de MIC-AB en la superficie de las células tumorales de cáncer de mama.

Aunque nuestros resultados muestran que PCLP1 disminuye la citotoxicidad mediada por células NK y la expresión de receptores activadores, no se observa alteración en la desgranulación, expresión de perforina ni en la producción de citocinas TNF- α e IFN- γ debidas a la expresión de PCLP1. Una posible explicación a este fenómeno podría ser que la disminución de los receptores de activación se viera contrarrestada por una disminución de receptores inhibidores, lo que finalmente desencadenaría una desgranulación normal.

Se han descrito varios mecanismos a través de los cuales las células tumorales son capaces de resistir a la citotoxicidad, como el impedimento de la interacción y formación de sinapsis entre células NK y células tumorales debido a la expresión de MUC16 en células de cáncer de ovario.²²³ Sin embargo, nuestro ensayo de formación de conjugados entre células NK y células tumorales reveló que PCLP1 no interviene en la interacción entre ambas células. Por otro lado, la resistencia a la apoptosis mediada por receptores de muerte es una característica muy común en tumores. Como se ha mencionado anteriormente, la expresión de formas inactivas de receptores de muerte o los receptores *decoy*, así como expresiones reducidas de receptores de muerte debidas a la regulación negativa, solubilización o secreción a través de exosomas, contribuye al escape tumoral.³¹⁹⁻³²⁵ Individualmente, la línea celular MCF-7 presenta en su superficie receptores (TRAILR) capaces de inducir la apoptosis como TRAIL-R1 y TRAIL-R2,³²⁶ sin embargo la expresión del receptor *decoy* TRAIL-R4 y la deficiente activación de las caspasas-8 y -3 hacen que esta línea celular se considere como una línea resistente a la apoptosis mediada por TRAIL.^{211,327-330} En cuanto a la muerte mediada por FasL/Fas en la célula MCF-7, nuestros resultados muestran que la expresión de PCLP1 regula de forma negativa la expresión de Fas en la superficie

tumoral. Esta disminución inducida por PCLP1 podría conferir resistencia a la apoptosis mediada por Fas, lo que permitiría explicar la resistencia a la citotoxicidad mediada por las células NK.

El incremento de la resistencia tumoral a la actividad de las células NK inducido por PCLP1 en el contexto de una maquinaria lítica intacta podría deberse a un aumento de la resistencia intrínseca de las células malignas. En malignidades hematológicas se ha detectado una resistencia a la citotoxicidad debida al impedimento de la formación de poros en la membrana tumoral ocasionada por una reducida unión de la perforina a la membrana.^{207,331} Otro estudio realizado con variantes tumorales resistentes a la muerte mediada por CTLs constata que, de forma similar a nuestro estudio, las células efectoras no presentan alteraciones ni en la desgranulación, ni en la formación de conjugados, ni en la expresión de gránulos citotóxicos como granzima B y perforina. Los autores demuestran que los cambios morfológicos debidos a la alteración de la polimerización y contenido de actina inducidos por la sobreexpresión de scinderina y efrina-A1 promueven la resistencia a la citotoxicidad inducida por CTLs a través de la formación de una sinapsis inmunológica ineficiente.^{332,333} De hecho, varios estudios han puesto de manifiesto la implicación del citoesqueleto de actina en la resistencia tumoral a la apoptosis inducida tanto por CTLs como por células NK.³³⁴⁻³³⁷ Dado que PCLP1 juega un papel esencial en la organización de actina en células de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231,⁸⁴ es posible que su expresión elevada altere la organización del citoesqueleto en la zona de contacto con las células NK, impidiendo el desencadenamiento del proceso lítico en la célula tumoral.

Centrándonos en la localización de PCLP1 durante la sinapsis inmunológica, nuestro trabajo revela que PCLP1 expresada por las células MCF-7 se polariza hacia la zona de contacto con las células NK y, posteriormente, es transferida a la membrana de estas células. Durante el proceso de sinapsis se produce un contacto directo entre la célula NK y la célula tumoral, donde se integran las señales de reconocimiento y respuesta antitumoral de la célula NK y se intercambian fragmentos de membrana y

moléculas entre ambos tipos celulares a través de un proceso denominado trogocitosis.^{156,157,338} Este proceso se describió inicialmente en las células del sistema inmunitario entre las que destacan los linfocitos B, T y células NK. Recientemente, se han publicado varios estudios que demuestran el proceso de trogocitosis entre células tumorales y células inmunitarias. Se cree que las células recurren a este mecanismo para evitar la pérdida de membrana después de la desgranulación. Sin embargo, cada vez más estudios apuntan a que la trogocitosis constituye un mecanismo de regulación de la respuesta inmunitaria.^{339,340} La transferencia de proteínas desde células tumorales hacia células NK mediante este proceso tiene como resultado la modificación de las características fenotípicas y/o funcionales de la célula receptora. Como ejemplo se ha descrito que la adquisición de antígenos carcinoembrionarios, HLA-G1 y m157 por parte de las células NK mediante trogocitosis inhibe la proliferación y la función citotóxica antitumoral de estas células.^{160,161} Del mismo modo, la transferencia de ligandos del receptor NKG2D como MIC-A o MIC-B ejerce un profundo efecto sobre la función de las células NK, teniendo como resultado la regulación negativa o bloqueo de su receptor NKG2D, lo cual tiene como consecuencia una reducida capacidad citotóxica de las células NK.^{159,161,162,341,342} Por otra parte, se ha observado que la adquisición de receptores de quimiocinas como CCR7 por parte de células NK incrementa la migración de estas células hacia los nódulos linfáticos.³⁴³ A demás, se ha sugerido que la transferencia de moléculas mediante trogocitosis ejerce un efecto mayor si las células NK presentan en su superficie el receptor de la molécula trogocitada.¹⁶¹

En nuestro trabajo hemos demostrado que PCLP1 expresada en células tumorales es transferida a células NK mediante un mecanismo que cumple los requerimientos de la trogocitosis, ya que se trata de un proceso rápido, dependiente de contacto celular y con una breve permanencia en la célula receptora. La presencia de PCLP1 en la superficie de células NK como consecuencia de la trogocitosis apoya en cierta medida la hipótesis del papel inmunomodulador de esta proteína. Cabe la posibilidad de que la transferencia de PCLP1 a las células NK tenga como consecuencia la alteración de su capacidad de adhesión a otras células y de migración

hacia ganglios linfáticos.^{30,344} En este proceso de transferencia podría estar implicada la selectina L, dado que se trata del único ligando identificado de PCLP1 expresado en la superficie de las células NK. Esta hipótesis se ve reforzada por un estudio que demuestra la interacción de PCLP1 expresada en células tumorales pancreáticas con selectina L purificada.⁶⁵

En conexión con el hallazgo de la presencia de PCLP1 en la sinapsis inmunológica, un estudio reciente ha revelado que PCLP1 se localiza en los terminales axónicos presinápticos del cerebro adulto y participa en la formación de la sinapsis neuronal.³³ Esta observación apoya la evidencia descrita en la literatura sobre la existencia de notables similitudes entre la sinapsis inmunológica y la sinapsis neuronal tanto a nivel molecular como funcional.³⁴⁵ PCLP1 comparte ciertas características con la agrina y CD47, incluyendo la expresión de estas moléculas en ambos tipos de sinapsis y su sobreexpresión en gran variedad de tumores, donde intervienen en la adhesión celular, migración e invasión, promoviendo la progresión tumoral.³⁴⁶ Asimismo, con el fin de limitar la inflamación del sistema nervioso central, las neuronas regulan negativamente el sistema inmunitario a través de la interacción de glucoproteínas de membrana, entre las que destacan CD200, NCAM, CD22 y la mencionada CD47, con sus ligandos expresados en células inmunitarias. Por lo tanto, PCLP1 expresada en células neuronales podría compartir con PCLP1 expresada en células tumorales la capacidad de inhibir la respuesta inmunitaria, suprimiendo de ese modo la neuroinflamación.³⁴⁷⁻³⁴⁹

2.2. PCLP1 expresada en células tumorales inhibe la proliferación de linfocitos T

Las sialoglicoproteínas presentan la capacidad de modular la activación, polarización y maduración linfocitarias, dificultando el inicio de las respuestas antitumorales mediadas por estas células.³⁵⁰⁻³⁵² Concretamente, la expresión de GD1A en ciertos cánceres, causa un deficiente desarrollo de linfocitos Th y promueve la diferenciación a Tregs.^{238,239} Asimismo, se ha descrito que las mucinas de la familia

MUC ejercen un efecto inhibitor sobre la respuesta antitumoral al interactuar con su ligando Siglec expresado en linfocitos T, células NK y DCs.^{353,354} Otras proteínas expresadas en varios tipos de tumores, como CD30, poseen la capacidad de inhibir la proliferación de linfocitos T resultando en una respuesta antitumoral inefectiva.³⁵⁵ De manera similar, nuestros resultados demuestran que la expresión de PCLP1 en células de cáncer de mama disminuye la proliferación de los linfocitos Th (CD4⁺) y CTLs (CD8⁺) inducida por agonistas, sin reducir la respuesta proliferativa de las células NK. En concordancia con esta observación, un trabajo reciente sugiere que PCLP1 expresada en células progenitoras cardíacas ejerce su actividad inmunoreguladora a través de la reducción de la proliferación de los linfocitos T.⁴⁷ La proliferación linfocitaria es determinante en el desarrollo de la respuesta antitumoral. Varios estudios sugieren que la proliferación de linfocitos T CD8⁺ es un factor a tener en cuenta en el pronóstico de pacientes con malignidades torácicas³⁵⁶ y el desarrollo de linfocitos T específicos de tumor se relaciona de manera positiva con la supervivencia en pacientes con melanoma metastásico.^{357,358} En pacientes con cáncer ovárico, colorectal y esofágico el infiltrado de linfocitos T CD8⁺ se asocia con un mejor pronóstico.³⁵⁹⁻³⁶¹

Por el contrario, el infiltrado de la subpoblación de linfocitos T CD4⁺ Treg puede predecir un peor desarrollo del cáncer en pacientes con cáncer.^{243,244,362,363} El balance entre la activación de linfocitos T efectores y el desarrollo de linfocitos T supresores como Tregs determina en cierta medida la capacidad del tumor de evadir la inmunovigilancia y constituye un factor a tener en cuenta en el desarrollo de terapias inmunológicas frente a tumores. De hecho, varios estudios actuales se centran en el bloqueo de la expresión del gen FOXP3 en inmunoterapia con el objetivo de disminuir el desarrollo de esta subpoblación celular. Nuestros resultados, sin embargo, muestran que la expresión de PCLP1 en las células tumorales de cáncer de mama no induce la generación de Tregs a partir de linfocitos CD4⁺, debido quizás a la ausencia de activación de las vías de señalización requeridas para el desarrollo de las Tregs en respuesta a la interacción de PCLP1 con su supuesto ligando expresado en la superficie de los linfocitos T.

Por último, numerosos estudios describen la existencia de moléculas tumorales con capacidad para inhibir la maduración de las células dendríticas, como los sialoglucanos.^{239,249,250,364-369} En cambio, el análisis de la inducción de marcadores de maduración en respuesta a la estimulación con LPS mostrado en nuestro trabajo revela que PCLP1 expresada en células tumorales no impide la maduración de las DCs, lo cual podría explicarse por la ausencia de selectina L u otros potenciales ligandos de PCLP1 en este tipo celular.

3. La expresión de PCLP1 es inducida por TGF- β 1 e IL-4

En este trabajo hemos demostrado que la expresión de PCLP1 en células de cáncer de mama se encuentra regulada positivamente por las citocinas TGF- β 1 e IL-4 en las líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 y MDA-MB-231. Estos resultados se relacionan con estudios previos que describen un aumento de ARNm de PCLP1 en respuesta a TGF- β 1 en células MDA-MB-231³⁷⁰ y un aumento de la forma proteica en células A459 de adenocarcinoma de pulmón.⁷⁵ Asimismo, PCLP1 se encuentra sobrerregulada en la transición epitelial-mesenquimal (EMT) inducida por TGF- β en células A549. La EMT es un proceso de diferenciación que ocurre durante el desarrollo y la invasión tumorales caracterizado por la pérdida de la polarización apical-basal de las células epiteliales, lo que genera un fenotipo mesenquimal y un comportamiento invasivo y migratorio.⁷⁶ Durante este proceso, las células pierden sus contactos intercelulares mediados por proteínas como E-cadherina, desmoplaquina y ZO-1 y aumentan la expresión de marcadores mesenquimales como N-cadherina, vimentina y β -catenina nuclear.³⁷¹ Estudios de silenciamiento demuestran que PCLP1, a pesar de su incapacidad para iniciar la EMT por sí misma, constituye una proteína determinante en el proceso iniciado por TGF- β .³⁷²⁻³⁷⁴ Además, niveles elevados de TGF- β 1 en pacientes con cáncer se han asociado con una inhibición sistémica de la función inmunitaria, incluyendo la respuesta citotóxica de células NK.^{192,234} Concretamente, trabajos *in vitro* han demostrado que la evasión tumoral a la actividad de las células NK mediada por TGF- β 1 ocurre de forma dependiente de

contacto.²³³ Por tanto, es posible que esta citocina altere la respuesta inmunitaria a través de la inducción de la expresión de PCLP1 en las células tumorales.

Mediante el uso de inhibidores específicos, en nuestro estudio demostramos que TGF- β 1 induce la expresión de PCLP1 en las células MDA-MB-231 a través de la cascada de señalización JAK/STAT y MEK/ERK, mientras que IL-4 aumenta dicha expresión tras la activación de las rutas MEK/ERK. Diversos estudios sugieren que la vías de señalización intracelular ERK1/2 se encuentra implicada en la invasividad tumoral inducida por TGF- β 1 en células de cáncer de mama.²⁶⁶ Asimismo, un estudio reciente en células de cáncer de pulmón apunta a la ruta JAK/STAT como la vía de señalización que participa en la inducción de EMT por TGF- β 1.³⁷⁵ Por otro lado, varios estudios ponen de manifiesto la importancia de la activación de la ruta ERK en la proliferación tumoral mediada por IL-4.^{274,282} Estas observaciones sugieren que las citocinas IL-4 y TGF- β 1 podrían ejercer su función protumoral a través de la inducción de PCLP1 en células de cáncer de mama.

4. Consideraciones finales

Los resultados de este trabajo muestran por primera vez la expresión de PCLP1 en DCs y su participación en el mantenimiento del fenotipo inmaduro. Además, PCLP1 expresada en células de cáncer de mama modula negativamente la respuesta inmunitaria mediada por células NK y el desarrollo de linfocitos T. El efecto de PCLP1 ejercido sobre la respuesta inmunitaria podría explicar en parte la agresividad y malignidad de los tumores mamarios con alta expresión de PCLP1. La Figura 38 muestra una representación esquemática de la posible función de PCLP1 en el microambiente tumoral.

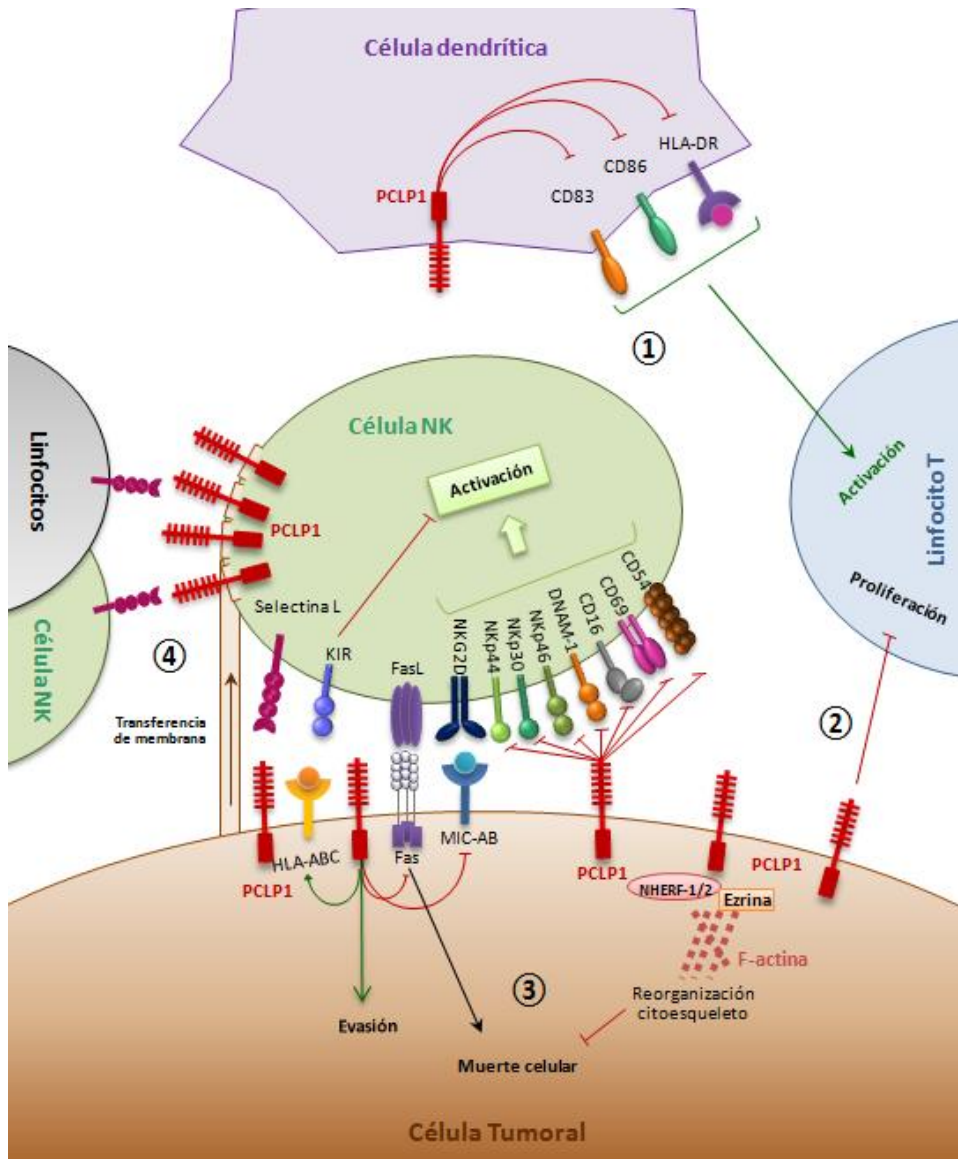


Figura 38. Modelo de la posible función de PCLP1 en el microambiente tumoral. Por un lado, la expresión de PCLP1 en DCs impide su maduración, lo que podría alterar su interacción con linfocitos T y células NK (1). Por otro lado, la expresión de PCLP1 en células tumorales inhibe la proliferación de linfocitos T (2) e induce resistencia a la actividad citotóxica de las células NK (3). Además, la transferencia de PCLP1 podría regular la actividad de las células NK (4).

