



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Programa de Doctorado en Biología Funcional y Molecular

Tesis doctoral

**REGULACIÓN EPIGENÉTICA DE
LOS LIGANDOS DE NKG2D.
IMPLICACIONES TERAPÉUTICAS
EN LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Aroa Baragaño Raneros

Oviedo, 2017



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español: Regulación epigenética de los ligandos de NKG2D. Implicaciones terapéuticas en la leucemia mieloide aguda.	Inglés: Epigenetic regulation of NKG2D ligands. Therapeutic implications in acute myeloid leukemia.
2.- Autor	
Nombre: AROA BARAGAÑO RANEROS	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Biología funcional y molecular	
Órgano responsable: Departamento de Biología funcional	

RESUMEN (en español)

La leucemia mieloide aguda (LMA) es una enfermedad muy heterogénea desde el punto de vista morfológico y molecular lo que dificulta su pronóstico y tratamiento. Estudios previos han mostrado que el patrón epigenético de la LMA, y principalmente la metilación del ADN, se modifica durante la progresión de la enfermedad dando lugar a una expresión aberrante de oncogenes y genes supresores tumorales. El tratamiento con agentes hipometilantes (5azaC y DAC), actualmente utilizados en la práctica clínica, ha mejorado significativamente la supervivencia de estos pacientes, aunque existe un gran desconocimiento sobre cuáles son los mecanismos o dianas sobre los que actúan estos compuestos. Las células NK (*Natural Killer o asesinas naturales*) son componentes del sistema inmune innato cuya actividad está regulada por un exhaustivo balance entre receptores de activación y de inhibición. NKG2D es uno de los principales receptores de activación de las células NK que también se expresa en células NKT, linfocitos T $\gamma\delta$ y T $\alpha\beta$ CD8+. Este receptor es capaz de reconocer múltiples ligandos (MICA, MICB, ULBPs1-6) expresados en situaciones de daño y estrés celular como ocurre durante el desarrollo tumoral. A pesar de ello, las células tumorales han desarrollado diversas estrategias para evadir el reconocimiento inmunológico como la inhibición de su expresión y/o la liberación de estos ligandos en su forma soluble (sNKG2DL).

En base a estos antecedentes, el objetivo principal de esta tesis ha sido determinar la implicación de la metilación del ADN y del tratamiento con agentes desmetilantes en la regulación de la expresión y liberación de los NKG2DL en la LMA así como sus posibles consecuencias sobre el reconocimiento inmunológico.

Nuestros resultados muestran que la expresión de los NKG2DL es más limitada en la LMA que en otros tumores hematológicos y sólidos. El patrón de metilación del ADN en estos genes, excepto en MICB, está aberrantemente metilado en líneas celulares de LMA asociándose a una inhibición transcripcional. Resultados similares fueron observados en pacientes con LMA donde el 59% de estos presentan metilación en al menos un ligando de NKG2D. Además, se observó que el tratamiento con agentes desmetilantes, 5azaC y DAC, incrementa la expresión de los NKG2DL en la superficie celular favoreciendo el reconocimiento inmunológico mediado por las células citolíticas NKG2D-positivas (NK y linfocitos T CD8+).

Adicionalmente, se analizó el efecto de los agentes desmetilantes sobre la liberación de los sNKG2DL en la LMA. Se observó que los niveles de sNKG2DL están significativamente reducidos tanto en líneas celulares como en pacientes con LMA tras el tratamiento con estas drogas epigenéticas. La disminución en los niveles de sMICA, sMICB y sULBP2 está asociada a la desmetilación del inhibidor de proteasas TIMP3, el cuál bloquea la actividad de ADAM17. Además, TIMP3 se encuentra metilado en pacientes con LMA asociándose con un pronóstico citogenético adverso de la enfermedad.

En conclusión, los resultados derivados de esta tesis muestran que los mecanismos



epigenéticos, y en concreto la metilación del ADN, juega un papel esencial en la regulación de la expresión de los NKG2DL y en la liberación en sus formas solubles durante el desarrollo de la LMA. El tratamiento de estos pacientes con agentes desmetilantes, actualmente utilizados en la práctica clínica, permitirá modular la expresión de los NKG2DL y favorecer el reconocimiento inmunológico mediado por la interacción NKG2D-NKG2DL.

RESUMEN (en Inglés)

Acute myeloid leukemia (AML) is a morphological and genetic heterogeneous disease which complicates its prognosis and treatment. Previous studies have suggested that the epigenetic patterns, and specifically DNA methylation, are modified during the development of AML, promoting an aberrant expression of several oncogenes and tumor-suppressor genes. Currently, hypomethylating drugs (5azaC and DAC) are used as treatment in AML. However, the action mechanisms of these drugs are poorly understood.

NK cells (natural killer) are components of the innate immune system whose activity is regulated by a tight balance between activating and inhibitory receptors. NKG2D is one of the main activating receptors for NK cells which is also expressed in NKT cells, $\gamma\delta$ T and T $\alpha\beta$ CD8 + lymphocytes. This receptor is able to recognize multiple ligands (MICA, MICB, ULBP1-6) expressed in cell stress situations as cancer. However, cancer cells have developed several strategies to avoid the immune response such as release of NKG2DL from the cell surface on soluble form (sNKG2DL).

Therefore, the main objective of this thesis has been to determine the role of DNA methylation and hypomethylating treatment effect on the regulation of expression and release of NKG2DL in AML, and their possible consequences in the immune recognition mediated by NKG2D-positive cells.

Firstly, the NKG2DL expression pattern showed that NKG2DL expression was heterogeneous and highly restricted to AML cells respect other tumor types. Quantification of DNA methylation showed that all NKG2DL, except MICB, were aberrantly methylated in AML cell lines which was associated with lack of transcription. Also, we found that 59% of AML patients showed high levels of DNA methylation for at least one NKG2DL. Treatment with hypomethylating drugs (5azaC, DAC) increased the NKG2DL on the cell surface of AML cells promoting the immune recognition mediated by NK and CD8+ T lymphocytes.

Next, it was analyzed the effect of hypomethylating drugs on the release of NKG2DL in AML. Results showed that sNKG2DL levels were significantly reduced after treatment in cell lines and AML patients. sMICA, sMICB and sULBP2 levels were reduced after hypomethylating treatment as consequence of TIMP3 hypomethylation, an ADAM17 inhibitor. Moreover, abnormal hypermethylation of TIMP3 was associated with adverse cytogenetic prognosis in AML patients.

In conclusion, these results suggest that DNA methylation plays an important role in the regulation of NKG2DL expression and release in AML. Treatment with hypomethylating drugs could be a relevant strategy to enhance the NKG2DL expression and therefore, the immune recognition mediated by NKG2D-NKG2DL.

ÍNDICE

I. ABREVIATURAS	47
II. INTRODUCCIÓN.....	51
1. La leucemia mieloide aguda	51
1.1. Clasificación	52
1.2. Aberraciones cromosómicas y mutaciones génicas.....	54
1.3. Tratamiento	57
1.3.1.- Tratamiento convencional	58
1.3.2.- Agentes hipometilantes	59
2. La epigenética	61
2.1. La metilación del ADN	62
2.2. La metilación del ADN en la LMA	64
2.3. Las modificaciones de histonas	66
3. El sistema NKG2D/NKG2DL.....	68
3.1. Las células “ <i>Natural Killer</i> ”	69
3.2. El receptor NKG2D.....	72
3.3. Los ligandos de NKG2D.....	75
3.4. Regulación de los ligandos de NKG2D.....	77
3.5. Liberación de los NKG2DL.....	79
3.5.1.- Liberación proteolítica mediante la acción de las MP	80
3.5.2.- Liberación en partículas exosomales	82
3.5.3.- Papel de los sNKG2DL en cáncer	84
4. El reconocimiento inmunológico de la LMA	87
4.1. Disfuncionalidad de las células NK	88
4.2. Expresión y liberación de los NKG2DL.....	90
4.3. Estrategias terapéuticas que potencian la interacción NKG2D-NKG2DL en cáncer	91
4.3.1.- Agentes quimioterapéuticos	92
4.3.2.- Inhibidores de las MP	92

4.3.3.- Drogas epigenéticas	94
III. OBJETIVOS	99
IV. RESULTADOS	103
1. La metilación del ADN en los NKG2DL contribuye a la evasión del sistema inmune en la leucemia mieloide aguda	107
2. Mecanismos implicados en la liberación de los ligandos de NKG2D de la superficie celular. Identificación de nuevas dianas terapéuticas	119
3. Los tratamientos desmetilantes disminuyen la liberación de MICA, MICB y ULBP2 en la leucemia mieloide aguda, favoreciendo el reconocimiento inmunológico mediado por las células NK.	133
V. DISCUSIÓN	157
1. Los ligandos de NKG2D se expresan de forma heterogénea en el cáncer.	157
2. La metilación del ADN contribuye al silenciamiento génico de los NKG2DL en la LMA	160
3. El tratamiento con agentes desmetilantes favorece el reconocimiento inmunológico mediado por la interacción NKG2D-NKG2DL.....	163
4. Liberación de los ligandos de NKG2D: mecanismos implicados y posibles estrategias terapéuticas.....	167
5. Los agentes desmetilantes bloquean la liberación de los NKG2DL favoreciendo la interacción con el receptor NKG2D..	173
6. La hipometilación de TIMP3 bloquea la liberación de MICA, MICB y ULBP2 y se asocia a un mejor pronóstico citogenético.....	176
VI. CONCLUSIONES	185
VII. BIBLIOGRAFÍA	189
VIII. ANEXOS	215
IX. AGRADECIMIENTOS	219

I. ABREVIATURAS

ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinases</i>	TIMP3	<i>Tissue inhibitor of metalloproteinase 3</i>
ADAM10	<i>ADAM metallopeptidase domain 10</i>	TM	Región transmembranal
ADAM17	<i>ADAM metallopeptidase domain 17</i>	TPH	Trasplante de progenitores hematopoyéticos
AZA	5'-azacitidina	ULBP1-3	<i>UL16 binding proteins 1-3</i>
DAC	5'-aza-2'-deoxicitidina		
DNMTs	DNA methyltransferasas		
FAB	<i>French-American-British cooperative group</i>		
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>		
HDACs	Histona deacetilasas		
IFN-γ	Interferon gamma		
LMA	Leucemia mieloide aguda		
MICA/B	<i>MHC class I-related-A/-B</i>		
MMP	<i>Matrix metalloproteinase</i>		
MPs	Metaloproteasas		
NCR	<i>Natural cytotoxicity receptor</i>		
NK	Células naturales asesinas (<i>Natural killer</i>)		
NKG2D	<i>Natural killer group 2 D</i>		
NKG2DL	<i>Ligandos de NKG2D</i>		
OMS	Organización mundial de la salud		
sNKG2DL	NKG2DL solubles		
sMICA/B	MICA/B soluble		
sULBPs 1-3	ULBPs 1-3 soluble		
TGF-β	<i>Transforming growth factor-β</i>		

I. INTRODUCCIÓN

1. LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

La **hematopoyesis** se define como el proceso de formación, desarrollo y maduración de las células de la sangre a partir de una célula madre hematopoyética. Esta célula madre se divide y da lugar a dos linajes principales: el **linaje linfoide** que engloba los linfocitos T, linfocitos B y las células NK (*Natural Killer*); y el **linaje mieloide** del que derivan las plaquetas, eritrocitos, granulocitos y monocitos (**Figura 1**).

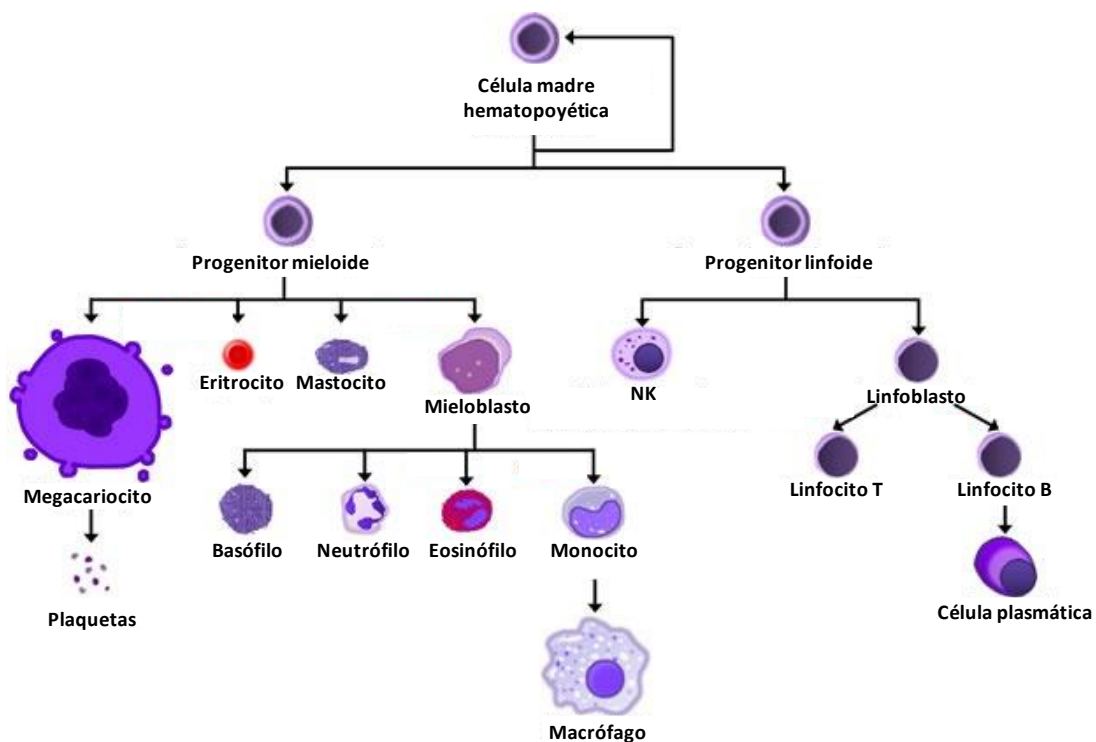


Figure 1. Hematopoyesis del linaje linfoide y mieloide. Modificado de Nobili y col., 2016.

El bloqueo en el proceso de diferenciación de las células mieloides y como consecuencia de ello, la proliferación anormal de los precursores mieloides tanto en sangre periférica, médula ósea o incluso en tejidos, desencadena el desarrollo de la **Leucemia Mieloide Aguda (LMA)** (Saultz y col., 2016). Mientras en las leucemias pediátricas predomina el linaje linfoide, las leucemias que tienen lugar en individuos

de edad avanzada (> 65 años) son mayoritariamente mieloides. De hecho, la incidencia de esta enfermedad incrementa con la edad, siendo en pacientes jóvenes de 1.3 casos por 100.000 habitantes/año mientras que en pacientes de edad avanzada es de 12.2 casos por 100.000 habitantes/año (De Kouchkovsky y col., 2016). Esto es debido al deterioro funcional de las células madre hematopoyéticas que se produce con la edad dando lugar a la pérdida de las funciones linfoides y a un aumento de la estirpe mieloide (Rossi y col., 2005).

En sus orígenes, la LMA era una enfermedad incurable. Sin embargo, gracias a los avances realizados durante los últimos años, entre el 35-40% de los pacientes menores de 60 años tienen curación. Sin embargo, en pacientes de edad avanzada, ésta es sólo de un 5-15% por lo que sigue siendo necesaria la búsqueda de nuevos mecanismos y dianas terapéuticas que ayuden a mejorar estos datos de supervivencia (Döhner y col., 2010).

1.1.- Clasificación

En 1857 Friedreich (Friedreich, 1857) realizó la primera clasificación de las leucemias dividiéndolas en agudas y crónicas. Posteriormente, Neumann (Neumann, 1882) acuñó el término “mieloide” para referirse a aquellas leucemias que se originan en la médula ósea. En el año 1976, el grupo cooperativo francés-americano-inglés, o FAB (*French-American-British cooperative group*) desarrolló por primera vez una clasificación que categorizaba en 7 subtipos (M0-M7) a los pacientes de LMA en base a sus características morfológicas e inmunohistoquímicas, la denominada **clasificación de la FAB** (Bennett y col., 1976) (**Tabla 1**). Pero esta clasificación continúa teniendo diversas limitaciones ya que no existe una clara relación entre el subtipo FAB y el pronóstico de la enfermedad, no incorpora datos citogenéticos y moleculares, y además muestra una gran variabilidad inter-observador a la hora de definir el subtipo de la enfermedad.

FAB	Descripción	Tipo celular predominante
M0	Indiferenciada	Mieloblastos no diferenciados
M1	Mínimamente diferenciada	Mieloblastos mínimamente diferenciados
M2	Diferenciada	Mieloblastos con diferenciación
M3	Promielocítica	Promielocitos hipergranulares
M4	Mielomonocítica	Mielomonoblastos
M5	Monocítica	Monoblastos
M6	Eritroleucemia	Eritroblastos y mieloblastos
M7	Megacariocítica	Megacarioblastos

Tabla 1. Clasificación de la FAB para la LMA.

En el año 2008, y debido a los grandes avances en el campo de la citogenética, la **OMS** (Organización Mundial de la Salud) estableció una nueva clasificación de la LMA basándose no sólo en las características morfológicas sino integrando también información genética, inmunofenotípica y biológica (Vardiman y col., 2009). A medida que avanzan los estudios citogenéticos, se han descrito nuevas asociaciones genéticas asociadas a la enfermedad lo que hace que esta clasificación sea revisada periódicamente. En la **Tabla 2** se recoge la última revisión de la clasificación de la OMS (Arber y col., 2016).

LMA con anomalías genéticas recurrentes
LMA con t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1
LMA con inv(16)(p13.1q22) o t(16;16)(p13.1;q22); CBFβ-MYH11
LPA con PML-RARA
LMA con t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A
LMA con t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214
LMA con inv(3)(q21.3q26.2) o t(3;3)(q2.3;q26.2); GATA2, MECOM
LMA (megacarioblástica) con t(1;22)(p13.3;q13.3); RBM15-MKL1
Entidad provisional: AML con BCR-ABL1
LMA con mutación NPM1
LMA con mutaciones bialélicas CEBPA
Entidad provisional: LMA con mutación RUNX1
LMA con cambios relativos a mielodisplasia
Neoplasmas mieloides relativos a terapia
LMA, NOS
LMA con mínima diferenciación
LMA sin maduración
LMA con maduración
Leucemia mielomonocítica aguda
Leucemia monoblástica/monocítica aguda
Leucemia eritroide pura
Leucemia megacarioblástica aguda
Leucemia basofílica aguda
Panmielosis aguda con mielofibrosis
Sarcoma mioelode
Proliferaciones mieloides debidas al síndrome de Down
Mielopoyesis transitoria anormal (MTA)
Leucemia mioelode asociada con síndrome de Down

Tabla 2. Clasificación de la OMS para la LMA. LPA: leucemia promielocítica aguda; NOS (*not otherwise specified*).

1.2.- Aberraciones cromosómicas y mutaciones génicas

Hace más de 40 años, y debido al descubrimiento de diversas aberraciones cromosómicas como las translocaciones t(15;17) y t(8;21), se estableció que la LMA es una enfermedad con base genética (Rowley, 1973; Rowley y col., 1977). En la mayoría de los pacientes con LMA se producen alteraciones cromosómicas y diversas mutaciones, siendo algunas bastante habituales mientras que otras se dan en un pequeño porcentaje de pacientes. Actualmente, el análisis citogenético de las células

en metafase es una herramienta muy utilizada para el seguimiento de los pacientes diagnosticados con LMA, considerándose hasta el momento el factor pronóstico más importante.

Diversas aberraciones cromosómicas, principalmente reordenamientos y deleciones, han sido asociadas con el pronóstico de la LMA (**Tabla 3**). Aquellos pacientes con LMA que tienen un cariotipo normal y presenten alteraciones cromosómicas, como las translocaciones t(15;17), t(8;21) ó t(16;16), ó la inversión inv(16) tendrán un **pronóstico citogenético favorable**. Mientras que si poseen un cariotipo normal pero tienen otras alteraciones, como la translocación t(9;11) o la trisomía 8, presentarán un **pronóstico citogenético intermedio**. Finalmente, si poseen un cariotipo complejo o monosómico, o presentan deleciones en el cromosoma 5 ó 7 se asociará a un **pronóstico citogenético desfavorable** (Yohe., 2015).

Riesgo	Citogenética	Molecular
Favorable	inv(16) o t(16;16); t(8;21); t(15;17)	Citogenética normal con mutación aislada bialélica de <i>CEBPA</i> ó mutación en <i>NPM1</i> sin <i>FLT3-ITD</i>
Intermedio	Citogenética normal; Trisomía 8 aislada; t(9;11); otros cambios	Mutación <i>KIT</i> en el CBF-leukemia: inv(16) o t(16;16); t(8;21)
Adverso	Compleja (≥ 3 anormalidades); cariotipo monosómico*; -5/-5q o -7/-7q; 11q23 distinto de t(15;17); inv(3) o t(3;3); t(6;9); t(9;22)	Citogenética normal con <i>FLT3-ITD</i>

Tabla 3. Asociación de las aberraciones citogenéticas y moleculares con el pronóstico de la LMA.

* ≥ 2 monosomías o 1 monosomía y una adicional o más diferencias estructurales. ITD (*Internal tandem duplications*), CBF-leukemia (*Core binding factor leukemia*) (Yohe., 2015).

Además, durante el desarrollo de la LMA van surgiendo alteraciones moleculares también relacionadas con el pronóstico de la enfermedad. Entre las alteraciones más frecuentes, y que se analizan rutinariamente en el seguimiento clínico de la enfermedad, se encuentran las mutaciones en *FLT3*, *NPM1* y *CEBPBA*:

FLT3 (*Fms-like tyrosine kinase 3*) es un receptor de tirosin quinasa que se expresa en células madre hematopoyéticas, macrófagos y granulocitos (Kikushige y col., 2008).

Tiene funciones esenciales en el control de la supervivencia y la proliferación celular a través de la activación de la vía PI3K (fosfatidil inositol 3 quinasa) y las GTPasas RAS, respectivamente (Grafone y col., 2012). *FLT3* se encuentra sobre-expresado en pacientes con LMA, sobre todo en aquellos pacientes que presentan un porcentaje elevado de blastos mieloides (Kuchenbauer y col., 2005). Su ligando, FL o FLT3L, (*FLT3 ligand*), también está sobreexpresado en pacientes con LMA lo que desencadena una señal autocrina o paracrina que activa de forma continuada a *FLT3* (Zheng y col., 2004). La presencia de mutaciones en el gen *FLT3* es muy frecuente, mostrándose en un tercio de los pacientes con LMA. Concretamente se conocen dos mutaciones diferentes para *FLT3*; *FLT3-ITD* y *FLT3-TKD*. La duplicación interna en tándem (ITD), producida en el exón 14, es la mutación más común (20% de los pacientes) incrementándose aún más (40%) en aquellos pacientes que presentan un cariotipo normal (Ofrañ y col., 2013). Múltiples estudios han demostrado que esta mutación *FLT3-ITD* está inversamente relacionada con la supervivencia global y la supervivencia libre de recaída (Patel y col., 2012; Port y col., 2014). La mutación *FLT3-TKD* (*tyrosin kinase domain*) es menos frecuente (7% de los pacientes con LMA) y consiste en una mutación puntual en el dominio TKD que tiene lugar el residuo aminoacídico 835 del aspartato o en el residuo 836 de la isoleucina. Como consecuencia de estas mutaciones se produce la autofosforilación del dominio tirosina de *FLT3* y, por lo tanto, su activación continuada. A diferencia de lo que ocurre con la mutación *FLT3-ITD*, *FLT3-TKD* no se asocia a la supervivencia global o libre de enfermedad (Sheikhha y col., 2003; Barragán y col., 2011).

NPM1 (*Nucleophosmin 1*) es una fosfoproteína nucleolar asociada a las translocaciones cromosómicas *NPM1-RARA* y *NPM1-MLF1*, características de pacientes con leucemia promielocítica aguda que presentan las translocaciones t(15;17) y t(3;5), respectivamente (Naoe y col., 2006). *NPM1* participa en múltiples funciones celulares como el control de la formación y exportación de los ribosomas, la estabilización del oncogen p14^{Arf} el cual induce parada en la fase G2 del ciclo celular y apoptosis, y la regulación de la duplicación centrosómica (Falini y col., 2011). El 35% de los pacientes con LMA que presentan un cariotipo normal muestran mutaciones en el gen *NPM1* (Verhaak y col., 2005). Esta mutación consiste en la inserción de 4 bases diferentes

(tetranucleótido) en el exón 12 dando lugar a diversos subtipos. La más frecuente es la mutación tipo A (TCTG) que se da en el 80% de los casos, seguida de la de tipo B (CATG) y tipo D (CCTG) cuya frecuencia es del 10%. También pueden ocurrir inserciones de 2 a 9 bases, pero éstas son infrecuentes (Falini y col., 2005). En ausencia de otras aberraciones cromosómicas como la mutación *FLT3-ITD*, la presencia de mutaciones en *NPM1* se asocia con un buen pronóstico de la enfermedad. De hecho, el 80% de los pacientes que portan mutaciones en *NPM1* presentan una remisión completa de la enfermedad que va acompañada de una disminución en el número de células leucémicas tras el tratamiento con agentes quimioterapéuticos (Schneider y col., 2009).

CEBPA (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*) es un factor de transcripción expresado en células mielomonocíticas y en granulocitos diferenciados (Koschmieder y col., 2009). Aproximadamente el 15% de los pacientes con LMA presentan mutaciones en *CEBPA* (Pabst y col, 2001), siendo la mutación en un único alelo del gen *CEBPA* (*CEBPAsm*, *single-mutated CEBPA*) la más frecuente (50% de los casos). Otras mutaciones, aunque mucho más infrecuentes, son la mutación bialélica (*CEBPAdm*, *double-mutated CEBPA*) y la mutación homocigota debido a la pérdida de heterocigosidad (Wouters y col., 2007; Wouters y col., 2009). Las mutaciones bialélicas más frecuentes consisten en una mutación en el extremo N-terminal de un alelo y una mutación bZIP (*C-terminal basic leucine zipper region*) en el C-terminal del otro alelo. Sin embargo, las mutaciones *CEBPAsm* pueden ocurrir o bien en el extremo N-terminal o en el C-terminal. En general, la presencia de mutaciones en *CEBPA* (principalmente *CEBPAdm*) se asocia con un buen pronóstico de la enfermedad debido a que estos pacientes presentan un menor número de aberraciones génicas (Green y col., 2010; Taskesen y col., 2011 Li y col., 2015).

1.3.- Tratamiento

En la actualidad, se administran dos tipos de terapia a los pacientes diagnosticados con LMA: la terapia convencional que se aplica como primera línea de

tratamiento en la mayoría de los pacientes y las terapias alternativas basadas principalmente en el uso de agentes hipometilantes.

1.3.1.-Tratamiento convencional

El tratamiento convencional de la LMA se divide en dos fases: una primera **fase de reducción** que consiste en la disminución del mayor número de células leucémicas y una segunda **fase de consolidación** cuyo objetivo es eliminar de forma permanente el resto de células leucémicas que puedan haber quedado en el paciente con el fin de evitar futuras recaídas de la enfermedad. En la fase de reducción se utilizan diversos agentes quimioterapéuticos que, en su mayoría, son variaciones de la citarabina combinadas con antraciclinas (daunorubicina, idarrubicina) (Roboz, 2011). Se administran a pacientes con una edad inferior a los 60 años o pacientes de edad avanzada pero que presentan un buen pronóstico de la enfermedad (Saultz y col., 2016). El uso de estos agentes quimioterapéuticos consigue una remisión completa en el 65-73% de los pacientes jóvenes, mientras que en pacientes de edad avanzada es sólo de un 36-62% (Estey y col., 2006; Fernández y col., 2009). En la fase de consolidación existen tres posibles alternativas de tratamiento en función del pronóstico del paciente. Si el pronóstico es favorable se recurre al uso de los mismos agentes quimioterapéuticos empleados en la fase de reducción y a dosis similares, y solo de forma eventual se realiza un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) autólogo. Si el pronóstico es desfavorable, se lleva a cabo un TPH alogénico. Sin embargo, no está recomendado en pacientes de edad avanzada debido a su alto riesgo y a una mayor tasa de mortalidad y morbilidad (Versluis y col., 2015). Finalmente, si el pronóstico de la LMA es intermedio las opciones terapéuticas no están definidas y se actuará en base a la recomendación del especialista.

1.3.2.- Agentes hipometilantes

La eficacia de los tratamientos convencionales frente a la LMA es limitada. Además, en muchos casos se asocia a altas tasas de mortalidad y morbilidad principalmente en pacientes de edad avanzada, sugiriendo que el uso de estos tratamientos no es el más adecuado para esta clase de pacientes. Por este motivo se recurre a tratamientos paliativos como los antibióticos, transfusiones de sangre, hidroxiurea y/o factores de crecimiento hematopoyético. Sin embargo, la supervivencia media de los pacientes que reciben tratamientos paliativos es únicamente de 3 meses y menos del 10% de ellos sobreviven más allá de los dos años (Kantarjian y col., 2010). Debido a esto, las investigaciones actuales están dirigidas a identificar nuevas dianas moleculares claves en el desarrollo de la enfermedad con el fin de desarrollar terapias alternativas que favorezcan la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes con LMA, principalmente de los pacientes con edad avanzada.

Antiguamente los agentes hipometilantes se utilizaban por su efecto citostático a elevadas dosis, hoy en día se sabe que son azanucleósidos análogos al nucleósido citidina que se incorporan al ADN. Estos compuestos actúan como agentes antitumorales a través de dos vías diferentes: la **hipometilación del ADN** a través de la inhibición de las DNA metiltransferasas (DNMT) y la **citotoxicidad** debida a su incorporación en el ADN activando la respuesta al daño (Diesch y col., 2016). Los agentes hipometilantes más conocidos y usados actualmente en la práctica clínica son azacitidina (5'-azacitidina, **AZA**) y decitabina (5'-aza-2'-deoxicitidina, **DAC**). Aunque ambos agentes actúan como agentes hipometilantes y afectan a la viabilidad celular, existen diversas diferencias entre ellos. DAC se incorpora únicamente al ADN mientras que AZA lo hace tanto al ADN como al ARN promoviendo la inhibición de la síntesis proteica. Por otro lado, aunque ambos incrementan el número de células en fase sub-G1, DAC también produce un incremento de las células en fase G2-M mientras que reduce las células en fase G0/G1. A nivel de la expresión génica, mientras que AZA disminuye principalmente la expresión de genes relacionados con el ciclo celular, la división celular o la mitosis; DAC incrementa mayoritariamente la expresión de genes asociados a la diferenciación celular y al sistema inmune (Hollenbach y col., 2010).

Azacitidina, (Vidaza[®], Celgene, New Jersey, USA) fue sintetizada por primera vez en el año 1964 (Sorm y col., 1964) y en 1967 se sugirió por primera vez su potencial como tratamiento frente a la LMA, sólo o en combinación con los agentes quimioterapéuticos utilizados como terapia convencional (Von Hoff y col., 1976). Pero no fue hasta el año 2004 cuando fue aprobado por la FDA (*Food and Drug Administration*) para el tratamiento de la LMA en pacientes de edad avanzada y que no eran candidatos a recibir una quimioterapia de inducción convencional. En estudios clínicos en fase III, en pacientes con un porcentaje de blastos leucémicos del 20% o superior, se observó que el tratamiento con Vidaza[®] incrementa la supervivencia global (24.5 meses) en relación con el tratamiento convencional (1-4 meses), incluso en aquellos pacientes de edad avanzada (Fenaux y col., 2010). Estos resultados fueron posteriormente corroborados por otros grupos, como los derivados de los registros franceses y austriacos donde se observó un incremento de la supervivencia en pacientes respondedores frente a no respondedores al tratamiento (9-10 vs. 3 meses) (Pleyer y col., 2014; Thépot y col., 2014) o el realizado por Dombert y col. (Dombret y col., 2015) en pacientes de edad avanzada donde la supervivencia global de estos aumentó significativamente respecto a los tratamientos convencionales (10.4 vs. 6.5 meses). Se ha mostrado que el tratamiento con Vidaza[®] disminuye la enfermedad del injerto contra huésped tras el TPH en aquellos pacientes de LMA que habían sufrido una recaída de la enfermedad (Ghobadi y col., 2016). Actualmente este tratamiento está recomendado para pacientes de LMA con una edad superior a 65 años o para aquellos pacientes que tienen un pronóstico adverso de la enfermedad y no pueden recibir un TPH alogénico.