A pesar del significativo progreso en la terapia contra el cáncer mediante abordajes convencionales como la cirugía, la quimioterapia y la radiación, la tasa general de supervivencia de los pacientes no ha mejorado sustancialmente durante la última década. Actualmente se ha logrado un significativo progreso en el desarrollo de terapias inmunológicas que inhiben la progresión tumoral y previenen la metástasis del cáncer de mama. Aunque los recientes avances en el desarrollo de vacunas e inmunoterapias basadas en células inmunitarias parecen prometedores, la evasión tumoral de la vigilancia inmunológica supone un enorme obstáculo para la erradicación del cáncer de mama. La identificación de moléculas responsables de la evasión y la tolerancia tumoral facilitaría el desarrollo de terapias que estimulen el sistema inmunitario y bloqueen la inmunosupresión, combinadas con los tratamientos convencionales. Dado que PCLP1 también se expresa en células normales, los anticuerpos frente a esta proteína podrían resultar inapropiados como agentes terapéuticos para el tratamiento del cáncer de mama por su toxicidad. No obstante, la expresión de glucoformas de PCLP1 específicas de tumor hace factible el desarrollo de anticuerpos que bloqueen la inmunosupresión y metástasis mediadas por PCLP1 a la vez que eviten la aparición de efectos secundarios autoinmunes. En este sentido, un trabajo publicado recientemente describe el desarrollo de un anticuerpo frente a PCLP1 específica de tumores. Este anticuerpo es capaz de inhibir el crecimiento y la progresión metatásica de células tumorales de cáncer de mama humano sin causar toxicidad en un ensayo preclínico realizado en ratones. Estos resultados sugieren que su uso en humanos podría prevenir el desarrollo de tumores que expresan PCLP1. Pese a que se requieren ensayos y determinaciones exhaustivas, la inhibición tumoral.⁸⁵ Por otro lado, al igual que proponen varios estudios, la evaluación de la expresión de esta proteína en carcinomas mamarios podría proporcionar un rápido diagnóstico y un marcador pronóstico en pacientes de cáncer de mama.

VI. CONCLUSIONES

Conclusiones

1. PCLP1 se expresa tanto en DCs mieloides como en DCs inmaduras derivadas de monocitos, donde se localiza en las protrusiones de membrana del polo posterior durante el proceso de migración celular.
2. PCLP1 participa en el mantenimiento del fenotipo inmaduro de DCs derivadas de monocitos.
3. Las células tumorales con altos niveles de expresión de PCLP1 exhiben mayor resistencia a la citotoxicidad mediada por células NK.
4. PCLP1 expresada en las células tumorales inhibe la expresión de receptores activadores en la superficie de las células NK de forma dependiente de contacto.
5. La sobreexpresión de PCLP1 en células tumorales induce un aumento de expresión de moléculas HLA-ABC y una disminución de MIC-AB y Fas en su superficie.
6. Durante la interacción entre las células NK y las células tumorales, PCLP1 se localiza en la sinapsis inmunológica y es transferida a la célula efectora mediante trogocitosis.
7. En células tumorales la sobreexpresión de PCLP1 inhibe la proliferación de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ inducida por agonistas.
8. Las citocinas TGF- β 1 e IL-4 regulan positivamente la expresión de PCLP1 en células de cáncer de mama.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- 1 Kerjaschki, D. *et al.* Identification and characterization of podocalyxin--the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell. *J Cell Biol.* 1984 Apr;98(4):1591-6.
- 2 Kershaw, D.B. *et al.* Assignment of the human podocalyxin-like protein (PODXL) gene to 7q32-q33. *Genomics.* 1997 Oct 1;45(1):239-40.
- 3 Kershaw, D.B. *et al.* Molecular cloning and characterization of human podocalyxin-like protein. Orthologous relationship to rabbit PCLP1 and rat podocalyxin. *J Biol Chem.* 1997 Jun 20;272(25):15708-14.
- 4 Rodriguez, R.B. *et al.* Production and characterization of murine monoclonal antibodies against human podocalyxin. *Tissue Antigens.* 2006 Nov;68(5):407-17.
- 5 Li, J. *et al.* Gene structure and alternative splicing of murine podocalyxin: a member of the CD34 sialomucin family. *DNA Seq.* 2001 Dec;12(5-6):407-12.
- 6 Nielsen, J.S. and McNagny, K.M. Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci.* 2008 Nov 15;121(Pt 22):3683-92. doi: 10.1242/jcs.037507.
- 7 Li, Y. *et al.* PDZ domain-mediated interaction of rabbit podocalyxin and Na(+)/H(+) exchange regulatory factor-2. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002 Jun;282(6):F1129-39.
- 8 Orlando, R.A. *et al.* The glomerular epithelial cell anti-adhesin podocalyxin associates with the actin cytoskeleton through interactions with ezrin. *J Am Soc Nephrol.* 2001 Aug;12(8):1589-98.
- 9 Kobayashi, T. *et al.* Cortactin interacts with podocalyxin and mediates morphological change of podocytes through its phosphorylation. *Nephron Exp Nephrol.* 2009;113(3):e89-96. doi: 10.1159/000235245. Epub 2009 Aug 14.
- 10 Takeda, T. Podocyte cytoskeleton is connected to the integral membrane protein podocalyxin through Na⁺/H⁺-exchanger regulatory factor 2 and ezrin. *Clin Exp Nephrol.* 2003 Dec;7(4):260-9.
- 11 Schmieder, S. *et al.* Podocalyxin activates RhoA and induces actin reorganization through NHERF1 and Ezrin in MDCK cells. *J Am Soc Nephrol.* 2004 Sep;15(9):2289-98.
- 12 Meder, D. *et al.* Gp135/podocalyxin and NHERF-2 participate in the formation of a preapical domain during polarization of MDCK cells. *J Cell Biol.* 2005 Jan 17;168(2):303-13. Epub 2005 Jan 10.
- 13 Palmer, R.E. *et al.* WT1 regulates the expression of the major glomerular podocyte membrane protein Podocalyxin. *Curr Biol.* 2001 Nov 13;11(22):1805-9.
- 14 Yang, L. *et al.* A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story. *Leukemia.* 2007 May;21(5):868-76. Epub 2007 Mar 15.
- 15 Butta, N. *et al.* Role of transcription factor Sp1 and CpG methylation on the regulation of the human podocalyxin gene promoter. *BMC Mol Biol.* 2006 May 9;7:17.
- 16 Stanhope-Baker, P. *et al.* The Wilms tumor suppressor-1 target gene podocalyxin is transcriptionally repressed by p53. *J Biol Chem.* 2004 Aug 6;279(32):33575-85. Epub 2004 May 21.
- 17 Doyonnas, R. *et al.* Anuria, omphalocele, and perinatal lethality in mice lacking the CD34-related protein podocalyxin. *J Exp Med.* 2001 Jul 2;194(1):13-27.

- 18 Dekan, G. *et al.* Sulfate contributes to the negative charge of podocalyxin, the major sialoglycoprotein of the glomerular filtration slits. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Jun 15;88(12):5398-402.
- 19 Takeda, T. *et al.* Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J Clin Invest.* 2001 Jul;108(2):289-301.
- 20 Schnabel, E. *et al.* Biogenesis of podocalyxin--the major glomerular sialoglycoprotein--in the newborn rat kidney. *Eur J Cell Biol.* 1989 Apr;48(2):313-26.
- 21 Takeda, T. *et al.* Expression of podocalyxin inhibits cell-cell adhesion and modifies junctional properties in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell.* 2000 Sep;11(9):3219-32.
- 22 Larrucea, S. *et al.* Expression of podocalyxin enhances the adherence, migration, and intercellular communication of cells. *Exp Cell Res.* 2008 Jun 10;314(10):2004-15. doi: 10.1016/j.yexcr.2008.03.009. Epub 2008 Mar 20.
- 23 Larrucea, S. *et al.* Podocalyxin enhances the adherence of cells to platelets. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Nov;64(22):2965-74.
- 24 Sawada, H. *et al.* Epithelial polyanion (podocalyxin) is found on the sides but not the soles of the foot processes of the glomerular epithelium. *Am J Pathol.* 1986 Nov;125(2):309-18.
- 25 Yu, C.Y. *et al.* A bipartite signal regulates the faithful delivery of apical domain marker podocalyxin/Gp135. *Mol Biol Cell.* 2007 May;18(5):1710-22. Epub 2007 Mar 1.
- 26 Cipollone, J.A. *et al.* The anti-adhesive mucin podocalyxin may help initiate the transperitoneal metastasis of high grade serous ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis.* 2012 Mar;29(3):239-52. doi: 10.1007/s10585-011-9446-0. Epub 2012 Jan 20.
- 27 Nielsen, J.S. *et al.* The CD34-related molecule podocalyxin is a potent inducer of microvillus formation. *PLoS One.* 2007 Feb 21;2(2):e237.
- 28 Horvat, R. *et al.* Endothelial cell membranes contain podocalyxin--the major sialoprotein of visceral glomerular epithelial cells. *J Cell Biol.* 1986 Feb;102(2):484-91.
- 29 Kershaw, D.B. *et al.* Molecular cloning, expression, and characterization of podocalyxin-like protein 1 from rabbit as a transmembrane protein of glomerular podocytes and vascular endothelium. *J Biol Chem.* 1995 Dec 8;270(49):29439-46.
- 30 Sassetti, C. *et al.* Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34. *J Exp Med.* 1998 Jun 15;187(12):1965-75.
- 31 Garcia-Frigola, C. *et al.* A collection of cDNAs enriched in upper cortical layers of the embryonic mouse brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 2004 Mar 30;122(2):133-50.
- 32 Vitureira, N. *et al.* Pattern of expression of the podocalyxin gene in the mouse brain during development. *Gene Expr Patterns.* 2005 Feb;5(3):349-54.
- 33 Vitureira, N. *et al.* Podocalyxin is a novel polysialylated neural adhesion protein with multiple roles in neural development and synapse formation. *PLoS One.* 2010 Aug 10;5(8):e12003. doi: 10.1371/journal.pone.0012003.

- 34 Doyonnas, R. *et al.* Podocalyxin is a CD34-related marker of murine hematopoietic stem cells and embryonic erythroid cells. *Blood*. 2005 Jun 1;105(11):4170-8. Epub 2005 Feb 8.
- 35 Hara, T. *et al.* Identification of podocalyxin-like protein 1 as a novel cell surface marker for hemangioblasts in the murine aorta-gonad-mesonephros region. *Immunity*. 1999 Nov;11(5):567-78.
- 36 McNagny, K.M. *et al.* Thrombomucin, a novel cell surface protein that defines thrombocytes and multipotent hematopoietic progenitors. *J Cell Biol*. 1997 Sep 22;138(6):1395-407.
- 37 Riccioni, R. *et al.* Podocalyxin is expressed in normal and leukemic monocytes. *Blood Cells Mol Dis*. 2006 Nov-Dec;37(3):218-25. Epub 2006 Oct 23.
- 38 Kerosuo, L. *et al.* Podocalyxin in human haematopoietic cells. *Br J Haematol*. 2004 Mar;124(6):809-18.
- 39 Miettinen, A. *et al.* Podocalyxin in rat platelets and megakaryocytes. *Am J Pathol*. 1999 Mar;154(3):813-22.
- 40 Pericacho, M. *et al.* Diminished thrombogenic responses by deletion of the Podocalyxin Gene in mouse megakaryocytes. *PLoS One*. 2011;6(10):e26025. doi: 10.1371/journal.pone.0026025. Epub 2011 Oct 7.
- 41 Tateno, H. *et al.* Podocalyxin is a glycoprotein ligand of the human pluripotent stem cell-specific probe rBC2LCN. *Stem Cells Transl Med*. 2013 Apr;2(4):265-73. doi: 10.5966/sctm.2012-0154. Epub 2013 Mar 22.
- 42 Schopperle, W.M. and DeWolf, W.C. The TRA-1-60 and TRA-1-81 human pluripotent stem cell markers are expressed on podocalyxin in embryonal carcinoma. *Stem Cells*. 2007 Mar;25(3):723-30. Epub 2006 Nov 22.
- 43 Boxall, S.A. and Jones, E. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem Cells Int*. 2012;2012:975871. doi: 10.1155/2012/975871. Epub 2012 May 14.
- 44 Lee, M.W. *et al.* Human bone marrow-derived mesenchymal stem cell gene expression patterns vary with culture conditions. *Blood Res*. 2013 Jun;48(2):107-14. doi: 10.5045/br.2013.48.2.107. Epub 2013 Jun 25.
- 45 Lee, R.H. *et al.* The CD34-like protein PODXL and alpha6-integrin (CD49f) identify early progenitor MSCs with increased clonogenicity and migration to infarcted heart in mice. *Blood*. 2009 Jan 22;113(4):816-26. doi: 10.1182/blood-2007-12-128702. Epub 2008 Sep 25.
- 46 Nauta, A.J. and Fibbe, W.E. Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*. 2007 Nov 15;110(10):3499-506. Epub 2007 Jul 30.
- 47 Moscoso, I. *et al.* Podocalyxin-like protein 1 is a relevant marker for human c-kit cardiac stem cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2013 Jul 30. doi: 10.1002/term.1795.
- 48 Somasiri, A. *et al.* Overexpression of the anti-adhesin podocalyxin is an independent predictor of breast cancer progression. *Cancer Res*. 2004 Aug 1;64(15):5068-73.

- 49 Casey, G. *et al.* Podocalyxin variants and risk of prostate cancer and tumor aggressiveness. *Hum Mol Genet.* 2006 Mar 1;15(5):735-41. Epub 2006 Jan 24.
- 50 Ney, J.T. *et al.* Podocalyxin-like protein 1 expression is useful to differentiate pancreatic ductal adenocarcinomas from adenocarcinomas of the biliary and gastrointestinal tracts. *Hum Pathol.* 2007 Feb;38(2):359-64. Epub 2006 Nov 29.
- 51 Heukamp, L.C. *et al.* Podocalyxin-like protein 1 expression in primary hepatic tumours and tumour-like lesions. *Histopathology.* 2006 Sep;49(3):242-7.
- 52 Schopperle, W.M. *et al.* Human embryonal carcinoma tumor antigen, Gp200/GCTM-2, is podocalyxin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Jan 10;300(2):285-90.
- 53 Larsson, A. *et al.* Overexpression of podocalyxin-like protein is an independent factor of poor prognosis in colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2011 Aug 23;105(5):666-72. doi: 10.1038/bjc.2011.295. Epub 2011 Aug 9.
- 54 Hsu, Y.H. *et al.* Podocalyxin EBP50 ezrin molecular complex enhances the metastatic potential of renal cell carcinoma through recruiting Rac1 guanine nucleotide exchange factor ARHGEF7. *Am J Pathol.* 2010 Jun;176(6):3050-61. doi: 10.2353/ajpath.2010.090539. Epub 2010 Apr 15.
- 55 Yasuoka, H. *et al.* Podocalyxin expression in undifferentiated thyroid carcinomas, *J Clin Pathol.* 2008 Nov;61(11):1228-9. doi: 10.1136/jcp.2008.059956.
- 56 Koch, L.K. *et al.* Stem cell marker expression in small cell lung carcinoma and developing lung tissue. *Hum Pathol.* 2008 Nov;39(11):1597-605. doi: 10.1016/j.humpath.2008.03.008. Epub 2008 Jul 24.
- 57 Hayatsu, N. *et al.* Podocalyxin expression in malignant astrocytic tumors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008 Sep 19;374(2):394-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.07.049. Epub 2008 Jul 17.
- 58 Kelley, T.W. *et al.* Podocalyxin: a marker of blasts in acute leukemia. *Am J Clin Pathol.* 2005 Jul;124(1):134-42.
- 59 Sizemore, S. *et al.* Podocalyxin increases the aggressive phenotype of breast and prostate cancer cells in vitro through its interaction with ezrin. *Cancer Res.* 2007 Jul 1;67(13):6183-91.
- 60 Larsson, A. *et al.* Validation of podocalyxin-like protein as a biomarker of poor prognosis in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2012 Jul 8;12:282. doi: 10.1186/1471-2407-12-282.
- 61 Boman, K. *et al.* Membranous expression of podocalyxin-like protein is an independent factor of poor prognosis in urothelial bladder cancer. *Br J Cancer.* 2013 Jun 11;108(11):2321-8. doi: 10.1038/bjc.2013.215. Epub 2013 May 7.
- 62 Kaprio, T. *et al.* Podocalyxin is a marker of poor prognosis in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2014 Jul 8;14:493. doi: 10.1186/1471-2407-14-493.
- 63 Saukkonen, K. *et al.* Podocalyxin Is a Marker of Poor Prognosis in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *PLoS One.* 2015 Jun 8;10(6):e0129012. doi: 10.1371/journal.pone.0129012. eCollection 2015.

- 64 Binder, Z.A. *et al.* Podocalyxin-like protein is expressed in glioblastoma multiforme stem-like cells and is associated with poor outcome. *PLoS One.* 2013 Oct 16;8(10):e75945. doi: 10.1371/journal.pone.0075945. eCollection 2013.
- 65 Dallas, M.R. *et al.* Sialofucosylated podocalyxin is a functional E- and L-selectin ligand expressed by metastatic pancreatic cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2012 Sep 15;303(6):C616-24. doi: 10.1152/ajpcell.00149.2012. Epub 2012 Jul 18.
- 66 Laubli, H. and Borsig, L. Selectins as mediators of lung metastasis. *Cancer Microenviron.* 2010 Feb 27;3(1):97-105. doi: 10.1007/s12307-010-0043-6.
- 67 Witte, J.S. *et al.* Genomewide scan for prostate cancer-aggressiveness loci. *Am J Hum Genet.* 2000 Jul;67(1):92-9. Epub 2000 May 24.
- 68 Witte, J.S. *et al.* Genome-wide scan of brothers: replication and fine mapping of prostate cancer susceptibility and aggressiveness loci. *Prostate.* 2003 Dec 1;57(4):298-308.
- 69 Kunapuli, P. *et al.* LGI1, a putative tumor metastasis suppressor gene, controls in vitro invasiveness and expression of matrix metalloproteinases in glioma cells through the ERK1/2 pathway. *J Biol Chem.* 2004 May 28;279(22):23151-7. Epub 2004 Mar 26.
- 70 P, O.c. *et al.* Signaling pathways required for matrix metalloproteinase-9 induction by betacellulin in head-and-neck squamous carcinoma cells. *Int J Cancer.* 2004 Aug 20;111(2):174-83.
- 71 Sarrio, D. *et al.* Abnormal ezrin localization is associated with clinicopathological features in invasive breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 2006 Jul;98(1):71-9. Epub 2006 Mar 15.
- 72 Elliott, B.E. *et al.* The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells. *Breast Cancer Res.* 2005;7(3):R365-73. Epub 2005 Mar 21.
- 73 Khanna, C. *et al.* The membrane-cytoskeleton linker ezrin is necessary for osteosarcoma metastasis. *Nat Med.* 2004 Feb;10(2):182-6. Epub 2004 Jan 4.
- 74 Hayashi, Y. *et al.* NHERF1/EBP50 is a new marker in colorectal cancer. *Neoplasia.* 2010 Dec;12(12):1013-22.
- 75 Meng, X. *et al.* Requirement of podocalyxin in TGF-beta induced epithelial mesenchymal transition. *PLoS One.* 2011 Apr 12;6(4):e18715. doi: 10.1371/journal.pone.0018715.
- 76 Kalluri, R. and Weinberg, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1420-8. doi: 10.1172/JCI39104.
- 77 Ali, S. and Coombes, R.C. Estrogen receptor alpha in human breast cancer: occurrence and significance. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2000 Jul;5(3):271-81.
- 78 Badve, S. *et al.* Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol.* 2011 Feb;24(2):157-67. doi: 10.1038/modpathol.2010.200. Epub 2010 Nov 12.

- 79 Prat, A. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12(5):R68. doi: 10.1186/bcr2635. Epub 2010 Sep 2.
- 80 Holliday, D.L. and Speirs, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011 Aug 12;13(4):215. doi: 10.1186/bcr2889.
- 81 James, J.J. *et al.* Bone metastases from breast carcinoma: histopathological - radiological correlations and prognostic features. *Br J Cancer.* 2003 Aug 18;89(4):660-5.
- 82 Borst, M.J. and Ingold, J.A. Metastatic patterns of invasive lobular versus invasive ductal carcinoma of the breast. *Surgery.* 1993 Oct;114(4):637-41; discussion 641-2.
- 83 Forse, C.L. *et al.* Elevated expression of podocalyxin is associated with lymphatic invasion, basal-like phenotype, and clinical outcome in axillary lymph node-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 Feb;137(3):709-19. doi: 10.1007/s10549-012-2392-y. Epub 2013 Jan 4.
- 84 Lin, C.W. *et al.* Podocalyxin-like 1 promotes invadopodia formation and metastasis through activation of Rac1/Cdc42/cortactin signaling in breast cancer cells. *Carcinogenesis.* 2014 Nov;35(11):2425-35. doi: 10.1093/carcin/bgu139. Epub 2014 Jun 26.
- 85 Snyder, K.A. *et al.* Podocalyxin enhances breast tumor growth and metastasis and is a target for monoclonal antibody therapy. *Breast Cancer Res.* 2015 Mar 27;17:46. doi: 10.1186/s13058-015-0562-7.
- 86 Galy, A. *et al.* Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity.* 1995 Oct;3(4):459-73.
- 87 M. Begoña Vázquez a, Manuel Sureda a, Joseba Rebollo (2012) Dendritic cells I: Basic biology and functions. *inmunología* 21 (01), 21-30
- 88 Barbara U Schraml1, C.R.e.S. (2014) Defining dendritic cells. *Current Opinion in Immunology* 32 (Innate immunity), 13–20
- 89 Lipscomb, M.F. and Masten, B.J. Dendritic cells: immune regulators in health and disease. *Physiol Rev.* 2002 Jan;82(1):97-130.
- 90 McKenna, K. *et al.* Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity. *J Virol.* 2005 Jan;79(1):17-27.
- 91 Aerts-Toegaert, C. *et al.* CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol.* 2007 Mar;37(3):686-95.
- 92 McLellan, A.D. *et al.* Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 co-stimulatory molecule. *Eur J Immunol.* 1995 Jul;25(7):2064-8.
- 93 Dudek, A.M. *et al.* Immature, Semi-Mature, and Fully Mature Dendritic Cells: Toward a DC-Cancer Cells Interface That Augments Anticancer Immunity. *Front Immunol.* 2013 Dec 11;4:438. doi: 10.3389/fimmu.2013.00438.
- 94 Bach, F.H. *et al.* Differential function of major histocompatibility complex antigens in T-lymphocyte activation. *Nature.* 1976 Jan 29;259(5541):273-81.

- 95 Femke Broere, S.G.A., Michail V. Sitkovsky and Willem van Eden. (2011) T cell subsets and T cell-mediated immunity. *Principles of Immunopharmacology*, 15-27
- 96 Taams, L.S. *et al.* Regulatory T cells in human disease and their potential for therapeutic manipulation. *Immunology*. 2006 May;118(1):1-9.
- 97 Herberman, R.B. *et al.* Natural cytotoxic reactivity of mouse lymphoid cells against syngeneic and allogeneic tumors. II. Characterization of effector cells. *Int J Cancer*. 1975 Aug 15;16(2):230-9.
- 98 Freud, A.G. and Caligiuri, M.A. Human natural killer cell development. *Immunol Rev*. 2006 Dec;214:56-72.
- 99 Cooper, M.A. *et al.* The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001 Nov;22(11):633-40.
- 100 De Maria, A. *et al.* Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56(dim)CD16+ NK cells as rapid producers of abundant IFN-gamma on activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Jan 11;108(2):728-32. doi: 10.1073/pnas.1012356108. Epub 2010 Dec 27.
- 101 P., E. (1909) Über den jetzigen stand der karzinomforschung. . *Ned Tijdschr Geneeskd*. 5, 273–290
- 102 Burnet, F.M. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res*. 1970;13:1-27.
- 103 Thomas, L. (1959) Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States. *Lawrence HS, editor.*, 529–532
- 104 Engel, A.M. *et al.* MCA sarcomas induced in scid mice are more immunogenic than MCA sarcomas induced in congenic, immunocompetent mice. *Scand J Immunol*. 1997 May;45(5):463-70.
- 105 Kiessling, R. *et al.* Tumor-induced immune dysfunction. *Cancer Immunol Immunother*. 1999 Oct;48(7):353-62.
- 106 Dunn, G.P. *et al.* Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002 Nov;3(11):991-8.
- 107 Schreiber, R.D. *et al.* Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011 Mar 25;331(6024):1565-70. doi: 10.1126/science.1203486.
- 108 Pradeu, T. *et al.* The speed of change: towards a discontinuity theory of immunity? *Nat Rev Immunol*. 2013 Oct;13(10):764-9. doi: 10.1038/nri3521. Epub 2013 Sep 2.
- 109 Coudert, J.D. *et al.* Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells. *Blood*. 2005 Sep 1;106(5):1711-7. Epub 2005 May 10.
- 110 Oppenheim, D.E. *et al.* Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance. *Nat Immunol*. 2005 Sep;6(9):928-37. Epub 2005 Aug 14.

- 111 Smyth, M.J. *et al.* NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma. *Int Immunol.* 2001 Apr;13(4):459-63.
- 112 Smyth, M.J. *et al.* Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol.* 2006;90:1-50.
- 113 Dewan, M.Z. *et al.* Natural killer cells in breast cancer cell growth and metastasis in SCID mice. *Biomed Pharmacother.* 2005 Oct;59 Suppl 2:S375-9.
- 114 Lanier, L.L. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23:225-74.
- 115 Kim, S. *et al.* Licensing of natural killer cells by host major histocompatibility complex class I molecules. *Nature.* 2005 Aug 4;436(7051):709-13.
- 116 Karre, K. *et al.* Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature.* 1986 Feb 20-26;319(6055):675-8.
- 117 Vivier, E. *et al.* Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol.* 2012 Mar 22;12(4):239-52. doi: 10.1038/nri3174.
- 118 Zwirner, N.W. and Domaica, C.I. Cytokine regulation of natural killer cell effector functions. *Biofactors.* 2010 Jul-Aug;36(4):274-88. doi: 10.1002/biof.107.
- 119 Valiante, N.M. *et al.* Functionally and structurally distinct NK cell receptor repertoires in the peripheral blood of two human donors. *Immunity.* 1997 Dec;7(6):739-51.
- 120 Olcese, L. *et al.* Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases. *J Immunol.* 1996 Jun 15;156(12):4531-4.
- 121 Purdy, A.K. and Campbell, K.S. SHP-2 expression negatively regulates NK cell function. *J Immunol.* 2009 Dec 1;183(11):7234-43. doi: 10.4049/jimmunol.0900088. Epub 2009 Nov 13.
- 122 Rajalingam, R. Human diversity of killer cell immunoglobulin-like receptors and disease. *Korean J Hematol.* 2011 Dec;46(4):216-28. doi: 10.5045/kjh.2011.46.4.216. Epub 2011 Dec 27.
- 123 Ivarsson, M.A. *et al.* Activating killer cell Ig-like receptors in health and disease. *Front Immunol.* 2014 Apr 22;5:184. doi: 10.3389/fimmu.2014.00184. eCollection 2014.
- 124 Navarro, F. *et al.* 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.* 1999 Jan;29(1):277-83.
- 125 Moretta, A. *et al.* Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:197-223.
- 126 Upshaw, J.L. and Leibson, P.J. NKG2D-mediated activation of cytotoxic lymphocytes: unique signaling pathways and distinct functional outcomes. *Semin Immunol.* 2006 Jun;18(3):167-75. Epub 2006 May 24.
- 127 Lopez-Larrea, C. *et al.* The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med.* 2008 Apr;14(4):179-89. doi: 10.1016/j.molmed.2008.02.004. Epub 2008 Mar 18.

- 128 Guerra, N. *et al.* NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity*. 2008 Apr;28(4):571-80. doi: 10.1016/j.immuni.2008.02.016.
- 129 Cosman, D. *et al.* ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*. 2001 Feb;14(2):123-33.
- 130 Gonzalez, S. *et al.* NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol*. 2008 Aug;29(8):397-403. doi: 10.1016/j.it.2008.04.007. Epub 2008 Jul 3.
- 131 Yamamoto, K. *et al.* Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim Biophys Acta*. 2001 Apr 3;1526(1):10-2.
- 132 Venkataraman, G.M. *et al.* Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D. *J Immunol*. 2007 Jan 15;178(2):961-9.
- 133 Gasser, S. *et al.* The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature*. 2005 Aug 25;436(7054):1186-90. Epub 2005 Jul 3.
- 134 Sivori, S. *et al.* p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation. *J Exp Med*. 1997 Oct 6;186(7):1129-36.
- 135 Pende, D. *et al.* Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J Exp Med*. 1999 Nov 15;190(10):1505-16.
- 136 Vitale, M. *et al.* NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J Exp Med*. 1998 Jun 15;187(12):2065-72.
- 137 Sivori, S. *et al.* NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur J Immunol*. 1999 May;29(5):1656-66.
- 138 Li, Y. *et al.* Structure of the human activating natural cytotoxicity receptor NKp30 bound to its tumor cell ligand B7-H6. *J Exp Med*. 2011 Apr 11;208(4):703-14. doi: 10.1084/jem.20102548. Epub 2011 Mar 21.
- 139 Hecht, M.L. *et al.* Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences. *J Proteome Res*. 2009 Feb;8(2):712-20. doi: 10.1021/pr800747c.
- 140 Pogge von Strandmann, E. *et al.* Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells. *Immunity*. 2007 Dec;27(6):965-74. Epub 2007 Dec 6.
- 141 Mandelboim, O. *et al.* Human CD16 as a lysis receptor mediating direct natural killer cell cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 May 11;96(10):5640-4.
- 142 Warren, H.S. and Kinnear, B.F. Quantitative analysis of the effect of CD16 ligation on human NK cell proliferation. *J Immunol*. 1999 Jan 15;162(2):735-42.

- 143** Grier, J.T. *et al.* Human immunodeficiency-causing mutation defines CD16 in spontaneous NK cell cytotoxicity. *J Clin Invest.* 2012 Oct;122(10):3769-80. doi: 10.1172/JCI64837. Epub 2012 Sep 24.
- 144** Zhang, Z. *et al.* DNAM-1 controls NK cell activation via an ITT-like motif. *J Exp Med.* 2015 Nov 9. pii: jem.20150792.
- 145** Lakshmikanth, T. *et al.* 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.* 2009 May;119(5):1251-63. doi: 10.1172/JCI36022. Epub 2009 Apr 6.
- 146** Bottino, C. *et al.* Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as cell surface ligands for the human DNAM-1 (CD226) activating molecule. *J Exp Med.* 2003 Aug 18;198(4):557-67. Epub 2003 Aug 11.
- 147** Brostjan, C. *et al.* Differential expression of inhibitory and activating CD94/NKG2 receptors on NK cell clones. *J Immunol Methods.* 2002 Jun 1;264(1-2):109-19.
- 148** Meinke, S. and Watzl, C. NK cell cytotoxicity mediated by 2B4 and NTB-A is dependent on SAP acting downstream of receptor phosphorylation. *Front Immunol.* 2013 Jan 22;4:3. doi: 10.3389/fimmu.2013.00003. eCollection 2013.
- 149** Schatzle, J.D. *et al.* Characterization of inhibitory and stimulatory forms of the murine natural killer cell receptor 2B4. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Mar 30;96(7):3870-5.
- 150** Chong, A.S. *et al.* CD54/ICAM-1 is a costimulator of NK cell-mediated cytotoxicity. *Cell Immunol.* 1994 Aug;157(1):92-105.
- 151** Borrego, F. *et al.* CD69 is a stimulatory receptor for natural killer cell and its cytotoxic effect is blocked by CD94 inhibitory receptor. *Immunology.* 1999 May;97(1):159-65.
- 152** Lowdell, M.W. *et al.* VLA-6 (CDw49f) is an important adhesion molecule in NK cell-mediated cytotoxicity following autologous or allogeneic bone marrow transplantation. *Exp Hematol.* 1995 Dec;23(14):1530-4.
- 153** Vetvicka, V. *et al.* Regulation of CR3 (CD11b/CD18)-dependent natural killer (NK) cell cytotoxicity by tumour target cell MHC class I molecules. *Clin Exp Immunol.* 1999 Feb;115(2):229-35.
- 154** Mace, E.M. *et al.* Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity. *Immunol Cell Biol.* 2014 Mar;92(3):245-55. doi: 10.1038/icb.2013.96. Epub 2014 Jan 21.
- 155** Reefman, E. *et al.* Cytokine secretion is distinct from secretion of cytotoxic granules in NK cells. *J Immunol.* 2010 May 1;184(9):4852-62. doi: 10.4049/jimmunol.0803954. Epub 2010 Apr 5.
- 156** Tabiasco, J. *et al.* Active trans-synaptic capture of membrane fragments by natural killer cells. *Eur J Immunol.* 2002 May;32(5):1502-8.
- 157** Williams, G.S. *et al.* Membranous structures transfer cell surface proteins across NK cell immune synapses. *Traffic.* 2007 Sep;8(9):1190-204. Epub 2007 Jul 1.
- 158** Kiave-Yune HoWangYin, E.D.C., Joel LeMaoult. (2009) Trogocytosis and NK Cells in Mouse and Man. *Natural Killer Cells*, pp 109-123

- 159 McCann, F.E. *et al.* 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.* 2007 Mar 15;178(6):3418-26.
- 160 Caumartin, J. *et al.* Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *EMBO J.* 2007 Mar 7;26(5):1423-33. Epub 2007 Feb 22.
- 161 Miner, C.A. *et al.* Acquisition of activation receptor ligand by trogocytosis renders NK cells hyporesponsive. *J Immunol.* 2015 Feb 15;194(4):1945-53. doi: 10.4049/jimmunol.1402408. Epub 2015 Jan 12.
- 162 Roda-Navarro, P. *et al.* 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.* 2006 Jul 25;103(30):11258-63. Epub 2006 Jul 18.
- 163 van den Broek, M.F. *et al.* Perforin dependence of natural killer cell-mediated tumor control in vivo. *Eur J Immunol.* 1995 Dec;25(12):3514-6.
- 164 Voskoboinik, I. *et al.* Perforin-mediated target-cell death and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2006 Dec;6(12):940-52.
- 165 Pardo, J. *et al.* Granzymes are essential for natural killer cell-mediated and perforin-facilitated tumor control. *Eur J Immunol.* 2002 Oct;32(10):2881-7.
- 166 Wiley, S.R. *et al.* Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity.* 1995 Dec;3(6):673-82.
- 167 Waring, P. and Mullbacher, A. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol Cell Biol.* 1999 Aug;77(4):312-7.
- 168 Smyth, M.J. *et al.* Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med.* 2001 Mar 19;193(6):661-70.
- 169 Kirou, K.A. *et al.* Induction of Fas ligand-mediated apoptosis by interferon-alpha. *Clin Immunol.* 2000 Jun;95(3):218-26.
- 170 Igney, F.H. and Krammer, P.H. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002 Apr;2(4):277-88.
- 171 Ashkenazi, A. and Dixit, V.M. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr Opin Cell Biol.* 1999 Apr;11(2):255-60.
- 172 Kolja Schleich, I.N.L. Systems Biology of Death Receptor-Induced Apoptosis. *Systems Biology of Apoptosis*, 33-56
- 173 Fauriat, C. *et al.* Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood.* 2010 Mar 18;115(11):2167-76. doi: 10.1182/blood-2009-08-238469. Epub 2009 Dec 1.
- 174 Wang, R. *et al.* Natural killer cell-produced IFN-gamma and TNF-alpha induce target cell cytolysis through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol.* 2012 Feb;91(2):299-309. doi: 10.1189/jlb.0611308. Epub 2011 Nov 1.

- 175** Diamond, M.S. *et al.* Type I interferon is selectively required by dendritic cells for immune rejection of tumors. *J Exp Med.* 2011 Sep 26;208(10):1989-2003. doi: 10.1084/jem.20101158. Epub 2011 Sep 19.
- 176** Shankaran, V. *et al.* IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature.* 2001 Apr 26;410(6832):1107-11.
- 177** Wendel, M. *et al.* Natural killer cell accumulation in tumors is dependent on IFN- γ and CXCR3 ligands. *Cancer Res.* 2008 Oct 15;68(20):8437-45. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-1440.
- 178** Park, S.Y. *et al.* IFN- γ enhances TRAIL-induced apoptosis through IRF-1. *Eur J Biochem.* 2004 Nov;271(21):4222-8.
- 179** Swann, J.B. *et al.* Type I IFN contributes to NK cell homeostasis, activation, and antitumor function. *J Immunol.* 2007 Jun 15;178(12):7540-9.
- 180** Pilaro, A.M. *et al.* TNF- α is a principal cytokine involved in the recruitment of NK cells to liver parenchyma. *J Immunol.* 1994 Jul 1;153(1):333-42.
- 181** van Horssen, R. *et al.* TNF- α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *Oncologist.* 2006 Apr;11(4):397-408.
- 182** Smyth, M.J. *et al.* An essential role for tumor necrosis factor in natural killer cell-mediated tumor rejection in the peritoneum. *J Exp Med.* 1998 Nov 2;188(9):1611-9.
- 183** Jewett, A. and Tseng, H.C. Tumor induced inactivation of natural killer cell cytotoxic function; implication in growth, expansion and differentiation of cancer stem cells. *J Cancer.* 2011;2:443-57. Epub 2011 Aug 10.
- 184** Levy, S. *et al.* Correlation of stress factors with sustained depression of natural killer cell activity and predicted prognosis in patients with breast cancer. *J Clin Oncol.* 1987 Mar;5(3):348-53.
- 185** Strayer, D.R. *et al.* Familial occurrence of breast cancer is associated with reduced natural killer cytotoxicity. *Breast Cancer Res Treat.* 1986;7(3):187-92.
- 186** Strayer, D.R. *et al.* Low natural cytotoxicity of peripheral blood mononuclear cells in individuals with high familial incidences of cancer. *Cancer Res.* 1984 Jan;44(1):370-4.
- 187** Kaneko, K. *et al.* Clinical implication of HLA class I expression in breast cancer. *BMC Cancer.* 2011 Oct 20;11:454. doi: 10.1186/1471-2407-11-454.
- 188** Algarra, I. *et al.* The selection of tumor variants with altered expression of classical and nonclassical MHC class I molecules: implications for tumor immune escape. *Cancer Immunol Immunother.* 2004 Oct;53(10):904-10. Epub 2004 Apr 7.
- 189** Aptsiauri, N. *et al.* Role of altered expression of HLA class I molecules in cancer progression. *Adv Exp Med Biol.* 2007;601:123-31.
- 190** Glas, R. *et al.* Recruitment and activation of natural killer (NK) cells in vivo determined by the target cell phenotype. An adaptive component of NK cell-mediated responses. *J Exp Med.* 2000 Jan 3;191(1):129-38.