DAC (Dacogen[®], Janssen Cilag) fue aprobado en el año 2008 por la FDA para el tratamiento de la LMA y en concreto de aquellos pacientes de edad avanzada que presentan una LMA primaria y contienen un porcentaje de blastos superior al 30% (Kantarjian y col., 2012). Sin embargo, existen controversias respecto a esto ya que estudios recientes han sugerido su mayor eficacia en el tratamiento de las LMA secundarias, mostrando en estos pacientes una respuesta superior al 70% de los casos (Khan y col., 2017). Estudios clínicos en fase II realizados en pacientes de edad avanzada y con alto riesgo mostraron que el 25-47% de los pacientes responden al

tratamiento (Caschen y col., 2010; Blum y col., 2010). Sin embargo, aunque posteriores estudios en fase II y fase III indican que el tratamiento con decitabina aumenta la tasa de remisión y también la supervivencia global, su eficacia no es tan significativa como el tratamiento con Vidaza® (Dombret y col., 2015). Por otra parte, se ha sido descrito que el tratamiento con decitabina en combinación con el TPH procedente de individuos haploidénticos ofrece una mayor supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad respecto a los tratamientos convencionales (Jing y col., 2016). A pesar de que este tratamiento no ofrece resultados tan prometedores en la tasa de supervivencia como Vidaza®, la mejora en la supervivencia es lo suficientemente relevante para que haya sido aprobado para la FDA como tratamiento en pacientes con LMA de edad avanzada y que no son candidatos a recibir un trasplante de progenitores hematopoyéticos.

A pesar del uso frecuente de estos agentes hipometilantes en la práctica clínica y de los buenos resultados obtenidos, no se conoce exactamente los genes o mecanismos moleculares sobre los que actúan. Por lo tanto, son necesarios estudios epigenéticos adicionales que determinen exactamente que dianas o mecanismos son modulados por estos tratamientos en la LMA.

2. LA EPIGENÉTICA

En 1942, Conrad Waddington (Waddington, 1942), haciendo alusión a las diferencias observadas en el desarrollo estructural de las moscas *Drosophila*, definió la epigenética como la interacción entre los genes y sus productos para generar un fenotipo determinado. Actualmente, la epigenética se define de forma más precisa como el estudio de los **cambios en la expresión génica** que se heredan de forma estable **sin afectar** a la propia secuencia del **ADN** (Berger y col., 2008). La mayor parte de estos cambios se establecen durante la división celular, permitiendo a las células generar una gran variedad de fenotipos diferentes a partir de un mismo genotipo.

Existen cuatro componentes claves en la regulación epigenética: la metilación del ADN, las modificaciones de histonas, los miRNAs y los complejos remodeladores de la cromatina. Estos mecanismos de regulación influyen en la interacción del ADN con las histonas, y, por lo tanto, en el grado de compactación de la cromatina. De modo que la presencia de marcas de histonas represivas y la metilación del ADN provocarán un estado conformacional cerrado de la cromatina asociado a represión génica. Por el contrario, la presencia de marcas de histonas activadoras y la hipometilación del ADN provocan un estado conformacional abierto de la cromatina facilitando el acceso de los factores de transcripción y el inicio de la expresión génica.

2.1.- La metilación del ADN

La **metilación del ADN** es el mecanismo epigenético mejor estudiado hasta la fecha y se asocia fundamentalmente a la represión génica. Consiste en la adición de un grupo metilo (CH_3) a la posición 5 del anillo pirimidínico de la citosina de un dinucleótido CpG (citosinas precedidas de guanina). El genoma humano consta de 28 millones de CpG de los cuales el 60-80% se encuentran normalmente metilados (Smith y col., 2013) y alrededor de un 10% de estos dinucleótidos CpG se concentran en islas CpG, es decir, en regiones de entre 200-2.000 bases que tienen una proporción de CpG superior al 50% (Esteller, 2008).

Las enzimas responsables de la metilación del ADN son las DNMTs (*DNA methyltransferases*) que catalizan la adición de un grupo metilo desde la S-adenosilmetionina (SAM) hasta la posición 5' del anillo de la citosina (**Figura 2**).

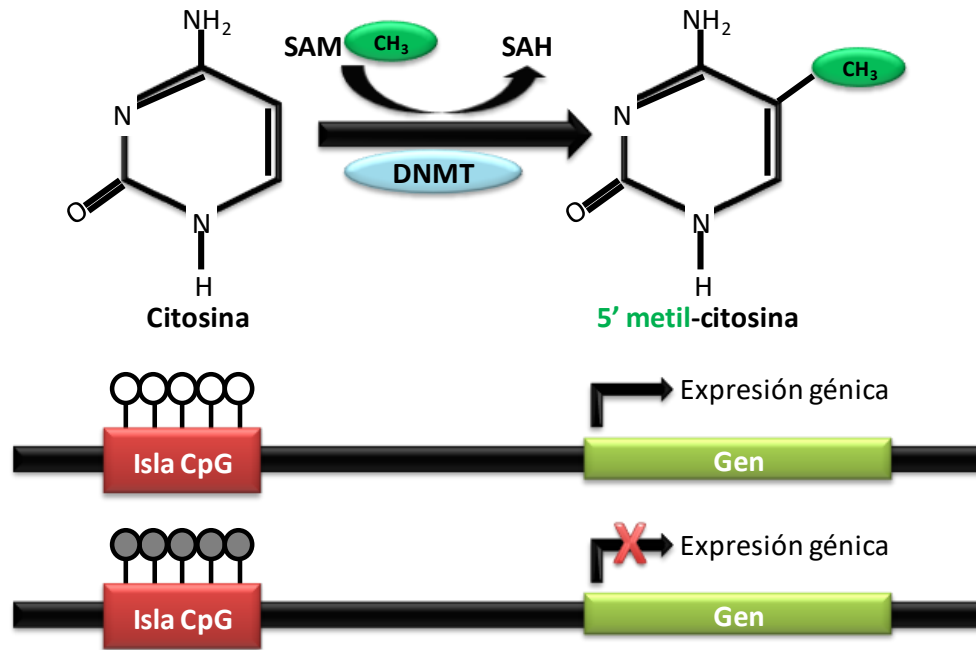


Figura 2. Metilación del ADN y su efecto en la expresión génica. SAM (S-adenosilmetionina), SAH (S-adenosilhomocisteína), DNMT (DNA metiltransferasa).

En mamíferos existen tres DNMTs catalíticamente activas: DNMT1, DNMT3A y DNMT3B. La DNMT1 se encarga de mantener el patrón de metilación del ADN parental en las hebras hijas durante la replicación. La DNMT3A y DNMT3B, expresadas en células embrionarias y cuya expresión se va perdiendo con la diferenciación celular, se encargan de la metilación “de novo” que tiene lugar durante el desarrollo embrionario, pero en momentos diferentes. Mientras que la DNMT3A se encarga de la metilación de genes en la última etapa del desarrollo embrionario y después del nacimiento, la DNMT3B lleva a cabo la metilación en estadios embrionarios tempranos (Smith y col., 2013). La metilación del ADN es un mecanismo de gran relevancia durante el desarrollo embrionario y la eliminación de alguna de las DNMTs conlleva un fenotipo letal en ratones (Li y col., 1992; Okano y col., 1999). En humanos, mutaciones en DNMT3B causan el síndrome ICF (*Immunodeficiency, Centromere instability and Facial anomalies*) caracterizado por inestabilidad cromosómica, defectos en el desarrollo e inmunodeficiencias (Hansen y col., 1999).

El patrón de metilación del ADN en cada estirpe celular se establece durante la diferenciación hematopoyética (Ji y col., 2010; Calvanese y col., 2012). Sin embargo, estos patrones se van alterando progresivamente con la edad como consecuencia de cambios genéticos y de factores externos (Fraga y col., 2007; Fernández y col., 2015; Pal y col., 2016) o durante el desarrollo de procesos patológicos como las infecciones, enfermedades autoinmunes o el cáncer (Javierre y col., 2008; Esteller, 2008; Reddy y col., 2013, Pacis y col., 2015). En cáncer la hipermetilación en las islas CpG de genes específicos conlleva al silenciamiento transcripcional de genes supresores tumorales (p16^{INK4a}, BRCA1, TP53, CDH-1, etc...) que promueven la progresión tumoral (Esteller M, 2002). Aunque en la mayoría de los tumores se hable de hipermetilación como un fenómeno mayoritario, la hipometilación de oncogenes también está presente en el desarrollo tumoral, aunque en menor frecuencia (Ehrlich, 2009). También se han identificado mecanismos de desmetilación activa en procesos tumorales a través de la acción de la familia de proteínas TET (*Ten eleven translocation*) por las que la 5-metilcitosina se transforma en 5-hidroxi-metilcitosina (Tahiliani y col., 2009).

Debido a que el patrón de metilación es característico del tumor, el estudio de la metilación del ADN permite identificar nuevos biomarcadores tanto de diagnóstico como de pronóstico específicos para cada tipo tumoral (Mulero-Navarro y col., 2008; Rodríguez-Paredes y col., 2011).

2.2.- La metilación del ADN en la LMA

Tal y como se ha mencionado previamente, la metilación del ADN es un proceso clave durante la diferenciación hematopoyética. Las células madre sanguíneas proliferan para poder diferenciarse y dar lugar a las diversas células de los linajes linfóide y mieloide. Durante estos procesos de proliferación y diferenciación, los patrones de metilación del ADN son modificados permitiendo la hipometilación y expresión de genes específicos en cada tipo celular mientras que otros genes no expresados se mantienen hipermetilados (Calvanese y col., 2012). La modulación

anómala o desregulación de estos patrones de metilación del ADN podría conducir al desarrollo de fenotipos tumorales, como la LMA.

En el año 1987 se describió por primera vez la implicación de la metilación del ADN en la LMA al observar que el gen de la calcitonina estaba aberrantemente metilado en estos pacientes (Baylin y col., 1987). Posteriormente, a través de diversos estudios de genoma completo se ha determinado el patrón de metilación del ADN en pacientes con LMA. En el estudio realizado por el proyecto internacional TCGA (*Cancer genome atlas research network*) se analizó el perfil de metilación en células CD34⁺CD38⁻ de 200 pacientes con LMA primarias mediante arrays de metilación observándose que el 67% de las CpG se encontraban hipermetiladas en estos pacientes (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013). Aunque los cambios en la metilación también tienen lugar en las regiones intergénicas, el 71% de los cambios de metilación en la LMA se producen en regiones génicas. Además, el 44% de los pacientes presentaban mutaciones en genes relacionados con la metilación del ADN. De hecho, aquellos pacientes con mutaciones triples para NPM1, DNMT3A y FLT3 perdían metilación en el 86% de las regiones analizadas. Es decir, los patrones de metilación difieren en función de las mutaciones o aberraciones cromosómicas sugiriendo que podría ser muy relevante para categorizar a los pacientes en base a su pronóstico citogenético y, por lo tanto, siendo muy útil en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (Figueroa y col., 2010; Cancer genome atlas research network, 2013; Li y col., 2017).

Una de las principales causas de los cambios de metilación observados en pacientes con LMA es la mutación en la DNMT3A, enzima responsable de la metilación “*de novo*” del ADN. Esta mutación se encuentra en el 6-36% de los pacientes, y se asocia con un mal pronóstico de la enfermedad (Wouters y col., 2016). La mutación más común (60% de los casos), tiene lugar en el aminoácido 882 donde la arginina (R) cambia por una histidina (H) (Ley y col., 2010). En individuos sanos de edad avanzada también se han encontrado mutaciones en la DNMT3A sugiriendo que estas mutaciones podrían ser un indicativo de desarrollo futuro de la enfermedad (Jaiswal y col., 2014; Spencer y col., 2017). Otra de las mutaciones encontradas en pacientes con

LMA (2-23% de los casos) es la mutación en TET2, enzima responsable de la hidroximetilación, que se asocia con un pronóstico adverso de la enfermedad, especialmente en pacientes con riesgo citogenético intermedio (Tefferi y col., 2009; Metzeler y col., 2011). Los genes que codifican este enzima (IDH1, IDH2), y que catalizan la conversión de isocitrato en α -cetoglutarato, sufren mutaciones en LMA que conducen a la formación de un metabolito aberrante (2-hidroxioglutarato) inactivando a TET2 (Ward y col., 2010). Al igual que ocurre con la DNMT3A, se han descrito mutaciones en individuos sanos de edad avanzada sugiriendo de nuevo que es un proceso que ocurre antes del desarrollo de leucemia (Busque y col., 2012; Jaiswal y col., 2014).

En conclusión, estos estudios demuestran que la metilación del ADN es un mecanismo muy importante en la patogénesis de la enfermedad. El conocimiento de los genes o dianas específicos regulados por la metilación del ADN podría ser de gran relevancia para desarrollar nuevas estrategias terapéuticas en esta enfermedad.

2.3.- Las modificaciones de histonas

En las células eucariotas, el ADN se empaqueta en la cromatina, cuya unidad básica de repetición es el nucleosoma. Cada nucleosoma consiste en 147 nucleótidos de ADN que se enrollan alrededor de un octámero de histonas el cual está compuesto de dos copias de cada histona (H2A, H2B, H3 y H4). La histona H1 actúa de nexo de unión entre los nucleosomas empaquetándolos unos con otros dando lugar a los cromosomas (**Figura 3**). Las colas N-terminales de estas histonas son susceptibles de sufrir modificaciones post-traduccionales en sus residuos aminoacídicos. Existen numerosas modificaciones de histonas, entre las que se encuentran la acetilación, la metilación de lisinas y argininas, y la fosforilación.

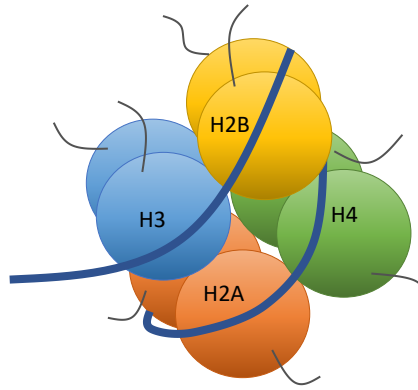


Figura 3. Estructura del nucleosoma.

En el año 1964, Alffrey y col. descubrieron por primera vez la existencia de **acetilación** en las histonas. Este proceso es regulado por la acción de dos familias opuestas de enzimas: las histonas acetiltransferasas (HATs) y las histonas deacetiltransferasas (HDACs) (Alffrey y col., 1964). Las HAT activan la transcripción génica mediante la transferencia de un grupo acetilo desde la acetil-coA a la posición ϵ -amino de la lisina. Se conocen dos clases de HAT: tipo A y tipo B. Las HAT tipo B se encargan de la acetilación de histonas recién sintetizadas como la acetilación de la histona H4 (K5, K12). Las HAT de tipo A son una familia mucho más diversa (GNAT, MYST, CBP/p300) que se asocia a complejos multiproteicos para acetilar lisinas en múltiples sitios dentro de la región N-terminal de las histonas. Por el contrario, las HDAC revierten la acetilación de histonas promoviendo la represión génica. Su especificidad no es muy alta de forma que la deacetilación tiene lugar en múltiples sitios y no en regiones específicas (Bannister y col., 2011).

A diferencia de la acetilación, las lisinas pueden incorporar desde uno a tres grupos metilo (mono-, di- o tri-metiladas). Dependiendo de la histona y del grado de **metilación** pueden ser marcas activadoras (H3K4me3, H3K36me3) o represoras (H3K9me3, H3K27me2, H3K27me3) de la transcripción. Las argininas también pueden encontrarse mono- o di-metiladas en las posiciones H4R3 y H3R2 siendo éstas marcas de activación transcripcional (Kourazides., 2007). Las enzimas que catalizan estos procesos son las HMTs (*Histone methyltransferases*) que se dividen en HKMTs (*Lysine*

methyltransferases) o en PRMTs (*Protein arginine methyltransferases*). Otras modificaciones como la **fosforilación** de histonas tienen lugar en serinas, treoninas, y tirosinas localizadas fundamentalmente en el extremo N-terminal de las histonas. Las histonas quinasas transfieren un grupo fosfato del ATP al grupo hidroxilo de la cadena lateral del aminoácido diana activando la transcripción (Rossetto y col., 2012).

Las diferentes combinaciones en los extremos N-terminales de las histonas afectan de forma específica tanto a la estructura de la cromatina y a su interacción con el ADN como a la interacción con otras proteínas asociadas (complejos remodeladores de la cromatina o factores de transcripción). Todo ello da lugar a un amplio rango de funciones biológicas relacionadas con la transcripción, la reparación, la replicación y el ciclo celular. Todas estas posibilidades están englobadas en lo que se conoce como el “código de histonas” (Jenuwein y col., 2001).

3. EL SISTEMA NKG2D-NKG2DL

En el año 1909, Ehrlich y col. (Ehrlich y col., 1909) propusieron por primera vez la **teoría de la inmunovigilancia** del cáncer indicando que las células tumorales se van generando a lo largo de la vida del individuo, pero el sistema inmune, tanto adaptativo como innato, es capaz de reconocerlas y erradicarlas sin que lleguen a cursar ninguna sintomatología clínica. Esta teoría fue apoyada más adelante por Thomas y Burnet (Burnet., 1971; Thomas, 1982) gracias al descubrimiento de los antígenos asociados a tumores, los cuales facilitan el reconocimiento inmunológico de las células transformadas. Sin embargo, ésta fue perdiendo fuerza al observar que en ratones atímicos no existía una mayor incidencia de cáncer, sugiriendo que no es el sistema inmune el principal responsable de la ausencia de tumores (Rygaard y col., 1974; Stutman, 1974). Estudios posteriores pusieron de manifiesto la existencia de tumores primarios que muestran una baja inmunogenicidad y son capaces de escapar o evadir el sistema inmune (Shankaran y col., 2001). A partir de estos resultados, Dunn y col. (Dunn y col., 2004) propusieron la **teoría de la inmunoección** del cáncer la cual constata tres fases: eliminación, equilibrio y escape (**Figura 4**).

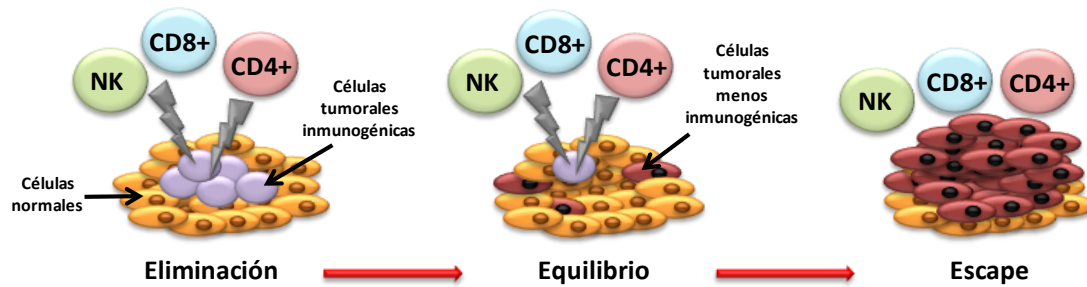


Figura 4. Teoría de la inmunoección del cáncer.

En la fase de **eliminación** las células tumorales tempranas son reconocidas por el sistema inmune innato y adaptativo y por lo tanto, eliminadas. En la fase de **equilibrio**, las células tumorales más inmunogénicas seguirán siendo eliminadas. Sin embargo, la adquisición de mutaciones génicas y epigenéticas dará paso a células menos inmunogénicas que no serán reconocidas por el sistema inmune. Por último, en la fase de **escape** estas células menos inmunogénicas proliferarán provocando la disminución de los antígenos tumorales, la expansión de las células T reguladoras y la expresión aberrante de moléculas coestimuladoras que facilitarán la progresión del tumor.

3.1.- Las células “Natural Killer”

Las células asesinas naturales o “Natural Killer” (NK) son células efectoras del sistema inmune innato que comprenden aproximadamente entre un 5-15% del total de las células linfoides circulantes en sangre periférica. Se diferencian de otros tipos celulares por la presencia en la superficie de la glicoproteína CD56 y el receptor CD16 el cual reconoce la región Fc de las inmunoglobulinas (IgG1 e IgG3). En humanos se han identificado dos subpoblaciones de células NK en base a la expresión de las moléculas CD56 y CD16. La subpoblación CD56^{dim} CD16⁺ que es la responsable de la citotoxicidad de las células diana y comprende aproximadamente el 90% de las células NK circulantes en sangre periférica y las infiltrantes en sitios de inflamación (Caligiuri., 2008). El 10% restante lo constituye la subpoblación CD56^{bright} CD16^{neg/dim} que presenta baja citotoxicidad y se encarga de la producción de citocinas para regular la respuesta inmune adaptativa.

A nivel funcional, las células NK se definen por su capacidad para destruir o eliminar células anormales (células tumorales o células infectadas por virus). Estas células contienen gránulos citotóxicos cargados de moléculas como las granzimas y perforinas. Cuando las células NK son activadas, el contenido de estos gránulos se vierte al exterior provocando la perforación de la membrana de la célula diana a través de las perforinas y la consiguiente entrada de las granzimas induciendo la apoptosis celular (Topham y col., 2009). Además, las células NK activadas tienen la capacidad de secretar diversas citocinas, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), el interferon gamma (IFN- γ) o el factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) encargados de reclutar y activar otras células del sistema inmune (Wei y col., 2015).

A diferencia de lo que ocurre con los linfocitos T y B, las células NK no emplean un único receptor para el reconocimiento de las células diana, sino que presentan un amplio repertorio de receptores de activación y de inhibición:

Receptores de Inhibición: Estos receptores contienen un dominio ITIM (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibitory Motif*) que recluta tirosín-fosfatasas para mediar su actividad inhibidora (Long, 2008). La familia de receptores **KIR** (*Killer cell Immunoglobulin-like receptors*) son los receptores más estudiados y su función consiste en el reconocimiento de las moléculas de MHC-I clásicas (HLA-A, -B, y -C) (Faray y col., 2002). Se pueden diferenciar dos subfamilias de receptores KIR en base a si presentan dos o tres dominios extracelulares tipo inmunoglobulina: KIR2D y KIR3D, respectivamente. Además, en función del tamaño de la cola citoplasmática los receptores KIR se pueden clasificar en inhibidores (cola larga: KIR2DL, KIR3DL) o activadores (cola corta: KIR2DS, KIR3DS). Otros receptores de inhibición de las células NK son la familia **LILR** (*Leukocyte Immunoglobulin-like Receptor*) y el heterodímero **CD94-NKG2A** que reconocen la molécula HLA-I y la molécula no clásica HLA-E, respectivamente (Pegram y col., 2011; Hirayasu y col., 2015).

Receptores de activación: Los **NCR** (*Natural cytotoxicity receptors*) (NKp44, NKp46 y NKp30) son glicoproteínas transmembrana de 44, 46 y 30 kDa, respectivamente, involucrados en el reconocimiento y la lisis de la célula diana a través

de la activación de las células NK (Pegram y col., 2011). Se desconoce la identidad de los ligandos de NKp44 y NK46. Sin embargo, B7H6 es el ligando de NKp30 el cual se expresa antes situaciones de estrés celular promoviendo la citotoxicidad de las células NK y la secreción de IFN- γ (Brandt y col., 2009). Otros receptores de activación son **DNAM-1**, que reconoce en la superficie de la célula diana al receptor del poliovirus (PVR o CD155) y a la Nectina 2 (CD112); y **2B4** que interacciona con su ligando CD48 en la superficie de la célula diana. Sin embargo, uno de los principales receptores de activación de las células NK es el receptor **NKG2D**, el cual será descrito en profundidad en el *apartado 3.2*.

Con el fin de evitar la muerte indiscriminada de células sanas y desencadenar el desarrollo de enfermedades autoinmunes, las células NK son capaces de reconocer en la superficie de la célula diana tanto moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I como moléculas de MHC no clásicas mediante sus receptores de inhibición. De esta forma, en una situación no patológica la señal inhibitoria sería lo suficientemente fuerte como para evitar la lisis celular (**Figura 5A**). Sin embargo, si la expresión de moléculas de MHC de clase I se reduce, por ejemplo, como consecuencia de la acción de patógenos intracelulares o el desarrollo del tumor, las células NK van ser capaces de lisar a las células diana. Es lo que se conoce como **teoría de pérdida de lo propio** (*Missing-self theory*) (Raulet, 2006) (**Figura 5B**). Por el contrario, la **teoría de inducción de lo propio** (*Induced-self theory*) (**Figura 5C**) describe que, ante una infección o transformación maligna, la expresión de los ligandos de estrés celular puede incrementarse en las células diana. Estos ligandos van a unirse a los receptores de activación de las células NK, activándolas y llevando a la lisis de la célula diana. Por lo tanto, la combinación de señales inhibitorias y activadoras en la célula diana y la unión a sus receptores determinará si las células NK ejercen su capacidad lítica sobre ésta o no.

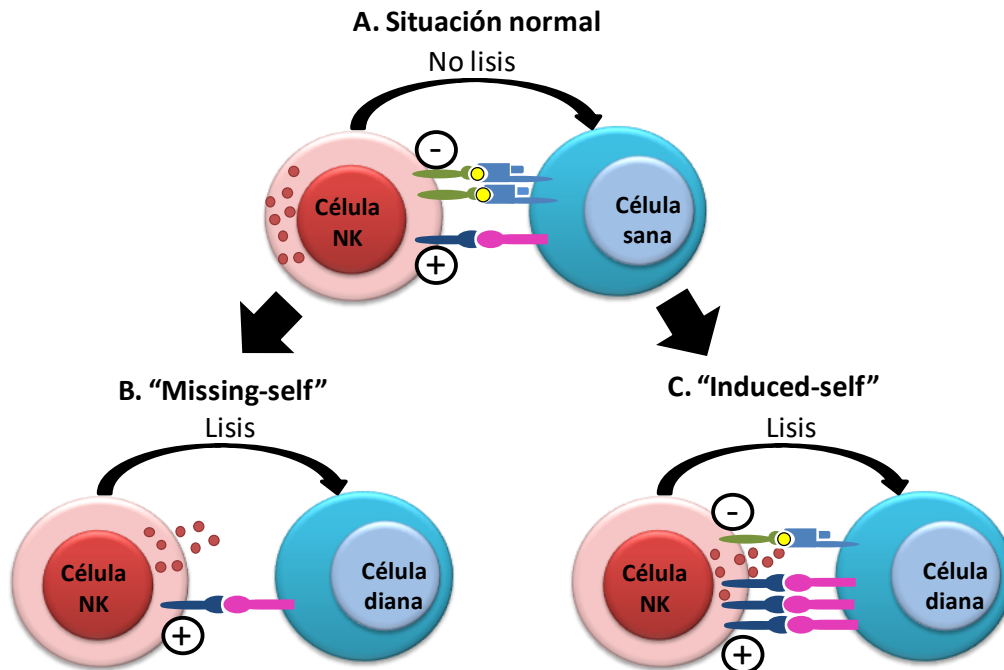


Figura 5. Modulación de la actividad de las células NK. A. El balance entre las señales de activación (+) y de inhibición (-) determina el reconocimiento de células sanas. B. La pérdida de las moléculas de MHC de clase supone el reconocimiento inmunológico de la célula diana. C. La inducción de ligandos de activación por situaciones de estrés celular potencia la actividad de las células NK promoviendo la lisis de la célula diana.

Adicionalmente, las células NK se pueden asociar también con una respuesta inmunológica adaptativa ya que son capaces de promover la activación de las células T $CD4^+$ a través de la producción de citocinas y de expandirlas a través de la expresión de moléculas coestimuladoras como el ligando OX40 (Schuster y col., 2016).

3.2.- El receptor NKG2D

NKG2D (*Natural-killer group 2, member D*) fue identificado por primera vez como un cDNA que se expresaba en células NK humanas, sin embargo, se desconocía su función (Houchins y col., 1991). En 1999, Bauer y col. (Bauer y col., 1999) observaron por primera vez que este receptor era capaz de interactuar con el ligando MICA (*MHC class I related-A*), expresado en células sometidas a estrés celular, provocando la lisis de la célula diana. El gen que codifica para NKG2D, *KLRK1*, se localiza en el cromosoma humano 12p13.2 flanqueado en la región centromérica por *KLRD1* (CD94)

y en la región telomérica por el cluster de *KLRC4* (NKG2F), *KLRC3* (NKG2E), *KLRC2* (NKG2C) y *KLRC1* (NKG2A) (Glienke y col., 1998).

En humanos, NKG2D se expresa de forma constitutiva en todas las células NK, la mayoría de NKT, y en linfocitos T $\gamma\delta$ y $CD8^+ \alpha\beta$ (Raulet y col., 2003). Los linfocitos T $CD4^+$ no expresan NKG2D de forma mayoritaria, pero existe una subpoblación de linfocitos T $CD4^+$ memoria, los cuales carecen de la molécula coestimuladora CD28, que muestran expresión de este receptor de activación y han sido asociados con una activación inmune persistente como ocurre en el envejecimiento, enfermedades autoinmunes (artritis reumatoide, enfermedad de Crohn) o infecciones crónicas (citomegalovirus, hepatitis B) (Groh y col., 2003; Pariente y col., 2011; Sáez-Borderías y col., 2006; Wang y col., 2009; Alonso-Arias y col., 2009; Alonso-Arias y col., 2011).

NKG2D es una molécula transmembrana de tipo II perteneciente a la familia de las lectinas de tipo C que funciona como receptor de activación en células NK y como receptor de coestimulación dependiente de la activación del TCR (*T cell receptor*) en células T (López-Larrea y col., 2008). Esta molécula es incapaz por sí misma de transducir señales al interior celular. Por ello, en humanos, un único homodímero de NKG2D interacciona con cuatro moléculas DAP10 a través de la interacción iónica que se produce entre la arginina de la región transmembranal de NKG2D y el ácido aspártico de la región transmembranal de DAP10, llevando así a la estabilización del complejo hexamérico formado (López-Larrea y col., 2008) (**Figure 6**). DAP10 actúa como una molécula adaptadora que se encarga de transducir la señal después de la interacción de NKG2D con sus ligandos gracias al dominio YxxM que recluta a la subunidad p85 de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) y a la proteína 2 de unión al receptor del factor de crecimiento (GRB2) (Wu y col., 1999; Chang y col., 1999). A través de estas cascadas de señalización se produce la reorganización del citoesqueleto, permitiendo la polarización de las células NK y la liberación de los gránulos líticos, y la transcripción de diversas citocinas y quimiocinas (Lanier, 2008; Long y col., 2013).

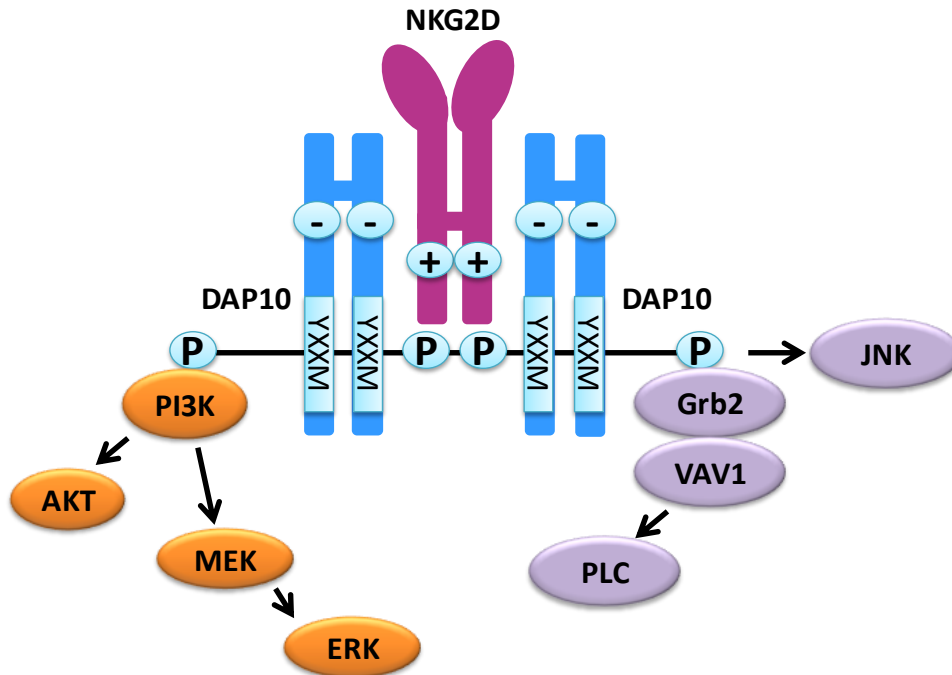


Figura 6. Estructura y mecanismos de señalización celular del homodímero NKG2D/DAP10

La expresión de NKG2D está regulada por diversos mecanismos. En células NK y en linfocitos T CD8⁺, diversas citocinas (IL2, IL7, IL12 e IL15) incrementan la expresión de NKG2D en la superficie celular, mientras que TGF- β (*Transforming growth factor beta*), IFN β 1 (*Interferon β -1*) o la interleucina 21 (IL21) actúan inhibiendo su expresión (Lanier y col., 2015). Por otra parte, algunos miRNAs como el miR-145 interaccionan con la región 3'UTR de NKG2D bloqueando su expresión e inhibiendo la actividad citotóxica de las células efectoras (Espinoza y col., 2012). Otro mecanismo de regulación de NKG2D es la trogocitosis, mecanismo que consiste en la transferencia intercelular de fragmentos intactos de membrana plasmática o de proteínas asociadas. Tras el contacto de la célula NK con su célula diana se produce la agrupación de moléculas en la zona de contacto conocida como NK-IS (*NK immune sinapse*). Roda-Navarro y col. (Roda-Navarro y col., 2006) mostraron que el receptor NKG2D, tras producirse el contacto entre la célula NKL y la célula 721.221 transfectada con MICB, se localizaba en la zona de sinapsis y además aparecía en la superficie de la célula diana disminuyendo la capacidad citotóxica de las células NKL. Pero, el principal mecanismo de regulación de la expresión de NKG2D en la membrana celular es la endocitosis. La interacción de NKG2D con sus ligandos provoca la mono- o

poliubiquitinación de la molécula adaptadora DAP10 desencadenando la internalización de NKG2D desde la membrana plasmática al interior de los lisosomas donde va a ser degradado. En células NK murinas se demostró que la interacción de NKG2D con su ligando, H60, reduce la expresión de DAP10 y DAP12 provocando la internalización y degradación de NKG2D. Sin embargo, la estimulación con el ligando Rae1 ϵ no degrada NKG2D sugiriendo que el grado de internalización y de degradación de NKG2D dependerá del tipo de ligando con el que interaccione (Molfetta y col., 2016).