- 191 Jobim, M.R. *et al.* Analysis of KIR gene frequencies and HLA class I genotypes in breast cancer and control group. *Hum Immunol.* 2013 Sep;74(9):1130-3. doi: 10.1016/j.humimm.2013.06.021. Epub 2013 Jun 18.
- 192 Mamessier, E. *et al.* Human breast tumor cells induce self-tolerance mechanisms to avoid NKG2D-mediated and DNAM-mediated NK cell recognition. *Cancer Res.* 2011 Nov 1;71(21):6621-32. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-0792. Epub 2011 Sep 21.
- 193 Tsukerman, P. *et al.* MiR-10b downregulates the stress-induced cell surface molecule MICB, a critical ligand for cancer cell recognition by natural killer cells. *Cancer Res.* 2012 Nov 1;72(21):5463-72. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2671. Epub 2012 Aug 21.
- 194 Fuertes, M.B. *et al.* Intracellular retention of the NKG2D ligand MHC class I chain-related gene A in human melanomas confers immune privilege and prevents NK cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol.* 2008 Apr 1;180(7):4606-14.
- 195 Raffaghello, L. *et al.* Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia.* 2004 Sep-Oct;6(5):558-68.
- 196 Ashiru, O. *et al.* 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.* 2010 Jan 15;70(2):481-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1688. Epub 2010 Jan 12.
- 197 Clayton, A. *et al.* Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer Res.* 2007 Aug 1;67(15):7458-66.
- 198 Salih, H.R. *et al.* Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol.* 2002 Oct 15;169(8):4098-102.
- 199 Waldhauer, I. and Steinle, A. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res.* 2006 Mar 1;66(5):2520-6.
- 200 Paschen, A. *et al.* Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. *Clin Cancer Res.* 2009 Aug 15;15(16):5208-15. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0886. Epub 2009 Aug 11.
- 201 de Kruijf, E.M. *et al.* NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. *BMC Cancer.* 2012 Jan 18;12:24. doi: 10.1186/1471-2407-12-24.
- 202 Groh, V. *et al.* Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature.* 2002 Oct 17;419(6908):734-8.
- 203 Clayton, A. and Tabi, Z. Exosomes and the MICA-NKG2D system in cancer. *Blood Cells Mol Dis.* 2005 May-Jun;34(3):206-13.
- 204 Cao, W. *et al.* RAET1E2, a soluble isoform of the UL16-binding protein RAET1E produced by tumor cells, inhibits NKG2D-mediated NK cytotoxicity. *J Biol Chem.* 2007 Jun 29;282(26):18922-8. Epub 2007 Apr 30.
- 205 Doubrovina, E.S. *et al.* Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J Immunol.* 2003 Dec 15;171(12):6891-9.

- 206** Chang, C.C. *et al.* Classical and nonclassical HLA class I antigen and NK Cell-activating ligand changes in malignant cells: current challenges and future directions. *Adv Cancer Res.* 2005;93:189-234.
- 207** Lehmann, C. *et al.* Impaired binding of perforin on the surface of tumor cells is a cause of target cell resistance against cytotoxic effector cells. *Blood.* 2000 Jul 15;96(2):594-600.
- 208** Medema, J.P. *et al.* Blockade of the granzyme B/perforin pathway through overexpression of the serine protease inhibitor PI-9/SPI-6 constitutes a mechanism for immune escape by tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 25;98(20):11515-20. Epub 2001 Sep 18.
- 209** Moreno, M. *et al.* High level of MUC1 in serum of ovarian and breast cancer patients inhibits huHMFG-1 dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). *Cancer Lett.* 2007 Nov 8;257(1):47-55. Epub 2007 Aug 9.
- 210** Snijdewint, F.G. *et al.* Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity can be induced by MUC1 peptide vaccination of breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2001 Jul 1;93(1):97-106.
- 211** Zhang, Y. and Zhang, B. TRAIL resistance of breast cancer cells is associated with constitutive endocytosis of death receptors 4 and 5. *Mol Cancer Res.* 2008 Dec;6(12):1861-71. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-08-0313.
- 212** Bullani, R.R. *et al.* Frequent downregulation of Fas (CD95) expression and function in melanoma. *Melanoma Res.* 2002 Jun;12(3):263-70.
- 213** Ganten, T.M. *et al.* Prognostic significance of tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in patients with breast cancer. *J Mol Med (Berl).* 2009 Oct;87(10):995-1007. doi: 10.1007/s00109-009-0510-z. Epub 2009 Aug 13.
- 214** Debatin, K.M. and Krammer, P.H. Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene.* 2004 Apr 12;23(16):2950-66.
- 215** Krajewski, S. *et al.* Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res.* 1995 Oct 1;55(19):4471-8.
- 216** Teitz, T. *et al.* Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med.* 2000 May;6(5):529-35.
- 217** Bargou, R.C. *et al.* Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumor growth in SCID mice. *J Clin Invest.* 1996 Jun 1;97(11):2651-9.
- 218** Tothova, E. *et al.* High expression of Bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy. *Neoplasma.* 2002;49(3):141-4.
- 219** Medema, J.P. *et al.* Immune escape of tumors in vivo by expression of cellular FLICE-inhibitory protein. *J Exp Med.* 1999 Oct 4;190(7):1033-8.
- 220** Hinz, S. *et al.* Bcl-XL protects pancreatic adenocarcinoma cells against CD95- and TRAIL-receptor-mediated apoptosis. *Oncogene.* 2000 Nov 16;19(48):5477-86.

- 221 Hong, X. *et al.* Tumors acquire inhibitor of apoptosis protein (IAP)-mediated apoptosis resistance through altered specificity of cytosolic proteolysis. *J Exp Med.* 2003 Jun 16;197(12):1731-43.
- 222 Niedojadlo, K. *et al.* Apaf-1 expression in human cutaneous melanoma progression and in pigmented nevi. *Pigment Cell Res.* 2006 Feb;19(1):43-50.
- 223 Gubbels, J.A. *et al.* MUC16 provides immune protection by inhibiting synapse formation between NK and ovarian tumor cells. *Mol Cancer.* 2010 Jan 20;9:11. doi: 10.1186/1476-4598-9-11.
- 224 Yang, L. (2006) Mechanisms of Apoptosis Resistance In Breast Cancer. *Breast Cancer Management and Molecular Medicine* (Breast Cancer and Molecular Medicine), 841-858
- 225 Baginska, J. *et al.* The critical role of the tumor microenvironment in shaping natural killer cell-mediated anti-tumor immunity. *Front Immunol.* 2013 Dec 25;4:490. doi: 10.3389/fimmu.2013.00490.
- 226 Mueller, M.M. and Fusenig, N.E. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004 Nov;4(11):839-49.
- 227 Le Maux Chansac, B. *et al.* NK cells infiltrating a MHC class I-deficient lung adenocarcinoma display impaired cytotoxic activity toward autologous tumor cells associated with altered NK cell-triggering receptors. *J Immunol.* 2005 Nov 1;175(9):5790-8.
- 228 Costello, R.T. *et al.* Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2002 May 15;99(10):3661-7.
- 229 Gillard-Bocquet, M. *et al.* Lung tumor microenvironment induces specific gene expression signature in intratumoral NK cells. *Front Immunol.* 2013 Feb 4;4:19. doi: 10.3389/fimmu.2013.00019. eCollection 2013.
- 230 Platonova, S. *et al.* Profound coordinated alterations of intratumoral NK cell phenotype and function in lung carcinoma. *Cancer Res.* 2011 Aug 15;71(16):5412-22. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4179. Epub 2011 Jun 27.
- 231 Fauriat, C. *et al.* Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood.* 2007 Jan 1;109(1):323-30. Epub 2006 Aug 29.
- 232 Madsen, C.B. *et al.* Glycan elongation beyond the mucin associated Tn antigen protects tumor cells from immune-mediated killing. *PLoS One.* 2013 Sep 6;8(9):e72413. doi: 10.1371/journal.pone.0072413. eCollection 2013.
- 233 Wilson, E.B. *et al.* Human tumour immune evasion via TGF-beta blocks NK cell activation but not survival allowing therapeutic restoration of anti-tumour activity. *PLoS One.* 2011;6(9):e22842. doi: 10.1371/journal.pone.0022842. Epub 2011 Sep 6.
- 234 Lee, J.C. *et al.* Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients. *J Immunol.* 2004 Jun 15;172(12):7335-40.

- 235** Castriconi, R. *et al.* Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 1;100(7):4120-5. Epub 2003 Mar 19.
- 236** Poggi, A. *et al.* Tumor-induced apoptosis of human IL-2-activated NK cells: role of natural cytotoxicity receptors. *J Immunol.* 2005 Mar 1;174(5):2653-60.
- 237** Leung, J. and Suh, W.K. The CD28-B7 Family in Anti-Tumor Immunity: Emerging Concepts in Cancer Immunotherapy. *Immune Netw.* 2014 Dec;14(6):265-76. doi: 10.4110/in.2014.14.6.265. Epub 2014 Dec 22.
- 238** Lee, H.C. *et al.* Ganglioside inhibition of CD8+ T cell cytotoxicity: interference with lytic granule trafficking and exocytosis. *J Immunol.* 2012 Oct 1;189(7):3521-7. Epub 2012 Sep 5.
- 239** Jales, A. *et al.* Ganglioside-exposed dendritic cells inhibit T-cell effector function by promoting regulatory cell activity. *Immunology.* 2011 Jan;132(1):134-43. doi: 10.1111/j.1365-2567.2010.03348.x. Epub 2010 Sep 28.
- 240** Halvorsen, E.C. *et al.* Emerging roles of regulatory T cells in tumour progression and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 2014 Dec;33(4):1025-41. doi: 10.1007/s10555-014-9529-x.
- 241** Schmidt, A. *et al.* Molecular mechanisms of treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol.* 2012 Mar 21;3:51. doi: 10.3389/fimmu.2012.00051. eCollection 2012.
- 242** Ghiringhelli, F. *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner. *J Exp Med.* 2005 Oct 17;202(8):1075-85.
- 243** Curiel, T.J. *et al.* Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004 Sep;10(9):942-9. Epub 2004 Aug 22.
- 244** Kobayashi, N. *et al.* FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2007 Feb 1;13(3):902-11.
- 245** Liyanage, U.K. *et al.* Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol.* 2002 Sep 1;169(5):2756-61.
- 246** Pinzon-Charry, A. *et al.* Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression. *Immunol Cell Biol.* 2005 Oct;83(5):451-61.
- 247** Della Bella, S. *et al.* Altered maturation of peripheral blood dendritic cells in patients with breast cancer. *Br J Cancer.* 2003 Oct 20;89(8):1463-72.
- 248** Hoffmann, T.K. *et al.* Alterations in the frequency of dendritic cell subsets in the peripheral circulation of patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2002 Jun;8(6):1787-93.
- 249** Michielsen, A.J. *et al.* Inhibition of dendritic cell maturation by the tumor microenvironment correlates with the survival of colorectal cancer patients following bevacizumab treatment. *Mol Cancer Ther.* 2012 Aug;11(8):1829-37. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0162. Epub 2012 Jun 6.

- 250 Kiertscher, S.M. *et al.* Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol.* 2000 Feb 1;164(3):1269-76.
- 251 Shurin, G.V. *et al.* Neuroblastoma-derived gangliosides inhibit dendritic cell generation and function. *Cancer Res.* 2001 Jan 1;61(1):363-9.
- 252 Ohta, M. *et al.* Immunomodulation of monocyte-derived dendritic cells through ligation of tumor-produced mucins to Siglec-9. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010 Nov 26;402(4):663-9. doi: 10.1016/j.bbrc.2010.10.079. Epub 2010 Oct 29.
- 253 Ishida, A. *et al.* Mucin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells during maturation. *Proteomics.* 2008 Aug;8(16):3342-9. doi: 10.1002/pmic.200800039.
- 254 Meulmeester, E. and Ten Dijke, P. The dynamic roles of TGF-beta in cancer. *J Pathol.* 2011 Jan;223(2):205-18. doi: 10.1002/path.2785. Epub 2010 Oct 18.
- 255 Fu, S. *et al.* TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am J Transplant.* 2004 Oct;4(10):1614-27.
- 256 Hasegawa, Y. *et al.* Transforming growth factor-beta1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer.* 2001 Mar 1;91(5):964-71.
- 257 Lebrecht, A. *et al.* Transforming growth factor beta 1 serum levels in patients with preinvasive and invasive lesions of the breast. *Int J Biol Markers.* 2004 Jul-Sep;19(3):236-9.
- 258 von Rahden, B.H. *et al.* Overexpression of TGF-beta1 in esophageal (Barrett's) adenocarcinoma is associated with advanced stage of disease and poor prognosis. *Mol Carcinog.* 2006 Oct;45(10):786-94.
- 259 Giehl, K. *et al.* Smad4-independent TGF-beta signaling in tumor cell migration. *Cells Tissues Organs.* 2007;185(1-3):123-30.
- 260 Zhou, Y.H. *et al.* TLR4 ligand/H(2)O(2) enhances TGF-beta1 signaling to induce metastatic potential of non-invasive breast cancer cells by activating non-Smad pathways. *PLoS One.* 2013 May 29;8(5):e65906. doi: 10.1371/journal.pone.0065906. Print 2013.
- 261 Gui, T. *et al.* The Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in TGF-beta-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *J Signal Transduct.* 2012;2012:289243. doi: 10.1155/2012/289243. Epub 2012 Jan 29.
- 262 Zhang, Y.E. Non-Smad pathways in TGF-beta signaling. *Cell Res.* 2009 Jan;19(1):128-39. doi: 10.1038/cr.2008.328.
- 263 Koul, H.K. *et al.* Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes Cancer.* 2013 Sep;4(9-10):342-59. doi: 10.1177/1947601913507951.
- 264 Chapnick, D.A. *et al.* Partners in crime: the TGFbeta and MAPK pathways in cancer progression. *Cell Biosci.* 2011 Dec 28;1:42. doi: 10.1186/2045-3701-1-42.
- 265 Kim, E.S. *et al.* TGF-beta-induced upregulation of MMP-2 and MMP-9 depends on p38 MAPK, but not ERK signaling in MCF10A human breast epithelial cells. *Int J Oncol.* 2004 Nov;25(5):1375-82.

- 266** Gomes, L.R. *et al.* TGF-beta1 modulates the homeostasis between MMPs and MMP inhibitors through p38 MAPK and ERK1/2 in highly invasive breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2012 Jan 19;12:26. doi: 10.1186/1471-2407-12-26.
- 267** Camp, B.J. *et al.* In situ cytokine production by breast cancer tumor-infiltrating lymphocytes. *Ann Surg Oncol*. 1996 Mar;3(2):176-84.
- 268** Gooch, J.L. *et al.* Interleukin 4 inhibits growth and induces apoptosis in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 1998 Sep 15;58(18):4199-205.
- 269** Gooch, J.L. *et al.* STAT6 mediates interleukin-4 growth inhibition in human breast cancer cells. *Neoplasia*. 2002 Jul-Aug;4(4):324-31.
- 270** Kim, H.D. *et al.* Interleukin-4 induces senescence in human renal carcinoma cell lines through STAT6 and p38 MAPK. *J Biol Chem*. 2013 Oct 4;288(40):28743-54. doi: 10.1074/jbc.M113.499053. Epub 2013 Aug 9.
- 271** Prokopchuk, O. *et al.* Interleukin-4 enhances proliferation of human pancreatic cancer cells: evidence for autocrine and paracrine actions. *Br J Cancer*. 2005 Mar 14;92(5):921-8.
- 272** Francipane, M.G. *et al.* Crucial role of interleukin-4 in the survival of colon cancer stem cells. *Cancer Res*. 2008 Jun 1;68(11):4022-5. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-6874.
- 273** Roca, H. *et al.* IL-4 induces proliferation in prostate cancer PC3 cells under nutrient-depletion stress through the activation of the JNK-pathway and survivin up-regulation. *J Cell Biochem*. 2012 May;113(5):1569-80. doi: 10.1002/jcb.24025.
- 274** Venmar, K.T. *et al.* IL4 receptor ILR4alpha regulates metastatic colonization by mammary tumors through multiple signaling pathways. *Cancer Res*. 2014 Aug 15;74(16):4329-40. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-14-0093. Epub 2014 Jun 19.
- 275** Koller, F.L. *et al.* Epithelial interleukin-4 receptor expression promotes colon tumor growth. *Carcinogenesis*. 2010 Jun;31(6):1010-7. doi: 10.1093/carcin/bgq044. Epub 2010 Feb 22.
- 276** Olver, S. *et al.* Tumor-derived interleukin-4 reduces tumor clearance and deviates the cytokine and granzyme profile of tumor-induced CD8+ T cells. *Cancer Res*. 2006 Jan 1;66(1):571-80.
- 277** Conticello, C. *et al.* IL-4 protects tumor cells from anti-CD95 and chemotherapeutic agents via up-regulation of antiapoptotic proteins. *J Immunol*. 2004 May 1;172(9):5467-77.
- 278** Bronte, V. *et al.* IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 2003 Jan 1;170(1):270-8.
- 279** Li, Z. *et al.* Endogenous interleukin-4 promotes tumor development by increasing tumor cell resistance to apoptosis. *Cancer Res*. 2008 Nov 1;68(21):8687-94. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0449.
- 280** Ding, H. *et al.* P38 mitogen activated protein kinase expression and regulation by interleukin-4 in human B cell non-Hodgkin lymphomas. *J Hematop*. 2009 Oct 21;2(4):195-204. doi: 10.1007/s12308-009-0049-5.

- 281** Malabarba, M.G. *et al.* Activation of JAK3, but not JAK1, is critical to interleukin-4 (IL4) stimulated proliferation and requires a membrane-proximal region of IL4 receptor alpha. *J Biol Chem.* 1995 Apr 21;270(16):9630-7.
- 282** Calvo, K.R. *et al.* IL-4 protein expression and basal activation of Erk in vivo in follicular lymphoma. *Blood.* 2008 Nov 1;112(9):3818-26. doi: 10.1182/blood-2008-02-138933. Epub 2008 Aug 5.
- 283** Igney, F.H. *et al.* Tumor counterattack--concept and reality. *Eur J Immunol.* 2000 Mar;30(3):725-31.
- 284** Jewett, A. and Bonavida, B. MHC-Class I antigens regulate both the function and the survival of human peripheral blood NK cells: role of endogenously secreted TNF-alpha. *Clin Immunol.* 2000 Jul;96(1):19-28.
- 285** Li, Z. *et al.* Paradoxical roles of IL-4 in tumor immunity. *Cell Mol Immunol.* 2009 Dec;6(6):415-22. doi: 10.1038/cmi.2009.53.
- 286** Chen, M.J. *et al.* Ezrin is required for epithelial-mesenchymal transition induced by TGF-beta1 in A549 cells. *Int J Oncol.* 2014 Oct;45(4):1515-22. doi: 10.3892/ijo.2014.2554. Epub 2014 Jul 22.
- 287** Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science.* 2010 Feb 5;327(5966):656-61. doi: 10.1126/science.1178331.
- 288** Kushwah, R. and Hu, J. Complexity of dendritic cell subsets and their function in the host immune system. *Immunology.* 2011 Aug;133(4):409-19. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03457.x. Epub 2011 Jun 1.
- 289** Bax, M. *et al.* Dendritic cell maturation results in pronounced changes in glycan expression affecting recognition by siglecs and galectins. *J Immunol.* 2007 Dec 15;179(12):8216-24.
- 290** Crespo, H.J. *et al.* Effect of sialic acid loss on dendritic cell maturation. *Immunology.* 2009 Sep;128(1 Suppl):e621-31. doi: 10.1111/j.1365-2567.2009.03047.x. Epub 2009 Jan 12.
- 291** Lock, K. *et al.* Expression of CD33-related siglecs on human mononuclear phagocytes, monocyte-derived dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells. *Immunobiology.* 2004;209(1-2):199-207.
- 292** Cabral, M.G. *et al.* The phagocytic capacity and immunological potency of human dendritic cells is improved by alpha2,6-sialic acid deficiency. *Immunology.* 2013 Mar;138(3):235-45. doi: 10.1111/imm.12025.
- 293** Videira, P.A. *et al.* Surface alpha 2-3- and alpha 2-6-sialylation of human monocytes and derived dendritic cells and its influence on endocytosis. *Glycoconj J.* 2008 Apr;25(3):259-68. Epub 2007 Dec 13.
- 294** Crespo, H.J. *et al.* Dendritic cells: a spot on sialic Acid. *Front Immunol.* 2013 Dec 27;4:491. doi: 10.3389/fimmu.2013.00491.
- 295** Tze, L.E. *et al.* CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med.* 2011 Jan 17;208(1):149-65. doi: 10.1084/jem.20092203. Epub 2011 Jan 10.

- 296** Dilioglou, S. *et al.* Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. *Exp Mol Pathol.* 2003 Dec;75(3):217-27.
- 297** Zheng, Y. *et al.* CD86 and CD80 differentially modulate the suppressive function of human regulatory T cells. *J Immunol.* 2004 Mar 1;172(5):2778-84.
- 298** Adler, H.S. *et al.* Neuronal nitric oxide synthase modulates maturation of human dendritic cells. *J Immunol.* 2010 Jun 1;184(11):6025-34. doi: 10.4049/jimmunol.0901327. Epub 2010 Apr 26.
- 299** Lim, T.S. *et al.* CD80 and CD86 differentially regulate mechanical interactions of T-cells with antigen-presenting dendritic cells and B-cells. *PLoS One.* 2012;7(9):e45185. Epub 2012 Sep 14.
- 300** Fais, S. and Malorni, W. Leukocyte uropod formation and membrane/cytoskeleton linkage in immune interactions. *J Leukoc Biol.* 2003 May;73(5):556-63.
- 301** Sanchez-Madrid, F. and Serrador, J.M. Bringing up the rear: defining the roles of the uropod. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 May;10(5):353-9. doi: 10.1038/nrm2680. Epub 2009 Apr 17.
- 302** Sanmamed, M.F. and Chen, L. Inducible expression of B7-H1 (PD-L1) and its selective role in tumor site immune modulation. *Cancer J.* 2014 Jul-Aug;20(4):256-61. doi: 10.1097/PPO.000000000000061.
- 303** Butte, M.J. *et al.* Programmed death-1 ligand 1 interacts specifically with the B7-1 costimulatory molecule to inhibit T cell responses. *Immunity.* 2007 Jul;27(1):111-22. Epub 2007 Jul 12.
- 304** Neal, Z.C. *et al.* NXS2 murine neuroblastomas express increased levels of MHC class I antigens upon recurrence following NK-dependent immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2004 Jan;53(1):41-52. Epub 2003 Sep 18.
- 305** Bennett, M.W. *et al.* The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. *J Immunol.* 1998 Jun 1;160(11):5669-75.
- 306** Hahne, M. *et al.* Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science.* 1996 Nov 22;274(5291):1363-6.
- 307** Andreola, G. *et al.* Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med.* 2002 May 20;195(10):1303-16.
- 308** Villunger, A. *et al.* Constitutive expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand on multiple myeloma cells: a potential mechanism of tumor-induced suppression of immune surveillance. *Blood.* 1997 Jul 1;90(1):12-20.
- 309** McGilvray, R.W. *et al.* NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoediting. *Clin Cancer Res.* 2009 Nov 15;15(22):6993-7002. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0991. Epub 2009 Oct 27.
- 310** Caras, I. *et al.* Evidence for immune defects in breast and lung cancer patients. *Cancer Immunol Immunother.* 2004 Dec;53(12):1146-52.

- 311** Mamessier, E. *et al.* When breast cancer cells start to fend the educational process of NK cells off. *Oncoimmunology*. 2013 Dec 1;2(12):e26688. Epub 2013 Oct 22.
- 312** Mamessier, E. *et al.* Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J Clin Invest*. 2011 Sep;121(9):3609-22. doi: 10.1172/JCI45816. Epub 2011 Aug 15.
- 313** Abbe de Vallejo, P.G., David Montag, Ryan Nussbaum, Naomi Gunawardema, and Stephanie Studenski. (2013) CD56 is a legitimate immune receptor regulating T cell and NK cell effector function, and its expression level predicts successful aging *The Journal of Immunology* 190
- 314** Belisle, J.A. *et al.* Peritoneal natural killer cells from epithelial ovarian cancer patients show an altered phenotype and bind to the tumour marker MUC16 (CA125). *Immunology*. 2007 Nov;122(3):418-29. Epub 2007 Jul 6.
- 315** Patankar, M.S. *et al.* Potent suppression of natural killer cell response mediated by the ovarian tumor marker CA125. *Gynecol Oncol*. 2005 Dec;99(3):704-13. Epub 2005 Aug 29.
- 316** Balsamo, M. *et al.* 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*. 2012 Jul;42(7):1833-42. doi: 10.1002/eji.201142179. Epub 2012 May 25.
- 317** Madjd, Z. *et al.* Upregulation of MICA on high-grade invasive operable breast carcinoma. *Cancer Immun*. 2007 Oct 22;7:17.
- 318** Madjd, Z. *et al.* Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer. *Int J Cancer*. 2005 Nov 1;117(2):248-55.
- 319** Merino, D. *et al.* Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Mol Cell Biol*. 2006 Oct;26(19):7046-55.
- 320** Konno, R. *et al.* Serum soluble fas level as a prognostic factor in patients with gynecological malignancies. *Clin Cancer Res*. 2000 Sep;6(9):3576-80.
- 321** Huber, V. *et al.* Human colorectal cancer cells induce T-cell death through release of proapoptotic microvesicles: role in immune escape. *Gastroenterology*. 2005 Jun;128(7):1796-804.
- 322** Shin, M.S. *et al.* Alterations of Fas (Apo-1/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol*. 1999 Jun;154(6):1785-91.
- 323** Fenton, R.G. *et al.* Inhibition of Fas (CD95) expression and Fas-mediated apoptosis by oncogenic Ras. *Cancer Res*. 1998 Aug 1;58(15):3391-400.
- 324** Pitti, R.M. *et al.* Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature*. 1998 Dec 17;396(6712):699-703.
- 325** Shin, M.S. *et al.* Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers. *Cancer Res*. 2001 Jul 1;61(13):4942-6.

- 326** Kajitani, K. *et al.* Mechanistic analysis of the antitumor efficacy of human natural killer cells against breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Jul;134(1):139-55. doi: 10.1007/s10549-011-1944-x. Epub 2012 Jan 20.
- 327** Singh, T.R. *et al.* Synergistic interactions of chemotherapeutic drugs and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand/Apo-2 ligand on apoptosis and on regression of breast carcinoma in vivo. *Cancer Res.* 2003 Sep 1;63(17):5390-400.
- 328** Zhang, J. *et al.* PKCdelta protects human breast tumor MCF-7 cells against tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-mediated apoptosis. *J Cell Biochem.* 2005 Oct 15;96(3):522-32.
- 329** Sanlioglu, A.D. *et al.* Surface TRAIL decoy receptor-4 expression is correlated with TRAIL resistance in MCF7 breast cancer cells. *BMC Cancer.* 2005 May 25;5:54.
- 330** Chandrasekaran, S. *et al.* TRAIL-mediated apoptosis in breast cancer cells cultured as 3D spheroids. *PLoS One.* 2014 Oct 24;9(10):e111487. doi: 10.1371/journal.pone.0111487. eCollection 2014.
- 331** Jiang, S.B. *et al.* Resistance of cytolytic lymphocytes to perforin-mediated killing. Inhibition of perforin binding activity by surface membrane proteins. *J Immunol.* 1990 Feb 1;144(3):998-1003.
- 332** Abouzahr, S. *et al.* Identification of target actin content and polymerization status as a mechanism of tumor resistance after cytolytic T lymphocyte pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jan 31;103(5):1428-33. Epub 2006 Jan 23.
- 333** Wulfig, C. *et al.* Stepwise cytoskeletal polarization as a series of checkpoints in innate but not adaptive cytolytic killing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jun 24;100(13):7767-72. Epub 2003 Jun 11.
- 334** Abouzahr-Rifai, S. *et al.* Resistance of tumor cells to cytolytic T lymphocytes involves Rho-GTPases and focal adhesion kinase activation. *J Biol Chem.* 2008 Nov 14;283(46):31665-72. doi: 10.1074/jbc.M800078200. Epub 2008 Sep 8.
- 335** Janji, B. *et al.* The actin filament cross-linker L-plastin confers resistance to TNF-alpha in MCF-7 breast cancer cells in a phosphorylation-dependent manner. *J Cell Mol Med.* 2010 Jun;14(6A):1264-75. doi: 10.1111/j.1582-4934.2009.00918.x. Epub 2009 Oct 3.
- 336** Hoa, N. *et al.* Glioma cells display complex cell surface topographies that resist the actions of cytolytic effector lymphocytes. *J Immunol.* 2010 Oct 15;185(8):4793-803. doi: 10.4049/jimmunol.1001526. Epub 2010 Sep 20.
- 337** Akalay, I. *et al.* Epithelial-to-mesenchymal transition and autophagy induction in breast carcinoma promote escape from T-cell-mediated lysis. *Cancer Res.* 2013 Apr 15;73(8):2418-27. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2432. Epub 2013 Feb 22.
- 338** Joly, E. and Hudrisier, D. *What is trogocytosis and what is its purpose?*, *Nat Immunol.* 2003 Sep;4(9):815.
- 339** Ahmed, K.A. *et al.* Intercellular trogocytosis plays an important role in modulation of immune responses. *Cell Mol Immunol.* 2008 Aug;5(4):261-9. doi: 10.1038/cmi.2008.32.

- 340** Domaica, C.I. *et al.* Tumour-experienced T cells promote NK cell activity through trogocytosis of NKG2D and NKp46 ligands. *EMBO Rep.* 2009 Aug;10(8):908-15. doi: 10.1038/embor.2009.92. Epub 2009 Jun 5.
- 341** Nakamura, K. *et al.* Fratricide of natural killer cells dressed with tumor-derived NKG2D ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jun 4;110(23):9421-6. doi: 10.1073/pnas.1300140110. Epub 2013 May 20.
- 342** LeMaoult, J. *et al.* Trogocytic intercellular membrane exchanges among hematological tumors. *J Hematol Oncol.* 2015 Mar 14;8:24. doi: 10.1186/s13045-015-0114-8.
- 343** Somanchi, S.S. *et al.* Engineering lymph node homing of ex vivo-expanded human natural killer cells via trogocytosis of the chemokine receptor CCR7. *Blood.* 2012 May 31;119(22):5164-72. doi: 10.1182/blood-2011-11-389924. Epub 2012 Apr 12.
- 344** Frey, M. *et al.* Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets. *J Immunol.* 1998 Jul 1;161(1):400-8.
- 345** Dustin, M.L. Signaling at neuro/immune synapses. *J Clin Invest.* 2012 Apr;122(4):1149-55. doi: 10.1172/JCI58705. Epub 2012 Apr 2.
- 346** Chao, M.P. *et al.* The CD47-SIRPalpha pathway in cancer immune evasion and potential therapeutic implications. *Curr Opin Immunol.* 2012 Apr;24(2):225-32. doi: 10.1016/j.coi.2012.01.010. Epub 2012 Feb 4.
- 347** Kawasaki, B.T. and Farrar, W.L. Cancer stem cells, CD200 and immunoevasion. *Trends Immunol.* 2008 Oct;29(10):464-8. doi: 10.1016/j.it.2008.07.005. Epub 2008 Sep 3.
- 348** Wang, X.Q. and Frazier, W.A. The thrombospondin receptor CD47 (IAP) modulates and associates with alpha2 beta1 integrin in vascular smooth muscle cells. *Mol Biol Cell.* 1998 Apr;9(4):865-74.
- 349** Chavarria, A. and Cardenas, G. Neuronal influence behind the central nervous system regulation of the immune cells. *Front Integr Neurosci.* 2013 Sep 2;7:64. doi: 10.3389/fnint.2013.00064.
- 350** Bi, S. and Baum, L.G. Sialic acids in T cell development and function. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Dec;1790(12):1599-610. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.07.027. Epub 2009 Aug 4.
- 351** Bull, C. *et al.* Sweet escape: sialic acids in tumor immune evasion. *Biochim Biophys Acta.* 2014 Aug;1846(1):238-46. doi: 10.1016/j.bbcan.2014.07.005. Epub 2014 Jul 12.
- 352** Carraway, K.L. *et al.* Tumor sialomucin complexes as tumor antigens and modulators of cellular interactions and proliferation. *J Cell Sci.* 1992 Oct;103 (Pt 2):299-307.
- 353** Belisle, J.A. *et al.* Identification of Siglec-9 as the receptor for MUC16 on human NK cells, B cells, and monocytes. *Mol Cancer.* 2010 May 24;9:118. doi: 10.1186/1476-4598-9-118.
- 354** Jandus, C. *et al.* Interactions between Siglec-7/9 receptors and ligands influence NK cell-dependent tumor immunosurveillance. *J Clin Invest.* 2014 Apr;124(4):1810-20. doi: 10.1172/JCI65899. Epub 2014 Feb 24.

- 355** Su, C.C. *et al.* CD30 is involved in inhibition of T-cell proliferation by Hodgkin's Reed-Sternberg cells. *Cancer Res.* 2004 Mar 15;64(6):2148-52.
- 356** McCoy, M.J. *et al.* Peripheral CD8(+) T cell proliferation is prognostic for patients with advanced thoracic malignancies. *Cancer Immunol Immunother.* 2013 Mar;62(3):529-39. doi: 10.1007/s00262-012-1360-z. Epub 2012 Oct 16.
- 357** Letsch, A. *et al.* High frequencies of circulating melanoma-reactive CD8+ T cells in patients with advanced melanoma. *Int J Cancer.* 2000 Sep 1;87(5):659-64.
- 358** Weide, B. *et al.* Functional T cells targeting NY-ESO-1 or Melan-A are predictive for survival of patients with distant melanoma metastasis. *J Clin Oncol.* 2012 May 20;30(15):1835-41. doi: 10.1200/JCO.2011.40.2271. Epub 2012 Apr 23.
- 359** Cho, Y. *et al.* CD4+ and CD8+ T cells cooperate to improve prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2003 Apr 1;63(7):1555-9.
- 360** Zhang, L. *et al.* Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.* 2003 Jan 16;348(3):203-13.
- 361** Zhuang, X. *et al.* A high number of CD8+ T cells infiltrated in NSCLC tissues is associated with a favorable prognosis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2010 Jan;18(1):24-8. doi: 10.1097/PAI.0b013e3181b6a741.
- 362** Mahmoud, S.M. *et al.* An evaluation of the clinical significance of FOXP3+ infiltrating cells in human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 May;127(1):99-108. doi: 10.1007/s10549-010-0987-8. Epub 2010 Jun 17.
- 363** Perrone, G. *et al.* Intratumoural FOXP3-positive regulatory T cells are associated with adverse prognosis in radically resected gastric cancer. *Eur J Cancer.* 2008 Sep;44(13):1875-82. doi: 10.1016/j.ejca.2008.05.017. Epub 2008 Jul 9.
- 364** Michielsen, A.J. *et al.* Tumour tissue microenvironment can inhibit dendritic cell maturation in colorectal cancer. *PLoS One.* 2011;6(11):e27944. doi: 10.1371/journal.pone.0027944. Epub 2011 Nov 18.
- 365** Almand, B. *et al.* Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol.* 2001 Jan 1;166(1):678-89.
- 366** Gabrilovich, D. *et al.* Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo. *Blood.* 1998 Dec 1;92(11):4150-66.
- 367** Gabrilovich, D.I. *et al.* Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med.* 1996 Oct;2(10):1096-103.
- 368** Hargadon, K.M. Tumor-altered dendritic cell function: implications for anti-tumor immunity. *Front Immunol.* 2013 Jul 11;4:192. doi: 10.3389/fimmu.2013.00192. eCollection 2013.
- 369** Monti, P. *et al.* Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10^{high}IL-12^{low} regulatory dendritic cell. *J Immunol.* 2004 Jun 15;172(12):7341-9.