3.3.- Los ligandos de NKG2D

El receptor NKG2D presenta la peculiaridad de interaccionar con múltiples ligandos expresados en la superficie de las células diana. Los ligandos de NKG2D (NKG2DL) fueron descubiertos por primera vez en el año 1996 en la línea murina F9 (derivada de un teratoma testicular embrionario) donde se observó que el tratamiento con ácido retinoico inducía la expresión del ligando murino Rae-1 (Zou y col., 1996). Actualmente, en humanos se conocen dos familias diferentes de ligandos, la familia MIC y la familia de las ULBPs (González y col., 2008; Eagle y col., 2009) (**Figura 6**):

La **familia MIC** está comprendida por las moléculas MICA y MICB (MHC class-I chain related protein A and B). Son moléculas de MHC no clásicas que presentan una estructura similar a las moléculas de MHC de clase I ya que contienen tres dominios extracelulares (α 1, α 2 y α 3) y se anclan a la membrana celular mediante un dominio transmembrana (TM). Sin embargo, se diferencian de las moléculas de MHC clásicas en que no se unen a β 2-microglobulina y no presentan péptidos antigénicos a las células T (Groh y col., 1996). Se trata de una familia muy polimórfica ya que se han descrito más de 100 alelos para MICA y 40 alelos para MICB.

La **familia de las ULBPs (UL16 binding proteins)** está formada por 6 miembros (ULBPs1-6) y deben su nombre a que fueron descubiertas analizando los ligandos de la glicoproteína HCMV o UL16 (Cosman y col., 2001; Eagle y col., 2009). Estas moléculas

presentan dos únicos dominios extracelulares ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) y se anclan a la membrana celular mediante un dominio TM (ULBP4 y ULBP5) o a través de un dominio GPI (*Glycosyl-phosphatidil inositol*) (ULBP1 y ULBP3). El ligando ULBP2 puede anclarse a la membrana mediante ambos, región TM o dominio GPI (Fernández-Messina y col., 2011).

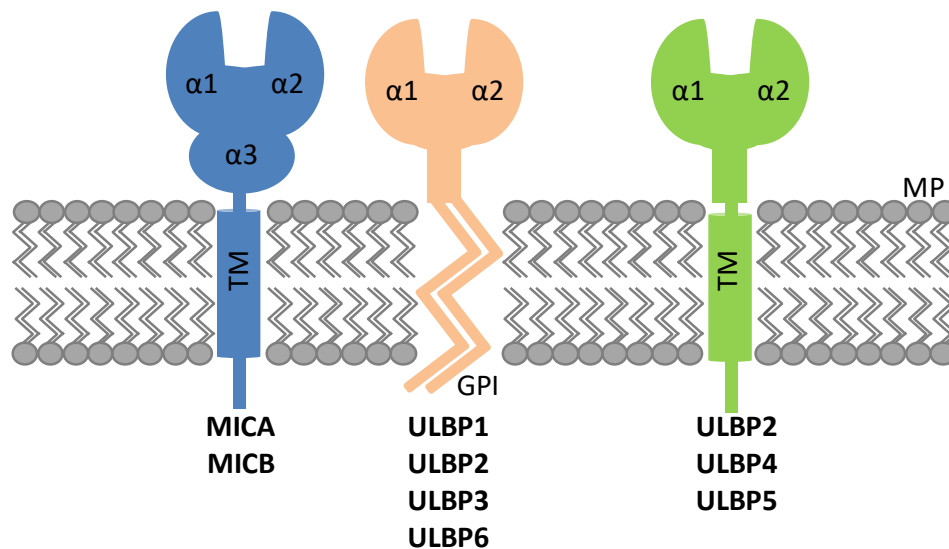


Figura 7. Estructura de los NKG2DL

La expresión de los NKG2DL en células sanas es restringida a ciertos tipos celulares. Durante la hematopoyesis se ha observado expresión en la superficie de células B, plaquetas, monocitos, granulocitos, células T y células dendríticas (Nowbakht y col., 2005; Mistry y col., 2007). También se ha encontrado expresión de MICA, MICB y/o ULBPs 1-3 en células sanas del epitelio gastrointestinal, en células madre mesenquimales y en fibroblastos (Groh y col., 1996; Nowbakht y col., 2005; Spaggiari y col., 2005; Zou y col., 2006; Shi y col., 2015). En el resto de células y en situaciones no patológicas, la expresión de los NKG2DL es nula o muy reducida. Sin embargo, bajo determinadas situaciones patológicas como el cáncer o las infecciones, la expresión de los NKG2DL es incrementada en la superficie celular considerándose un indicador de estrés celular.

En tumores, la expresión de cada ligando de NKG2D varía dependiendo del tipo celular, siendo MICA y MICB mayoritariamente expresados en tumores de origen

epitelial y las ULBPs en tumores de origen hematológico (Ullrich y col., 2013; Nausch y col., 2009). Existen algunas controversias a la hora de determinar el significado de la expresión de los NKG2DL en la superficie de las células tumorales. En algunos tipos tumorales (melanoma, cáncer colorrectal, cervical, mama, colangiocarcinoma, carcinoma hepatocelular), la expresión de los NKG2DL está asociada con un buen pronóstico de la enfermedad (Vetter y col., 2004; McGilvray y col., 2009; Cho y col., 2014; de Kruijf y col., 2012; Tsukagoshi y col., 2016; Kamimura y col., 2012). Mientras que en cáncer ovárico la expresión de ULBP2 se relaciona con una menor infiltración intraepitelial de linfocitos T, comportándose como un factor independiente de mal pronóstico de la enfermedad (Li y col., 2009; McGilvray y col., 2010). Asimismo, en cáncer gástrico la expresión de los ligandos MICA y MICB es incrementada en aquellos tumores de mayor tamaño (>5 cm) asociándose con una mayor progresión de la enfermedad (Ribeiro y col., 2016). Estos resultados señalan que tanto el patrón de expresión como la significación clínica de los ligandos son dependientes del tipo tumoral.

3.4.- Regulación de los ligandos de NKG2D

La regulación de los NKG2DL ocurre en los distintos niveles de su biogénesis: regulación transcripcional, post-transcripcional y post-traducciona.

Regulación transcripcional: La expresión de los NKG2DL se incrementa en respuesta a diversos estímulos de estrés celular. Por ejemplo, tras un choque térmico, la expresión de MICA y MICB aumenta debido a la presencia de elementos HSE (*Heat shock response elements*) en su región promotora (Groh y col., 1996; Venkataraman y col., 2007). La respuesta al daño en el ADN causado por la radiación ionizante o por agentes farmacológicos (cisplatino o 5-fluoracilo) también induce la expresión de los ligandos de NKG2D murinos (H60, MULT1, Rae1) a través de la ruta de ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*) y ATR (*ATM and Rad3-related*) (Gasser y col., 2006). Además, durante la transformación maligna la expresión de los NKG2DL se incrementa en diversos tumores como consecuencia de la sobreexpresión de diversos oncogenes

(*BCR/ABL, c-MYC, RAS*) (Terme y col., 2005; Liu y col., 2012; Nanbakhsh y col., 2014) o factores de transcripción (*STAT3, E2F, NF- κ B, SP1, Sp3, AP-1, AP-2, p53*) (Molinero y col., 2004; López-Soto y col., 2006; Venkataraman y col., 2007; Bedel y col., 2011; Textor y col., 2011; Jung y col., 2012). Diversas citocinas liberadas durante el desarrollo tumoral, como TGF- β e IFN- γ , reducen la transcripción de los NKG2DL en líneas celulares de glioma y sarcoma, respectivamente (Eisele y col., 2006; Schwinn y col., 2009). Finalmente, agentes remodeladores de la cromatina tales como drogas desmetilantes o inhibidores de HDACs incrementan la expresión de los NKG2DL en células tumorales sugiriendo que además de una regulación genética, los ligandos se regulan mediante mecanismos epigenéticos (Rohner y col., 2007; Tang y col., 2008; Schmiedel y col., 2011; Kato y col., 2007; Diermayr y col., 2008; López-Soto y col., 2009; Poggi y col., 2009; Lu y col., 2010; Huang y col., 2011; Berghuis y col., 2012; Wu y col., 2012; Yan y col., 2013)

Regulación post-transcripcional y post-traducional: Una elevada transcripción de los NKG2DL no siempre se corresponde con una elevada presencia de éstos en la membrana celular sugiriendo que mecanismos de regulación post-transcripcional podrían afectar a la expresión de los NKG2DL. Diferentes estudios han puesto de manifiesto que los NKG2DL están regulados por diferentes miRNAs (miR-17-5-p, miR-20a, miR-93, miR-106b, miR-373, miR-520, miR-34a, miR-34c) que se unen a la región 3'-UTR de los ligandos promoviendo la degradación del mRNA o impidiendo su traducción (Raulet y col., 2013). La falta de reconocimiento de las células tumorales por las células NK y T CD8⁺ es también influenciada por la trogocitosis. Así, se ha descrito que MICA, MICB y las ULBPs 1-3 pueden transferirse desde la superficie de la célula tumoral a la superficie de una célula T o de una célula NK manteniendo la orientación original y haciendo que estas células sean reconocidas por las células NK autólogas proponiéndose como un mecanismo de escape inmunológico del tumor (Roda-Navarro y col., 2006; McCann y col., 2007; Domaica y col., 2009; López-Cobo y col., 2015). Para que ocurra este proceso es necesaria la interacción entre el receptor y el ligando. Aunque se conoce poco sobre este proceso y posteriores estudios son necesarios para determinar el impacto de la trogocitosis en la evasión tumoral.

Por último, el mecanismo por excelencia implicado en la disminución de los NKG2DL en la superficie celular es el corte y liberación de los ligandos en su forma soluble, el cual describiremos detalladamente en el apartado 3.5.

3.5.- Liberación de los NKG2DL

La liberación de los NKG2DL en su forma soluble (sNKG2DL) desde la superficie celular al medio extracelular es la estrategia más importante de evasión inmunológica desarrollada por las células tumorales. Este proceso tiene dos consecuencias importantes: una reducción de la expresión de los NKG2DL en la superficie de la célula tumoral y la capacidad de estas formas solubles de interactuar con su receptor NKG2D bloqueando el sitio de unión y provocando su internalización. En ambos casos lo que se produce es un menor reconocimiento NKG2D-NKG2DL, impidiendo la lisis celular y favoreciendo la progresión del tumor (Groh y col., 2002; Ashiru y col., 2010).

Existen dos mecanismos principales involucrados en la liberación de los sNKG2DL: el corte proteolítico de los NKG2DL a través de la acción de diferentes **metaloproteasas** (MPs) (apartado 3.5.1) y el reclutamiento de los sNKG2DL en **partículas exosomales** (apartado 3.5.2). Mientras MICA, MICB y ULBP2 son liberados fundamentalmente por la acción de MP, ULBP1 y ULBP3 son mayoritariamente secretadas dentro de partículas exosomales (Hedlund y col., 2009; Hedlund y col., 2011; Fernández-Messina y col., 2010). Sin embargo, se sabe que dependiendo del tipo celular, de la expresión y la actividad de las proteasas o de la composición lipídica de los exosomas, los NKG2DL podrán ser liberados por uno u otro mecanismo indistintamente (López-Cobo S y col., 2016). Además, se ha descrito que los ligandos ULBP4 y ULBP5 presentan un codón de parada prematuro localizado después de los exones que codifican las regiones $\alpha 1$ y $\alpha 2$ de forma que carecen de dominio TM (Cao y col., 2007; Eagle y col., 2009). Sin embargo, aunque estas moléculas generadas por procesamiento alternativo se liberan en líneas celulares tumorales, no han sido detectadas en tumores primarios.

3.5.1.- Liberación proteolítica mediante la acción de MP

La expresión de las MPs es ubicua y su principal función consiste en degradar componentes de la matriz extracelular. Se conocen tres familias diferentes de MP: MMPs (*Matrix metalloproteinase*), ADAMs (*A disintegrin and metalloproteinase*) y ADAMs-TS (*ADAM with thrombospondin motifs*). Diferentes miembros de MMP y ADAM han sido involucrados en la liberación de los NKG2DL (**Tabla 4**).

MP	Diana	Tipo tumoral	Ref
MMP2	MICA	Carcinoma renal	Yang y col., 2014.
MMP9	MICA, MICB	Cáncer de mama, glioma, osteosarcoma	Kim y col., 2004; Eisele y col., 2006; Sun y col., 2011; Yamanegi y col., 2012; Yamanegi y col., 2012
MMP14	MICA	Cáncer de próstata	Liu y col., 2010
ADAM9	MICA	Carcinoma hepatocelular	Kogha y col., 2010; Kogha y col., 20
ADAM10	MICA, MICB, ULBP2, ULBP3	Transfectos C1R-MICA, cáncer de próstata, cáncer de mama, glioma	Waldahuer y col., 2008; Barsoum y col., 2011; Chitadze y co., 2013; Wolpert y col., 2014; Camodeca y col., 2016;
ADAM15	MICB	Cáncer pancreático	Duan y col., 2013
ADAM17	MICA, MICB, ULBP2	Transfectos C1R-MICA, transfectos U373-MICB, transfectos CV1-MICB, glioma	Waldahuer y col., 2008; Boutet y col., 2009; Wolpert y col., 2014

Tabla 4. Metaloproteasas implicadas en la liberación de los sNKG2DL.

La familia de las MMPs son un grupo de 24 zinc endopeptidasas capaces de degradar componentes de la matriz extracelular. Su función en el desarrollo del cáncer es esencial ya que participan en diversos procesos tales como supervivencia, crecimiento, angiogénesis, migración o invasión tumoral (Noël y col., 2012). MMP2 y MMP14 regulan la liberación de MICA en carcinoma renal y cáncer de próstata (Yang y col., 2014; Liu y col., 2010) mientras que MMP9 ha sido involucrada tanto en la liberación de MICA como de MICB en células de glioma, osteosarcoma y cáncer de mama (Kim y col., 2004; Eisele y col., 2006; Sun y col., 2011; Yamanegi y col, 2012; Yamanegi y col, 2012; Camodeca y col., 2016). Aunque se desconoce el sitio específico donde se produce el corte proteolítico por parte de las MMP en MICA y MICB, se sabe

que tiene lugar en la proximidad del dominio $\alpha 3$ extracelular (Waldhauer y col., 2008; Wu y col., 2009).

De forma similar, la familia de las ADAMs también juega un papel importante en el desarrollo tumoral ya que participan en la activación de factores de crecimiento, la liberación de proteínas de adhesión celular y en la angiogénesis (Duffy y col., 2011). ADAM9 y ADAM10 han sido implicadas en la liberación de MICA y MICB, respectivamente, en células de tumores hepáticos y pancreáticos (Kohga y col., 2010; Duan y col., 2013). Sin embargo, ADAM10 y ADAM17 son las proteasas esenciales implicadas en la liberación de los NKG2DL, tanto de MICA, MICB como de ULBP2 y en diferentes tipos de tumores (Waldhauer., 2006; Waldhauer y col., 2008; Boutet y col., 2009; Barsoum y col., 2011; Chitadze y col., 2013; Wolpert y col., 2014). La liberación de MICA y MICB en su forma soluble es promovida por el reclutamiento de estos ligandos a regiones de membrana resistentes a detergentes (DRM; *Detergent-resistant membrane microdomains*) donde se localiza la proteasa ADAM17 y donde se lleva a cabo el corte proteolítico (Boutet y col., 2009; Tellier y col., 2006). En el caso de MICA, la palmitoilación, es decir, la adición de un ácido graso de 16 carbonos a residuos de cisteína del tallo citoplasmático es el mecanismo responsable del reclutamiento de este ligando en a las regiones DRM (Agüera-González y col., 2011).

Además, para que tenga lugar el corte proteolítico de MICA a través de las MP es necesaria la unión de la chaperona ERp5 (*Endoplasmic reticulum protein 5*) al dominio $\alpha 3$ extracelular de MICA (Kaiser y col., 2007; Huergo-Zapico y col., 2012). Elevados niveles de expresión de ERp5 y de GRP78 (*78 KDa glucose-regulated protein*), otra chaperona del retículo endoplasmático, se han asociado con una mayor liberación de MICA en pacientes con linfoma de Hodking y leucemia linfoide crónica (Zocchi y col., 2012; Huergo-Zapico y col., 2012) sugiriendo que ambas proteínas juegan un papel importante en la regulación de sMICA en cáncer.

En la **Figura 8** se resumen los mecanismos de liberación proteolítica comentados en esta sección.

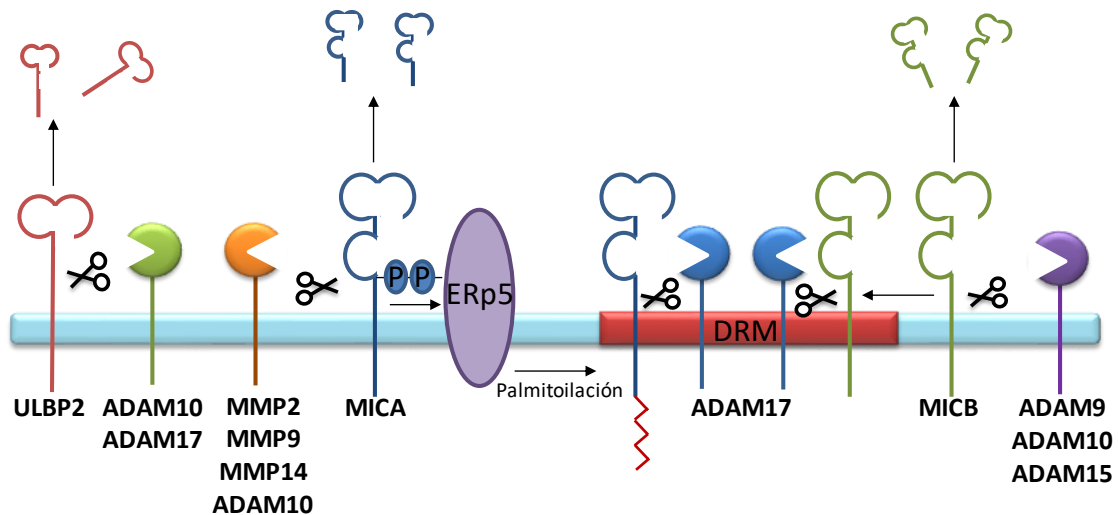


Figura 8. Mecanismos envueltos en la liberación proteolítica de MICA, MICB y ULBP2.

3.5.2.- Liberación en partículas exosomales

Los exosomas son vesículas de pequeño tamaño (30-100 nm) que son liberadas al medio extracelular mediante la fusión de cuerpos multivesiculares con la membrana plasmática (Zhang y col., 2011). Los exosomas presentan un contenido particular de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos que hace pensar que el reclutamiento de las proteínas en las partículas exosomales dependerá de las características bioquímicas de las propias proteínas, así como de una apropiada composición lipídica (López-Cobo y col., 2016).

Aunque todos los NKG2DL han sido detectados en exosomas, la liberación dentro de partículas exosomales es más común para el alelo MICA*008, ULBP1 y ULBP3 (**Figura 9**). Al igual que ULBP1 y ULBP3, el alelo MICA*008 presentan un dominio GPI de anclaje a la membrana plasmática lo que sugiere que este dominio podría ser el responsable de su aparición en exosomas (Ashiru y col., 2013).

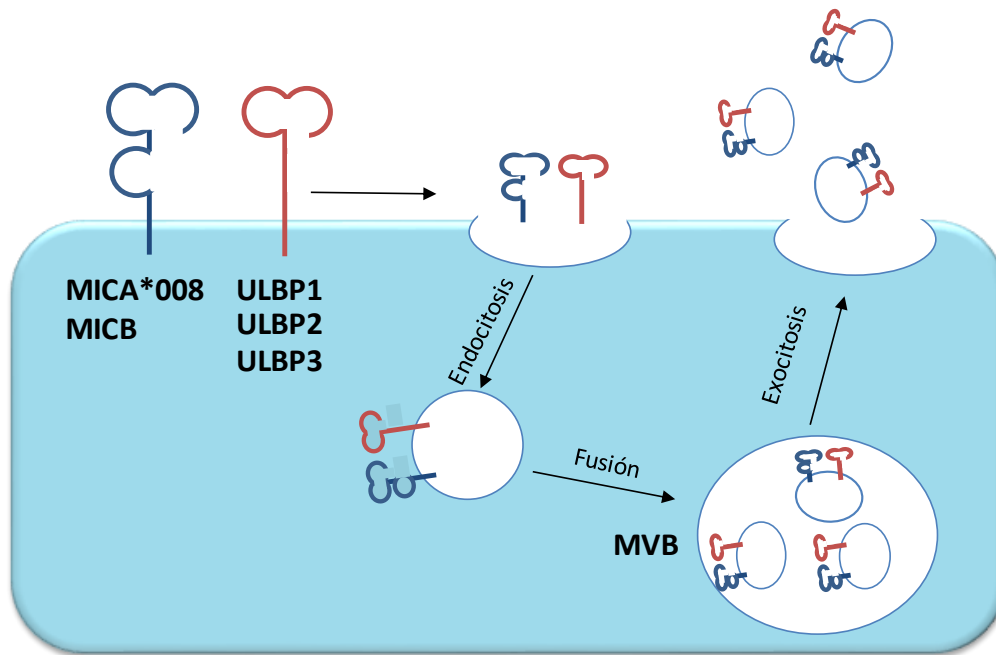


Figura 9. Liberación de los NKG2DL dentro de partículas exosomales. MVB: cuerpo multivesicular.

Estudios de la funcionalidad de estos exosomas en los procesos tumorales han revelado resultados contradictorios. Clayton y col. (Clayton y col., 2008) observaron que exosomas aislados de líneas celulares de mesoteliomas malignos conteniendo TGF- β y los ligandos MICA, MICB y ULBP2 inducen una disminución del receptor NKG2D tanto en células NK como en linfocitos T CD8⁺. Sin embargo, otros autores mostraron que la vacunación con exosomas derivados de células dendríticas que contienen el receptor de la interleucina 15 (IL-15R α) y ULBP1 restaura la funcionalidad de las células NK en pacientes con melanoma (Viaud y col., 2009). Aunque en estos estudios no se ha podido determinar si la modulación de la expresión de NKG2D tras el contacto con los exosomas puede ser debida a la acción de los ligandos o de las citocinas que llevan en su interior.

Numerosas evidencias ponen de manifiesto que los exosomas juegan un papel fundamental en cáncer ya que son capaces de transferir al medio extracelular diversas proteínas (TP53, KRAS, TGF- β ...) y ácidos nucleicos (miRNAs) modulando procesos envueltos en el desarrollo del cáncer como el crecimiento celular, migración,

angiogénesis o metástasis (Azmi y col., 2013; Zhang y col., 2015). Debido a ello, las diversas proteínas alojadas dentro de las partículas exosomales han sido propuestas como nuevos biomarcadores para la predicción, el diagnóstico, el pronóstico y la monitorización de diversos tipos tumorales como el cáncer de mama, próstata, ovario, páncreas, colon o el glioblastoma (Soung y col., 2017). Además, los exosomas también han sido considerados como estrategias terapéuticas en cáncer. Los exosomas, exosomas derivados de células dendríticas, son capaces de estimular a las células T CD4⁺, T CD8⁺ y a las células NK inhibiendo el desarrollo tumoral y se encuentran en fase de estudio en tumores como el cáncer de colon, pulmón o el melanoma (Tan A y col., 2010; Pitt y col., 2014). Otras terapias alternativas consistirían o bien en la bien la utilización de los exosomas como vehículos de tratamiento, por ejemplo, como portadores de siRNA o drogas específicas frente a una diana tumoral (Zhang y col., 2013).

3.5.3.- Papel de los sNKG2DL en cáncer

Desde el descubrimiento de la liberación de los NKG2DL en su forma soluble, múltiples estudios han revelado la presencia de estos en el suero de pacientes diagnosticados con diferentes malignidades. La liberación de uno u otro ligando ha sido estrechamente relacionada con el tipo de patología tumoral (**Tabla 5**). Así, en tumores de origen hematológico se ha observado que todos los NKG2DL (MICA, MICB, ULBPs 1-3) pueden ser liberados al medio extracelular, mientras que MICA es el ligando que se libera con mayor frecuencia en tumores de origen epitelial seguido de la liberación de MICB y en menor medida ULBP2.

Malignidad	NKG2DL soluble	Significado clínico	Ref
LMA	MICA, MICB ULBPs 1-3	<ul style="list-style-type: none"> - Correlación negativa con la expresión de NKG2D. - Los niveles de sMICB y sULBP2 se asocian con una peor supervivencia de los pacientes. - Los niveles de sULBP1 son menores en pacientes que presentan CR respecto a los pacientes que son resistentes a terapia. 	Salih HR., y col, 2003; Diermayr S., y col, 2008; Hilpert J y col, 2012
LLA	MICA, MICB ULBPs 1-3	<ul style="list-style-type: none"> - Correlación negativa con la expresión de NKG2D. 	Salih y col, 2003; Hilpert J y col, 2012
LMC	MICA, MICB ULBPs 1-3	<ul style="list-style-type: none"> - Correlación negativa con la expresión de NKG2D. 	Salih y col, 2003; Hilpert J y col, 2012
LLC	MICA, MICB ULBPs 1-3	<ul style="list-style-type: none"> - Correlación negativa con la expresión de NKG2D. - sMICA, sMICB y sULBP2 se asocian con TFS. 	Salih y col, 2003; Hilpert J y col, 2012; Nüchel H y col, 2010; Huergo-Zapico y col, 2012
LNH-T	MICA, MICB	<ul style="list-style-type: none"> - No hay correlación con la expresión de MICA y MICB en la superficie celular. 	Salih HR y col, 2003
Cáncer cervical	MICA	<ul style="list-style-type: none"> - Correlación negativa con la expresión de NKG2D. 	Arreygue-García y col, 2008
CHC	MICA	<ul style="list-style-type: none"> - Correlación negativa con la expresión de NKG2D. - Asociación con una baja OS y con invasión vascular. 	Kumar V y col, 2012 Jinushi M y col, 2005
Cáncer pancreático	MICA, MICB ULBP2	<ul style="list-style-type: none"> - sMICA se asocia con metastasis y con una baja OS. - sMICB se asocia con la imposibilidad de extirpación. - sULBP2 es un factor predictivo independiente de baja SG y de SLE. 	Duan X y col, 2011 Chung HW y col, 2011 Chen J y col, 2016
Neuroblastoma	MICA	<ul style="list-style-type: none"> - Correlación negativa con la expresión de NKG2D. 	Raffaghello L y col, 2004
Malignidades gastrointestinales	MICA	<ul style="list-style-type: none"> - Los niveles de sMICA son más elevados en cáncer gástrico, de colon y de recto que en controles sanos. 	Salih HR y col, 2002
Melanoma	MICA, MICB, ULBP2	<ul style="list-style-type: none"> - Los sNKG2DL se asocian con una reducida OS. - Los niveles de sULBP2 se asocian con progression de la enfermedad y se trata de un factor de pronóstico independiente. - El nivel de sMICB es un factor predictivo independiente de progresión y de OS. 	Paschen A y col, 2009 Wu BJ y col, 2013
CPCNP	ULBP2	<ul style="list-style-type: none"> - Asociación con baja OS. 	Yamaguchi K y col, 2012
Carcinoma oral de células escamosas	MICB	<ul style="list-style-type: none"> - Asociación con baja OS. 	Tamaki S y col, 2010
Carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas	MICA	<ul style="list-style-type: none"> - Correlación negativa con la expresión de NKG2D. - Disminución de la citotoxicidad de las células NKs. - Correlación con la progresión de la enfermedad y la recaída. 	Klöß S y col, 2015
Mieloma múltiple	MICA	<ul style="list-style-type: none"> - sMICA es un factor predictivo independiente de OS y de supervivencia libre de progresión. 	Rebmann V y col, 2007

Tabla 5. Estudios publicados sobre la presencia de los sNKG2DL en el suero de pacientes diferentes malignidades y su relación con la evolución y el pronóstico de la enfermedad. LMA, leucemia mieloide aguda; LLA, leucemia linfocítica aguda; LMC, leucemia mieloide crónica; LLC, leucemia linfocítica crónica; LNH-T, linfoma no Hodking de células T; CHC, carcinoma hepatocelular; CPCNP, cáncer de pulmón de células no pequeñas; RC, remisión completa; SLT, supervivencia libre de tratamiento; SLE, supervivencia libre de enfermedad; SG, supervivencia global.

La liberación de los ligandos solubles desde la superficie de las células tumorales es capaz de reducir la inmunogenicidad facilitando la progresión del tumor. De hecho, en pacientes con leucemia linfocítica crónica, la presencia de formas solubles para MICA, MICB y ULBP2 se ha asociado con una peor supervivencia libre de tratamiento (Nüchel y col., 2010). De la misma forma, los niveles solubles de MICA, MICB o ULBP2 se relacionan con una peor supervivencia y progresión de la enfermedad en diversos tumores sólidos (Paschen y col., 2009; Tamaki y col., 2010; Duan y col., 2011; Yamaguchi y col., 2012; Wu y col., 2013; Klöß y col., 2015). En pacientes con carcinoma hepatocelular infectados por el virus de la hepatitis B, los niveles de sMICA se han visto asociados con un peor pronóstico de la enfermedad sugiriendo que su cuantificación podría ser útil como un nuevo biomarcador predictivo del curso de la enfermedad (Kumar y col., 2012). Además de ser útiles como factores de pronóstico de la enfermedad, los sNKG2DL también pueden ser utilizados como biomarcadores de diagnóstico. En cáncer pancreático, los niveles de MICA y MICB solubles son lo suficientemente sensibles y específicos como para discriminar entre pacientes e individuos sanos de forma similar a lo que ocurre con el biomarcador CA19-9 (*Carbohydrate antigen 19-9*), hasta ahora el más fiable en el diagnóstico de esta patología (Chung y col., 2011).

Todos estos datos sugieren que los NKG2DL son liberados durante el desarrollo del tumor y que a diferencia de lo que ocurría con la expresión de estos ligandos en la membrana celular, se asocian claramente con un mal pronóstico de la enfermedad. Por este motivo, es importante conocer los mecanismos implicados en la liberación de los ligandos de NKG2D para potenciar el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que bloqueen la liberación de los NKG2DL potenciando la inmunidad antitumoral.