- 370** Wilson, C.A. *et al.* HER-2 overexpression differentially alters transforming growth factor-beta responses in luminal versus mesenchymal human breast cancer cells. *Breast Cancer Res.* 2005;7(6):R1058-79. Epub 2005 Nov 8.
- 371** Zeisberg, M. and Neilson, E.G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1429-37. doi: 10.1172/JCI36183. Epub 2009 Jun 1.
- 372** Xu, J. *et al.* TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009 Feb;19(2):156-72. doi: 10.1038/cr.2009.5.
- 373** Miyazono, K. Transforming growth factor-beta signaling in epithelial-mesenchymal transition and progression of cancer. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2009;85(8):314-23.
- 374** Cesi, V. *et al.* TGFbeta-induced c-Myb affects the expression of EMT-associated genes and promotes invasion of ER+ breast cancer cells. *Cell Cycle.* 2011 Dec 1;10(23):4149-61. doi: 10.4161/cc.10.23.18346. Epub 2011 Dec 1.
- 375** Liu, R.Y. *et al.* JAK/STAT3 signaling is required for TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition in lung cancer cells. *Int J Oncol.* 2014 May;44(5):1643-51. doi: 10.3892/ijo.2014.2310. Epub 2014 Feb 21.

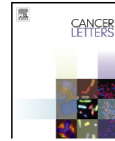
VIII. ANEXOS

Publicaciones relacionadas

Podocalyxin-like protein 1 functions as an immunomodulatory molecule in breast cancer cells. Amo L, Tamayo-Orbegozo E, Maruri N, Buqué A, Solaun M, Riñón M, Arrieta A, Larrucea S. *Cancer Lett.* 2015. doi: 10.1016/j.canlet.2015.06.029.

Involvement of platelet-tumor cell interaction in immune evasion. Potential role of podocalyxin-like protein 1. Amo L,† Tamayo-Orbegozo E,† Maruri N, Eguizabal C, Zenarruzabeitia O, Riñón M, Arrieta A, Santos S, Monge J, Vesga MA, Borrego F, Larrucea S. *Front Oncol.* 2014. doi: 10.3389/fonc.2014.00245.

(En preparación) Identification of PCLP1 as a marker for immature dendritic cells. Laura Amo, Estíbaliz Tamayo-Orbegozo, Irene Luque, Unai Pérez-Sautu, Natalia Maruri, Marta Riñón, Arantza Arrieta, Susana Larrucea.



Original Articles

Podocalyxin-like protein 1 functions as an immunomodulatory molecule in breast cancer cells



Laura Amo^a, Estíbaliz Tamayo-Orbegozo^a, Natalia Maruri^a, Aitziber Buqué^b, Miren Solaun^c, Marta Riñón^a, Arantza Arrieta^a, Susana Larrucea^{a,*}

^a Regulation of the Immune System Group, BioCruces Health Research Institute, Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Bizkaia, Spain

^b Medical Oncology Research Laboratory, BioCruces Health Research Institute, Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Bizkaia, Spain

^c Flow Cytometry Unit, BioCruces Health Research Institute, Hospital Universitario Cruces, Barakaldo, Bizkaia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 March 2015

Received in revised form 19 June 2015

Accepted 23 June 2015

Keywords:

Podocalyxin

Breast cancer

NK cells

Immune evasion

ABSTRACT

Podocalyxin-like protein 1 (PCLP1), a CD34-related sialomucin involved in the regulation of cellular morphology and adhesion, is expressed by a number of normal cells and various tumor cells. In breast malignancies PCLP1 overexpression has been associated with the most aggressive, metastatic cancers and poor prognosis. These observations suggest that PCLP1 expression could provide a mechanism to evade the immune response, thereby promoting metastatic progression of cancer. In the present work, we aimed to determine the effect of PCLP1 overexpressed in MCF7 breast cancer cells on natural killer (NK) cell cytotoxicity, dendritic cell maturation, and agonist-induced T cell proliferation. The results showed that PCLP1 expressed in MCF7 breast cancer cells confers resistance to NK cell-mediated cytotoxicity and impairs T cell proliferation. Furthermore, PCLP1 decreased the levels of NK cell activating receptors NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, DNAM-1, and CD16 on cell surface in a contact-dependent manner. Moreover, NK cells acquired PCLP1 from MCF7 cells by a process known as trogocytosis. These data reveal a new function of PCLP1 expressed on tumor cells as an immunomodulatory molecule, which may represent a mechanism to evade the immune response.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Introduction

Breast cancer is the most common cancer in women. The predominant cause of patient's death is the metastatic spread to distant organs which represents the primary challenge for cancer treatment. Immune system plays a crucial role in restricting breast tumor growth and metastasis, particularly due to the antitumor cytotoxicity of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) and NK cells [1]. Dendritic cells also exert an essential function in antitumor immune response through their ability to act as potent antigen-presenting cells [2]. NK cells are CD56⁺CD3⁻ lymphocytes of the innate immunity with the capacity to elicit direct cellular cytotoxicity against tumor and virus-infected cells without prior antigen stimulation. NK cell

cytolytic activity is regulated by a balance of signals delivered by inhibitory and activating receptors that interact with ligands variably expressed on target cells [3]. Once activated, NK cells are able to kill target cells via multiple effector mechanisms. These encompass the exocytosis of cytotoxic granules containing perforin and granzymes that trigger tumor-cell apoptosis, death receptor-mediated apoptosis, secretion of various inflammatory cytokines and chemokines, and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) mediated by the NK cell receptor CD16/FcγRIIIa [4].

However, breast tumors have developed various mechanisms to evade the immune system in order to progress and metastasize. These mechanisms include the prevention of the recognition and destruction by cytotoxic immune cells, impairment of regulatory T cell infiltration, and inhibition of lymphocyte proliferation and dendritic cell differentiation [5,6]. Breast tumor cells escape from immune cell-mediated lysis by altering the levels of activating and inhibitory receptors on cytotoxic cells and their ligands on tumor cells, avoiding the recognition and destruction of malignant cells [7,8]. NK cells from patients with metastatic breast cancer exhibit a reduced expression of activating receptors such as NKp30, NKG2D, DNAM-1, and CD16 and an altered cytotoxic function. Other mechanisms to avoid immune cell cytotoxicity include tumor cell resistance to death through the modulation of molecules involved in apoptosis and the expression of immune inhibitory ligands such as B7-H1 (PD-L1), HLA-E, HLA-G, and CD200 [9–11].

Abbreviations: 7-AAD, 7-aminoactinomycin D; ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity; CFSE, carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester; CMTMR, 4-chloromethyl benzoyl amino tetramethylrhodamine; CTL, cytotoxic T lymphocyte; EMT, epithelial-mesenchymal transition; IFN- γ , interferon- γ ; NK cell, natural killer cell; mAb, monoclonal antibody; PBMCs, peripheral blood mononuclear cells; PCLP1, podocalyxin-like protein 1; rhGM-CSF, recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; rhIL-2, recombinant human interleukin-2; TGF- β 1, tumor growth factor- β 1; TNF- α , tumor necrosis factor- α .

* Corresponding author. Tel.: +34 94 600 6144; fax: +34 94 600 6014.

E-mail address: slarrucea@osakidetza.net (S. Larrucea).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2015.06.029>

0304-3835/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

PCLP1 is a cell surface glycoprotein belonging to the CD34 family of sialomucins, expressed by a number of normal cell types and whose up-regulation has been correlated with a more aggressive phenotype and unfavorable prognosis in numerous types of cancer, including breast, colorectal, prostate, bladder, ovarian cancer, renal carcinoma, and oral squamous cell carcinoma [12–20]. This observation suggests the possibility that PCLP1 expression may confer a mechanism for immune evasion to tumor cells and thereby promote the progression of metastatic cancer.

The purpose of the research reported in this study was to assess the effect of PCLP1 expression on the function of immune system cells in breast tumor cells. This work shows that PCLP1 expressed on breast cancer cells impairs NK cell-mediated killing and agonist-induced T cell proliferation. These results indicate that PCLP1 contributes to tumor escape from NK cell-mediated lysis in breast cancer cells, revealing a role of PCLP1 as an immunomodulatory molecule in cancer.

Materials and methods

Cell lines and primary cells

Human breast cancer cell lines MCF7 and MDA-MB-231 were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in Dulbecco's Modified Eagles' medium (Gibco®, Life Technologies, Madrid, Spain) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS). Human blood was used with the approval of the ethical committee of the hospital and conforms to the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density

gradient centrifugation over Ficoll-Hypaque (Lymphoprep™, Axis-Shield, Norway). NK cells and monocytes were isolated from PBMCs by negative selection using antibody-coated bead separation kit (Dynabeads®, Invitrogen, Life Technologies, Madrid, Spain) in accordance with the manufacturer's instructions and cultured in RPMI-1640 GlutaMAX™ medium (Invitrogen) supplemented with 10% FBS. For the generation of immature monocyte-derived dendritic cells, monocytes were cultured for 5 or 6 days in complete RPMI medium containing 400 U/mL rIL-4 and 800 U/mL rhGM-CSF (Preprotech, NJ, USA).

Generation of stable transfected cells

MCF7 cells were electroporated with hPCLP1 coding sequence subcloned into pEGFP-N1 eukaryotic expression vector (a gift from Dr. R. Parrilla, CIB-CSIC) using Amaxa electroporation system (Amaxa® Cell Line Nucleofector® Kit V, Lonza, Basel, Switzerland), as indicated by the manufacturer. Cells were selected to stably express the indicated vector with geneticin (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) at a final concentration of 800 µg/mL. Control cells were obtained by transfection with the empty plasmid. Protein expression was confirmed by flow cytometry, western blotting, and fluorescence microscopy.

Flow cytometric assays

Cell staining

Cells were incubated with specific monoclonal antibodies (mAbs) (Table S1) for 30 min at 4 °C, fixed, and acquired on a Cytoomics FC500 or Tetra Navios (Beckman Coulter, Barcelona, Spain). FlowJo Software (Tree Star, Ashland, OR, USA) or CXP analysis software was used for data analysis. Isotype-matched control antibodies were used to evaluate nonspecific binding. Dead cells were excluded based upon 7-AAD staining (BD-ViaProbe™). Data are expressed as median fluorescence intensity (MFI) or the proportion of positive cells corrected for nonspecific staining using fluorescence minus one (FMO) and isotype controls.

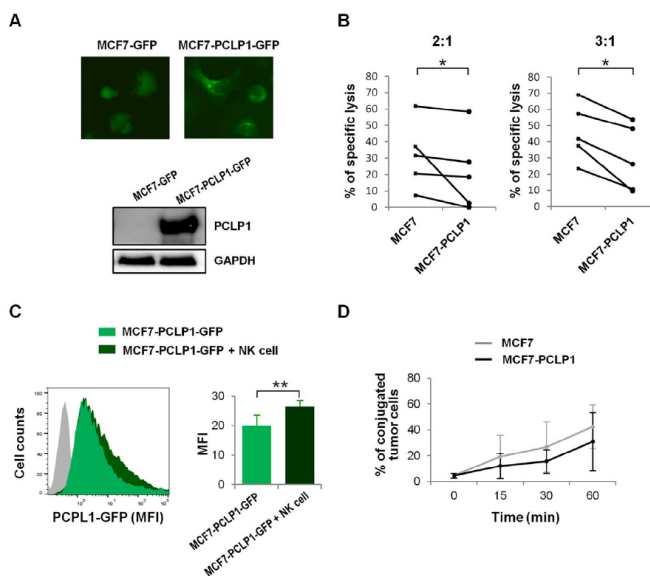


Fig. 1. PCLP1 expression on tumor cells decreases NK cell-mediated lysis. (A) GFP or PCLP1-GFP detection on MCF7 cell line transfected with pEGFP or pEGFP-PCLP1, respectively, by fluorescence microscopy (upper panels). PCLP1 expression detected with an anti-PCLP1 mAb by western blotting using GAPDH as protein loading control (lower panels). (B) The cytotoxic activity of NK to MCF7 or MCF7-PCLP1 cells was measured as percentage of dead cells at the indicated E:T ratios (2:1 and 3:1) at 4 h. The figure shows the results obtained from five independent experiments performed on different days using NK cells from five different donors. (C) Flow cytometry analysis of PCLP1-GFP expression on the surviving population (dark green) compared to NK cell-untreated MCF7-PCLP1 cells (light green). Autofluorescence of untransfected MCF7 cells is shown in gray. The graph bar represents the MFI of PCLP1 positive cells of seven independent experiments. (D) MCF7-PCLP1 (black) or MCF7 (gray) cells were co-cultured with CMTMR-labeled NK cells at a 3:1 E:T ratio. The graphic illustrates the percentage of conjugated tumor cells (CMTMR-GFP). Statistical analysis of three to five independent experiments was performed using two-tailed paired T-Student test. * $P < 0.05$. ** $P < 0.01$. *** $P < 0.001$. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Assessment of NK-cell cytotoxicity

NK cells cultured in the presence of 200 U/ml rhIL-2 for 4 days were mixed with MCF7 cells at an effector:target (E:T) ratio of 3:1 or 2:1 for 4 h at 37 °C. Spontaneous cell death was determined by analyzing a sample containing only target cells and 7-AAD. Data are presented as the percentage of specific killing, calculated using the formula: % specific lysis = [(% lysis of target cell - % spontaneous cell death) / (100% - % spontaneous cell death)] × 100.

Conjugate-forming assay

NK cells were labeled with 10 μM CMTMR and mixed with target cells at an E:T ratio of 3:1. Then, the cell mixture was centrifuged at 200 g for 1 min in order to facilitate immediate cell contact and then incubated for different time points at 37 °C, fixed and analyzed by flow cytometry. The percentage of conjugates was calculated as the number of cell clusters simultaneously positive in green (GFP) and red (CMTMR).

CD107a degranulation assay

To determine CD107a expression on NK cells, 0.4 μL of BD GolgiStop™ (containing monensin) (BD Biosciences, San Jose, USA) was added to 500 μL of NK cell-tumor cell mixture at an E:T ratio of 2:1 or 3:1 after 1 hour of co-incubation and 2 hours later PE-conjugated anti-CD107a mAb was added for additional 2 hours. Finally, cells were stained with APC-H7-CD45 mAb and 7-AAD.

Intracellular cytokine determination

The measurement of intracellular cytokine was performed as previously described with minor modifications [21]. Briefly, NK cells were incubated with target cells at an E:T ratio of 2:1 or 3:1 for a total period of 4–6 hours. Two hours before the end of the incubation period, BD GolgiStop™ and PE-conjugated anti-CD107a mAb were added to cell mixture. Then, cells were stained with FITC-CD56 mAb,

APC-H7-CD45 mAb, and 7-AAD, followed by intracellular staining with anti-human Vio770™-IFN-γ and APC-TNF-α mAbs.

Cell proliferation assay

T cell and NK cell proliferation was evaluated by carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) dilution method. To analyze T cell proliferation, CFSE-labeled PBMCs were co-cultured with mitomycin C-treated MCF7 transfected cells in 96-well plate at an E:T ratio of 2:1 with 10 μg/mL phytohemagglutinin (PHA) for 4 days. To determine NK cell proliferation, PBMCs were cultured for 6 days in the presence of 1000 U/ml rhIL-2 and then co-cultured with mitomycin C-treated MCF7 cells at a ratio of 2:1 for 24 additional hours. Finally, T cells and NK cells were stained with the indicated antibodies for flow cytometry analysis.

Western blotting

Cells were lysed and equal amounts of total protein (5 μg/lane) were resolved on 4%–12% SDS-PAGE gel and transferred to PVDF membrane. After blocking with 1% BSA, the membranes were incubated overnight at 4 °C with anti-podocalyxin mAb (3D3, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) at 1:200 dilution followed by a secondary goat anti-mouse IgG (H+L)-HRP-conjugated antibody (Bio-Rad, California, USA) at 1:5000 dilution for 1 h at room temperature. Immunoreactive proteins were detected using enhanced chemiluminescence and Gene Snap imaging system (Syngene, Cambridge, UK).

Fluorescence microscopy

NK cells and MCF7 cells were mixed at a 3:1 E:T ratio and centrifuged at 200 g for 1 min. Subsequently, cells were adhered on poly-L-lysine-coated glass slides for different time points at 37 °C, fixed with 3.7% paraformaldehyde and stained with

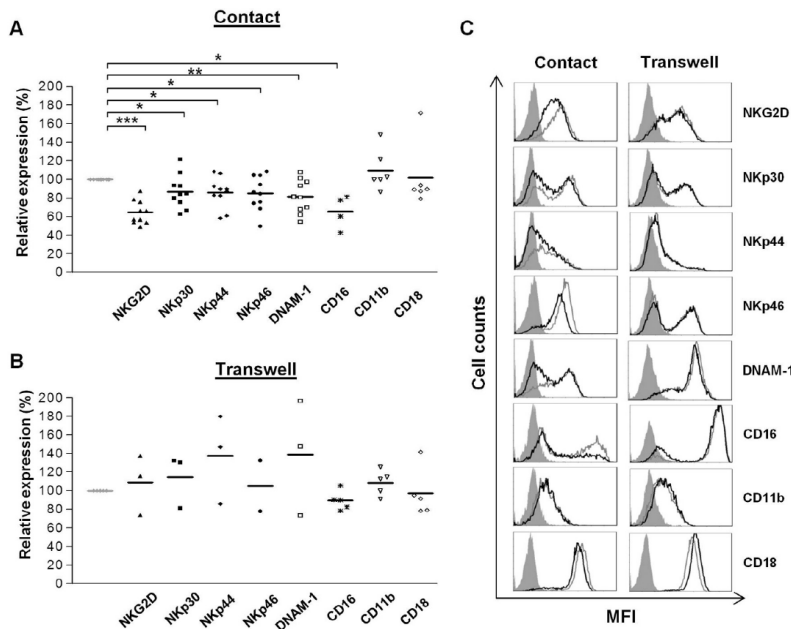


Fig. 2. Effect of PCLP1 on the expression of NK cell receptors. Median fluorescence intensity (MFI) of receptor expression on activated NK cells after cultured with MCF7 cells overexpressing PCLP1 in the absence (A) or presence (B) of transwells was determined by flow cytometry. Transwell studies were performed using Transwell culture system with a 0.4-μm-pore semipermeable membrane. MCF7 cells were plated in the lower chamber of a 24-well plate and NK cells were added to the upper chamber, and cultured for the indicated time. (C) A representative histogram of receptor expression on NK cells cultured with MCF7-PCLP1 (black line) or with MCF7 control (gray line) is shown. Filled gray profiles represent isotype controls. NK cells were gated based on forward and side-scatter properties and CD45⁺CD56⁺ staining. Data were normalized according to their controls. Statistical analysis was performed using T-Student test, except for NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, and DNAM-1 expression analysis shown in (B), where the nonparametric Wilcoxon test was used. *P < 0.05. **P < 0.01. ***P < 0.001.

1/3000 DAPI. The fluorescence signals were captured using a TE 2000 inverted fluorescence microscope (Nikon) with NIS-software.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 3.0 Software (San Diego, California, USA). Statistical significance was calculated by two-tailed, paired Student's t-test. *P* values lower than 0.05 were considered significantly different (*, *p* < 0.05; **, *p* < 0.01; ***, *p* < 0.001). Wilcoxon test was used to compare nonparametric data.