4. EL RECONOCIMIENTO INMUNOLÓGICO EN LA LMA

Desde un punto de vista teórico, las células de LMA deberían de ser potenciales dianas de los linfocitos T y células NK. Estas células expresan antígenos asociados a la leucemia, moléculas de MHC-I y -II, moléculas coestimuladoras y ligandos de NK los cuales podrían ser reconocidos por las células inmunes activándolas e induciendo la lisis de la célula tumoral. Sin embargo, la realidad es muy distinta, y aunque los agentes quimioterapéuticos frente a la LMA permiten una remisión completa de la enfermedad en más del 50% de los casos, las recaídas son muy frecuentes sugiriendo que las células leucémicas residuales son capaces de escapar del sistema inmunitario. Esto es debido a que las células de LMA son capaces de generar un microambiente inmunosupresivo donde tanto la respuesta inmune innata como adaptativa están profundamente desreguladas. Los principales mecanismos de evasión desarrollados por los blastos mieloides están recogidos en la **Figura 10** (Barret y col., 2010). Por un lado, los blastos mieloides inhiben la lisis mediada por los linfocitos T citotóxicos debido a la presencia de defectos en la sinapsis inmunológica, a la disminución de moléculas coestimuladoras o a la expresión de la proteína CLIP (*The class II-associated invariant chain self-peptide*) y del ligando de GITRL (*Glucocorticoid-induced tumour necrosis factor-related protein*) (**Figura 10A**). Además, las células de LMA tienen la capacidad de generar células dendríticas leucémicas que tienen la capacidad de bloquear a los linfocitos T citotóxicos induciendo la anergia de las células T y de generar células T reguladoras (**Figura 10B**). Finalmente, el reconocimiento inmunológico mediado por las células NK también se ve afectado debido a un aumento de la expresión de moléculas de MHC de clase I, a la expresión de receptores de inhibición KIR, a la liberación de los NKG2DL en su forma soluble, y como consecuencia, a la disminución de NKG2D (**Figura 10C**).

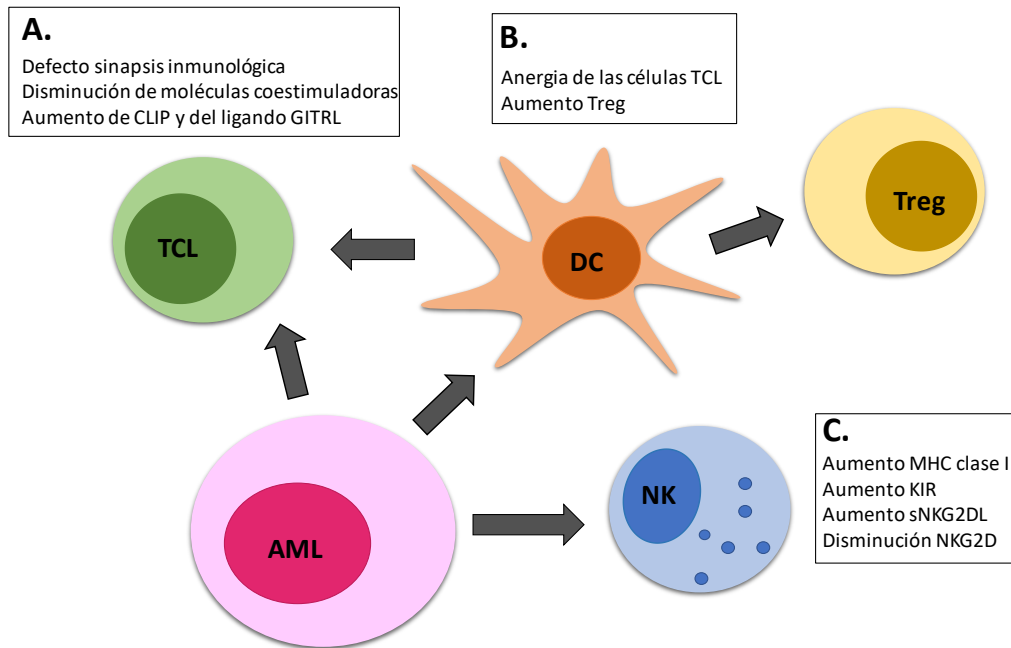


Figura 10. Interacción del sistema inmune con la LMA. A. Efecto de las células de LMA sobre los linfocitos T citotóxicos (CTL). B. Efecto de las células dendríticas de las células de LMA sobre los TCL y los linfocitos T reguladores (Treg). C. Efecto de las células de LMA sobre la actividad de las células NK.

4.1.- Disfuncionalidad de las células NK

Las células de LMA son capaces de escapar del reconocimiento mediado por las células NK. Esto es debido a que las células tumorales adquieren características invasivas que las hacen menos susceptibles al reconocimiento inmunológico y a la disfuncionalidad de las células NK de pacientes con LMA. La expresión de NKG2D, así como de otros receptores de activación (DNAM-1, NCRs) de las células NK es mucho más reducida en pacientes con LMA asociándose con una mayor probabilidad de recaída de la enfermedad (Ingram y col., 2009; Lion y col., 2012). Estudios recientes han corroborado estos datos observando que la expresión de NKG2D, DNAM-1, NKp30 y NKp46, y la producción de perforina e IFN- γ se reduce en células NK de pacientes con LMA (Khaznadar y col., 2015; Sandoval-Borrego y col., 2016). Además de un descenso en la expresión de receptores de activación, también se produce un incremento en la

expresión de los receptores de inhibición como NKG2A, NKG2C, CD158b y receptores KIR (KIR2DL1, KIR2DL3, KIR3DL1, KIR3DL2) (Verheyden y col., 2004; Nguyen S y col., 2005; Sandoval-Borrego y col., 2016). Como consecuencia de este desbalance de receptores, es decir, del incremento de receptores de inhibición y del descenso de receptores de activación, las células NK de pacientes con LMA van a ser incapaces de reconocer a los blastos mieloides dando lugar a la progresión de la enfermedad.

Cuando las células NK interactúan con las células leucémicas se produce la disminución de la expresión de la molécula CD16 debido a la acción de MP como ADAM17, lo que desencadena la pérdida de funcionalidad de las células NK (Arriga y col., 2015). Como consecuencia de ello, la utilización del anticuerpo CD16 x CD33 BIKE que bloquea la liberación de CD16 y activa a las células NK frente a la LMA ha sido propuesto como estrategia terapéutica (Wiernik y col., 2013). Adicionalmente, otros factores pueden afectar a la funcionalidad de las células NK como la proteína GSK3- β (*Glycogen synthase kinase beta*). Esta proteína, sobreexpresada en diversos tipos tumorales como la LMA, es una serina-treonina quinasa implicada en diversas rutas de señalización como la vía Wnt/ β -catenina y NF κ B, y participa en diversos procesos biológicos como proliferación celular, inflamación y apoptosis (Doble y col., 2003). Ha sido descrito que la inhibición farmacológica de GSK3- β es capaz de activar la vía NF- κ B provocando la liberación de TNF- α por las células NK y la expresión de ICAM-1 en las células de LMA potenciando la capacidad lítica de las células NK la lisis de las células de LMA sugiriendo esto como un posible tratamiento para la LMA (Parameswaran y col., 2016).

En base a estos datos, el conocimiento de los mecanismos de evasión inmunológica desarrollados por los blastos mieloides podría ser de gran relevancia para la generación de terapias inmunológicas alternativas a los tratamientos convencionales de la LMA. Actualmente, los estudios en inmunoterapia están dirigidos a incrementar la expansión de las células NK, así como la búsqueda de drogas inmunomoduladoras que mejoren la susceptibilidad de las células leucémicas al sistema inmune. Una de las terapias propuestas consiste en el trasplante de células NK alogénicas las cuales mantienen sus propiedades citotóxicas permitiendo el

reconocimiento de las células leucémicas (Lim y col., 2015). Otras estrategias alternativas están basadas en la modulación directa o indirecta de la actividad de las células NK del paciente con LMA (Lion y col., 2012). La modulación directa radica en el uso de diversas citocinas (IFN- α , IL15), en el bloqueo de la citocina TNF- β o en el uso de anticuerpos frente a los receptores KIR para potenciar la actividad de las células NK. La modulación indirecta permite potenciar el reconocimiento inmunológico mediado por las células NK aumentando la presentación antigénica de las células dendríticas derivadas de la LMA, o aumentando la expresión e inhibiendo la liberación de los ligandos de los receptores de activación de las células NK, como de NKG2D, objetivo principal de esta tesis doctoral.

4.2.- Expresión y liberación de los NKG2DL

La ausencia del reconocimiento inmunitario mediado por la interacción NKG2D-NKG2DL en la LMA, puede ser provocada por una disminución de la expresión de los NKG2DL en la superficie de los blastos mieloides o por un incremento de la liberación de los ligandos en su forma soluble.

Pende y col. (Pende y col., 2005) mostraron por primera vez que mientras los ligandos del receptor de activación DNAM-1 (Nectin-2, PVR) se expresan frecuentemente en pacientes con LMA, los NKG2DL (MICA, MICB, ULBPs 1-3) no se expresan o lo hacen a muy bajos niveles. Estos resultados fueron posteriormente confirmados observándose que la expresión de las ULBPs 1-3 es nula o muy baja en el 80% de los pacientes con LMA (Nowbakht y col., 2005). Además, la expresión de los NKG2DL varía entre los diferentes subtipos (clasificación de la FAB) siendo escasa en los subtipos M1-M3 mientras que en los subtipos monocíticos (M4-M5) se expresan frecuentemente (Diermayr y col. 2008). A pesar de esto, algunos estudios revelaron resultados opuestos observando que la expresión de los ligandos de NKG2D entre los pacientes con LMA es heterogénea tanto a nivel transcripcional como en la superficie celular, siendo MICA el ligando que se expresa con mayor frecuencia (Salih y col., 2003). Estudios posteriores determinaron que MICA y MICB se expresan en el 50% de

los pacientes con LMA (Sánchez-Correa y col. 2011). Quizá el estudio más importante realizado hasta la fecha en pacientes con LMA, debido al gran tamaño muestral, es el realizado por Hilpert y col. (Hilpert y col., 2012) donde a pesar de la expresión altamente heterogénea de los ligandos de NKG2D en blastos mieloides, el 70% de los pacientes expresan al menos un NKG2DL siendo MICA el ligando más frecuente mientras que ULBP2 es el menos abundante.

Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre con la expresión de los NKG2DL en la superficie celular, está claramente aceptado que los NKG2DL están presentes en altos niveles en el suero de pacientes con LMA. Salih y col. (Salih y col., 2003) observaron por primera vez que MICA y MICB se liberan en su forma soluble al suero de pacientes diagnosticados con LMA. Posteriores estudios confirmaron que los niveles de todos los ligandos solubles, excepto ULBP1, son significativamente superiores en el suero de pacientes con LMA respecto a controles sanos y que el 90% de estos pacientes liberaban al menos un ligando en su forma soluble (Diermayr y col., 2008; Hilpert y col., 2012). La presencia de estos ligandos solubles se traduce en una disminución significativa de la expresión del receptor NKG2D en las células NK de pacientes con LMA y por lo tanto impide el reconocimiento inmunológico de los blastos mieloides. Estudios en profundidad son necesarios para determinar la importancia funcional de estos NKG2DL solubles en la progresión de la LMA.

4.3.- Estrategias terapéuticas dirigidas a potenciar la interacción NKG2D-NKG2DL.

Potenciar la interacción de NKG2D con sus ligandos facilitará el reconocimiento inmunológico de las células tumorales, y por lo tanto su progresión. Por ello, numerosas estrategias terapéuticas, como el uso de agentes quimioterapéuticos, la inhibición de las MPs o tratamientos epigenéticos, están siendo dirigidas a potenciar la expresión de los NKG2DL o bloquear la liberación de sus formas solubles en diversos tipos tumorales, incluida la LMA.

4.3.1.- Agentes quimioterapéuticos

Se ha descrito que algunos agentes quimioterapéuticos pueden modular la presencia de los NKG2DL en la superficie celular incrementando su expresión. Así el bortezomib, un inhibidor del proteasoma aprobado para el tratamiento del mieloma múltiple, incrementa la expresión de MICA, MICB, ULBP1 y de otros ligandos de activación como Nectin-2 y PVR en la superficie celular incrementando la citotoxicidad mediada por células NK y $\gamma\delta$ T (Fernández-Messina y col., 2016; Niu y col., 2017). Recientemente, se ha publicado que diversos agentes quimioterapéuticos (citocalasadina D, nocodazol, docetaxel) producen hiperploída lo que conduce a un incremento de la expresión de los ligandos de NKG2D y DNAM-1 favoreciendo el reconocimiento inmunológico de las células tumorales (Acebes-Huerta y col, 2016).

Otros agentes quimioterapéuticos modulan la presencia de los NKG2DL a través de la inhibición de las MPs y, por lo tanto, de la liberación de los ligandos en su forma soluble. Las antraciclinas, epirubicina y doxorubicina, utilizadas como tratamiento en hepatocarcinoma, inhiben la expresión de ADAM10 en líneas celulares (HepG2 y PLC/PRF/5) disminuyendo la liberación MICA en su forma soluble y, por lo tanto, incrementado su expresión en la superficie celular (Kogha y col., 2009). El sorafenib, un inhibidor del angiogénesis capaz de incrementar la supervivencia en pacientes con hepatocarcinoma, también produce una disminución de MICA soluble como consecuencia de la disminución de la expresión de la proteasa ADAM9 (Kohga y col., 2010).

4.3.2.- Inhibición de las MPs

El bloqueo de la actividad de las MPs con inhibidores específicos ha sido sugerido como una prometedora estrategia terapéutica dirigida a bloquear la liberación de los ligandos de NKG2D, principalmente MICA, MICB y ULBP2, en su forma soluble con el fin de potenciar la inmunidad antitumoral. Inhibidores de amplio espectro de las MMPs, MMPI II y MMPI III, son capaces de reducir la liberación de MICA y ULBP2 en

células transfectadas C1R-MICA y C1R-ULBP2 (Yamanegi y col., 2012; Waldahuer y col., 2006). La inhibición farmacológica de MMP9 en la línea celular NUGC-3 de cáncer gástrico aumenta la expresión de MICA, MICB y de ULBP2 en la membrana celular y disminuye la liberación de éstos en su forma soluble (Shiraishi y col., 2016). Además, se ha observado una correlación inversa entre la expresión de MMP9 y la expresión de MICA, MICB y ULBP2 en estas células. El tratamiento con inhibidores específicos de ADAM10 (GW280264X) y ADAM17 (y GI254023X) reduce la liberación de MICA soluble en las células transfectadas C1R-MICA (Waldhuer y col., 2008). Adicionalmente, el BB94 (Batismatat), inhibidor de MMPs y ADAMs, es capaz de reducir la liberación de MICA, MICB y ULBP2 (Waldahuer y col., 2006; Boutet y col., 2009; Waldahuer y col., 2008). Sin embargo, la principal desventaja del uso de estos inhibidores farmacológicos es que se trata de inhibidores de amplio espectro lo cual dificulta su posterior uso en clínica como agentes antitumorales.

Los TIMPs (*Tissue inhibitors of metalloproteinases*) son inhibidores endógenos de las MPs que regulan la actividad de estas durante el remodelamiento de la matriz extracelular (Baker y col., 2002). Se conocen cuatro miembros de TIMPs (TIMP1, TIMP2, TIMP3 y TIMP4) pero únicamente TIMP1 y TIMP3 son capaces de inhibir MPs implicadas en la liberación de los NKG2DL, aunque lo hacen con diferente afinidad. Mientras TIMP1 es un inhibidor de baja afinidad de MMP9, MMP14 y ADAM10; TIMP3 es un potente inhibidor de MMP9, ADAM10 y de ADAM17 (Bourboulia y col., 2010; Brew y col., 2010). TIMP1 es capaz de modular las MPs involucradas en la liberación de MICA, MICB y ULBP2, pero su papel directo en la producción de los ligandos solubles es aún desconocido. Sin embargo, se ha visto que la adición de TIMP3 exógeno al medio de cultivo en células transfectadas con MICB reduce la liberación de este ligando al medio extracelular (Boutet y col., 2009). Por lo tanto, conocer los mecanismos de regulación de TIMP3 podría ser de gran utilidad en el diseño de nuevas estrategias terapéuticas que bloqueen la liberación de los ligandos solubles de NKG2DL.

4.3.3.- Drogas epigenéticas

Se ha descrito que diferentes drogas epigenéticas que modulan la acetilación de histonas y la metilación del ADN regulan tanto la expresión como la liberación de los NKG2DL en diversos tumores. Inhibidores de histona deacetilasas como el valproato sódico disminuyen la expresión de la MMP9, incrementando la presencia de MICA y MICB en la superficie de células de osteosarcoma y disminuyendo su liberación al medio extracelular (Yamanegi y col., 2012).

El tratamiento con tratamientos hipometilantes (AZA, DAC) solo o en combinación con otros tratamientos (tricotatina A, vitamina D3, briostatina, factores de crecimiento mieloides...) induce la expresión de MICA, MICB y ULBPs 1-3 en la superficie de líneas celulares leucémicas (HL60, K562, Raji) y en cultivos primarios de blastos mieloides (Rohner y col., 2007; Schmiedel y col., 2011; Tang y col., 2008). Además, algunos autores han sugerido que el incremento en la expresión de los ligandos MICA, MICB, ULBP1 y ULBP3 tras el tratamiento con DAC en la línea celular HL60 puede ser debido a la inhibición de la vía JAK/STAT3 (Zhu y col., 2015). Todos estos datos indican que los inhibidores de las DNMTs, azacitidina y decitabina, causan un incremento de los NKG2DL en la superficie de células tumorales promoviendo el reconocimiento inmunológico mediado por las células NK.

Adicionalmente, tratamiento con otros agentes remodeladores de la cromatina, como inhibidores de HDACs (valproato sódico, tricotatina A), también inducen la expresión de MICA, MICB, ULBP1 y ULBP2 en líneas celulares de leucemia y en cultivos primarios de pacientes con LMA incrementando la capacidad lítica de las células NK (Kato y col., 2007; Diermayr y col., 2008; Lu y col., 2010). Estudios en líneas celulares de otros tipos tumorales (carcinoma renal, mieloma, sarcoma, cáncer de ovario...) muestran que la inhibición de las HDACs también produce un incremento de la expresión de MICA, MICB y las ULBPs 1-3 (López-Soto y col., 2009; Huan y col., 2011; Yang y col., 2013; Wu y col., 2012; Berghuis y col., 2012). Además de producir un incremento en la expresión de los NKG2DL, el tratamiento con inhibidores de HDACs (ácido transretinoico, valproato sódico) produce una disminución de la liberación de

MICA, ULBP2 y ULBP3 tanto en líneas celulares como en cultivos primarios de LMA (Poggi y col., 2009). Otro agente hipometilante, hidralazina, en combinación con valproato sódico, reduce la liberación de MICA y MICB promoviendo la expresión de éstos en la membrana de líneas celulares de cáncer de mama y próstata (Chávez-Blanco y col., 2011).

El incremento de la expresión de los NKG2DL en la membrana celular tras el tratamiento con agentes remodeladores de la cromatina sugiere que los mecanismos epigenéticos juegan un papel muy importante en la regulación de los ligandos durante el desarrollo tumoral. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para determinar los mecanismos de acción de estos tratamientos e identificar sus dianas específicas.

III. OBJETIVOS

El sistema inmune innato, y en particular las células *Natural Killer* (NK) tienen un papel esencial en el control del desarrollo tumoral. En concreto, la interacción entre el receptor activador NKG2D y sus ligandos (MICA, MICB y ULBPs 1-6) ha sido propuesta como clave para promover la actividad de las células NK frente a los tumores. Sin embargo, las células tumorales han desarrollado diversas estrategias para evitar este reconocimiento inmune tales como una reducida expresión de los ligandos de NKG2D (NKG2DL) en la superficie celular o la liberación de estos al medio extracelular como moléculas solubles. Por lo tanto, las estrategias terapéuticas actuales están siendo dirigidas a incrementar la expresión de los NKG2DL e impedir su liberación mediante el uso de diversos fármacos entre los que se encuentran los tratamientos epigenéticos.

El uso de agentes hipometilantes ha supuesto en los últimos años una revolución en el tratamiento de diversos tumores. En concreto, en la leucemia mieloide aguda y síndromes mielodisplásicos donde la supervivencia es muy reducida, siendo los resultados observados enormemente esperanzadores. Por lo tanto, elucidar los efectos que la metilación del ADN y el tratamiento con agentes hipometilantes tienen en la regulación de los NKG2DL podría ser de gran relevancia para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que favorezcan el reconocimiento inmune mediado por la interacción NKG2D-NKG2DL.

En consecuencia, y como objetivo principal de esta Tesis Doctoral, nos planteamos estudiar la implicación que los tratamientos desmetilantes tienen en la regulación de los NKG2DL y su contribución al reconocimiento inmunológico en el contexto de la leucemia mieloide aguda. Los objetivos específicos de este trabajo han sido:

- 1.- Caracterizar el patrón de expresión de los ligandos de NKG2D en diversos tumores hematológicos y sólidos, y determinar la implicación que la metilación del ADN tiene en la regulación de su expresión.

2.- Analizar el efecto de los tratamientos desmetilantes (AZA y DAC) en la liberación de los NKG2DL en su forma soluble e identificar los mecanismos moleculares implicados.

3.- Evaluar las consecuencias funcionales, *in vitro* e *in vivo*, que los tratamientos con agentes hipometilantes tienen en la expresión y liberación de los NKG2DL, y en el reconocimiento inmune mediado por células NK.

IV. RESULTADOS

Trabajos publicados:

Artículo 1: “Methylation of NKG2D ligands contributes to immune system evasion in acute myeloid leukemia.”

Baragaño Raneros A, Martín-Palanco V, Fernandez AF, Rodriguez RM, Fraga MF, Lopez-Larrea C, Suarez-Alvarez B.

Genes Immun. 2015; 16: 71-82.

Factor de Impacto (WoS): 2.472

Categoría / Especialidad (WoS): Cuartil 3 (Q3), Inmunología.

Artículo 2: “Secretory pathways generating immunosuppressive NKG2D ligands: New targets for therapeutic intervention.”

Baragaño Raneros A, Suarez-Álvarez B, López-Larrea C.

Oncimmunology. 2014; 3:e28497.

Factor de Impacto (WoS): 7.64

Categoría / Especialidad (WoS): Cuartil 1 (Q1), Oncología.

Artículo 3: “Increasing TIMP3 expression by hypomethylating agents diminishes soluble MICA, MICB and ULBP2 shedding in acute myeloid leukemia, facilitating NK cell-mediated immune recognition.”

Baragaño Raneros A, Minguela Puras A, Rodriguez RM, Colado E, Bernal T, Anguita E, Vasco Mogorron A, Chaparro Gil A, Vidal-Castiñeira JR, Márquez-Kisinousky L, Díaz Bulnes P, Martinez Marin A, García Garay MC, Suárez-Álvarez B, López-Larrea C.

Oncotarget. 2017 Mar 29. doi: 10.18632/oncotarget.16657.

Factor de Impacto (WoS): 5.009

Categoría / Especialidad (WoS): Cuartil 1 (Q1), Oncología.

En los trabajos incluidos en esta tesis doctoral se han utilizado diversas líneas celulares tumorales para los estudios *in vitro*, así como muestras biológicas de pacientes con leucemia mieloide aguda procedentes del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Central de Asturias y del Hospital Reina Sofía de Córdoba, así como del Servicio de Inmunología del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia, del Servicio de Hematología del Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena y del Servicio de Hematología del Hospital Puerta del Hierro de Madrid. Las muestras de pacientes diagnosticados de cáncer de colon proceden del Hospital Puerta de Hierro de Madrid y los controles sanos han sido derivados desde el Centro Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias y desde el Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia (**Tabla 6**).

Trabajo	Material Biológico
<p>Artículo 1:</p> <p>Methylation of NKG2D ligands contributes to immune system evasion in acute myeloid leukemia</p>	<p>Líneas celulares:</p> <ul style="list-style-type: none"> - LMA: HL60, KG1A, NB4, HELR, MV4-11, MOLM-13, KASUMI-1. - LLA: RS411, KOPN8, JURKAT, REH. - Hepatocarcinoma: HUH7, SNU354, ALEX, SNU368. - Cáncer de colon: SW480, SW620, HCT116, HT29, RKO. - Células NK: NKL <p>Muestras de pacientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ADN de controles sanos (n=25) procedentes del Centro de Comunitario de Sangre y Tejidos de Asturias. ADN de pacientes con LMA (n=60) diagnosticados en el Hospital Reina Sofía de Córdoba. - ADN de muestras pareadas de tejido normal y tumoral de pacientes diagnosticados con cáncer de colon (n=44) procedentes del Hospital Puerta de Hierro, Madrid.
<p>Artículo 3:</p> <p>Increasing TIMP3 expression by hypomethylating agents diminishes soluble MICA, MICB and ULBP2 shedding in acute myeloid leukemia, facilitating NK cell-mediated immune recognition</p>	<p>Líneas celulares:</p> <ul style="list-style-type: none"> - LMA: KG1A, NB4 <p>Muestras de pacientes:</p> <ul style="list-style-type: none"> - ADN de médula ósea de controles sanos (n=25) y pacientes con LMA (n=90) procedentes del Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia y del Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena de Murcia. - Sueros de pacientes con LMA antes y después del tratamiento con Vidaza® (n=12) procedentes del Hospital Universitario Central de Asturias. - Células de médula ósea de pacientes con LMA antes y después del tratamiento con Vidaza® (n=5) procedentes del Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

Tabla 6. Material biológico utilizado en la presente Tesis Doctoral. LMA: leucemia mieloide aguda; LLA: leucemia linfocítica aguda.

1. LA METILACIÓN DEL ADN EN LOS NKG2DL CONTRIBUYE A LA EVASIÓN DEL SISTEMA INMUNE EN LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA

ANTECEDENTES: Las células NK son componentes del sistema inmune innato esenciales en la inmunovigilancia del cáncer. La actividad de las células NK está regulada por un balance exhaustivo entre los receptores de activación y de inhibición expresados en su superficie celular que reconocen ligandos específicos presentes en la célula diana. NKG2D es uno de los principales receptores de activación de las células NK, que también se expresa en células NKT, $\gamma\delta$ T, $\alpha\beta$ CD8⁺, y el cual es capaz de reconocer múltiples ligandos como MICA, MICB y ULBPs 1-3, entre otros. La expresión de estos ligandos es reducida o ausente en condiciones normales, pero se induce durante el desarrollo tumoral favoreciendo el reconocimiento del tumor por células inmunes. A pesar de ello, las células tumorales han desarrollado diversos mecanismos para reducir la expresión de los NKG2DL y con ello evadir la respuesta inmunológica. Como consecuencia de ello, numerosas estrategias terapéuticas están siendo dirigidas a incrementar la expresión de los NKG2DL en la superficie de las células tumorales para facilitar la interacción NKG2D-NKG2DL y la eliminación del tumor por las células inmunes citotóxicas.

Además, durante el desarrollo del tumor, los mecanismos que controlan la metilación del ADN pueden estar desregulados desencadenando la sobreexpresión de oncogenes o la inhibición de genes supresores tumorales. De hecho, tratamientos con agentes desmetilantes (azacitidina y 5-aza-2'-deoxicitidina) son actualmente utilizados en la práctica clínica para el tratamiento de pacientes con síndromes mielodisplásicos y LMA. Por lo tanto, en este trabajo nos planteamos analizar la implicación que la metilación del ADN tiene en la regulación de la expresión de los NKG2DL en diversas patologías tumorales, y especialmente en la LMA.

Artículo 1: "Methylation of NKG2D ligands contributes to immune system evasion in acute myeloid leukemia." **Baragaño Raneros A**, Martín-Palanco V, Fernandez AF, Rodriguez RM, Fraga MF, Lopez-Larrea C, Suarez-Alvarez B. *Genes Immun.* 2015; 16: 71-82.

RESUMEN: En este trabajo se analizó el perfil de expresión de los NKG2DL en diferentes líneas celulares procedentes de tumores de origen hematológico (LMA, leucemia linfocítica aguda) y epitelial (hepatocarcinoma, cáncer de mama y cáncer de colon). Se observó una gran heterogeneidad en la expresión de los NKG2DL en los diferentes tipos tumorales siendo mucho más reducida en tumores hematológicos. El análisis del patrón de metilación de los NKG2DL mediante la técnica de pirosecuenciación mostró que estos genes están hipermetilados en al menos alguna línea celular, excepto MICB que se encuentra hipometilado o parcialmente metilado en todas. Sin embargo, la mayor frecuencia en la metilación de los NKG2DL se observó en las líneas celulares de LMA. El análisis de metilación de los NKG2DL en pacientes diagnosticados de LMA (n=60) mostró que los niveles de metilación en *MICA* y las *ULBPs 1-3* son significativamente incrementados respecto a controles sanos (n=25). Por el contrario, los NKG2DL se encuentran hipometilados en muestras pareadas de tejido normal y tumoral de pacientes con cáncer de colon (n=44) sugiriendo que la metilación de los NKG2DL podría ser un hecho característico de la LMA. Debido a que la metilación del ADN es un mecanismo reversible, se demostró que el tratamiento con inhibidores de las DNMTs (AZA, DAC) restaura la expresión de los NKG2DL en la superficie celular favoreciendo el reconocimiento inmune y la lisis de la célula tumoral por las células citotóxicas NK y linfocitos T CD8⁺.

CONCLUSIONES: Los resultados de este trabajo muestran por primera vez que la metilación del ADN es un mecanismo clave en la regulación y silenciamiento de los NKG2DL durante el desarrollo de la LMA. El tratamiento con agentes hipometilantes contribuye a restaurar la expresión de los NKG2DL en la superficie tumoral, favoreciendo el reconocimiento y la lisis de los blastos mieloides por las células inmunes positivas NKG2D e impidiendo la progresión tumoral. Además, la cuantificación de los niveles de metilación de los NKG2DL por técnicas sencillas como la pirosecuenciación, podría ser de gran relevancia para determinar el grado de evolución tumoral en la LMA.



ORIGINAL ARTICLE

Methylation of NKG2D ligands contributes to immune system evasion in acute myeloid leukemia

A Baragaño Raneros¹, V Martín-Palanco², AF Fernandez³, RM Rodriguez¹, MF Fraga³, C Lopez-Larrea^{1,4,6} and B Suarez-Alvarez^{5,6}

Engagement of the activating receptor NKG2D (natural killer group 2 member D) with its ligands (NKG2DL) major histocompatibility complex class I related-A and -B (MICA/B), UL-16 binding protein families (ULBPs 1–6) is important to ensure the innate immunity to tumor cells. However, these cells have developed strategies to downregulate NKG2DL expression and avoid immune recognition. We demonstrate that DNA methylation can contribute to the absence of NKG2DL expression during tumor progression. We analyzed the DNA methylation profiles for each NKG2DL by pyrosequencing in acute myeloid leukemia (AML), acute lymphocytic leukemia (ALL), hepatocellular carcinoma (HC), breast cancer and colon cancer cell lines. High levels of DNA methylation for NKG2DL were found in some tumor cell lines, mainly in AML cells. This hypermethylation was correlated with the absence of transcription for NKG2DL. Higher DNA methylation levels for *MICA*, *ULBP1* and *ULBP2* were observed in AML patients ($n=60$) compared with healthy donors ($n=25$). However, no DNA methylation for NKG2DL was found in colon cancer patients ($n=44$). Treatment with demethylating agents (5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine) restored the expression of NKG2DL on the cell surface of AML cells, leading to an enhanced recognition by NKG2D-expressing cells. Our data suggest that NKG2DL may be aberrantly silenced by DNA methylation as a consequence of tumor development in AML patients.

Genes and Immunity (2015) 16, 71–82; doi:10.1038/gene.2014.58; published online 13 November 2014

INTRODUCTION

Natural killer (NK) cells are components of the innate immune system that have an important role in antitumor immunity to tumor cells.¹ NK cell-mediated cytotoxicity is regulated by a tight balance between inhibiting and activating receptors that recognize ligands expressed on the surface of tumor cells. One of these activating receptors is the NK group 2 member D (NKG2D), which is mainly expressed in NK, NKT, $\gamma\delta$ T and $\alpha\beta$ CD8⁺ T cells.² NKG2D recognizes different ligands in humans: major histocompatibility complex class I related-A and -B (MICA and MICB) and UL-16 binding protein families (ULBPs 1–6).^{3,4} Under physiological conditions, the expression of NKG2D ligands (NKG2DLs) is absent or present at very low levels in most cell types. Nevertheless, during cancer development, the activation of the DNA damage pathway (ATM/ATR pathway), transcription factors such as nuclear factor- κ B or several oncogenes (BCR/ABL, c-myc, p53 and so on) can enhance NKG2DL expression on the cell surface, making tumor cells susceptible to recognition and killing by NKG2D-positive cells.^{5–8}

Malignant cells have developed diverse strategies to avoid NKG2D-mediated immune recognition. One of the most widely studied mechanisms is the shedding of NKG2DL, which consists of the release of soluble NKG2DL from the cell surface of tumor cells by proteolytic cleavage. These soluble molecules are able to bind to the NKG2D receptor and induce their endocytosis, thereby impairing responsiveness to tumor cytolysis.^{9–11} Several metalloproteinases (matrix metalloproteinases and a disintegrin and

metalloproteinase families) are involved in shedding MICA, MICB or ULBP2, whereas ULBP3 is released from the cell surface, especially in exosomes.^{12–17} Additional mechanisms, such as the presence of endoplasmic reticulum proteins (ERp5 and GRP78), which are involved in the protein folding or the palmitoylation of MICA that enables the recruitment to detergent-resistant membranes, are also involved in MICA shedding.^{18–20} Release of NKG2DL from the cell surface of tumor cells has been used in the diagnosis and prognosis of several malignancies.²¹

Current antitumor therapy studies tend to focus on increasing NKG2DL expression in cancer cells to enhance their susceptibility to lysis mediated by NKG2D-positive cytotoxic cells. Azacytidine (5-azacytidine (5azaC)) and decitabine (5-aza-2'-deoxycytidine (DAC)) are DNA methyltransferase (DNMT) inhibitors (DNMTi) currently used to treat patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia (AML).²² Previous studies in cell lines showed that both reagents enhance the cell surface expression of NKG2DL, alone or in combination with differentiation-promoting agents in tumor cells.^{23–25} Moreover, combined treatment with histone deacetylase inhibitors, not only induce NKG2DL expression but also blocks the release of soluble NKG2DL in several types of cancer cell.^{26–34} All these observations suggest that NKG2DL expression may be regulated by chromatin remodeling in tumor cells. In fact, high levels of ULBP2 expression were found in defective DNMTs colon cancer cells suggesting that this ligand could be regulated by DNA methylation.³⁵ However, an in-depth study of the DNA methylation profile for NKG2DL regulation has not yet been performed.