Results

PCLP1 increases tumor cell resistance to NK cell-mediated lysis

We first aimed to determine whether PCLP1 expressed on tumor cells provides resistance to NK cell-mediated cytotoxicity by overexpressing PCLP1 in MCF7 cell line. MCF7 cells, a breast cancer cell line expressing low levels of endogenous PCLP1, were stably transfected with pEFGP plasmid containing PCLP1 construct (pEFGP-PCLP1) or empty plasmid as control. Positive cells expressing PCLP1-GFP or GFP were detected by fluorescence microscopy and the expression of PCLP1 confirmed by western blotting analysis (Fig. 1A). For the sake of clarity, we will refer to MCF7-PCLP1-GFP cells as MCF7-PCLP1 cells.

Next, we conducted cytotoxicity assays with MCF7-PCLP1 or MCF7 control cells as target cells and IL-2-activated NK cells as effector cells at 2:1 or 3:1 E:T ratio. MCF7-PCLP1 exhibited reduced susceptibility to activated NK cell-mediated cytotoxicity in comparison to MCF7 control cells at both ratios (Fig. 1B). Next, the surviving MCF7-PCLP1 cells were analyzed for PCLP1 expression levels 24 hours after cytotoxic assay. The MFI of PCLP1-GFP expression increased significantly in MCF7-PCLP1 cells incubated in the presence of NK cells compared to those cultured in the absence of NK cells (Fig. 1C), which reveals a higher resistance to NK cell-mediated lysis of MCF7

cells expressing high levels of PCLP1 compared to those expressing lower levels.

To assess whether PCLP1 expressed on tumor cells modulates the formation of effector and target cell conjugates, we co-incubated MCF7-PCLP1 cells or MCF7 control cells with CMTMR-labeled NK cells for different times and analyzed the formation of cell aggregates by flow cytometry. The results revealed no significant differences between MCF7-PCLP1 and MCF7 control cells (Fig. 1D), suggesting that PCLP1 expressed on tumor cell does not alter the interaction between NK cells and tumor cells.

PCLP1 expressed on MCF7 breast cancer cells decreases the levels of NK cell activating receptors

We then tested whether PCLP1 on tumor cells could modulate the expression of the main NK cell activating receptors involved in tumor cell killing. For this purpose, we co-cultured IL-2-activated NK cells with MCF7-PCLP1 cells or MCF7 control cells and analyzed the expression of the activating receptors NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, and DNAM-1 by flow cytometry. The results revealed that the expression of all these receptors decreased when NK cells were co-cultured with MCF7-PCLP1 cells compared to MCF7 control (Fig. 2A). We next analyzed the surface expression of other molecules involved in NK cell-mediated cytotoxicity, including CD16 and the adhesion molecules CD11b and CD18. We found that the expression of CD16 was significantly reduced, whereas the surface levels of CD11b and CD18 remained unaltered (Fig. 2A).

To further evaluate whether the decreased expression of NK cell activating receptors mediated by PCLP1 was due to soluble factors or membrane-associated molecules, we performed aforementioned experiments using a semipermeable transwell system to avoid the contact between tumor and NK cells. We found that PCLP1-induced effect on the expression of NK cell receptors was completely

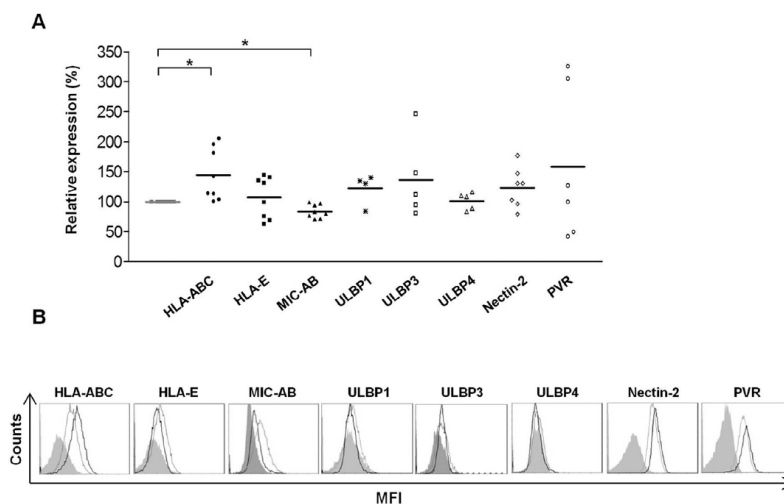


Fig. 3. Expression of NK cell receptor ligands on MCF7 cells overexpressing PCLP1. (A) Flow cytometry analysis of NK cell receptor ligand expression on MCF7-PCLP1 cells and MCF7 control cells. Data are expressed as MFI of the expression of NK cell receptor ligands on MCF7-PCLP1 cells relative to that observed on MCF7 control cells. (B) A representative histogram of NK cell receptor ligand expression on MCF7 cells (gray line) and MCF7-PCLP1 cells (black line) is shown. Filled gray histograms represent isotype controls. Data were normalized according to their controls. Statistical analysis of 4 to 8 experiments was performed using T-Student test. **P* < 0.05.

abrogated in the presence of a separating membrane (Fig. 2B and C).

Overall, these results revealed that PCLP1 expressed on MCF7 breast cancer cells partially inhibits the expression of NK cell activating receptors NKG2D, DNAM-1, NKp30, NKp46, and CD16 on cell surface through a cell-to-cell contact-dependent mechanism.

Expression of NK cell receptor ligands HLA-ABC and MICA/B is regulated by PCLP1 expressed on MCF7 cells

Engagement of NKG2D activating receptor to major histocompatibility complex (MHC) class I chain-related molecules A and B (MICA/B) or UL16-binding proteins (ULBPs) expressed on tumor cells as well as the binding of DNAM-1 activating receptor to poliovirus receptor (PVR) or Nectin-2 potentiates NK cell cytotoxicity and cytokine production. On the contrary, the interaction of NK cell inhibitory receptors to classical MHC class I molecules (HLA-ABC) on target cells protects them from NK cell-mediated lysis. We evaluated whether PCLP1 overexpression modulates NK cell receptor ligands on MCF7 cells. PCLP1 overexpression increased the levels of HLA-ABC on MCF7-PCLP1 cells compared to MCF7 control cells (Fig. 3A and B). On the contrary, MICA/B expression was reduced on MCF7 cells overexpressing PCLP1. These results demonstrate that PCLP1 modulates the expression of HLA-ABC and MICA/B in MCF7 breast cancer cells.

PCLP1 expression has no effect on NK cell degranulation and cytokine production

To evaluate whether the decreased cytotoxicity observed on NK cell co-incubated with PCLP1-expressing target cells was due to a deficient degranulation, we determined the surface expression of the specific marker for degranulation CD107a. The results revealed no significant differences in the percentage of degranulating NK cells co-incubated with MCF7-PCLP1 cells compared to MCF7 control cells (Fig. 4). Then, we evaluated the level of cytokine production by NK cells positive for CD107a. No differences could be observed neither in IFN- γ or TNF- α expression nor in the percentage of polyfunctional NK cells (positive for CD107, IFN- γ and TNF α) when incubated with MCF7-PCLP1 compared to control cells (Fig. 4). These data demonstrate that PCLP1 expressed on MCF7 cells does not regulate NK cell degranulation or cytokine production.

PCLP1 localizes to the immunological synapse and is acquired by NK cells

We next analyzed the distribution of PCLP1 in NK cell-tumor conjugates. Fluorescence microscopy analysis revealed that PCLP1 is recruited to the cell-to-cell contact site formed between NK cells and target cells, known as the immunological synapse (Fig. 5A). Furthermore, we observed that NK cells displayed PCLP1 on their surface, which demonstrated that NK cells acquired PCLP1 from target cells.

To further analyze the process of PCLP1 transfer, activated NK cells were co-incubated with MCF7-PCLP1 or MCF7 control cells for 1 hour and analyzed by flow cytometry. As depicted in Fig. 5B, NK cells displayed PCLP1 when incubated with MCF7-PCLP1 cells. However, no expression was observed on NK cells incubated with MCF7 control cells. The presence of PCLP1 on NK cells could be explained by a mechanism of intercellular transfer of membrane fragments and associated molecules from tumor cells to NK cells known as trogocytosis. The trogocytic process must fulfill certain requirements such as a dependency on cell contact between the donor and acceptor cells and a fast kinetics [22]. Thus, to determine whether the presence of PCLP1 on NK cells was due to cell-to-cell contact or to the uptake of membrane fragments present in

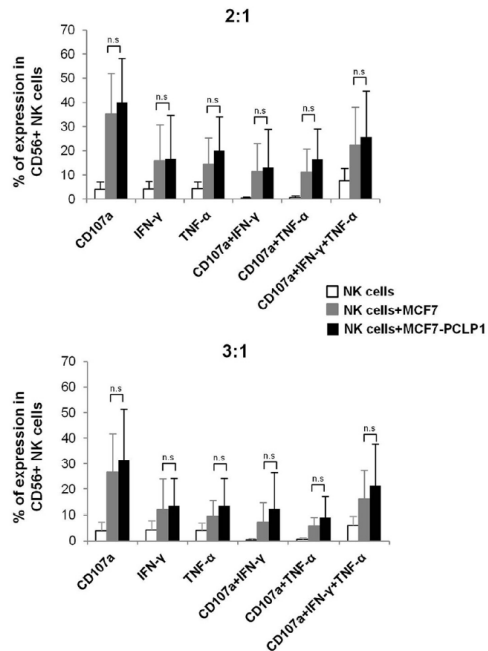


Fig. 4. Degranulation and cytokine production in NK cells co-cultured with MCF7-PCLP1 cells. Percentage of CD107a expression and cytokine production on NK cells in presence of MCF7 or MCF7-PCLP1 cells at the indicated E:T ratios (2:1 and 3:1). CD56⁺ NK lymphocytes were studied for the expression of surface CD107a or IFN- γ or/and TNF- α staining on CD107a positive NK cells. The mean \pm SD of six independent experiments was performed using two-tailed paired T-Student test. * P < 0.05.

the cultured medium and derived from tumor cells, we performed the previous experiment in the presence of a 0.4 μ m-pore transwell membrane. The results showed that in the presence of a separating membrane NK cells did not exhibit PCLP1 expression (Fig. 5B). The kinetics of PCLP1 transfer showed that NK cells displayed PCLP1 as soon as 10 min of co-incubation with tumor cells, reaching the maximum level at 1 hour and decreasing to almost initial level at 8 h (Fig. 5C). Altogether, these results indicate that PCLP1 displayed on tumor cells is acquired by NK cells through a fast process dependent on cell-to-cell contact.

MCF7 overexpressing PCLP1 decreases T cell proliferation but does not alter NK cell proliferation or dendritic cell maturation

Next, we sought to determine whether PCLP1 expressed on tumor cells could inhibit lymphocyte proliferation in response to polyclonal activators. For this purpose, CFSE-labeled PBMCs isolated from healthy donors were cultured in the presence of MCF7-PCLP1 or MCF7 control cells in medium containing PHA or IL-2. We observed that the proliferative response of both CD3⁺ CD4⁺ T cells and CD3⁺ CD8⁺ T cells to PHA stimulation was significantly reduced when co-cultured with MCF7-PCLP1 cells compared with that observed in the presence of MCF7 control (Fig. 6A). However, the results showed no differences in NK cell proliferation (Fig. 6B). These results

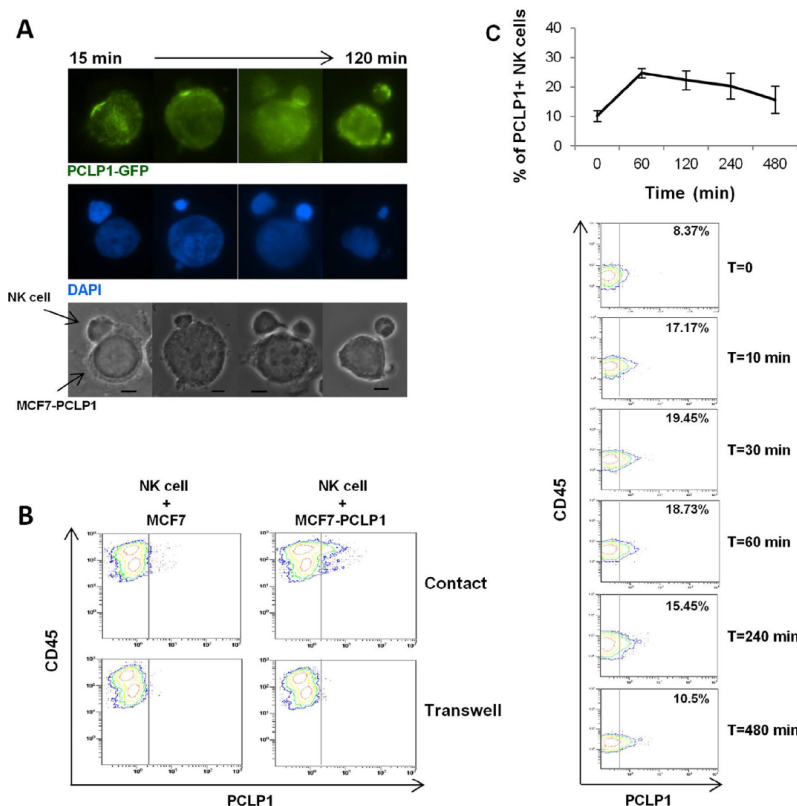


Fig. 5. Localization of PCLP1 at the immunological synapse and analysis of PCLP1 transfer from MCF7-PCLP1 cells onto NK cells. (A) Fluorescence analysis of PCLP1 after co-incubation with tumor cells. Panels illustrate PCLP1-GFP labeling (green), nucleus visualization in DAPI (blue), and phase-contrast images of NK cells and MCF7-PCLP1 cells (arrows). Images were captured with a x60 objective. Scale bar: 5 μ m. (B) Cell contact dependency of PCLP1 transfer onto NK cells. NK cells were co-cultured with tumor cells for 1 h together (contact) or separated by a semipermeable membrane (transwell). The expression of PCLP1 was analyzed by flow cytometry on CD45⁺CD56⁺ cells representing NK cells. Similar results were obtained in three independent experiments. (C) Kinetics of PCLP1 acquisition by NK cells after co-incubation with MCF7-PCLP1-GFP cells. The values represent the percentages of PCLP1-GFP positive cells. Plots depict a representative experiment out of 3 with similar results. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

indicate that PCLP1 expressed on tumor cells significantly inhibits lymphocyte proliferation and that this effect is exerted both on CD4⁺ T cells and CD8⁺ T cells but not on NK cells.

We then aimed to examine the effect of PCLP1 expressed on tumor cells on dendritic cell maturation. The results revealed that surface expression levels of all the maturation markers known to be up-regulated upon lipopolysaccharide-induced dendritic cell maturation, including CD80, CD83, CD86, CD40, and MHC Class II, were similar in dendritic cells co-cultured with MCF7-PCLP1 compared to MCF7 control (Fig. S1).

PCLP1 expression on MCF7 and MDA-MB-231 cell lines increases following stimulation with immunomodulatory cytokines

Immunomodulatory cytokines present in breast cancer microenvironment, such as IL-4 and TGF- β 1, have been shown to exert an

essential role in cancer progression and metastasis [23,24]. Previous studies have demonstrated that PCLP1 expression is up-regulated in response to TGF- β 1 in A540 lung cancer cells [25]. To determine whether TGF- β 1 modulates PCLP1 expression in breast tumor cells, we incubated MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cells in the presence of increasing concentrations of TGF- β 1 at different time points and analyzed PCLP1 expression by western blotting. The results revealed that TGF- β 1 greatly induces PCLP1 expression in breast cancer cells in a time and concentration-dependent manner (Fig. 7A). PCLP1 was also significantly up-regulated in IL-4-treated tumor cells in a time-dependent manner (Fig. 7B).

Discussion

In the current study, we described a previously unidentified function of PCLP1 expressed on breast tumor cells as a molecule involved

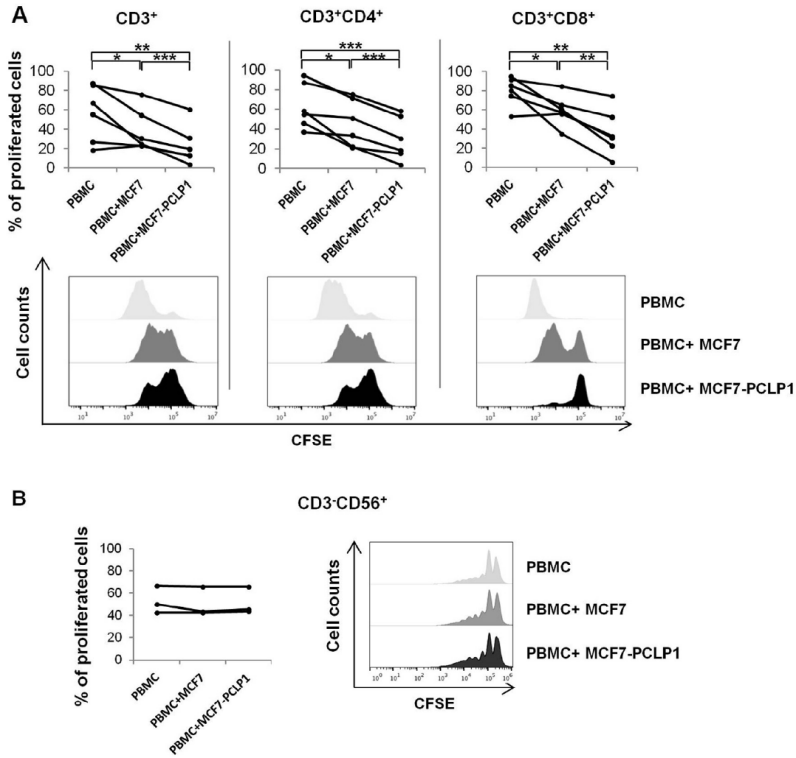


Fig. 6. Effect of PCLP1 expression on lymphocyte proliferation. PBMCs were stained with CFSE for cell proliferation analysis. (A) PBMCs stimulated with PHA were cultured in the absence or presence of MCF7 or MCF7-PCLP1 cells for 4 days and the percentage of proliferating cells was measured in CD3⁺, CD3⁺CD4⁺, or CD3⁺CD8⁺ T cells. A representative flow cytometry histogram is shown. Statistical analysis of five independent experiments was performed using T-Student test. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. (B) PBMCs were stimulated with IL-2 for 6 days and the last day cultured in the absence or presence of MCF7 or MCF7-PCLP1 cells for one more day. The percentage of proliferating cells was measured in CD56⁺CD16⁺ NK cells. The nonparametrical Wilcoxon test was used for statistical analysis.

in tumor evasion from the immune surveillance. Under in vitro conditions, we demonstrated that PCLP1 overexpressed on breast tumor cells decreases NK cell-mediated cytotoxicity and agonist-induced lymphocyte proliferation pointing to a role of PCLP1 as a negative regulator of the immune response in breast cancer.