¹Department of Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain; ²Area of Cell Therapy, Hospital Reina Sofía, Córdoba, Spain; ³Cancer Epigenetics Laboratory, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA-HUCA), Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain; ⁴Fundación Renal 'Iñigo Álvarez de Toledo', Madrid, Spain and ⁵Cellular Biology of Renal Diseases Laboratory, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma Madrid, Madrid, Spain. Correspondence: Dr B Suarez-Alvarez, Cellular Biology of Renal Diseases Laboratory, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Avda Reyes Católicos, 2, Madrid 28040, Spain or Dr C López-Larrea, Department of Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias, c/ Celestino Villamil s/n, Oviedo 33006, Spain. E-mail: beatriz.suarez@fjd.es or inmuno@hca.es

⁶CL-L and BS-A share senior authorship.

Received 12 March 2014; revised 3 September 2014; accepted 24 September 2014; published online 13 November 2014

In this study, we demonstrate that promoter regions of NKG2DL are aberrantly methylated in tumor cell lines, mainly in AML cell lines. In primary samples from AML patients, *MICA*, *ULBP1* and *ULBP2* DNA methylation levels are significantly higher than in healthy donors. However, all NKG2DL were found to be hypomethylated in colon cancer patients. Treatment of tumor cells with hypomethylating reagents (5azaC and DAC) increases NKG2DL expression on the cell surface, making them more susceptible to recognition and lysis by NKG2D-mediated NK cells.

RESULTS

NKG2DL expression is highly heterogeneous in hematological and solid tumor cells

We studied the expression profile of each NKG2DL (*MICA*, *MICB*, *ULBP1*, *ULBP2* and *ULBP3*) by quantitative real-time PCR in several

human cell lines derived from hematological (AML and acute lymphocytic leukemia (ALL)) and solid tumors (hepatocellular carcinoma (HCC), breast and colon). We observed that NKG2DL expression was highly heterogeneous among cell lines (Figure 1a). *MICA* and *MICB* transcripts were detected in most cell lines, although at different levels. *ULBP* expression was more restricted, mainly in the case of *ULBP3*, except in colon cancer cell lines, in which high levels of transcription for this ligand were found. At least one ligand was expressed in all cell lines. However, depending on their origin, the frequencies of the combined expression of two or more NKG2DL in cancer cell lines differed (Figure 1b). So, although all solid tumor (HCC, breast cancer and colon cancer) cell lines expressed two or more NKG2DL, their combined expression was less frequent in hematological cells. More than 25% of AML and ALL cell lines only expressed *MICB*, implying that the absence of one or more ligands is a common characteristic of hematological tumor cells.

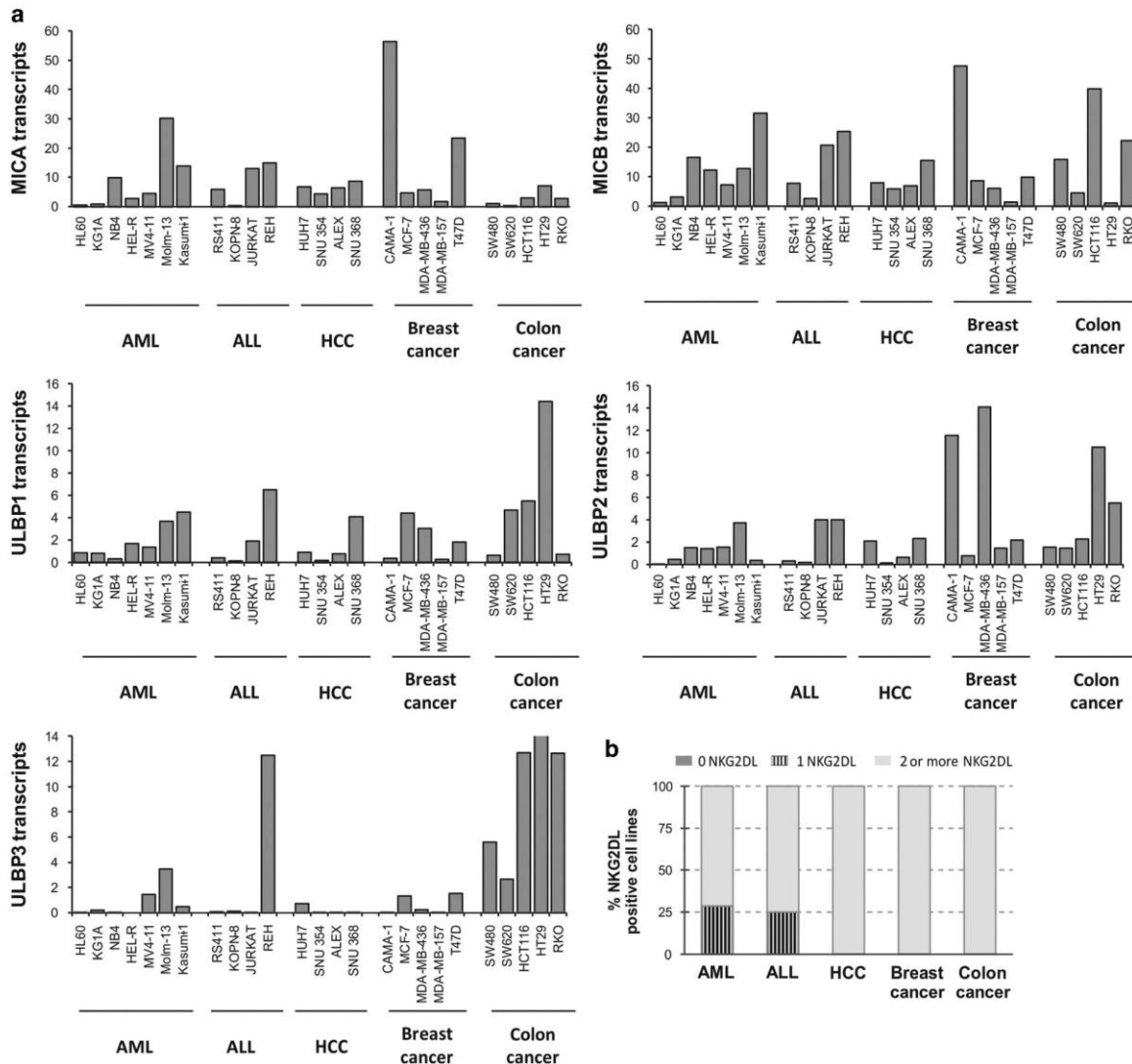


Figure 1. Expression profile of NKG2DL in tumor cell lines. (a) Transcription levels of *MICA*, *MICB*, *ULBP1*, *ULBP2* and *ULBP3* were analyzed by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in AML, ALL, HCC, breast cancer and colon cancer cell lines. Each bar represents the relative expression of each gene, normalized with respect to the housekeeping gene glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). Relative mRNA abundance was determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (ΔCt : Ct gene test – Ct endogenous control), and results are summarized as the mean \pm s.d. of three independent experiments. (b) The lower right histogram illustrates the frequency of NKG2DL expression in each tumor type.

Hypermethylation of *MICA*, *ULBPs 1–3* genes is associated with the absence of transcription

In view of these findings, we postulated that epigenetic mechanisms such as DNA methylation could contribute to the lack of NKG2DL expression in tumor cells. For this reason, we analyzed DNA methylation patterns by the bisulfite-sequencing method. We selected a regulatory region around the transcription start site that contained 23 CpGs sites located from -453 to -53 bp for *MICA*, 30 CpGs (-339 to $+94$ bp) for *MICB*, 34 CpGs (-493 to -88 bp) for *ULBP1*, 18 CpGs (-246 to -15 bp) for *ULBP2* and finally, 38 CpGs (-222 to $+174$ bp) for *ULBP3* (Figure 2).

Firstly, to study whether changes in the DNA methylation level could involve changes in expression level, we examined two cell lines with different transcription levels for each NKG2DL. High levels of DNA methylation were detected in cell lines lacking NKG2DL transcription (*MICA*, *ULBP2* and *ULBP3* in HL60 cells, and *ULBP1* in NB4 cells). In contrast, and as expected, cell lines with high levels of transcription for these ligands were completely unmethylated (*MICA* and *ULBP2* in HEL-R cells, *ULBP1* in MOLM-13 cells and *ULBP3* in MV4;11 cells). For *MICB*, we assayed two cell lines with differing transcription levels (HEL-R and HL60). A close correlation between methylation and transcription levels for this gene was not found, suggesting that *MICB* expression is not regulated by DNA methylation.

Consistent with these results, we determined the specific DNA methylation level for *MICA*, *MICB* and *ULBPs 1–3* genes in all cell lines by bisulfite pyrosequencing. This technique enables rapid and straightforward quantification of DNA methylation. All NKG2DL were highly methylated ($>60\%$) in at least one cell line: *MICA* in HL60 and KG1A cell lines, *ULBP1* in NB4 and RS411, *ULBP2* in HL60, and *ULBP3* in HL60, NB4 and CAMA-1 cells (Table 1). Moreover, high DNA methylation levels were closely associated with a lack of transcription for *MICA*, *ULBP1*, *ULBP2* and *ULBP3* ligands in these cells. However, only partial DNA methylation (35–60%) of *MICB* was observed in KG1A, NB4, HEL-R and HT29 cell lines. Thus, our results imply that DNA methylation may contribute to the lack of expression of NKG2DL in tumor cells.

NKG2DL are methylated in primary AML but not in colon cancer samples

To determine whether the NKG2DL methylation pattern observed in AML cell lines is similar in primary AML samples, we quantified the DNA methylation levels for NKG2DL in peripheral blood lymphocytes (PBLs) isolated from AML patients ($n=60$) using the bisulfite pyrosequencing technique. All PBLs samples from AML patients showed $\geq 70\%$ myeloid blasts. As controls, we used PBLs isolated from healthy donors ($n=25$). To establish the appropriate control sub-population, we analyzed the expression and methylation pattern for each NKG2DL in the cell sub-populations isolated

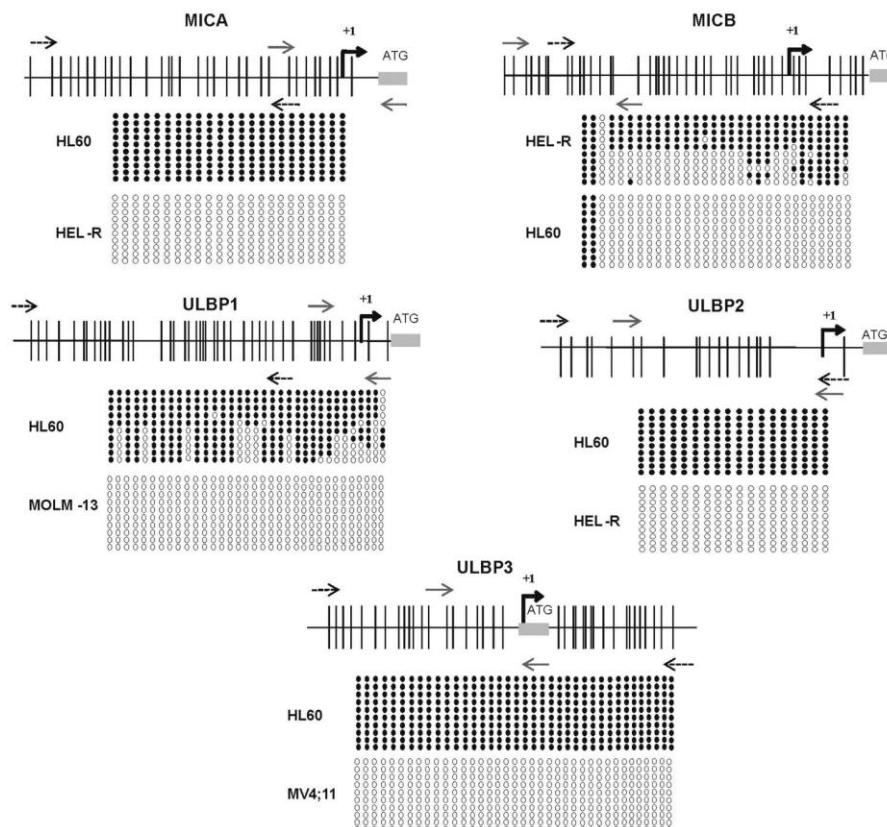


Figure 2. Different DNA methylation patterns for NKG2DL with respect to transcription levels. The DNA methylation patterns of NKG2DL (*MICA*, *MICB*, *ULBP1*, *ULBP2* and *ULBP3*) genes were analyzed by bisulfite sequencing. Diagrams illustrate the genomic region surrounding the transcriptional start site (TSS, thick arrow) analyzed in each NKG2DL. The thin vertical line indicates CpG positions. Bisulfite-sequencing and pyrosequencing primers are shown by dashed and dotted lines, respectively. The DNA methylation profile for each NKG2DL was determined in two tumor cell lines with different levels of expression for these ligands by bisulfite sequencing. Ten individual clones were sequenced for each cell line. Open and filled circles represent unmethylated and methylated CpGs, respectively.

Table 1. Methylation profile of NKG2DL genes in cancer cell lines

Cell lines	% DNA methylation				
	MICA	MICB	ULBP1	ULBP2	ULBP3
<i>Acute myeloid leukemia</i>					
HL60	91.7	1.6	46.4	66.9	71.1
KG1A	90.9	55.3	46.6	30.0	10.0
NB4	29.3	56.1	82.7	21.5	92.7
HEL-R	4.4	35.2	0.0	5.9	30.3
MV4-11	3.0	6.6	10.2	15.5	2.5
MOLM-13	2.6	2.3	21.4	13.8	2.2
KASUMI-1	1.5	6.0	2.5	11.8	1.7
<i>Acute lymphocytic leukemia</i>					
RS411	7.5	3.8	74.3	20.4	27.3
KOPN-8	2.0	1.7	57.3	53.8	9.4
JURKAT	5.2	1.4	8.3	6.3	47.5
REH	2.4	2.7	36	22.4	5.2
<i>Hepatocellular carcinoma</i>					
HUH7	23.2	4.1	27.6	2.5	2.7
SNU354	2.4	1.5	52.3	23.5	21.7
ALEX	2.0	2.6	19.7	3.4	19.1
SNU38	1.0	2.3	3.6	5.7	57.4
<i>Breast cancer</i>					
CAMA-1	1.5	0.4	3.8	4.5	69.6
MCF-7	2.5	1.6	9.1	7.5	2.5
MDA-MB-436	1.2	16.4	3.5	6.5	14.1
MDA-MB-157	1.6	2.2	13.0	13.5	3.1
T47D	2.8	3.1	6.6	8.0	5.2
<i>Colon cancer</i>					
SW480	1.7	1.2	4.0	1.8	1.6
SW620	1.2	1.6	2.4	3.0	1.3
HCT116	2.2	1.2	8.1	2.9	1.1
HT29	1.6	42.2	5.0	1.7	1.2
RKO	1.5	3.2	5.4	2.3	0.9

Abbreviations: NKG2DL, natural killer group 2 member D ligand; MICA, major histocompatibility complex class I related-A; ULBP, UL-16 binding protein family. NKG2DL with >60% DNA methylation are in bold.

from peripheral blood (monocytes, lymphocytes and granulocytes) (Figure 3). Monocytes and granulocytes had different NKG2DL expression levels in healthy donors, whereas all lymphocytes lacked NKG2DL expression. However, NKG2DL were fully demethylated in all cell types, and unmethylated in subsets of CD4+ and CD8+ T lymphocytes, B cells and NK cells (results not shown). Therefore, we concluded that PBLs from healthy controls are an appropriate control population because all NKG2DL are unmethylated independently of the expression. Thus, the presence of DNA methylation for NKG2DL in AML patients can only be due to tumor cells.

Quantification of DNA methylation for each NKG2DL showed that all ligands were more strongly methylated in AML patients compared with healthy controls (Figure 4a). The percentage DNA methylation levels for MICA, ULBP1 and ULBP2 were significantly higher in AML patients than in healthy controls (MICA: $6.13 \pm 9.02\%$ vs $0.89 \pm 0.16\%$; ULBP1: $7.06 \pm 6.98\%$ vs $1.96 \pm 0.38\%$; ULBP2: $31.65 \pm 24.97\%$ vs $3.34 \pm 2.28\%$; $P < 0.001$). DNA methylation of MICB and ULBP3 was also higher in AML patients, although the difference was not statistically significant. We found no significant differences in comparisons of the DNA methylation levels of NKG2DL in 44 paired normal and tumor tissues from colon cancer patients. NKG2DL were unmethylated in all tumor samples according to the results previously found in colon cancer cell lines.

In AML patients, an aberrant DNA hypermethylation level of NKG2DL was defined as that for levels higher than the median \pm s.d. Accordingly, the established density cutoffs were 12.5% for MICA, 11% for MICB and ULBP1, 54% for ULBP2 and 12% for ULBP3. 59% of patients showed hypermethylation of at least one NKG2DL, the combination of methylated ligands varying considerably between patients (Figure 4b). No statistically significant association of NKG2DL methylation levels with age, sex, French-American-British classification, FLT3 or NPM1 mutations or treatment response was found. We conclude that NKG2DL are highly methylated in AML patients and that this aberrant DNA methylation pattern could be acquired during disease progression.

Increased NKG2DL expression after treatment with 5azaC and DAC hypomethylating agents

To verify the role of DNA methylation in the absence of NKG2DL expression, we examined whether the induced demethylation of MICA, ULBP1, ULBP2 and ULBP3 genes by DNMTi could enhance NKG2DL expression. To this end, we chose the AML (HL60, NB4 and KG1A), ALL (RS411) and breast cancer (CAMA-1) cell lines, which showed hypermethylation (>60%) of some NKG2DL. Beforehand, we determined the appropriate concentration of DNMTi that did not compromise the viability of each cell type (data not shown). Cells were treated with 5azaC and DAC for 72 h and the NKG2DL expression was then analyzed by real-time-PCR and flow cytometry.

After treatment with both DNMTi, a significant increase in NKG2DL transcription was observed in all cell lines. ULBP2 was the ligand most susceptible to demethylation, resulting in up to a 400-fold induction in the HL60 cell line after DAC treatment (Figure 5a). NKG2DL expression was also induced on the cell surface of AML cells (HL60, KG1A and NB4) (Figure 5b). However, no changes in ULBP1 and ULBP3 expression were found on the cell surface of RS411 and CAMA-1 cell lines after DNMTi treatment, suggesting that DNA methylation has an important role in regulating NKG2DL in AML but not in other tumors types.

This result confirms that NKG2DL are regulated by DNA methylation in AML cells and therefore that treatment with demethylating agents may increase NKG2DL expression at the cell surface, thereby facilitating immune recognition.

Treatment of tumor cells with 5azaC and DAC increases NKG2D-mediated cytotoxicity

The engagement of NKG2D-NKG2DL activates the effector functions of cytotoxic NK cells, leading to the release of cytotoxic granules and the lysis of tumor cells. Therefore, we examined whether the increased expression of NKG2DL after treatment with DNMTi agents could enhance the recognition and lysis mediated by NK cells. For this purpose, we used a well-known model that enables the NKG2D-NKG2DL interaction to be specifically analyzed. The NKL cell line, which expresses high levels of NKG2D, was used as a source of effector cells. As target cells, we used the HL60, KG1A and NB4 tumor cell lines before and after DNMTi treatment. As shown in Figure 6a, the percentage of specific lysis of tumor cells before treatment was very low because of the lack of NKG2DL. However, when tumor cells were previously incubated with demethylating agents for 72 h and then co-cultured with effector cells, the percentage of specific lysis was significantly higher for all analyzed effector:target (E:T) ratios.

This increase in cytotoxicity was critically dependent on the NKG2D-NKG2DL interaction, because when NKL cells were incubated beforehand with anti-NKG2D blocking monoclonal antibody (mAb) for 1 h, the percentage of specific lysis was significantly lower for all E:T ratios (Figures 6a). Some differences between the treatments with 5azaC and DAC were noted. Although the cytotoxic capacity was greater after treatment with

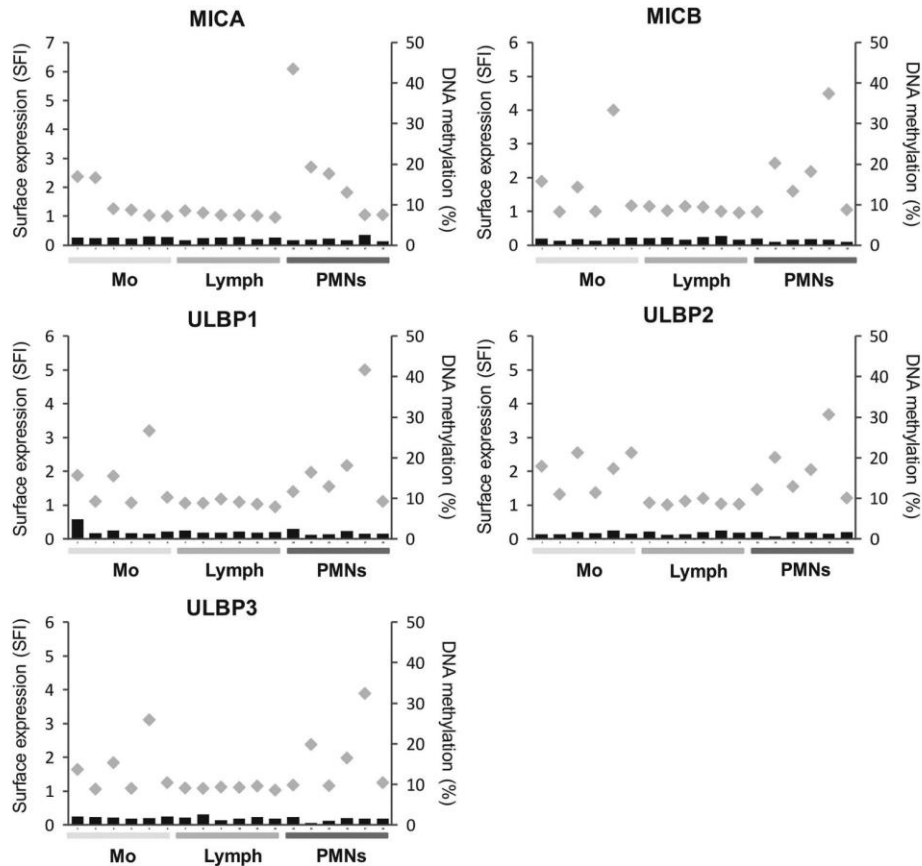


Figure 3. Expression and DNA methylation patterns for NKG2DL in cell subsets isolated from healthy controls. Monocytes (Mo), PBLs (Lymph) and polymorphonuclear cells (PMNs) were isolated from peripheral blood of six healthy donors. NKG2DL expression on the cell surface was measured for each cell type (gray markers) by flow cytometry using anti-human MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 and ULBP3 mAbs, followed by incubation with a FITC-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G. Surface expression was determined as specific fluorescence index (SFI) (mean specific fluorescence intensity: mean fluorescence of respective specific mAbs/mean fluorescence of secondary antibody). Black histograms show the DNA methylation level for each NKG2DL assayed by pyrosequencing. The level of methylation was expressed as an average percentage of total CpGs analyzed for each NKG2DL.

5azaC in HL60 and KG1A cells, a more pronounced effect of DAC in NB4 cell lines was observed. Consistent with the effects on lytic ability by demethylating agents, we also analyzed the interferon- γ (IFN- γ) production after 5azaC and DAC treatments. As a positive control, we used the HEL-R cell line that expresses high levels of all NKG2DL on the cell surface. Figure 6b shows that the positive cell line produces IFN- γ in a NKG2D-dependent manner. However, IFN- γ was also produced by methylated cell lines (HL60, KG1A and NB4). In spite of the elevated IFN- γ levels in these cells, we observed that treatment with DAC reduced the IFN- γ production in a NKG2D-dependent manner, while in control cells (treated with dimethylsulphoxide) or after 5azaC treatment this effect was not observed.

Taken together, our data corroborate that treatment of AML cells with demethylating agents increases NKG2DL expression enhancing the recognition and lysis of these tumor cells by NK cells.

Methylated NKG2DL impair the recognition of AML cells by NK and CD8+ T cells

Finally, we attempted to confirm whether DNA methylation for NKG2DL impairs the recognition of AML cell lines by cytotoxic NK and CD8+ T cells. To this end, we quantified CD107a

degranulation in isolated CD8+ T and NK cells from healthy donors against unmethylated-NKG2DL cells (HEL-R) and methylated-NKG2DL cell lines (NB4, KG1A and HL60).

We observed some controversies in the degranulation of polyclonal NK (pNK) cells against AML cell lines. Although some donors showed more degranulation in HEL-R than in methylated-NKG2DL cell lines (responders donors by NKG2D, pNK#1 and pNK#2), others NKs from different donors act inversely (non-responders donors by NKG2D, pNK#3 and pNK#4) (Figure 7a). This result could be due to the different expression profiles of activating and inhibitory receptors in NK cells isolated from different healthy donors. To corroborate this, we analyzed the expression of some ligands for these activating and inhibitory receptors expressed on AML cell lines (Figure 7b and Supplementary Figure 1). A clear difference was observed for the expression levels of human leukocyte antigen (HLA)-class I (HLA-I) and CD48 (2B4 ligand) molecules. The NKG2DL-positive HEL-R cell line expresses high levels of HLA-I and low levels of CD48, whereas methylated-NKG2DL AML cell lines showed low HLA-I expression and high expression of the activation-inducing CD48 ligand. In fact, when we blocked the NKG2A inhibitory receptor in NK cells from a non-responder donor against HEL-R (pNK#4) with an anti-NKG2A mAb, a significant increase in the percentage of CD107a⁺ cells was observed (Figure 7c). Moreover,

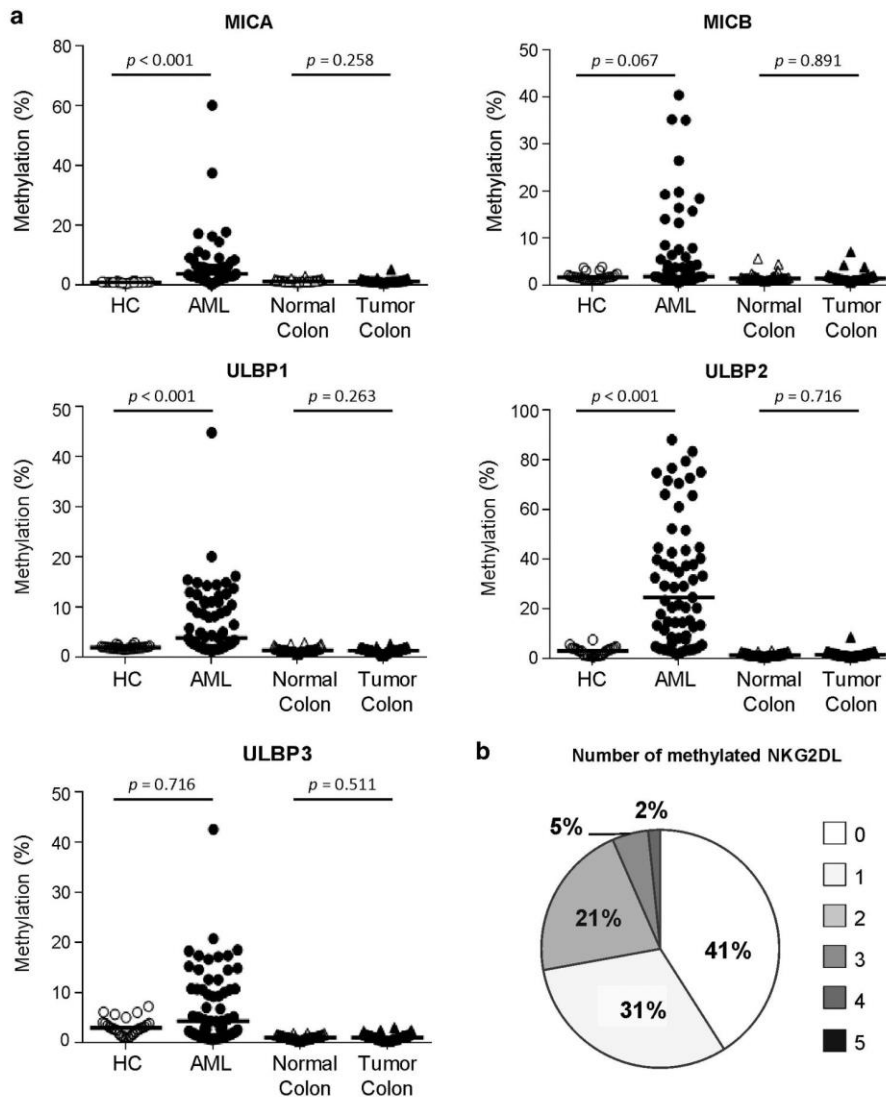


Figure 4. DNA methylation level for NKG2DL in AML and colon cancer patients. (a) The DNA methylation level for each NKG2DL (*MICA*, *MICB*, *ULBP1*, *ULBP2* and *ULBP3*) was quantified by pyrosequencing in PBLs from AML patients ($n = 60$) and healthy controls ($n = 25$), and in paired normal and tumor tissues from colon cancer patients. The solid line indicates the median level of DNA methylation, and statistical significance of the comparison of healthy donors and AML patients or of normal and tumor tissues in colon cancer is indicated by P -values. (b) The lower right diagram represents the frequency of NKG2DL expression in each tumor type.

this increase was dependent of NKG2D as it is shown by the reduced degranulation of NK cells after combined incubation with anti-NKG2A and anti-NKG2D mAb. That data suggest that blockage of the inhibitory signaling could favor the elimination of AML cells in a NKG2D-dependent manner. In addition, we analyzed whether the enhanced degranulation of NK cells after co-culture with methylated-NKG2DL cell lines could be due to the high expression of the CD48 ligand. After blockage with an anti-2B4 mAb, a slight reduction of the percentage of CD107a⁺ cells was observed in KG1A and HL60 cell lines but it did not reach statistical significance (Figure 7c).

However, when NK cells from a responder donor (pNK#2) were analyzed, a clear impaired degranulation was shown after NKG2D blockage in the HEL-R cell line but remains unchanged in the methylated-NKG2DL AML cell lines (Figure 7c). Similar results were observed with activated CD8⁺ T lymphocytes, where a higher

percentage of CD107a⁺ cells after co-cultures with NKG2DL-positive AML cell lines than with NKG2DL-negative cells was shown (Figure 7d). This degranulation of CD8⁺ T cells was significantly dependent of the NKG2D-NKG2DL interaction, suggesting that high levels of NKG2DL expression in AML cells lead to an enhanced recognition of CD8⁺ T cells.

In other word, our findings confirm that aberrant DNA methylation of NKG2DL in AML cells impair the immune recognition mediated by CD8⁺ T cells. Although NKG2DL expression can also contribute to the recognition by NK cells, the elimination and lysis of AML cells is ultimately dependent on the balance between all activating and inhibitory signals. In patients with NK cells, which do not recognize AML cells, blockage of anti-NKG2A receptor could be used as strategy to enhance the elimination of AML cells in a NKG2D-dependent manner.

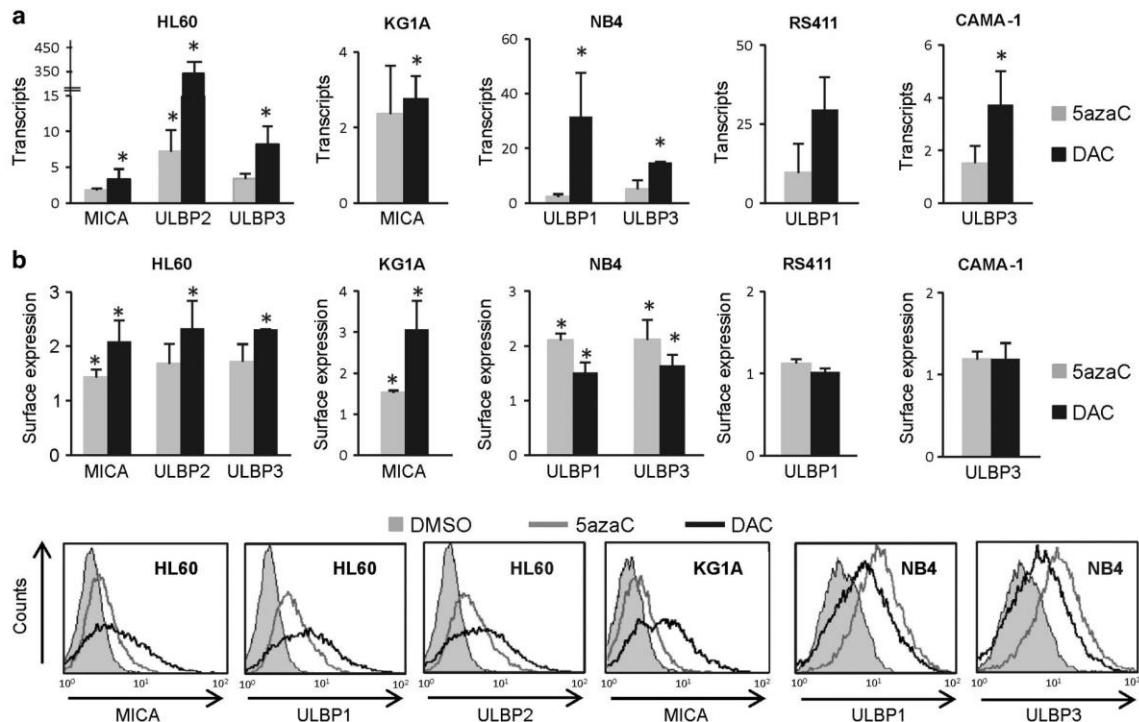


Figure 5. Enhancement of NKG2DL expression in tumor cell lines following treatment with demethylating agents (5azaC and DAC). AML cell lines (HL60, NB4 and KG1A), ALL cells (RS411) and breast cancer cells (CAMA-1) were treated with dimethylsulphoxide (DMSO) (control cells), 5azaC (10 μ M) and DAC (5 μ M) for 72 h, and expression was quantified by real-time (RT)-PCR (a) and flow cytometry (b). The RS411 cell line was treated with 2.5 μ M of 5azaC and 1 μ M DAC. Histograms represent the relative transcripts and the relative specific fluorescence index of NKG2DL after DNMTi treatment using DMSO-treated cells as a control. Glycerinaldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and isotype control antibody were used to normalize NKG2DL expression. Data are represented as the mean \pm s.d. of three independent experiments. * P < 0.05. The bottom panel shows representative histograms of NKG2DL expression on the surface of HL60, KG1A and NB4 cells after treatment with DMSO (shaded gray histogram), 5azaC (gray line) and DAC (black line).

DISCUSSION

The NKG2D–NKG2DL system is involved in the innate and adaptive immune response, and has an important role in the immunosurveillance of cancer cells. Although MICA/MICB and ULBPs may be expressed in healthy cells,^{36,37} this does not normally occur under non-pathological circumstances. In response to cell stress such as infection or cancer, NKG2DL can be upregulated to promote immune recognition of tumor cells.³⁸ However, NKG2DL can be downregulated in tumor cells by various mechanisms, helping these cells evade the immune system.³⁹ Thus, current therapeutic strategies aim to induce NKG2DL expression to facilitate immune recognition. In this study, we show that epigenetic mechanisms, such as DNA methylation, may contribute to the absence of NKG2DL expression in tumor cells.

NKG2DL expression was highly heterogeneous among the tumor cell lines analyzed, suggesting that while some cells may be susceptible to lysis exerted by NKG2D-expressing cytotoxic cells, others may escape the immune system. MICA and MICB were the most commonly expressed ligands, whereas ULBPs expression was highly restricted, except in colon cancer cell lines. Moreover, NKG2DL was expressed at lower levels in AML cells than in other cell types. NKG2DL expression in AML has been analyzed in-depth, but some controversies remain. Some authors reported null or low levels of NKG2DL expression in AML patients,^{40,41} while others showed that at least one NKG2DL is expressed in AML blast.⁴² Moreover, the expression patterns of NKG2DL are highly variable not only among AML patients but also in ALL patients, in whom MICA is the most frequent ligand.⁴³ By contrast, the relevance of

NKG2DL expression is widely accepted in epithelial tumors. High levels of MICA and ULBP1 expression are associated with tumor progression in HCC patients.⁴⁴ NKG2DL are strongly expressed in breast cancer patients, where their levels are associated with the prognosis of the disease.⁴⁵ We found that expression of two or more ligands is more frequent in solid than in hematological tumors in which NKG2DL expression is highly restricted and thereby contributes to immune evasion.

The lower level of NKG2DL transcription found, especially in cells from hematological tumors, prompted us to examine whether aberrant DNA methylation patterns in these genes could contribute to the absence of expression in tumors. To this end, we used the bisulfite pyrosequencing technique, with which the level of DNA methylation for each CpG dinucleotide can be quantified. All NKG2DL were hypermethylated in some cell lines, except MICB, which showed only partial DNA methylation. Of all the cancer cell lines (AML, ALL, HCC, breast and colon cancer), the highest frequency of methylated NKG2DL was observed in AML cells. DNA methylation levels for NKG2DL were inversely correlated with transcription levels.

During tumor development, the mechanisms controlling DNA methylation can be dysregulated, allowing a decrease of DNA methylation levels mainly in oncogenes or a higher level of methylation in CpG dinucleotides of tumor-suppressor genes.⁴⁶ In blood cell subsets from healthy donors, NKG2DL expression has been found in B cells, monocytes and granulocytes, but not in NK or T cells.⁴⁰ Consistent with this, we found no methylation of NKG2DL in any of these cell subsets of healthy controls. Interestingly, high levels of DNA methylation for all NKG2DL were

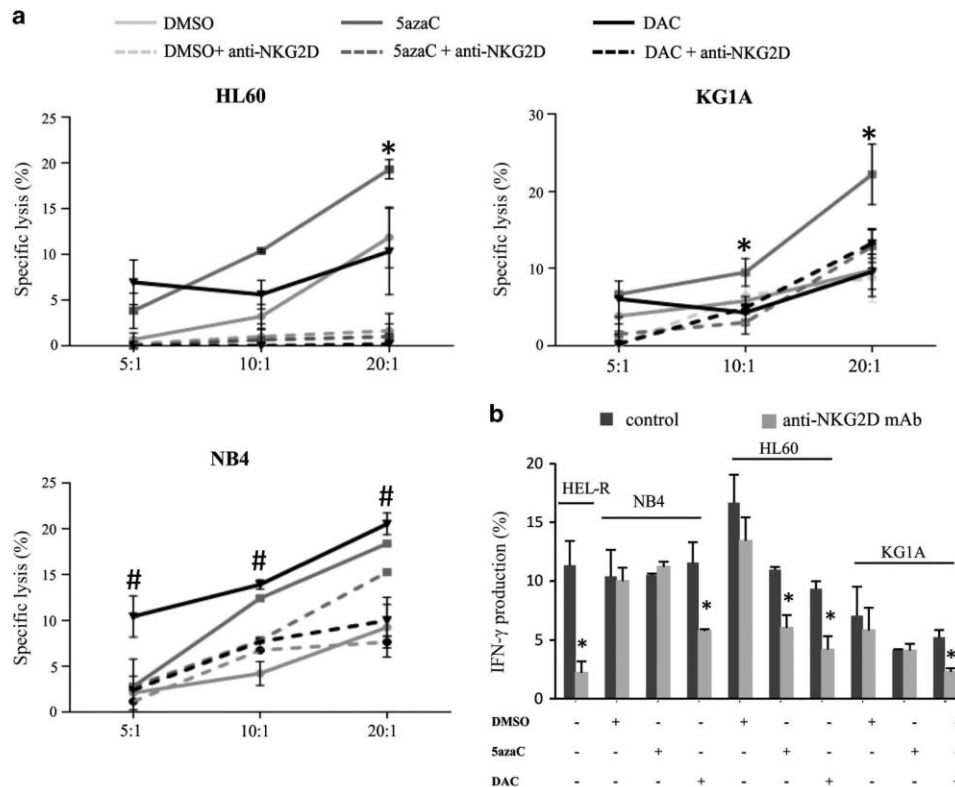


Figure 6. Demethylation of NKG2DL enhances the susceptibility of AML cells to the lysis of NKG2D-mediated NK cells. **(a)** NK cells were co-cultured with AML cell lines: HL60, KG1A and NB4 for 4 h at the indicated E:T ratios. AML cells were previously incubated for 72 h in the presence or absence of 5azaC (10 μM) or DAC (5 μM), and cytotoxicity was assayed by flow cytometry after PHK67/7AAD staining. Blocking mAb against NKG2D was preincubated with NK cells prior to the assay. Measurements were made in triplicate and the mean ± s.d. of three independent experiments are shown. **P* < 0.05 for 5azaC and #*P* < 0.05 for DAC treatments. **(b)** Frequency of IFN-γ production by NK cells after co-culture for 6 h with untreated and 5azaC and DAC treated AML cell lines (HL60, KG1A and NB4) at E:T ratio 2:1. The AML cell line HEL-R was used as positive control. For specificity assays, NK cells were previously incubated with a blocking anti-NKG2D mAb for 1 h. Data represent mean ± s.d. values from triplicate experiments. **P* < 0.05.

detected in AML patients. Thirty-six (59%) of the patients analyzed showed at least one methylated ligand, ULBP2 being the most frequent. The combination of methylated NKG2DL varied substantially among patients in accordance with the previously reported high degree of variability of expression of these ligands.⁴³ This result suggests that NKG2DL can be aberrantly methylated during tumor progression, contributing to their downregulation in AML. The propensity for NKG2DL methylation during hematopoietic maturation remains poorly understood because NKG2DL are unmethylated in CD34⁺ stem cells and remain unmethylated during hematopoietic differentiation and in mature blood cell subsets.⁴⁷ Malignant transformation may involve selection of cells with aberrant methylation of NKG2DL that prevents their expression at the cell surface.

In colon cancer, NKG2DL expression is upregulated in the earliest stages of the diseases and consequently further down-regulated, giving a poor prognosis of the disease.⁴⁸ Methylation of ULBP2 and ULBP3 has previously been reported in colon cancer cell lines.^{35,49} However, we found that all the ligands analyzed (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 and ULBP3) were unmethylated and highly expressed in colon cancer cell lines. Moreover, analysis of the NKG2DL methylation status in colon cancer patients showed that both normal and tumor tissues from colon cancer patients were hypomethylated independently of the tumor stage. The different promoter region analyzed, in our case closely located to the transcription start site, could account for the observed

difference between both studies. Therefore, our data suggest that DNA methylation changes at the NKG2DL promoter could be more prevalent in AML than in solid tumors such as colon cancer.

Absence or a low level of expression of NKG2DL in tumor cells hinders recognition by NKG2D-expressing cytotoxic cells, promoting immunoescape. Therefore, current therapeutic strategies aim to enhance NKG2DL expression on the surface of tumor cells to promote their lysis and to prevent tumor development. In this study, we found that treatment with demethylating agents (5azaC or DAC) increased NKG2DL transcription in AML, HCC and breast cancer cells. However, NKG2DL were enhanced on the cell surface only in AML cells, leading to greater recognition and lysis by cytotoxic NK cells. These results suggest that DNA demethylation could contribute to the recognition and lysis of tumor cells by the immune system. Epigenetic drugs such as 5azaC and DAC have been approved by the US Food and Drug Administration as alternatives to traditional therapies (best supportive care or ara-C) in AML patients. The advantage of these agents over traditional treatments is the better outcome they provide for patients, possibly as a consequence of the increased immune recognition of the tumor.^{50,51} However, the exact mechanisms and the identity of targets where they act are largely unknown at present.

These hypomethylating reagents have opposite effects in NK cell activity. Although azacytidine impairs cytotoxicity, decitabine

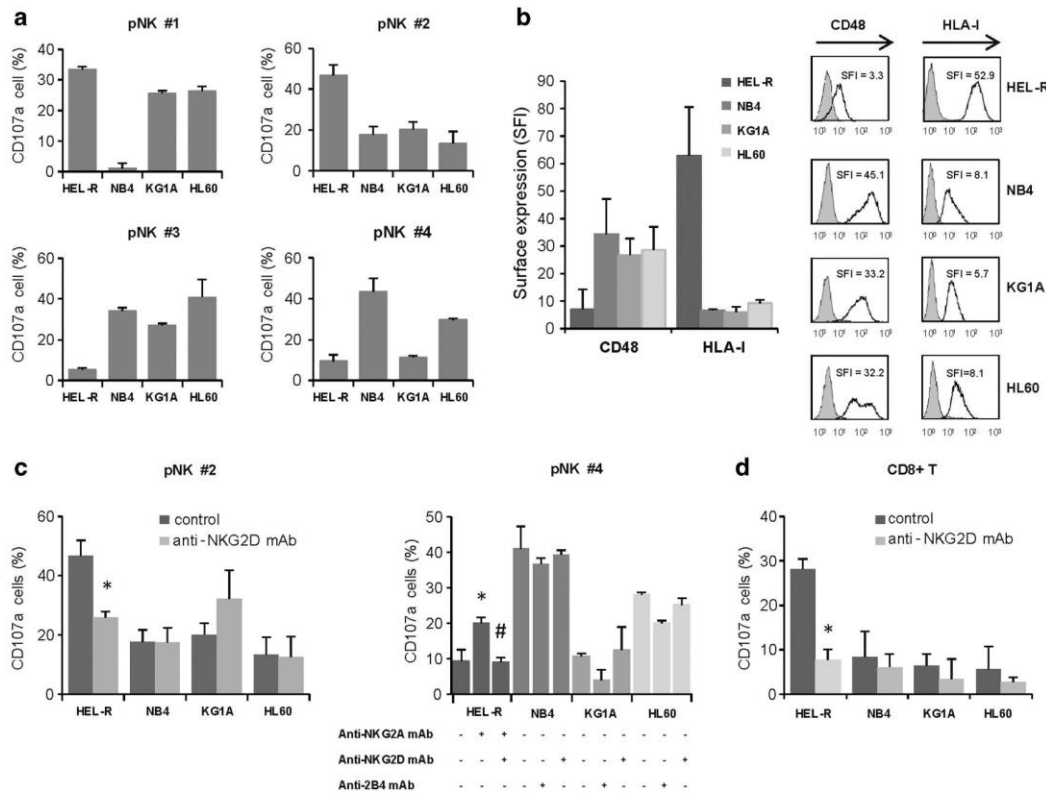


Figure 7. Aberrant DNA methylation of NKG2DL impairs recognition of AML cells by NK and CD8+ T cells. (a) Frequency of CD107a degranulation by primary NK cells isolated from different donors after co-culture with NKG2DL-positive HEL-R cell line and methylated-NKG2DL cell lines (NB4, KG1A and NB4) for 6 h. Data represent mean \pm s.d. of three individual experiments for each donor. (b) Expression levels of the activation-inducing CD48 ligand and HLA-I molecules in the cell surface of AML cell lines. The right panel shows representative histograms of an experiment for CD48 and HLA-I expression. Isotype control, shaded peaks; and staining with specific mAbs, black line. (c) Percentage of CD107a+ NK cells from a responder donor by NKG2D (pNK#2) and a non-responder donor (pNK#4) after co-culture with AML cell lines in the presence of absence of blocking anti-NKG2D mAb, anti-NKG2A mAb or anti-2B4 mAb, as indicated. Irrelevant immunoglobulin G was used as isotype control. Data are represented as the mean \pm s.d. of three triplicates of the same donor. * $P < 0.05$, anti-NKG2A blockage vs control, and # $P < 0.05$, combined anti-NKG2A+NKG2D vs anti-NKG2A blockage. (d) Frequency of degranulation of primary CD8+ T cells after co-culture with AML cells in the presence of absence of blocking anti-NKG2D mAb. Data are shown as the mean \pm s.d. of three healthy donors. * $P < 0.05$.

enhances this effect.⁵² Moreover, it should be noted that target susceptibility to NK-mediated lysis does not exclusively depend on the interaction between NKG2D and its ligands. NK cells are regulated by several inhibitory receptors (KIRs, ILT2 and NKG2A) and activating receptors (NKG2D, NKp30, NKp46, NKp44, DNAM-1 and 2B4).⁵³ The variability in the expression of these receptors will determine the susceptibility of AML blast to NK-mediated lysis. NK cells from AML patients have an abnormal phenotype featuring downregulation of the NCRs (NKp46, NKp30 and NKp44) and DNAM-1 receptors, and upregulation of the inhibitory receptor NKG2A and KIR2DL2, which contributes to tumor evasion.^{40,54-57} So, new anti-leukemic therapies focus on the transfusion of NK cells from donors with identical HLA-I in order to promote the *in vivo* expansion of NK cells and their cytotoxicity to AML cells.^{58,59} Therefore, although our findings demonstrate that hypomethylating agents promote NKG2DL expression in AML cells, lysis of methylated- and unmethylated-NKG2DL cell lines by NK cells will depend on the global balance between activating and inhibitory signals. Treatment of AML patients with demethylating agents could modify the expression of these receptors and their ligands, altering the lytic ability of NK cells. In this way, it has been shown that lack of DNMTs by itself or in combination with mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated

kinases 1/2 inhibitors, not only increases the expression of the ULBP2 ligand but also HLA-class I molecules. Consequently, HLA-class I molecules overexpression could be counteracting the immune recognition mediated by NKG2D–NKG2DL interaction.³⁵ Further studies are needed to identify these changes of expression and their consequences for the recognition and elimination of AML cells. On the other hand, we found that AML recognition by CD8+ T lymphocytes is dependent on NKG2DL methylation status suggesting that aberrant DNA methylation has an important role in the immune evasion of AML cells.

In summary, we showed that the absence of NKG2DL expression from AML tumor cells could be due to the aberrant DNA methylation of these genes during tumor progression. This is the first time that aberrant hypermethylation of NKG2DL has been reported in AML patients. Quantification of the level of DNA methylation by pyrosequencing may be useful as a marker of tumor evolution in AML. Reactivation of epigenetically silenced NKG2DL expression by hypomethylating agents could facilitate the immune recognition and lysis of AML blast. Additional studies are needed to understand the effect of these demethylating treatments on other NK cells receptors and their ligands, by which the elimination of tumor cells can be promoted.



MATERIALS AND METHODS

Cell lines and treatments with DNMTi

Cell lines of AML (NB4, HL60, HEL-R, KG1A, MV4;11, MOLM-13 and KASUMI-1), ALL (RS411, KOPN-8, JURKAT and REH), HCC (HUH7, ALEX, SNU354 and SNU368), breast cancer (CAMA-1, MCF-7, T47D, MDA-MB-157 and MDA-MB-436) and colon cancer (SW480, SW620, HCT166, HT29 and RKO) were maintained in RPMI-1640 medium plus 10% heat-inactivated serum. Polymorphonuclear cells were isolated from the hemolyzed pellet after being subjected to a standard Ficoll (Lymphoprep) gradient. CD14⁺ monocytes were isolated by sorting after staining with anti-CD14-fluorescein isothiocyanate (FITC) antibody (Biolegend, San Diego, CA, USA). CD4⁺, CD8⁺ T cells and NK cells sub-populations were isolated by negative selection using magnetic microbeads (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The purity of isolated cells was always > 95%. For cytotoxic experiments, the NKL (derived from NK cells) and C1R (human B-cell lymphoma) cell lines were grown in RPMI-1640 medium plus 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 100 U ml⁻¹ of streptomycin-penicillin. The NKL effector cells were supplemented with 100 U/interleukin-2 (Novartis, Basel, Switzerland). C1R-MICA*004 transfectants were maintained in complete medium supplemented with hygromycin B at 800 µg ml⁻¹ (Invitrogen).

Tumor cell lines were cultured at a density of 0.5×10^6 cells ml⁻¹ with complete media supplemented with 5αzaC (2.5 or 10 µM) or DAC (1 or 5 µM) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) for 72 h. Cell viability was determined by staining with 7AAD (Immunostep Inc., Salamanca, Spain).

Patients

Blood samples were obtained from 60 AML patients (35 males and 25 females) from Reina Sofia Hospital (Córdoba, Spain) who had been diagnosed with *de novo* non-M3 AML during 2000–2008. The diagnosis was made according to the morphological and cytochemical criteria of the French–American–British classification. Twenty-five healthy adult blood donors, obtained from the Blood Transfusion Center, Oviedo, Spain, were used as controls. In addition, a set of 44 paired adjacent normal and tumor tissues from colorectal cancer patients (31 males and 13 females) obtained from Puerto del Hierro Hospital (Madrid, Spain) were included in this study. All patients and healthy donors gave their written informed consent, in adherence to the Principles of the Declaration of Helsinki and the guidelines of the local ethics committee. Supplementary Tables 1 and 2 summarize the patients' characteristics.

Bisulfite conversion and DNA sequencing

DNA was purified using a DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) and modified with bisulfate using the EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA). Converted DNA was amplified using specific primers (Supplementary Table 1) and PCR products were cloned into the pGEM-T Easy Vector System II (Promega, Madison, WI, USA) and 10 independent clones were sequenced for each gene.

Bisulfite pyrosequencing

Bisulfite-modified DNA was amplified by PCR with specific biotinylated primers designed using PyroMark Assay Design Software 2.0 (Qiagen). Details of primers are available from the authors on request. Briefly, sequencing primers were designed to hybridize with CpG-free sites to ensure methylation-independent amplification. Pyrosequencing was performed with the PyroMark Q24 System version 2.0.6 (Qiagen), following the instructions in the PyroMark Gold Q24 Reagents Handbook (Qiagen). Methylation levels were quantified using PyroMark Q24 Software 2.0 (Qiagen).

Flow cytometry analysis

Cells were stained with the human mAb specific for each NKG2DL (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) and were then incubated with FITC-conjugated goat anti-mouse immunoglobulin G (eBioscience, San Diego, CA, USA) and analyzed on a BD FACScalibur Cytometer using the CellQuest Pro Software package (Becton Dickinson, Sparks, MD, USA). The specific fluorescence index was calculated by dividing mean fluorescence obtained with the respective specific mAb by that of the secondary antibody. Cell viability was determined by staining with 7AAD (Immunostep Inc.).

Quantitative real-time PCR analysis

RNA was purified using NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Duren, Germany) and reverse-transcribed using the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Berkeley, CA, USA). NKG2DL were amplified with specific primers for NKG2DL (Qiagen) using iQ SYBR Green Super Mix (Bio-Rad) for 40 cycles in the MyiQ Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). Values were adjusted using glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as the endogenous control and all samples were run in triplicate. Relative mRNA abundance was determined by the 2^{-ΔCt} method (ΔCt: Ct gene test–Ct endogenous control).

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was assayed using the PKH67 Green Fluorescent Cell Linker kit (Sigma-Aldrich) and by flow cytometry, as previously described.⁵³ We used the NKL cell line as effector cells because it is broadly suitable for studies based on the NKG2D–NKG2DL interaction, given the high levels of NKG2D expression. HL60, NB4 and KG1A cells were treated beforehand with dimethylsulphoxide, 5αzaC (10 µM) or DAC (5 µM) for 72 h and further co-cultured with the NKL effector cells for 4 h at 37 °C. After that, cells were stained with 5 µl of 7AAD and analyzed by flow cytometry. Target cells incubated in the absence of effector cells were used as a negative control. Percentage specific lysis was calculated using the formula: % NK-specific lysis = 100 × [(% 7AAD staining of sample – % 7AAD staining of negative control) / (100 – % 7AAD staining of negative control)]. For blocking experiments, NKL cells were incubated beforehand with 10 µg ml⁻¹ anti-human NKG2D blocking mAb (Biolegend) for 1 h at 4 °C.

IFN-γ production and degranulation assay

For intracellular IFN-γ analysis, NKL cells were co-cultured with AML cell lines previously treated or not treated with the demethylating agents (5αzaC at 10 µM and DAC at 5 µM for 72 h) at E:T ratio 2:1. After 1 h, brefeldin A (10 µg ml⁻¹, eBioscience) was added for an additional 5 h, and cells were stained with anti-CD16-APC, fixed and permeabilized for intracellular staining with anti-IFN-γ FITC antibody (Biolegend) for 30 min. Cells were washed and analyzed by flow cytometry.

Degranulation of NKL cells and isolated NK and CD8⁺ T cells from healthy donors was assessed by flow cytometry analysis of CD107a lysosome-associated membrane protein-1 expression. AML cell lines were incubated with the effector cells at an E:T ratio of 1:1. CD107a-FITC antibody was added directly to the wells and, after 1 h of culture, monesin (6 µg ml⁻¹, eBioscience) was added for an additional 5 h. Cells were then stained with CD8-PE, CD3-PerCP and CD16-APC antibodies (all from Biolegend) and analyzed by flow cytometry. In blocking experiments, effector cells were incubated beforehand with anti-NKG2D mAb (Biolegend), anti-NKG2A mAb (Biolegend), and anti-2B4 mAb (eBioscience) at 10 µg ml⁻¹ or anti-HLA-class I mAb supernatant for 1 h at 4 °C.

Statistical analysis

Statistical tests were carried out with SPSS 15.0 (Chicago, IL, USA). Values of $P < 0.05$ were considered to be statistically significant.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Red de Investigación Renal (REDinREN RD12/0021), Spain, and the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias-Fondos FEDER European Union (FIS PI12/02587) del Plan Nacional de I+D+I 2008–2011. ABR was supported by a Severo Ochoa fellowship (FICYT, Consejería de Educación y Ciencia del Principado de Asturias, Spain).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ABR, BS-A and CL-L designed the study. ABR and AFS did the research. VM-P, RMR and MFF provided samples. ABR and BS-A collected, analyzed and interpreted the results. ABR, BS-A and CL-L wrote the manuscript.

REFERENCES

- 1 Orr MT, Lanier LL. Natural killer cell education and tolerance. *Cell* 2010; **142**: 847–856.
- 2 Lopez-Larrea C, Suarez-Alvarez B, Lopez-Soto A, Lopez-Vazquez A, Gonzalez S. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med* 2008; **14**: 179–189.
- 3 Gonzalez S, Lopez-Soto A, Suarez-Alvarez B, Lopez-Vazquez A, Lopez-Larrea C. NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol* 2008; **29**: 397–403.
- 4 Eagle RA, Traherne JA, Hair JR, Jafferji I, Trowsdale J. ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand. *Eur J Immunol* 2009; **39**: 3207–3216.
- 5 Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 2005; **436**: 1186–1190.
- 6 Terme M, Borg C, Guilhot F, Masurier C, Flament C, Wagner EF *et al*. BCR/ABL promotes dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *Cancer Res* 2005; **65**: 6409–6417.
- 7 Unni AM, Bondar T, Medzhitov R. Intrinsic sensor of oncogenic transformation induces a signal for innate immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 1686–1691.
- 8 Textor S, Fiegler N, Arnold A, Porgador A, Hofmann TG, Cerwenka A. Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2. *Cancer Res* 2011; **71**: 5998–6009.
- 9 Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002; **419**: 734–738.
- 10 Holdenrieder S, Stieber P, Peterfi A, Nagel D, Steinle A, Salih HR. Soluble MICB in malignant diseases: analysis of diagnostic significance and correlation with soluble MICA. *Cancer Immunol Immunother* 2006; **55**: 1584–1589.
- 11 Song H, Kim J, Cosman D, Choi I. Soluble ULBP suppresses natural killer cell activity via down-regulating NKG2D expression. *Cell Immunol* 2006; **239**: 22–30.
- 12 Waldhauer I, Steinle A. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res* 2006; **66**: 2520–2526.
- 13 Liu G, Attridge CL, Wang X, Lundgren AD, Wu JD. The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. *J Immunol* 2010; **184**: 3346–3350.
- 14 Sun D, Wang X, Zhang H, Deng L, Zhang Y. MMP9 mediates MICA shedding in human osteosarcomas. *Cell Biol Int* 2011; **35**: 569–574.
- 15 Chitadze G, Lettau M, Bhat J, Wesch D, Steinle A, Furst D *et al*. Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: heterogeneous involvement of the 'a disintegrin and metalloproteinases' 10 and 17. *Int J Cancer* 2013; **133**: 1557–1566.
- 16 Duan X, Mao X, Sun W. ADAM15 is involved in MICB shedding and mediates the effects of gemcitabine on MICB shedding in PANC-1 pancreatic cancer cells. *Mol Med Rep* 2013; **7**: 991–997.
- 17 Fernandez-Messina L, Ashiru O, Boutet P, Aguera-Gonzalez S, Skepper JN, Reyburn HT *et al*. Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *J Biol Chem* 2010; **285**: 8543–8551.
- 18 Kaiser BK, Yim D, Chow IT, Gonzalez S, Dai Z, Mann HH *et al*. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* 2007; **447**: 482–486.
- 19 Huergo-Zapico L, Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Gonzalez E, Lopez-Soto A, Fernandez-Guizan A *et al*. Expression of ERp5 and GRP78 on the membrane of chronic lymphocytic leukemia cells: association with soluble MICA shedding. *Cancer Immunol Immunother* 2012; **61**: 1201–1210.
- 20 Aguera-Gonzalez S, Gross CC, Fernandez-Messina L, Ashiru O, Esteso G, Hang HC *et al*. Palmitoylation of MICA, a ligand for NKG2D, mediates its recruitment to membrane microdomains and promotes its shedding. *Eur J Immunol* 2011; **41**: 3667–3676.
- 21 Baragaño Raneros A, Suarez-Alvarez B, López-Larrea C. Secretory pathways generating immunosuppressive NKG2D ligands: new targets for therapeutic intervention. *Oncimmunology* 2014; **3**: e28497.
- 22 Stone R, Sekeres M, Garcia-Manero G. Evolving strategies in the treatment of MDS and AML. *Clin Adv Hematol Oncol* 2009; **7**: 1–14 quiz 12 p following 14.
- 23 Rohner A, Langenkamp U, Siegler U, Kalberer CP, Wodnar-Filipowicz A. Differentiation-promoting drugs up-regulate NKG2D ligand expression and enhance the susceptibility of acute myeloid leukemia cells to natural killer cell-mediated lysis. *Leuk Res* 2007; **31**: 1393–1402.
- 24 Schmiedel BJ, Arelin V, Gruenebach F, Krusch M, Schmidt SM, Salih HR. Azacitidine impairs NK cell reactivity while decitabine augments NK cell responsiveness toward stimulation. *Int J Cancer* 2011; **128**: 2911–2922.
- 25 Tang KF, He CX, Zeng GL, Wu J, Song GB, Shi YS *et al*. Induction of MHC class I-related chain B (MICB) by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; **370**: 578–583.
- 26 Kato N, Tanaka J, Sugita J, Toubai T, Miura Y, Ibata M *et al*. Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia* 2007; **21**: 2103–2108.
- 27 Diermayr S, Himmelreich H, Durovic B, Mathys-Schneeberger A, Siegler U, Langenkamp U *et al*. NKG2D ligand expression in AML increases in response to HDAC inhibitor valproic acid and contributes to allorecognition by NK-cell lines with single KIR-HLA class I specificities. *Blood* 2008; **111**: 1428–1436.
- 28 Lopez-Soto A, Folgueras AR, Seto E, Gonzalez S. HDAC3 represses the expression of NKG2D ligands ULBPs in epithelial tumour cells: potential implications for the immunosurveillance of cancer. *Oncogene* 2009; **28**: 2370–2382.
- 29 Poggi A, Catellani S, Garuti A, Pierri I, Gobbi M, Zocchi MR. Effective *in vivo* induction of NKG2D ligands in acute myeloid leukaemias by all-trans-retinoic acid or sodium valproate. *Leukemia* 2009; **23**: 641–648.
- 30 Lu X, Ohata K, Kondo Y, Espinoza JL, Qi Z, Nakao S. Hydroxyurea upregulates NKG2D ligand expression in myeloid leukemia cells synergistically with valproic acid and potentially enhances susceptibility of leukemic cells to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Cancer Sci* 2010; **101**: 609–615.
- 31 Huang B, Sikorski R, Sampath P, Thorne SH. Modulation of NKG2D-ligand cell surface expression enhances immune cell therapy of cancer. *J Immunother* 2011; **34**: 289–296.
- 32 Yang F, Shao Y, Liu M, Huang J, Zhu K, Guo C *et al*. Valproic acid upregulates NKG2D ligand expression and enhances susceptibility of human renal carcinoma cells to NK cell-mediated cytotoxicity. *Arch Med Sci* 2013; **9**: 323–331.
- 33 Wu X, Tao Y, Hou J, Meng X, Shi J. Valproic acid upregulates NKG2D ligand expression through an ERK-dependent mechanism and potentially enhances NK cell-mediated lysis of myeloma. *Neoplasia* 2012; **14**: 1178–1189.
- 34 Berghuis D, Schilham MW, Vos HI, Santos SJ, Kloess S, Buddingh EP *et al*. Histone deacetylase inhibitors enhance expression of NKG2D ligands in Ewing sarcoma and sensitize for natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Clin Sarcoma Res* 2012; **2**: 8.
- 35 Sers C, Kuner R, Falk CS, Lund P, Sueltmann H, Braun M *et al*. Down-regulation of HLA class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2009; **125**: 1626–1639.
- 36 Schrambach S, Ardizzone M, Leymarie V, Sibilia J, Bahram S. *In vivo* expression pattern of MICA and MICB and its relevance to auto-immunity and cancer. *PLoS ONE* 2007; **2**: e518.
- 37 Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W *et al*. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001; **14**: 123–133.
- 38 Fernandez-Messina L, Reyburn HT, Vales-Gomez M. Human NKG2D-ligands: cell biology strategies to ensure immune recognition. *Front Immunol* 2012; **3**: 299.
- 39 Stern-Ginossar N, Mandelboim O. An integrated view of the regulation of NKG2D ligands. *Immunology* 2009; **128**: 1–6.
- 40 Nowbakht P, Ionescu MC, Rohner A, Kalberer CP, Rossy E, Mori L *et al*. Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood* 2005; **105**: 3615–3622.
- 41 Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, Martini S, Rivera P, Capobianco A *et al*. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood* 2005; **105**: 2066–2073.
- 42 Sanchez-Correa B, Morgado S, Gayoso I, Bergua JM, Casado JG, Arcos MJ *et al*. Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: analysis of NK cell-activating receptors and their ligands. *Cancer Immunol Immunother* 2011; **60**: 1195–1205.
- 43 Hilpert J, Grosse-Hoves L, Grunebach F, Buechele C, Nuebling T, Raum T *et al*. Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses. *J Immunol* 2012; **189**: 1360–1371.
- 44 Kamimura H, Yamagiwa S, Tsuchiya A, Takamura M, Matsuda Y, Ohkoshi S *et al*. Reduced NKG2D ligand expression in hepatocellular carcinoma correlates with early recurrence. *J Hepatol* 2012; **56**: 381–388.
- 45 de Kruijff EM, Sajet A, van Nes JG, Putter H, Smit VT, Eagle RA *et al*. NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. *BMC Cancer* 2012; **12**: 24.
- 46 Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 2007; **8**: 286–298.
- 47 McGilvray RW, Eagle RA, Watson NF, Al-Attar A, Ball G, Jafferji I *et al*. NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoeediting. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 6993–7002.
- 48 Calvanese V, Fernandez AF, Urduinguo RG, Suarez-Alvarez B, Mangas C, Perez-Garcia V *et al*. A promoter DNA demethylation landscape of human hematopoietic differentiation. *Nucleic Acids Res* 2012; **40**: 116–13147.