Expression of PCLP1 in cardiac progenitor cells has been suggested to modulate their immunoregulatory capacity by reducing T-lymphocyte proliferation [26]. In agreement with this result, our data demonstrate that PCLP1 expressed on breast tumor cells diminishes both CD4⁺ and CD8⁺ T cell proliferation induced by agonist. The inhibitory effect of the sialomucin PCLP1 on immune cells response revealed in our study correlates with the observation that sialoglycoproteins inhibit NK cell and T cell activity, influencing tumor growth, immune evasion, immunoeediting, and metastasis [27]. PCLP1 shares similarities with MUC16, a mucin overexpressed in tumor cells that displays charged sialic acid and induces NK cell inhibition [28]. Our results show that NK cell-mediated lysis selects breast tumor cells displaying higher expression of PCLP1, a molecule which endows cells with enhanced ability to metastasize [26].

It has been previously demonstrated that NK cells from breast cancer patients display an impaired activity and diminished expression of the activating receptors NKG2D, NKp30, DNAM-1, and CD16 due in part to the release of soluble factors such as TGF-β1 and which correlates with disease progression [7]. Another study revealed HLA, NKG2D, and DNAM1 as the most important receptors mediating the recognition of breast tumor cells by NK cells [8]. Our results showed that PCLP1 on tumor cells down-regulates the expression of NKG2D, NKp30, NKp44, NKp46, and DNAM-1 in a cell-cell contact dependent manner. We also observed that PCLP1 expressed on tumor cells notably decreases CD16 expression on NK cells. As CD16 is involved in antibody-dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC), PCLP1 on breast tumor cells may potentially lead to an impairment of NK cell-mediated ADCC. Tumor cells evade NK cell recognition by up-regulating ligands for NK cell inhibitory receptors, such as HLA class I, or decreasing ligands for NK cell activating receptors, including MICA and MICB. Our results show that overexpression of PCLP1 in breast cancer cells leads to an augmented expression of HLA class I molecules on cell surface while

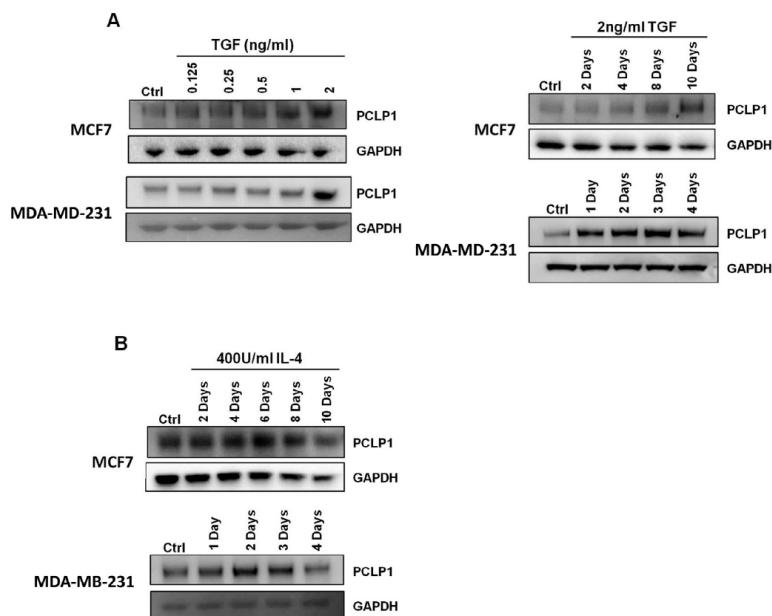


Fig. 7. Modulation of PCLP1 levels on MCF7 and MDA-MB-231 cell lines following stimulation with immunomodulatory cytokines. PCLP1 expression on MCF7 cells (A) and MDA-MB-231 cells (B) after being cultured with TGF- β 1 and IL-4 immunomodulatory molecules at increasing concentrations and different time points as detected by western blotting using a specific anti-PCLP1 mAb. Equal loading of protein samples was verified with an antibody to GAPDH.

decreasing MICA/B. In breast cancer patients, loss of MHC class I molecules is an independent marker of good prognosis [29] and NKG2D ligand expression results in beneficial outcome [30].

NK cell-mediated lysis requires direct contact between effector and target cells, resulting in the formation of an immunological synapse, an essential specialized structure which integrates signals generated by activating and inhibitory receptors [31]. Our finding that PCLP1 localizes at the immunological synapse correlates with a previous study demonstrating PCLP1 localization in presynaptic axon terminals in adult brain [32], supporting the evidence of striking similarities found in immune and neuronal synapses at both molecular and functional levels [33]. PCLP1 expressed in neurons might share with tumor PCLP1 the ability to abrogate immune response thereby suppressing neuroinflammation.

Shortly after the formation of immunological synapse, the interacting cells exchange membrane fragments and proteins at the contact site through a process termed trogocytosis. Recently, trogocytosis has been described as an important mechanism to control immune responses by modifying the functional characteristics of the acceptor cells [34]. For instance, HLA-G1 and m157 are acquired by NK cells from tumor cells via trogocytosis and inhibit NK cell-mediated cytotoxicity [35,36]. We demonstrated that PCLP1 expressed on tumor cells is transferred to NK cells through a process that meets the requirements of trogocytosis. Although we have not identified the ligand on NK cells involved in PCLP1 transfer, it is tempting to hypothesize that L-selectin, which is the only known PCLP1-ligand expressed on a subset of NK cells [37,38], could participate in this process.

Unexpectedly, although our results revealed a decrease in NK cell activating receptors induced by PCLP1-expressing tumor cells, we did not detect a reduction in NK cell degranulation. One possible explanation could be that NK cell activating receptors might be counterbalanced by a decrease in the expression of inhibitory receptor expression, eventually resulting in a normal degranulation. The increased resistance to NK cell killing mediated by PCLP1 in the context of an intact lytic granule exocytosis could rely on the intrinsic resistance of PCLP1-expressing cells to death. In this regard, it has been reported that tumor variants from non-small-cell lung carcinoma resistant to CTL-mediated killing present normal degranulation as well as granzyme B and perforin expression [39]. The authors demonstrate that morphological change due to alteration of actin polymerization and content induced by scinderin and ephrin-A1 overexpression can be used by tumor cells as a strategy to promote their resistance to CTL-induced killing cytotoxicity through the formation of an inefficient lytic synapse in spite of a normal formation of effector–target conjugates. Recruitment of filamentous actin at the immunological synapse is necessary for the cytotoxic activity of NK cells [40]. It has been reported that PCLP1 plays a critical role in actin organization through the induction of Rac1/Cdc42/cortactin signaling pathway in MCF7 and MDA-MB-231 breast cancer cells [41]. Hence, PCLP1 might induce cell resistance to NK cell-mediated cytotoxicity through the regulation of actin dynamics. Additionally, PCLP1 expression in breast cancer cells could inhibit death receptor-induced cytotoxicity through a defective death-receptor signaling or by increasing the activation of signaling pathways involved in cell resistance to death-inducing stimuli such as the

mitogen activated protein kinase (MAPK) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathways. Consistent with this assumption, PCLP1 increases the activity of MAPK and PI3K pathways [42], which activation has been demonstrated to inhibit TRAIL-induced cell death in MCF7 cells [43]. The mechanism accounting for breast tumor cell resistance to NK cell-mediated cytotoxicity mediated by PCLP1 is currently under investigation in our laboratory.

Tumor cells as well as tumor-infiltrating lymphocytes, including T cells and NK cells, expressed immunomodulatory cytokines, such as IL-4 and TGF- β , which in turn induce the expression of molecules involved in tumor progression and immune evasion [23,24]. The impairment of NK cell function in breast cancer has been partially attributed to TGF- β 1 [7]. Our results demonstrate that PCLP1 expression is significantly up-regulated in breast cancer cells in response to IL-4 and TGF- β , in agreement with a previous study showing an increment of PCLP1 mRNA induced by TGF- β 1 in MDA-MB-231 cells [44]. An augmentation in PCLP1 levels by TGF- β 1 treatment has also been described in lung adenocarcinoma A450 cells [25]. These observations suggest that IL-4 and TGF- β 1 could indirectly decrease the immune response by enhancing the expression of PCLP1 on tumor cells.

Collectively, these studies uncovered a previously unrecognized function of PCLP1 expressed on tumor cells as an immunomodulatory molecule, thereby providing knowledge about its significance in cancer progression. Identification of this new mechanism of immune evasion may have implications for the development of PCLP1 antagonist which, in combination with other therapeutic agents, might improve the clinical outcome in patients with breast cancer.

Acknowledgements

This work was supported by grants BIO11/CM/007 from EITB Maratoia-BIOEF (Basque Foundation for Health Innovation and Research) and PI08-1112 from the Fondo de Investigaciones Sanitarias-Instituto de Salud Carlos III.

Conflict of interest

None.

Appendix: Supplementary material

Supplementary data to this article can be found online at doi:10.1016/j.canlet.2015.06.029.

References

- C.Y. Slaney, J. Rautela, B.S. Parker, The emerging role of immunosurveillance in dictating metastatic spread in breast cancer, *Cancer Res.* 73 (2013) 5852–5857.
- A. Pinzon-Charry, T. Maxwell, J.A. Lopez, Dendritic cell dysfunction in cancer: a mechanism for immunosuppression, *Immunol. Cell Biol.* 83 (2005) 451–461.
- L.L. Lanier, NK cell recognition, *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005) 225–274.
- M. Cheng, Y. Chen, W. Xiao, R. Sun, Z. Tian, NK cell-based immunotherapy for malignant diseases, *Cell. Mol. Immunol.* 10 (2013) 230–252.
- X. Jiang, D.J. Shapiro, The immune system and inflammation in breast cancer, *Mol. Cell. Endocrinol.* 382 (2014) 673–682.
- C. Kichler-Lakomy, A.C. Budinsky, R. Wolfram, M. Hellan, C. Wiltshcke, T. Brodowicz, et al., Deficiencies in phenotype expression and function of dendritic cells from patients with early breast cancer, *Eur. J. Med. Res.* 11 (2006) 7–12.
- E. Mamessier, A. Sylvain, M.L. Thibault, G. Houvenaeghel, J. Jacquemier, R. Castellano, et al., Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity, *J. Clin. Invest.* 121 (2011) 3609–3622.
- E. Mamessier, A. Sylvain, F. Bertucci, R. Castellano, P. Finetti, G. Houvenaeghel, et al., Human breast tumor cells induce self-tolerance mechanisms to avoid NKG2D-mediated and DNAM-1-mediated NK cell recognition, *Cancer Res.* 71 (2011) 6621–6632.
- M. Janakiram, Y.M. Abadi, J.A. Sparano, X. Zang, T cell coinhibition and immunotherapy in human breast cancer, *Discov. Med.* 14 (2012) 229–236.
- E.M. de Kruijf, A. Sajet, J.G. van Nes, R. Natanov, H. Putter, V.T. Smit, et al., HLA-E and HLA-G expression in classical HLA class I-negative tumors is of prognostic value for clinical outcome of early breast cancer patients, *J. Immunol.* 185 (2010) 7452–7459.
- R.M. Gorczynski, Z. Chen, J. Diao, I. Khatri, K. Wong, K. Yu, et al., Breast cancer cell CD200 expression regulates immune response to EMT6 tumor cells in mice, *Breast Cancer Res. Treat.* 123 (2010) 405–415.
- J.S. Nielsen, K.M. McNagy, The role of podocalyxin in health and disease, *J. Am. Soc. Nephrol.* 20 (2009) 1669–1676.
- A. Somasiri, J.S. Nielsen, N. Makretsov, M.L. McCoy, L. Prentice, C.B. Gilks, et al., Overexpression of the anti-adhesion podocalyxin is an independent predictor of breast cancer progression, *Cancer Res.* 64 (2004) 5068–5073.
- D. Kerjaschki, D.J. Sharkey, M.G. Faruqar, Identification and characterization of podocalyxin—the major sialoprotein of the renal glomerular epithelial cell, *J. Cell Biol.* 98 (1984) 1591–1596.
- A. Larsson, M.E. Johansson, S. Wangejord, A. Gaber, B. Nodin, P. Kucharzewska, et al., Overexpression of podocalyxin-like protein is an independent factor of poor prognosis in colorectal cancer, *Br. J. Cancer* 105 (2011) 666–672.
- G. Casey, P.J. Neville, X. Liu, S.J. Plummer, M.S. Ciccek, L.M. Krumroy, et al., Podocalyxin variants and risk of prostate cancer and tumor aggressiveness, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 735–741.
- K. Boman, A.H. Larsson, U. Segersten, E. Kuteva, H. Johannesson, B. Nodin, et al., Membranous expression of podocalyxin-like protein is an independent factor of poor prognosis in urothelial bladder cancer, *Br. J. Cancer* 108 (2013) 2321–2328.
- J.A. Cipollone, M.L. Graves, M. Kobel, S.E. Kalloger, T. Poon, C.B. Gilks, et al., The anti-adhesive mucin podocalyxin may help initiate the transperitoneal metastasis of high grade serous ovarian carcinoma, *Clin. Exp. Metastasis* 29 (2012) 239–252.
- Y.H. Hsu, W.L. Lin, Y.T. Hou, Y.S. Pu, C.T. Shun, C.L. Chen, et al., Podocalyxin EBP50 ezrin molecular complex enhances the metastatic potential of renal cell carcinoma through recruiting Rac1 guanine nucleotide exchange factor ARHGAP7, *Am. J. Pathol.* 176 (2010) 3050–3061.
- C.W. Lin, M.S. Sun, H.C. Wu, Podocalyxin-like 1 is associated with tumor aggressiveness and metastatic gene expression in human oral squamous cell carcinoma, *Int. J. Oncol.* 45 (2014) 710–718.
- V.R. Simhadri, J.L. Mariano, O. Zenarruzabeitia, C.M. Serogy, S.M. Holland, H.S. Kuehn, et al., Intact IL-12 signaling is necessary for the generation of human natural killer cells with enhanced effector function after restimulation, *J. Allergy Clin. Immunol.* 134 (2014) 1190–1193, e1191.
- J. LeMaoult, J. Caumartin, M. Daouya, B. Favier, S. Le Rond, A. Gonzalez, et al., Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells, *Blood* 109 (2007) 2040–2048.
- M.A. Hallett, K.T. Venmar, B. Fingleton, Cytokine stimulation of epithelial cancer cells: the similar and divergent functions of IL-4 and IL-13, *Cancer Res.* 72 (2012) 6338–6343.
- M.H. Barcellos-Hoff, R.J. Akhurst, Transforming growth factor-beta in breast cancer: too much, too late, *Breast Cancer Res.* 11 (2009) 202.
- X. Meng, P. Ezzati, J.A. Wilkins, Requirement of podocalyxin in TGF-beta induced epithelial mesenchymal transition, *PLoS ONE* 6 (2011) e18715.
- I. Moscoso, N. Tejadós, O. Barreiro, P. Sepulveda, A. Izarra, E. Calvo, et al., Podocalyxin-like protein 1 is a relevant marker for human c-kit cardiac stem cells, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* (2013) doi:10.1002/term.1795.
- C. Bull, M.A. Stoel, M.H. den Brok, G.J. Adema, Sialic acids sweeten a tumor's life, *Cancer Res.* 74 (2014) 3199–3204.
- J.A. Gubbels, M. Felder, S. Horibata, J.A. Belisle, A. Kapur, H. Holden, et al., MUC16 provides immune protection by inhibiting synapse formation between NK and ovarian tumor cells, *Mol. Cancer* 9 (2010) 11.
- Z. Madjid, I. Spendlöve, S.E. Pinder, I.O. Ellis, L.G. Durrant, Total loss of MHC class I is an independent indicator of good prognosis in breast cancer, *Int. J. Cancer* 117 (2005) 248–255.
- E.M. de Kruijf, A. Sajet, J.G. van Nes, H. Putter, V.T. Smit, R.A. Eagle, et al., NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study, *BMC Cancer* 18 (2012) 24.
- J.S. Orange, Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 713–725.
- N. Vitreira, R. Andres, E. Perez-Martinez, A. Martinez, A. Bribian, J. Blasi, et al., Podocalyxin is a novel polysialylated neural adhesion protein with multiple roles in neural development and synapse formation, *PLoS ONE* 5 (2010) e12003.
- M.L. Dustin, Signaling at neuro/immune synapses, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 1149–1155.
- M. Dhainaut, M. Moser, Regulation of immune reactivity by intercellular transfer, *Front. Immunol.* 5 (2014) 112.
- J. Caumartin, B. Favier, M. Daouya, C. Guillard, P. Moreau, E.D. Carosella, et al., Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells, *EMBO J.* 26 (2007) 1423–1433.
- C.A. Miner, T.K. Giri, C.E. Meyer, M. Shabovsch, S.K. Tripathy, Acquisition of activation receptor ligand by trogocytosis renders NK cells hyporesponsive, *J. Immunol.* 194 (2015) 1945–1953.
- C. Sasseti, K. Tangemann, M.S. Singer, D.B. Kershaw, S.D. Rosen, Identification of podocalyxin-like protein as a high endothelial venule ligand for L-selectin: parallels to CD34, *J. Exp. Med.* 187 (1998) 1965–1975.
- M. Frey, N.B. Packianathan, T.A. Fehniger, M.E. Ross, W.C. Wang, C.C. Stewart, et al., Differential expression and function of L-selectin on CD56bright and CD56dim natural killer cell subsets, *J. Immunol.* 161 (1998) 400–408.

- [39] S. Abouzahr, G. Bismuth, C. Gaudin, O. Caroll, P. Van Endert, A. Jalil, et al., Identification of target actin content and polymerization status as a mechanism of tumor resistance after cytolytic T lymphocyte pressure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 1428–1433.
- [40] C. Wulfig, B. Purtic, J. Klem, J.D. Schatzle, Stepwise cytoskeletal polarization as a series of checkpoints in innate but not adaptive cytolytic killing, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (2003) 7767–7772.
- [41] C.W. Lin, M.S. Sun, M.Y. Liao, C.H. Chung, Y.H. Chi, L.T. Chiou, et al., Podocalyxin-like 1 promotes invadopodia formation and metastasis through activation of Rac1/Cdc42/cortactin signaling in breast cancer cells, *Carcinogenesis* 35 (2014) 2425–2435.
- [42] S. Sizemore, M. Cicek, N. Sizemore, K.P. Ng, G. Casey, Podocalyxin increases the aggressive phenotype of breast and prostate cancer cells in vitro through its interaction with ezrin, *Cancer Res.* 67 (2007) 6183–6191.
- [43] M. Sarker, C. Ruiz-Ruiz, G. Robledo, A. Lopez-Rivas, Stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway antagonizes TRAIL-induced apoptosis downstream of BID cleavage in human breast cancer MCF-7 cells, *Oncogene* 21 (2002) 4323–4327.
- [44] C.A. Wilson, E.E. Cajulis, J.L. Green, T.M. Olsen, Y.A. Chung, M.A. Damore, et al., HER-2 overexpression differentially alters transforming growth factor- β responses in luminal versus mesenchymal human breast cancer cells, *Breast Cancer Res.* 7 (2005) R1058–R1079.