- 49 Bormann F, Sers C, Seliger B, Handke D, Bergmann T, Seibt S *et al*. Methylation-specific ligation detection reaction (msLDR): a new approach for multiplex evaluation of methylation patterns. *Mol Genet Genomics* 2011; **286**: 279–291.
- 50 Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U *et al*. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 562–569.
- 51 Kantarjian HM, Thomas XG, Dmoszynska A, Wierzbowska A, Mazur G, Mayer J *et al*. Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2012; **30**: 2670–2677.
- 52 Schmiedel BJ, Arélin V, Gruenebach F, Krush M, Schmidt SM, Salih HR. Azacitidine impairs NK cell reactivity while decitabine augments NK cell responsiveness toward stimulation. *Int J Cancer* 2011; **128**: 2911–2922.
- 53 Koch J, Steinle A, Watzl C, Mandelboim O. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol* 2013; **34**: 182–191.
- 54 Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Reviron D *et al*. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2002; **99**: 3661–3667.
- 55 Verheyden S, Bernier M, Demanet C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia* 2004; **18**: 2002–2007.
- 56 Sanchez-Correa B, Gayoso I, Bergua JM, Casado JG, Morgado S, Solana R *et al*. Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. *Immunol Cell Biol* 2012; **90**: 109–115.
- 57 Stringaris K, Sekine T, Khoder A, Alsuliman A, Razzaghi B, Sargeant R *et al*. Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica* 2014; **99**: 836–847.
- 58 Miller JS, Soignier Y, Panoskaltis-Mortari A, McNearney SA, Yun GH, Fautsch SK *et al*. Successful adoptive transfer and in vivo expansion of human haploidentical NK cells in patients with cancer. *Blood* 2005; **105**: 3051–3057.
- 59 Locatelli F, Pende D, Maccario R, Mingari MC, Moretta A, Moretta L. Haploidentical hemopoietic stem cell transplantation for the treatment of high-risk leukemias: how NK cells make the difference. *Clin Immunol* 2009; **133**: 171–178.

Supplementary Information accompanies this paper on Genes and Immunity website (<http://www.nature.com/gene>)

2. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA LIBERACIÓN DE LOS LIGANDOS DE NKG2D DE LA SUPERFICIE CELULAR. IDENTIFICACIÓN DE NUEVAS DIANAS TERAPEÚTICAS

ANTECEDENTES: Las células tumorales han desarrollado diversos mecanismos con el fin de evitar la expresión de los NKG2DL en la superficie celular y como última consecuencia su reconocimiento por el sistema inmune. Uno de estos mecanismos, y el mejor estudiado hasta la fecha, es la liberación de los NKG2DL en su forma soluble. Numerosos trabajos han demostrado la presencia de estos ligandos en el suero de pacientes con diversas patologías tumorales, tanto de origen hematológico como epitelial, y su utilidad como marcadores de diagnóstico y de pronóstico de la enfermedad. La liberación de los NKG2DL en su forma soluble impide el reconocimiento y favorece la evasión inmune, principalmente a través de dos procesos; la disminución de los NKG2DL en la membrana de la célula tumoral, y la interacción con NKG2D bloqueando el sitio de unión de NKG2D a sus ligandos e induciendo su internalización desde la superficie celular. Por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos que regulan la liberación de los NKG2DL es de gran relevancia en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que eviten la liberación de estos ligandos y como consecuencia favorezcan el reconocimiento inmune.

Artículo 2: “Secretory pathways generating immunosuppressive NKG2D ligands: New targets for therapeutic intervention.” **Baragaño Raneros A,** Suarez-Álvarez B, López-Larrea C. *Oncoimmunology*. 2014; 3:e28497.

RESUMEN: En este trabajo hemos revisado los mecanismos implicados en la liberación de los NKG2DL durante el desarrollo tumoral haciendo especial hincapié en la liberación proteolítica mediada por la acción de las metaloproteasas (MPs). Las MPs, de las cuales se conocen tres familias (MMPs, ADAMs, ADAMs-TS) han sido implicadas en diferentes procesos celulares relacionados con el cáncer como supervivencia, angiogénesis, crecimiento, migración o invasión. Miembros de la familia MMP (MMP2,

MMP9, MMP14) han sido involucrados en la liberación de MICA y MICB. Sin embargo, las proteasas más relevantes son ADAM10 y ADAM17 ya que también modulan la liberación de ULBP2. Además, mecanismos adicionales, como el reclutamiento de MICA y MICB en dominios ricos en colesterol (DRM) o el cambio conformacional de MICA como consecuencia de la interacción con la proteína del retículo endoplasmático ERp5, cooperan con las MPs para favorecer la digestión proteolítica de los NKG2DL. Por el contrario, la actividad de las MPs es bloqueada por la acción de los TIMPs 1-4, inhibidores endógenos de las proteasas. Sin embargo, únicamente TIMP3 ha sido implicado en la regulación de los NKG2DL en su forma soluble, concretamente en la liberación de MICB. Aunque no es su principal mecanismo de liberación, MICA, MICB y ULBP2 también pueden liberarse dentro de partículas exosomales. Sin embargo, este es el único mecanismo de liberación conocido para ULBP1 y ULBP3. A la vista de estos datos, la inhibición de las MPs podría ser una buena estrategia terapéutica para impedir la liberación de los ligandos solubles y potenciar la respuesta inmunológica. En la actualidad, diversos inhibidores sintéticos de las MPs (MMPI II, MMPI III, GW2800264X, GI254023X) y agentes quimioterapéuticos utilizados para el tratamiento del hepatocarcinoma o el cáncer de mama (epirubicina, doxorubicina) han sido propuestos como terapia ya que reducen la liberación de MICA, MICB y/o ULBP2 en células tumorales. Además, el tratamiento con hidralacina (inhibidor de DNMTs) o valproato (inhibidor de HDACs) reduce los niveles de MICA y MICB solubles sugiriendo que los mecanismos de regulación epigenética podrían ser relevantes en la regulación de los NKG2DL solubles.

CONCLUSIONES: Debido a la relevancia de las formas solubles de los NKG2DL en la progresión del cáncer, diversos inhibidores de las MPs han sido sugeridos como potenciales tratamientos farmacológicos para impedir la liberación de los ligandos solubles y favorecer el reconocimiento inmunológico. Sin embargo, estos inhibidores son de amplio espectro por lo que es necesario un estudio en profundidad para determinar su validez terapéutica. Por ello, es necesaria la búsqueda de nuevas dianas terapéuticas que permitan modular la liberación de los NKG2DL. El conocimiento de los mecanismos de regulación que controlan la expresión de TIMP3, como por ejemplo

la regulación epigenética, y la liberación de los NKG2DL dentro de partículas exosomales podría ser de gran relevancia para inhibir la liberación de los NKG2DL y, por lo tanto, potenciar la respuesta inmunológica mediada por NKG2D-NKG2DL.

Secretory pathways generating immunosuppressive NKG2D ligands

New targets for therapeutic intervention

Aroa Baragaño Raneros¹, Beatriz Suarez-Álvarez², and Carlos López-Larrea^{1,3*}

¹Department of Immunology; Hospital Universitario Central de Asturias; Oviedo, Spain; ²Cellular Biology of Renal Diseases Laboratory; Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz; Universidad Autónoma Madrid; Madrid, Spain; ³Fundación Renal "Iñigo Álvarez de Toledo"; Madrid, Spain

Keywords: NKs, NKG2D, soluble NKG2D ligands, shedding, exosomes

Abbreviations: ADAM, a disintegrin and metalloproteinase; CLL, chronic lymphocytic leukemia; CR, complete remission; DRM, detergent-resistant membrane microdomains; ERp5/ PDIA6, protein disulfide isomerase family A, member 6; GRP78/HSPA5, heat shock 70kDa protein 5; GTN, nitroglycerin; HIF1 α , hypoxia-inducible factor 1 α ; IFN γ , interferon- γ ; IL-1 β , interleukin-1 β ; MICA/B, MHC class I chain-related A/B; MMP, matrix metalloproteinase; MP, metalloproteinase; MMPi, MMP inhibitors; NKG2D, natural killer group 2 member D; NKG2DL, NKG2D ligands; sNKG2DL, soluble NKG2DL; OS, overall survival; STAT3, signal transducer and activator of transcription 3; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; TIMP, tissue inhibitors of metalloproteinase; TFS, treatment-free survival; TGF β , transforming growth factor- β ; ULBP, UL-16 binding protein

Natural Killer Group 2 member D (NKG2D) activating receptor, present on the surface of various immune cells, plays an important role in activating the anticancer immune response by their interaction with stress-inducible NKG2D ligands (NKG2DL) on transformed cells. However, cancer cells have developed numerous mechanisms to evade the immune system via the downregulation of NKG2DL from the cell surface, including the release of NKG2DL from the cell surface in a soluble form. Here, we review the mechanisms involved in the production of soluble NKG2DL (sNKG2DL) and the potential therapeutic strategies aiming to block the release of these immunosuppressive ligands. Therapeutically enabling the NKG2D-NKG2DL interaction would promote immunorecognition of malignant cells, thus abrogating disease progression.

Introduction

NKG2D (Natural Killer Group 2 member D) is one of the most potent activating receptors expressed on the surface of natural killer (NK) cells. It is a homodimeric C-type lectin-like type II transmembrane receptor that is also expressed on other cells of the immune system, including natural killer T cells (NKT), $\gamma\delta$ T cells, and $\alpha\beta$ CD8⁺ T cells.^{1,2} A distinctive

characteristic of NKG2D is its interaction with various human stress-inducible ligands: the transmembrane proteins MHC class I chain-related A and B (MICA and MICB), and 6 UL-16 binding proteins (ULBPs 1–6). These include GPI-anchored variants ULBP-1, -2, -3, -6, as well as transmembrane family members ULBP-4 and -5.^{3,3}

The surface expression of NKG2D ligands (NKG2DL) is considered a cellular stress indicator. Whereas under physiological conditions NKG2DL expression is either absent or scarce in most cell types, the expression is enhanced during malignant transformation by the activation of different cellular pathways.^{4,5} Activation of the DNA damage response pathway (ATM/ATR pathway), transcription factors (e.g., NF- κ B), and various oncogenes (e.g., BCR/ABL, MYC, TP53, etc.) can enhance NKG2DL expression on the cell surface during malignant transformation, thereby exposing tumor cells to recognition and killing by NKG2D-positive immune effector cells.^{6–8} Recently, Jung et al.⁹ have reported that the murine ligand for NKG2D, retinoic acid early transcript 1E (*Raet1e*), is positively regulated by E2f transcription factors (E2f1, E2f2, and E2f3). These transcription factors are highly expressed under oncogenic stress or growth stimulation and are involved in the regulation of the cell cycle. This finding suggests a new role for NKG2DL in cell cycle progression, and therefore, in the control of tumor development. NKG2DL are expressed in a wide range of neoplastic diseases, with preferential expression of MICA and MICB in many solid tumors whereas ULBPs are predominantly expressed in hematological malignancies, as well as in gliomas and melanomas.¹⁰ The lytic efficiency of NKG2D-positive immune effector cells is associated with the surface density of NKG2DL on the surface of the target cells.¹¹ Thus, high levels of NKG2DL expression result in greater immune-recognition, thereby preventing tumor progression via immune constraint.

*Correspondence to: Carlos López-Larrea; Email: immuno@hca.es

Submitted: 01/22/2014; Revised: 02/26/2014;

Accepted: 03/10/2014; Published Online: 04/25/2014

Citation: Baragaño Raneros A, Suarez-Álvarez B, López-Larrea C. Secretory pathways generating immunosuppressive NKG2D ligands: New targets for therapeutic intervention. *Oncoimmunology* 2014, 3:e28497; <http://dx.doi.org/10.4161/onci.28497>

However, malignant cells have developed a myriad of strategies to reduce or prevent NKG2DL expression.

Although NKG2DL is upregulated during malignant transformation in response to oncogenic activation, it is also known that tumor cells can evade the immune response through the inhibition of NKG2DL transcription. For example, the signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), a tumor-promoting transcription factor involved in several cancer-related signaling pathways (e.g., hypoxia and epithelial-mesenchymal transition) has been observed to act as a negative regulator of *MICA* mRNA expression in HT29 colorectal cancer cells.¹² In contrast, it has been reported that the transcriptional regulatory mechanism regulating *ULBP1* mRNA levels is dictated primarily by the balance between Sp3/Sp1 transcription factors and activating enhancer binding protein 2- α (AP-2 α) performing as positive and repressive regulatory factors, respectively.¹³ Secretion of immunomodulatory cytokines during malignant transformation such as transforming growth factor- β (TGF β) or interferon- γ (IFN γ) also downregulates NKG2DL transcription in tumor cell lines.^{14,15}

Cells with high NKG2DL variant transcriptional levels do not always express corresponding NKG2DL proteins on the cell surface, suggesting that NKG2DL encoding genes are also subject to post-transcriptional mechanisms of regulation. Several studies have shown that NKG2DL can be downregulated by the action of multiple overexpressed cancer miRNAs that contribute to neoplastic cell avoidance of immune recognition.¹⁶⁻²⁰ Moreover, treatment with 2-deoxy-D-glucose, an inhibitor of protein N-linked glycosylation in the endoplasmic reticulum, reduces MICA/B expression on the cell surface in several tumor cell lines, suggesting that N-linked glycosylation is an important post-transcriptional mechanism regulating functional NKG2DL cell surface expression in cancer.²¹

In addition to these NKG2DL-attenuating mechanisms, the lack of cytotoxic NK and CD8⁺ T-cell recognition of cancerous cells during tumor progression is also influenced by trogocytosis. During this process cell-to-cell contact allows the transference of cell membrane molecules from cancer cells to those of the immune system.²² MICA and MICB ligands are co-transferred during this process from the tumor cell surface to the T-cell or NK-cell surface, potentially suppressing the ability of other NKG2D-positive immune cells to recognize the neoplastic cell.^{23,24} However, little is definitively known about this process and further studies are needed to determine the actual impact on cancer cell immune evasion.

In addition to the myriad of immune-escape routes discussed above, the best-known mechanism of tumor escape from immunity is the release of NKG2DL from the cell surface in its soluble form. This occurrence has 2 fundamental consequences. The first is a prominent reduction of NKG2DL on the tumor cell surface, facilitating immune evasion. The second is the ability of the soluble NKG2DL (sNKG2DL) to engage the NKG2D receptor, thereby triggering its internalization. Considerable effort is being expended to understand the mechanisms involved in the production of sNKG2DL, with the aim of developing

new therapeutic strategies by fostering NKG2D-NKG2DL interaction. In this review, we summarize the current knowledge regarding sNKG2DL release mechanisms and propose how the modulation of sNKG2DL by various means may stimulate immunorecognition of tumor cells, thereby preventing tumor progression.

Soluble NKG2DL In Tumor Cells

Following the discovery by Salih et al.²⁵ that MICA could be released in a soluble form into the extracellular milieu, several reports have since shown that NKG2DL variants are present in the serum of various cancer patients but is absent from healthy controls (Table 1).

NKG2DL-surface expression is highly heterogeneous among hematological cancers. While the majority of leukemia patients are positive for at least one type of NKG2DL, the combination of several distinct ligands on the cell surface is highly restricted.²⁶ The absence of integral NKG2DL correlates with a higher degree of release of these ligands in the soluble form, an occurrence detected mainly for MICA, MICB, and ULBP2, all of which have been found in numerous types of hematological malignancies, including acute myeloid leukemia (AML), chronic myeloid leukemia (CML), acute lymphocytic leukemia (ALL), and chronic lymphocytic leukemia (CLL).²⁶⁻²⁹

The release of sNKG2DL has also been documented within solid tumors. In-depth analysis has revealed high levels of soluble MICA (sMICA) in cancer patient sera, including those afflicted with cervical cancer and squamous intraepithelial lesions caused by the human papilloma virus,³⁰ as well as hepatitis C virus-induced hepatocellular carcinoma (HCC).³¹ High serum sMICA has also been detected in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC),^{32,33} neuroblastoma,³⁴ gastrointestinal malignancies,²⁵ and melanoma.²⁵ Unlike MICA, little is known about the presence of other ligands in solid cancers. High levels of soluble MICB (sMICB) have been observed in PDAC patient sera³⁵ and in the culture media supernatant of human cervical cancer cell lines,³⁶ whereas elevated soluble ULBP2 (sULBP2) has been detected in melanoma³⁵ and non-small cell lung cancer (NSCL) patients.³⁷

Release of NKG2DL from the cancer cell surface reduces their immunogenicity, thereby facilitating tumor progression. In B-cell CLL patients, despite observations that NKG2DL expression levels do not appear to correlate with disease progression, the presence of soluble forms of MICA, MICB, and ULBP2 in patient sera have been associated with poor treatment-free survival (TFS).²⁸ However, only sULBP2 proved to be an independent predictive factor for TFS among such leukemia patients. The presence of sMICA in Stage III and IV PDAC patient sera and the accompanying downregulation of NKG2D receptor on NK cells revealed both parameters to be independent markers of pancreatic malignant disease progression.³² Similarly, elevated sMICB or sULBP2 levels in sera have also been associated with worse outcome, including sMICB in late-stage oral squamous cell carcinoma (OSCC)³⁸

Table 1. Clinical significance of soluble NKG2DL in tumor patients.

Malignance	Soluble NKG2DL	Clinical Significance	Ref.
AML	MICA/B ULBP _s 1–3	- Negative correlation with NKG2D expression. - sMICA and sULBP2 levels are associated with AML patients survival. - sULBP1 levels are lower in CR than in therapy-refractory patients.	26, 27
ALL	MICA/B ULBP _s 1–3	- Negative correlation with NKG2D expression.	26, 27
CML	MICA/B, ULBP _s 1–3	- Negative correlation with NKG2D expression.	26, 27
CLL	MICA/B ULBP _s 1–3	- Negative correlation with NKG2D expression. - sMICA/B and sULBP2 are associated with TFS.	26–29
T-NHL	MICA/B	- No correlation with MICA/B surface expression.	26
Cervical cancer	MICA	- Negative correlation with NKG2D expression.	30
HCC	MICA	- Negative correlation with NKG2D expression. - Association with low OS and vascular invasion.	31,40
PDAC	MICA/B	- sMICA is associated with metastasis and low OS. - sMICB is associated with unresectability.	32,33
Neuroblastoma	MICA	- Negative correlation with NKG2D expression.	34
Gastrointestinal malignancies	MICA	- sMICA levels are higher in gastric, colon, and rectum cancers than healthy donors.	25
Melanoma	MICA/B, ULBP2	- sNKG2DL are associated with reduced OS. - sULBP2 is associated with disease progression and tumor load, and is an independent predictor of prognosis. - sMICB is an independent predictive factor for progression-free and OS.	35,39
NSCLC	ULBP2	- Association with low OS.	37
OSCC	MICB	- Association with low OS.	38
Multiple mieloma	MICA	- sMICA is an independent predictive factor for OS and progression-free survival.	41

Presence of soluble NKG2DL in serum from patients with different malignancies is related with the evolution and prognosis of the disease. AML, Acute Myeloid Leukemia; ALL, Acute Lymphocytic Leukemia; CML, Chronic Lymphocytic Leukemia; CLL, Chronic Lymphocytic Leukemia; T-NHL, T-cell Non Hodgkin Lymphoma; HCC, Hepatocellular Carcinoma; PDAC, Pancreatic Ductal Adenocarcinoma; NSCLC, Non-Small-Cell Lung Cancer; OSCC, Oral Squamous Cell Carcinoma; CR, Complete Remission; TFS, Treatment-Free Survival; OS, Overall Survival.

and melanoma patients,³⁹ and sULBP2 among melanoma³⁵ and NSCL patients.³⁷

Recently sNKG2DL has been shown to be not only a useful prognostic factor for malignant disease, but also a diagnostic biomarker as well. The quantification of sMICA and sMICB in the serum of PDAC patients shows an adequate sensitivity and specificity for discriminating patients from healthy donors in a similar way to carbohydrate antigen 19–9 (CA19–9), the most widely available biomarker used in the diagnosis of this disease.³³ Moreover, high levels of sMICA correlate with poor prognosis in hepatitis B virus-induced HCC patients, suggesting that assaying the sera levels of this NKG2D ligand may be useful as a predictive biomarker of the pathological course of this particular malignancy.³¹

By contrast, the status of soluble ULBP1 (sULBP1) and ULBP3 (sULBP3) molecules is obscure and further studies are needed to determine their potential role in evading the immune system and tumor progression. In short, the release of sNKG2DL during malignant transformation and its involvement in the prognosis of the disease suggest that the mechanisms involved in producing these soluble forms are potential targets that could be exploited to attenuate immune evasion and thereby reinforce antitumor immunity.

Mechanisms Involved In The Secretion Of sNKG2DL

In recent years, several distinct mechanisms have been implicated in the release of NKG2DL. Protease-mediated cleavage on the cell membrane is considered to be the main mechanism by which sMICA, sMICB, and sULBP2 are released from the cell surface whereas sULBP3 is secreted within exosomes (Fig. 1). However, the mechanisms related to the shedding of ULBP1 remain unknown. Alternative splicing of ULBP4 and ULBP5 produce soluble forms of these ligands, but these molecules have not been detected in primary tumors.^{42,43}

MICA, MICB, and ULBP2 are cleaved by metalloproteases

There are 3 families of metalloproteases (MPs), namely matrix metalloproteases (MMPs), a disintegrin and metalloproteinases domains (ADAMs), and ADAM with thrombospondin motifs (ADAM-TS). MMPs and ADAMs have been implicated in the proteolytic shedding of NKG2DL from tumor cells. MMPs are a group of 24 human zinc-binding endopeptidases which can degrade different components of the extracellular matrix and play an important role in cancer cell survival, cell growth, angiogenesis, migration, and invasion.⁴⁴ Similar to MMPs, ADAM proteins are also salient in the pathophysiology of cancer, participating in various processes, such as the activation of positive growth

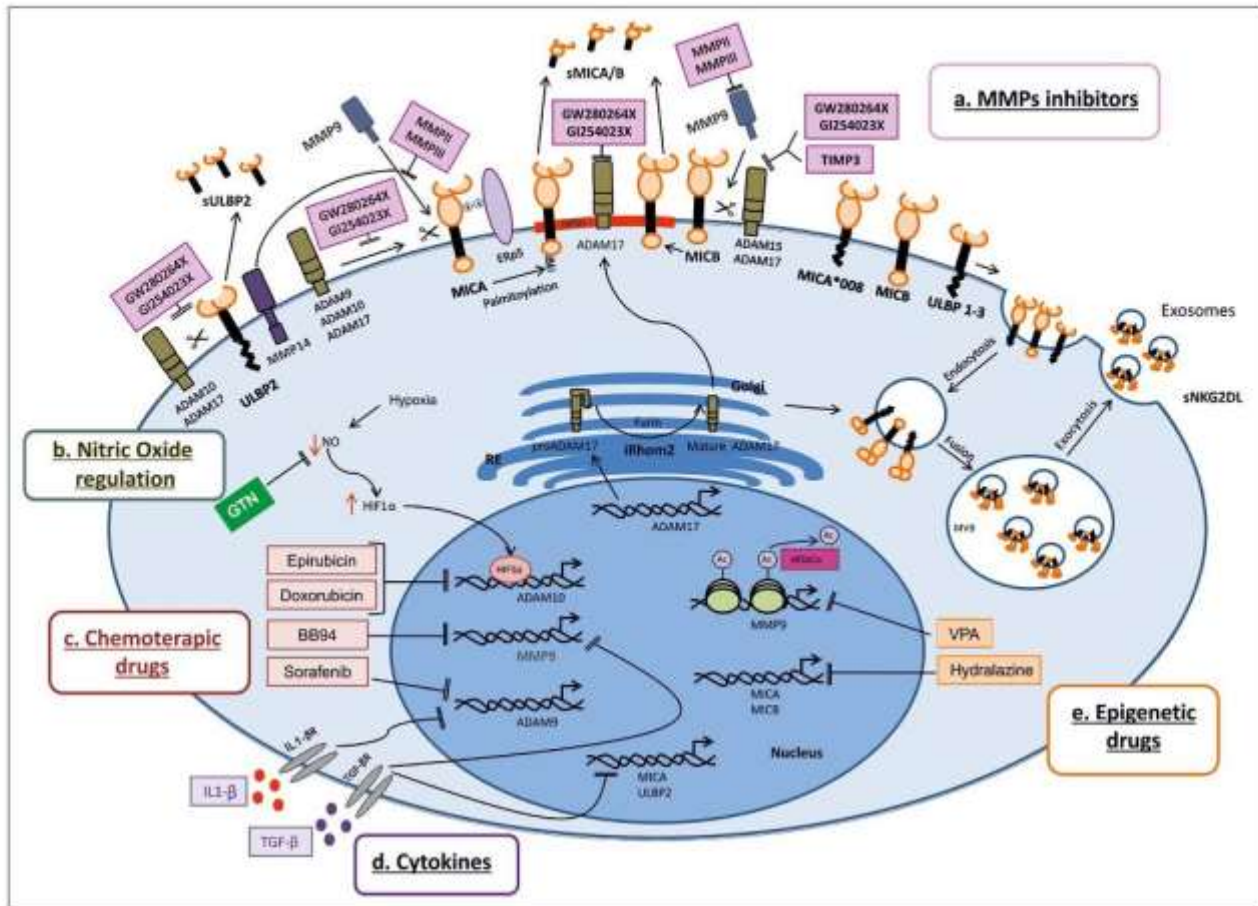


Figure 1. Mechanisms involved in the release of soluble NKG2D and blocking strategies. Natural Killer Group 2 member D ligands (NKG2DL) may be released in a soluble form (sNKG2DL) to the extracellular environment mainly through proteolytic shedding mediated by metalloproteases, or by release in exosomes derived from the cell membrane. Blockage of these mechanisms facilitates the enhanced expression of NKG2DL on the surface of tumor cells promoting immune recognition. Several therapeutic strategies have been proposed to abrogate these NK2G2DL release mechanisms. These include: **(A)** Matrix metalloproteases (MMPs) inhibitors (MMPPI II, MMPPI III) can inhibit shedding of MHC class I related-A/B (MICA/B), while a disintegrin and metalloproteinases domains 10 and 17 (ADAM10 and 17) inhibitors (GW280264X, GI254023X) downregulate the release of sULBP2. The natural inhibitor of ADAM17 (TIMP3) blocks ADAM17 activity, preventing MICB shedding. **(B)** During hypoxia, nitric oxide levels are reduced, promoting the upregulation of hypoxia inducible factor 1, α subunit (HIF1 α). Consequently, ADAM10 mRNA levels are upregulated, correspondingly enhancing the release of sMICA and sMICB. However, the restoration of nitric oxide levels by nitroglycerin (GTN) attenuates the shedding of these ligands. **(C)** Several chemotherapeutic drugs can regulate the production of sNKG2DL through the downregulation of mRNA expression of several metalloproteases (MMP2, MMP9, ADAM10, ADAM9). **(D)** Cytokines like interleukin-1 β (IL-1 β) or transforming growth factor β (TGF β) reduce shedding of NKG2DL by transcriptional regulation of ADAM9 and NKG2DL. **(E)** Epigenetic drugs such as valproate (histone deacetylase inhibitor) and hyalalazine (DNA methyltransferase inhibitor) may modulate the production of sNKG2DL by downregulating MMP9 or NKG2DL mRNA expression.

factors (the EGFR/HER epidermal growth factors family), and growth inhibitory pathways (e.g., TGF β), as well as the shedding of adhesion proteins (e.g., E-cadherin, L-selectin, ICAM-1, and VCAM) and in regulating angiogenesis.⁴⁵

The cleavage of MICA occurs at multiple sites at the surface of tumor cells and involves several MPs that do not recognize a specific sequence motif but are more active in the proximity of the MICA α 3 domain.⁴⁶ Matrix metallopeptidase 9 and 14 (MMP9 and MMP14) have been experimentally evinced to be involved in the proteolytic cleavage of MICA. Suppression of MMP9 by specific small interfering RNA (siRNA) reduces the production of sMICA from human osteosarcoma cells while the

induction of these proteases by cytokines such as TGF β promote MICA shedding from malignant glioma cell lines.^{14,47-49} Similarly, inhibition of MMP14 by a short hairpin RNA (shRNA) reduces MICA shedding from murine prostate cancer cells.⁵⁰ Moreover, ADAM metallopeptidase 10 (ADAM10) and 17 (ADAM17, best known as TACE) have also been implicated in the regulation of MICA shedding. Thus, transitory RNAi-mediated silencing or pharmacological inhibition of these ADAM family MPs in MICA transfectants and prostate carcinoma cells decreases the release of soluble MICA.^{46,51}

Barsoum et al.⁵² showed that nitric oxide levels play an important role in the production of sMICA. During hypoxia,

nitric oxide levels are reduced, promoting the accumulation of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF1 α) and enhancing ADAM10 expression, thereby increasing the release of MICA molecules. In contrast, in human prostate xenografts growing in nude mice, nitric oxide reactivation by nitroglycerin (GTN) attenuated the accumulation of HIF1 α and ADAM10 expression, a molecular phenotype associated with diminishing tumor growth.⁵² The inactive rhomboid protein 2 (iRHOM2), encoded by *RHBDF2* gene, has recently been reported to be a regulator of ADAM17.⁵³⁻⁵⁵ This protein facilitates the maturation of ADAM17, which in turn promotes the shedding of the tumor-necrosis factor (TNF) inflammatory cytokine. However, it is not yet known whether this protein is able to regulate the production of sNKG2DL through ADAM17.

Another protease documented to be involved in MICA shedding is ADAM metalloproteinase 9 (ADAM9), a protease that generates 2 soluble MICA molecules of 39 and 37 kDa.⁵⁶ The 39 kDa protein is produced by ADAM9 proteolytic cleavage in the intracellular domain between the amino acids Gln347 and Val348, a cleavage event that generates a MICA protein isoform lacking the cytosolic domain. Subsequently, this protein undergoes a second proteolytic cleavage through the action of an unidentified protease to generate the final 37 kDa sMICA. Induction of ADAM9 expression by interleukin 1 β (IL-1 β) treatment in human HCC cells also promotes MICA shedding although curiously, no changes in the levels of membrane-bound MICA expression have been observed.⁵⁷ Furthermore, a positive correlation between the levels of IL-1 β and sMICA was found in the serum of these patients, suggesting that this cytokine plays an important role in MICA shedding through ADAM9.⁵⁷

Although the precise cleavage site of MICB has yet to be determined, replacement of the α 3 domain with residues from HLA-A2 molecule prevents the release of sMICB and inhibits tumor development in immunodeficient mice.⁵⁸ Similar to MICA, several different MPs have been implicated in the proteolytic cleavage of the MICB ligand. MMP9 has been observed to proteolytically cleave both MICA and MICB in osteosarcoma cells (U-2 OS and SaOS-2).⁵⁹ Furthermore, it has recently been reported that ADAM metalloproteinase 15 (ADAM15) and MICB are strongly expressed in PDAC and their expression correlates with tumor stage.⁶⁰ Thus, when ADAM15 activity is blocked in PANC-1 cells, the release of sMICB is suppressed, enhancing MICB expression on the cell surface. Taken together, these observations suggest that ADAM15 plays a key role in the regulation of MICB shedding.

The proteolytic release of MICA and MICB ligands is promoted by the recruitment of these ligands to DRMs (detergent-resistant membrane microdomains). These cholesterol and sphingolipid-enriched membrane regions can recruit MICA and MICB, their proximity enhancing ADAM17 activity that subsequently promotes the efficient shedding of the ligands.⁶¹ Knowledge of the molecular basis that associates the ligands (MICA and MICB) with cholesterol and sphingolipid-enriched domains could foster the development of new strategies for modulating the release of sNKG2DL from tumor cells. On this basis, it has been reported that MICA palmitoylation—the addition of a 16-carbon

fatty acid chain by thioester linkage to cysteine residues in the cytoplasmic tail—is the prerequisite for recruiting this ligand to cholesterol-enriched microdomains. Site-directed mutagenesis in the Cys306 and Cys307 aminoacids of the MICA protein blocks palmitoylation of MICA, preventing MICA molecules from appearing in the DRM fractions. However, blockage of palmitoylation only partially reduces sMICA levels, implying that shedding does not occur exclusively from DRMs.⁶²

In contrast to what happens to MICA and MICB, little is currently known in regards to the mechanisms regulating the shedding of ULBP ligands. Previous studies have demonstrated that CV1 and CHO cell lines transfected with different ligands (ULBP1–3) release more soluble forms of ULBP2 and ULBP3 than of ULBP1.¹⁰ These results suggest that different mechanisms may mediate the release of ULBP ligands. In support, ULBP2 has been documented to be shed from the cell membrane by the action of ADAM-family MPs (ADAM10 and ADAM17) in glioma cells and in ULBP2-transfected cells, whereas ULBP1 and ULBP3 were not released by the action of such MPs.^{63,64}

TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) are endogenous inhibitors of MPs that regulate the activity of these proteases during extracellular matrix remodeling.⁶⁵ Four TIMP family members are known (TIMP1, TIMP2, TIMP3, and TIMP4), of which only TIMP1 and TIMP3 are known to act as inhibitors of MPs involved in NKG2DL shedding. TIMP1 has been observed to block the activity of MMP9, MMP14, and ADAM10, but with low affinity. By contrast, TIMP3 is a potent inhibitor of MMP9, ADAM10, and ADAM17.^{66,67} Although these inhibitors can downregulate the activity of metalloproteinases involved in the shedding of MICA, MICB, and ULBP2, little is known about their direct role in the production of soluble ligands. To date, only TIMP3 has been associated with a reduction in the release of sMICB upon exogenous addition to MICB-transfected cells.⁶¹ Therefore, an understanding of TIMP regulatory mechanisms could be useful for designing means to control the release of sNKG2DL.

ERp5 and GRP78 chaperones contribute to the release of sMICA

There is clear evidence that endoplasmic reticulum chaperones, such as thiol isomerases, are involved in the release of sMICA from the tumor cell surface. Protein disulfide isomerase family A, member 6 (PDIA6, best known as ERp5) is a member of the family of thiol isomerases that assists in the folding of nascent proteins.²⁹ Heat shock 70kDa protein 5 (HSPA5, best known as GRP78) is another endoplasmic reticulum protein which co-regulates protein folding mediated by the protein disulfide isomerase family, including ERp5 protein.⁶⁸ The role of ERp5 in regulating MICA shedding has been documented using different tumor cell lines treated with 5,5-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) and phenylarsine oxide, agents which impair protein disulfide isomerase function, or by *PDIA6* transitory silencing with siRNAs.⁶⁹ In both cases, the inhibition of ERp5 abrogates the release of sMICA, suggesting that this chaperone has a key role in regulating MICA shedding. ERp5 binds to the MICA α 3 domain through transitory disulfide bonds, inducing a conformational change that is essential for the further proteolytic cleavage of MICA by MPs. The role of ERp5 in MICA shedding

has recently been reported in Hodgkin's lymphoma in which patients with high levels of ERp5 and ADAM10 expression have correspondingly high levels of sMICA in their serum.⁷⁰ Similarly, in CLL patients, high levels of sMICA are correlated with a high level of ERp5 and GRP78 expression on the cell membrane.²⁹

sNKG2DL and exosomes

Exosomes are small vesicles (30–100 nm) that are released by tumor cells upon fusion of multivesicular bodies with the plasma membrane.⁷¹ Tumors release exosomes comprising molecules that modify the tumor microenvironment, thus promoting tumor immune evasion. It has been reported that exosomes from malignant mesothelioma pleural fluid can express TGF β and NKG2DL (MICA/B, ULBP1–3) on their surface that can subsequently cause the downregulation of NKG2D receptor on immune cells.⁷² However, others authors have shown that dendritic cell-derived exosomes express functional interleukin 15 receptor, α chain (IL-15R α) and NKG2DL, which can promote the proliferation and activation of NK cells *ex vivo*.⁷³ Vaccination of melanoma patients with these exosomes restored the number and function of NKG2D-dependent NK cells, abrogating tumor progression in these patients. Despite these intriguing observations, it is unclear whether NKG2D modulation by exosomes may actually be due to the presence of the cytokines (i.e., TGF β or IL-15-R α) rather than engagement through NKG2DL. Further studies are necessary to determine the exact role of exosomes bearing NKG2DL.

Although MICA, MICB, and ULBP2 are principally released by the proteolytic activity of MPs, they can also be released via exosomes, an alternative mechanism also leading to immunosuppression. However, exosomes are the only known mechanism by which the GPI-anchored variants ULBP1 and ULBP3 are released from the cell surface.¹⁰ Additionally, MICA*008, the most frequent allele in the Caucasoid population encoding a variant possessing a short transmembrane domain and a cytoplasmic domain, is preferentially released as a full-length molecule in exosomes rather than by proteolytic cleavage.⁷⁴ Ashiru O et al.⁷⁵ have recently reported that the acquisition of the GPI-domain anchor by MICA*008 is responsible for the recruitment of this allele in exosomes.

Pharmacological inhibition of NKG2DL shedding

Blockade of NKG2DL shedding by inhibition of MP activity may be a tractable strategy for enhancing antitumor immunity (Fig. 1). Release of sMICA, sMICB, and sULBP2 via MPs can be inhibited by the action of several pharmacological inhibitors of MMPs and ADAM proteins. MMP inhibitors (MMPI), including MMPI II and MMPI III are broad spectrum inhibitors of several MPs and application of these MMPIs have been shown to downregulate MICA and ULBP2 shedding in C1R-MICA and C1R-ULBP2 transfectants, respectively.^{46,63} Furthermore, treatments with ADAM10 and ADAM17 inhibitors (GW280264X and G1254023X) has also been observed to reduce the release of sMICA in C1R-MICA transfectants.⁴⁶ Nevertheless, these synthetic inhibitors have the disadvantage of being relatively nonspecific, prompting the evaluation of new approaches using specific natural TIMPs inhibitors.

Chemotherapy treatments can modulate the production of sNKG2DL. Some genotoxic treatments such as gemcitabine, a

first-line treatment used in pancreatic cancer, may increase the release of soluble ligands due to the upregulation of NKG2DL expression on the cell surface, a phenomenon documented in studies of pancreatic cancer cells.^{76,77} However, other chemotherapeutics may reduce the level of sNKG2DL by blocking MP activity. BB94 (Batismatat), an agent that inhibits both MMPs and ADAMs, has been observed to dampen the production of sNKG2DL (MICA, sMICB, and sULBP2).^{46,61,65} Epirubicin and doxorubicin are anthracycline antitumor drugs commonly used in HCC chemotherapy. Treatment with these drugs in HCC cell lines (HepG2 and PLC/PRF/5 cell lines) inhibits ADAM10 expression, increasing the expression of membrane-bound MICA and correspondingly decreasing the release of sMICA.⁷⁸ Sorafenib, an inhibitor of angiogenesis that effectively prolongs the median overall survival of patients with advanced HCC, yields similar results through the downregulation of ADAM9.⁷⁶ Thus, various chemotherapy reagents can inhibit the proteolytic activity of several MPs, increasing the surface expression of NKG2DL and enhancing malignant cell recognition (and potentially elimination) by the immune system.

Epigenetic modifying drugs, such as histone deacetylase inhibitors and demethylating reagents, have also been observed to increase NKG2DL expression on the cell surface of various cancer cell types. Valproate treatment in osteosarcoma cells downregulates MMP9 expression and thereby enhances the expression of MICA and MICB ligands on the cell surface while downregulating the release of soluble forms of these ligands.⁷⁹ Moreover, the hypomethylating reagent hydralazine reduces the release of soluble form of MICA and MICB in conjunction with enhanced surface expression of these ligands.⁸⁰ These observations suggest that epigenetic drugs could be a new therapeutic strategy to enhance the immunorecognition of tumor cells, not only by promoting NKG2DL expression on the cancer cell surface, but also by reducing the release of the soluble forms of these ligands.

Concluding Remarks

In recent years, the release of soluble forms of NKG2DLs has been extensively investigated with regard to their involvement in tumor pathologies. Several studies have shown that sNKG2DL are frequently associated with a worse prognosis among tumor patients. This corollary may be due to the interaction of soluble ligands with the NKG2D receptor, a contact that promotes receptor internalization and corresponding reduced cytotoxic NK or CD8⁺ T-cell recognition of cancerous cells. Therefore, modulation of the balance between soluble and membrane-bound NKG2DL could be useful in the development of anticancer therapy. In these regards, it has been reported that specific inhibitors of MP activity can block the production of sNKG2DL, although future studies will be required to determine whether these protease inhibitors comprise a valid therapeutic strategy for modulating the release of sNKG2DL. Finally, the recently elucidated role of exosomes in cancer development and in immunosuppression via NKG2DL shedding suggests that further knowledge delineating the mechanisms by which

exosomes are released will further endeavors to develop new strategies aiming to enhance immunity through the NKG2D-NKG2DL interaction.

In conclusion, although it is widely accepted that the presence of sNKG2DL is closely related to the prognosis of tumor, in-depth knowledge of the mechanisms involved in the release of these soluble forms will allow us to address new therapeutic approaches for enhancing the immune recognition of tumor cells.

References

1. González S, Grob V, Spies T. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 298:121-38; PMID:16329186; http://dx.doi.org/10.1007/s3-540-27743-9_6
2. López-Larrea C, Suárez-Alvarez B, López-Soto A, López-Vázquez A, González S. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med* 2008; 14:179-89; <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2008.02.004>; PMID:18353724
3. Eagle RA, Traberne JA, Hair JR, Jafarji I, Trowsdale J. ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand. *Eur J Immunol* 2009; 39:3207-16; <http://dx.doi.org/10.1002/eji.200939502>; PMID:19658097
4. Ullrich E, Koch J, Cerwenka A, Steinle A. New prospects on the NKG2D/NKG2DL system for oncology. *Oncotarget* 2013; 2:e26097; PMID:24353908; <http://dx.doi.org/10.4161/onc.26097>
5. Rauler DH, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol* 2013; 31:413-41; <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095951>; PMID:23298206
6. Heinemann A, Zhao F, Pechlivanis S, Eberle J, Steinle A, Diederichs S, Schindler D, Paschen A. Tumor suppressive microRNAs miR-34a/c control cancer cell expression of ULBP2, a stress-induced ligand of the natural killer cell receptor NKG2D. *Cancer Res* 2012; 72:460-71; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-1977>; PMID:22102694
7. Terme M, Boeg C, Guilhot F, Masurier C, Flamant C, Wagner EF, Caillat-Zucman S, Berubein A, Turban AG, Caignard A, et al. BCR/ABL promotes dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *Cancer Res* 2005; 65:6409-17; PMID:16024645; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-2675>
8. Unni AM, Bondar T, Medzhinov R. Intrinsic sensor of oncogenic transformation induces a signal for innate immunosurveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:1686-91; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0701675105>; PMID:18223157
9. Jung H, Hsiung B, Pestal K, Procyk E, Rauler DH. RAE-1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by E2F transcription factors, which control cell cycle entry. *J Exp Med* 2012; 209:2409-22; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20120565>; PMID:23166357
10. Fernández-Mosquera L, Ashiru O, Bouzet P, Agüero-González S, Skepper JN, Reyburn HT, Valés-Gómez M. Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *J Biol Chem* 2010; 285:8543-51; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M109.045906>; PMID:20080967
11. Pende D, Rivera P, Marcanaro S, Chang CC, Biasoni R, Conte R, Kubin M, Gonnard D, Ferrone S, Moretta L, et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* 2002; 62:6178-86; PMID:12414645

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

This work was supported by Spanish grant PI12/02587 and the Red de Investigación Renal (REDiNREN RD12/0021/0021) from the Instituto de Salud Carlos III, and by European Union "Fondos FEDER".

12. Bedel R, Thierry-Vuillemin A, Grandclément C, Ballard J, Remy-Martin JP, Kanelop B, Pallandre JR, Pivrot X, Ferrand C, Tiberghien P, et al. Novel role for STAT3 in transcriptional regulation of NK immune cell targeting receptor MICA on cancer cells. *Cancer Res* 2011; 71:1615-26; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4540>; PMID:21257710
13. López-Soto A, Quiñones-Lombrana A, López-Arbesú R, López-Larrea C, González S. Transcriptional regulation of ULBP1, a human ligand of the NKG2D receptor. *J Biol Chem* 2006; 281:30419-30; PMID:16901903; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M604868200>
14. Eisele G, Wischhausen J, Mittelbronn M, Meyermann R, Waldhauer I, Steinle A, Weller M, Friese MA. TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain* 2006; 129:2416-25; PMID:16891318; <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awl205>
15. Schwinn N, Volkminova D, Sucker A, Textor S, Striegel S, Moll I, Nausch N, Tuettenberg J, Steinle A, Cerwenka A, et al. Interferon-gamma down-regulates NKG2D ligand expression and impairs the NKG2D-mediated cytotoxicity of MHC class I-deficient melanoma by natural killer cells. *Int J Cancer* 2009; 124:1594-604; <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.24098>; PMID:19089914
16. Himmelreich H, Mathys A, Wodnarski-Filipowicz A, Kalberer CP. Post-transcriptional regulation of ULBP1 ligand for the activating immunoreceptor NKG2D involves 3' untranslated region. *Hum Immunol* 2011; 72:470-8; <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2011.03.005>; PMID:21406206
17. Nachmani D, Lankey D, Wolf DG, Mandelboim O. The human cytomegalovirus microRNA miR-UL112 acts synergistically with a cellular microRNA to escape immune elimination. *Nat Immunol* 2010; 11:806-13; <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1916>; PMID:20694010
18. Stern-Ginossar N, Gur C, Biton M, Horwitz E, Elboim M, Stanitsky N, Mandelboim M, Mandelboim O. Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nat Immunol* 2008; 9:1065-73; <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1642>; PMID:18677316
19. Yadav D, Ngolah J, Lim RS, Krishnamurthy S, Bui JD. Cutting edge: down-regulation of MHC class I-related chain A on tumor cells by IFN-gamma-induced microRNA. *J Immunol* 2009; 182:39-43; PMID:19109132; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.182.1.39>
20. Tsukerman P, Stern-Ginossar N, Gur C, Glasner A, Nachmani D, Bauman Y, Yamin R, Vitenashtein A, Stanitsky N, Bar-Mag T, 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; 72:5463-72; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2671>; PMID:22915757
21. Andresen L, Skövbakke SL, Persson G, Hagemann-Jensen M, Hansen KA, Jensen H, Skov S. 2-deoxy D-glucose prevents cell surface expression of NKG2D ligands through inhibition of N-linked glycosylation. *J Immunol* 2012; 188:1847-55; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1004085>; PMID:22227571
22. Caumartin J, Favier B, Daoouy M, Guillard C, Moreau P, Carosella ED, LeMaouh J. Troglodytosis-based generation of suppressive NK cells. *EMBO J* 2007; 26:1423-33; PMID:17318190; <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7601570>
23. Roda-Navarro P, Vales-Gomez M, Chisholm SE, Reyburn HT. 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; 103:11258-63; PMID:16849432; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0600721103>
24. Domaica CI, Fuentes MB, Rossi LE, Girart MV, Avila DE, Rabinovich GA, Zwirner NW. Tumor-experienced T cells promote NK cell activity through troglodytosis of NKG2D and NKp46 ligands. *EMBO Rep* 2009; 10:908-15; <http://dx.doi.org/10.1038/embo.2009.92>; PMID:19498463
25. Salih HR, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 2002; 169:4098-102; PMID:12570336; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.169.8.4098>
26. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kant L, Rammensee HG, Steinle A. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 2003; 102:1389-96; PMID:12714493; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2003-01-0019>
27. Hilperit J, Grosse-Hovest L, Grünebach F, Buechele C, Nuebling T, Razum T, Steinle A, Salih HR. Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses. *J Immunol* 2012; 189:1360-71; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1200796>; PMID:22730533
28. Nüchel H, Switala M, Sellmann L, Horn PA, Dürig J, Dührsen U, Küppers R, Grosse-Wilde H, Rebmann V. The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2010; 24:1152-9; <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2010.74>; PMID:20428196
29. Huergo-Zapico L, Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Gonzalez E, López-Soto A, Fernandez-Guizán A, Acebes-Huerta A, de Los Toyos JR, Lopez-Larrea C, Groh V, et al. Expression of ERp5 and GRP78 on the membrane of chronic lymphocytic leukemia cells: association with soluble MICA shedding. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61:1201-10; <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-011-1195-z>; PMID:22215138
30. Arreygue-García NA, Daneri-Navarro A, del Toro-Arreola A, Cid-Arregui A, Gonzalez-Ramella O, Jave-Suarez LF, Aguilar-Lemarrroy A, Troyo-Sanroman R, Beavon-Cuellar A, Delgado-Rizzo V, et al. Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer* 2008; 8:16; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-8-16>; PMID:18208618

31. Kumar V, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, et al. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. *PLoS One* 2012; 7:e44743; PMID:23024757; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044743>
32. Duan X, Deng L, Chen X, Lu Y, Zhang Q, Zhang K, Hu Y, Zeng J, Sun W. Clinical significance of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule A and NKG2D receptor on NK cells in pancreatic cancer. *Med Oncol* 2011; 28:466-74; <http://dx.doi.org/10.1007/s12032-010-9480-9>; PMID:20354827
33. Chung HW, Lim JB. Clinical significance of serum levels of immune-associated molecules, uric acid and soluble MHC class I chain-related molecules A and B, as diagnostic tumor markers for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci* 2011; 102:1673-9; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.01989.x>; PMID:21615621
34. Raffaghello L, Prigione I, Airelli I, Camoriano M, Leventi I, Gambioli C, Pende D, Steinle A, Ferrone S, Pionta V. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia* 2004; 6:558-68; PMID:15548365; <http://dx.doi.org/10.1593/neo.04316>
35. Paschen A, Sucker A, Hill B, Moll I, Zaparka M, Nguyen XD, Sim GC, Gutmann I, Hassel J, Becker JC, 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; 15:5208-15; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-09-0886>; PMID:19671853
36. Del Toro-Arreola S, Arreyguc-García N, Aguilar-Lemarroy A, Cid-Arregui A, Jimenez-Perez M, Haramati J, Barros-Núñez P, González-Ramella O, Del Toro-Arreola A, Ortiz-Lazareno P, et al. MHC class I-related chain A and B ligands are differentially expressed in human cervical cancer cell lines. *Cancer Cell Int* 2011; 11:15; <http://dx.doi.org/10.1186/1475-2867-11-15>; PMID:21631944
37. Yamaguchi K, Chikumi H, Shimizu A, Takata M, Kinoshita N, Hashimoto K, Nakamoto M, Matsunaga S, Kurai J, Miyake N, et al. Diagnostic and prognostic impact of serum-soluble UL16-binding protein 2 in lung cancer patients. *Cancer Sci* 2012; 103:1405-13; <http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02330.x>; PMID:22587355
38. Tamaki S, Kawakami M, Ishitani A, Kawashima W, Kanda S, Yamanaka Y, Shimomura H, Imai Y, Nakagawa Y, Hatake K, et al. Soluble MICB serum levels correlate with disease stage and survival rate in patients with oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2010; 30:4097-101; PMID:21036725
39. Wu BJ, Li WP, Qian C, Ding W, Zhou ZW, Jiang H. Serum soluble MICB (sMICB) correlates with disease progression and survival in melanoma patients. *Tumour Biol* 2013; 34:565-9; <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-012-0582-1>; PMID:23150178
40. Jimishi M, Takehara T, Tatsumi T, Hiramatsu N, Sakamoto R, Yamaguchi S, Hayashi N. Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol* 2005; 43:1013-20; PMID:16168521; <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2005.05.026>
41. Rebonann V, Schür P, Brandhorst D, Opalka B, Moritz T, Nowrouzian MR, Grosse-Wilde H. Soluble MICA as an independent prognostic factor for the overall survival and progression-free survival of multiple myeloma patients. *Clin Immunol* 2007; 123:114-20; PMID:17218152; <http://dx.doi.org/10.1016/j.clim.2006.11.007>
42. Cao W, Xi X, Hao Z, Li W, Kong Y, Cui L, Ma C, Ba D, He W. RAET1E2, a soluble isoform of the UL16-binding protein RAET1E produced by tumor cells, inhibits NKG2D-mediated NK cytotoxicity. *J Biol Chem* 2007; 282:18922-8; PMID:17470428; <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M702504200>
43. Eagle RA, Flack G, Warford A, Martínez-Borra J, Jaffarji I, Traherne JA, Ohashi M, Boyle LH, Barrow AD, Caillaud-Zucman S, et al. Cellular expression, trafficking, and function of two isoforms of human ULBP5/RAET1G. *PLoS One* 2009; 4:e4503; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004503>; PMID:19223974
44. Noël A, Gutiérrez-Fernández A, Soussi NE, Behrendt N, Maquó E, Lund IK, Sal S, Hoyer-Hansen G, López-Otin C. New and paradoxical roles of matrix metalloproteinases in the tumor microenvironment. *Front Pharmacol* 2012; 3:140; <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2012.00140>; PMID:22822400
45. Duffy MJ, Mullooly M, O'Donovan N, Sukor S, Crown J, Pierce A, McGowan PM. The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer? *Clin Proteomics* 2011; 8:9; <http://dx.doi.org/10.1186/1559-0275-8-9>; PMID:21906355
46. Waldhauer I, Goehldorf D, Gieseke F, Weinschenk T, Wittenbrink M, Ludwig A, Stevanovic S, Ramnensee HG, Steinle A. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res* 2008; 68:6368-76; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6768>; PMID:18676862
47. Sun D, Wang X, Zhang H, Deng L, Zhang Y. MMP9 mediates MICA shedding in human osteosarcomas. *Cell Biol Int* 2011; 35:569-74; <http://dx.doi.org/10.1042/CBI20100431>; PMID:21143201
48. Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, Ohyama H, Nakasho K, Yamada N, Hata M, Fukunaga S, Futani H, Okamura H, et al. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 mRNA by valproic acid plays a role in inhibiting the shedding of MHC class I-related molecules A and B on the surface of human osteosarcoma cells. *Oncol Rep* 2012; 28:1585-90; <http://dx.doi.org/10.3892/or.2012.1981>; PMID:22925031
49. Kim ES, Kim MS, Moon A. 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; 25:1375-82; PMID:15492828
50. Liu G, Arneridge CL, Wang X, Lundgren AD, Wu JD. The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. *J Immunol* 2010; 184:3346-50; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0903789>; PMID:20208009
51. Chitradre G, Lettas M, Bhar J, Wesch D, Steinle A, Fürtt D, Mytilineos J, Kaldhoff H, Janssen O, Oberg HH, et al. Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: heterogeneous involvement of the "a disintegrin and metalloproteinases" 10 and 17. *Int J Cancer* 2013; 133:1557-66; <http://dx.doi.org/10.1002/ijc.28174>; PMID:23526433
52. Baroum JB, Hamilton TK, Li X, Cotecchini T, Miles EA, Siemens DR, Graham CH. Hypoxia induces escape from innate immunity in cancer cells via increased expression of ADAM10: role of nitric oxide. *Cancer Res* 2011; 71:7433-41; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2104>; PMID:22006996
53. Adrain C, Zerd M, Christova Y, Taylor N, Freeman M. Tumor necrosis factor signaling requires iRhom2 to promote trafficking and activation of TACE. *Science* 2012; 335:225-8; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1214400>; PMID:22246777
54. McIlwain DR, Lang PA, Marerzky T, Hamada K, Ohishi K, Maney SK, Berger T, Murthy A, Duncan G, Xu HC, et al. iRhom2 regulation of TACE controls TNF-mediated protection against *Listeria* and responses to LPS. *Science* 2012; 335:229-32; <http://dx.doi.org/10.1126/science.1214448>; PMID:22246778
55. Siggs OM, Xiao N, Wang Y, Shi H, Tomisato W, Li X, Xia Y, Beutler B. iRhom2 is required for the secretion of mouse TNF α . *Blood* 2012; 119:5769-71; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-03-417949>; PMID:22550345
56. Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Ishida H, Miyagi T, Hosui A, Hayashi N, Sorafenib inhibits the shedding of major histocompatibility complex class I-related chain A on hepatocellular carcinoma cells by down-regulating a disintegrin and metalloproteinase 9. *Hepatology* 2010; 51:1264-73; <http://dx.doi.org/10.1002/hep.23456>; PMID:20099300
57. Kohga K, Tatsumi T, Tsunematsu H, Aono S, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Yamamoto M, Oze T, Aketa H, et al. Interleukin-1 β enhances the production of soluble MICA in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2012; 61:1425-32; PMID:22302133; <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-012-1208-6>
58. Wu JD, Arneridge CL, Wang X, Seya T, Plymate SR. Obstructing shedding of the immunostimulatory MHC class I chain-related gene B prevents tumor formation. *Clin Cancer Res* 2009; 15:632-40; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-08-1305>; PMID:19147769
59. Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, Kato-Kogoe N, Ohyama H, Nakasho K, Yamada N, Hata M, Fukunaga S, Futani H, et al. Valproic acid cooperates with hyaluronase to augment the susceptibility of human osteosarcoma cells to Fas- and NK cell-mediated cell death. *Int J Oncol* 2012; 41:83-91; <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2012.1438>; PMID:22576685
60. Duan X, Mao X, Sun W. ADAM15 is involved in MICB shedding and mediates the effects of gemcitabine on MICB shedding in PANC-1 pancreatic cancer cells. *Mol Med Rep* 2013; 7:991-7; <http://dx.doi.org/10.3892/mmr.2013.1272>; PMID:23314034
61. Bouam P, Agüera-González S, Atkinson S, Pennington CJ, Edwards DR, Murphy G, Reyburn HT, Valls-Gómez M. Cutting edge: the metalloproteinase ADAM17/TNF-alpha-converting enzyme regulates proteolytic shedding of the MHC class I-related chain B protein. *J Immunol* 2009; 182:49-53; PMID:19109134; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.182.1.49>
62. Agüera-González S, Gross CC, Fernández-Messina L, Ashiru O, Eteso G, Hang HC, Reyburn HT, Long EO, Valls-Gómez M. Palmitoylation of MICA, a ligand for NKG2D, mediates its recruitment to membrane microdomains and promotes its shedding. *Eur J Immunol* 2011; 41:3667-76; PMID:21928280; <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201141645>
63. Waldhauer I, Steinle A. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res* 2006; 66:2520-6; PMID:16510567; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2520>
64. Hedlund M, Nagaeva O, Kargl D, Barzov V, Mincheva-Nilsson L. Thermal- and oxidative stress causes enhanced release of NKG2D ligand-bearing immunosuppressive exosomes in leukemia/lymphoma T and B cells. *PLoS One* 2011; 6:e16899; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0016899>; PMID:21364924
65. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002; 115:3719-27; PMID:12235282; <http://dx.doi.org/10.1242/jcs.00065>

© 2014 Landes Bioscience. Do not distribute.

66. Bourbonlaila D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol* 2010; 20:161-8; <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcancer.2010.05.002>; PMID:20470890
67. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803:55-71; <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer.2010.01.003>; PMID:20080133
68. Zhang LH, Zhang X. Roles of GRP78 in physiology and cancer. *J Cell Biochem* 2010; 110:1299-305; <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.22679>; PMID:20506407
69. Kaiser BK, Yim D, Chow TT, Gonzalez S, Dai Z, Mann HH, Strong RK, Groh V, Spies T. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature* 2007; 447:482-6; PMID:17895932; <http://dx.doi.org/10.1038/nature05768>
70. Zocchi MR, Catellani S, Canevali P, Tavella S, Garuti A, Villaggio B, Zunino A, Gobbi M, Fraternali-Orcioni G, Kunkl A, et al. High ERp5/ADAM10 expression in lymph node microenvironment and impaired NKG2D ligands recognition in Hodgkin lymphomas. *Blood* 2012; 119:1479-89; <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2011-07-370841>; PMID:22167753
71. Zhang HG, Grizzle WE. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clin Cancer Res* 2011; 17:959-64; <http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1489>; PMID:21224375
72. Clayton A, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol* 2008; 180:7249-58; PMID:18490724; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.180.11.7249>
73. Viaud S, Terme M, Flament C, Taieb J, André F, Novault S, Escudier B, Robert C, Caillat-Zucman S, Turza T, et al. Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15Ralpha. *PLoS One* 2009; 4:e4942; <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0004942>; PMID:19319200
74. Ashiru O, Boute P, Fernández-Messina L, Agütera-González S, Skepper JN, Valés-Gómez M, Reyburn HT. 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; 70:481-9; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-1688>; PMID:20068167
75. Ashiru O, López-Cobo S, Fernández-Messina L, Pontes-Quero S, Pandolfi R, Reyburn HT, Valés-Gómez M. A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA*008. *Biochem J* 2013; 454:295-302; <http://dx.doi.org/10.1042/BJ20130194>; PMID:23772752
76. Xu X, Rao GS, Groh V, Spies T, Gattuso P, Kaufman HL, Plate J, Prinz RA. Major histocompatibility complex class I-related chain A/B (MICA/B) expression in tumor tissue and serum of pancreatic cancer: role of uric acid accumulation in gemcitabine-induced MICA/B expression. *BMC Cancer* 2011; 11:194; <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2407-11-194>; PMID:21605422
77. Moeizaki T, Onishi H, Koya N, Kiyota A, Tanaka H, Umehayashi M, Ogino T, Nagamatsu I, Katano M. Combinatorial cytotoxicity of gemcitabine and cytokine-activated killer cells in hepatocellular carcinoma via the NKG2D-MICA/B system. *Anticancer Res* 2011; 31:2505-10; PMID:21873167
78. Kohga K, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Ishida H, Okawa K, Kato T, Hiramatsu N, Hayashi N. Anticancer chemotherapy inhibits MHC class I-related chain a ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 2009; 69:8050-7; <http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-0789>; PMID:19826051
79. Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, Ohyama H, Nakasho K, Yamada N, Hata M, Fukunaga S, Furani H, Okamura H, et al. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 mRNA by valproic acid plays a role in inhibiting the shedding of MHC class I-related molecules A and B on the surface of human osteosarcoma cells. *Oncol Rep* 2012; 28:1585-90; <http://dx.doi.org/10.3892/or.2012.1981>; PMID:22923031
80. Chávez-Blanco A, De la Cruz-Hernández E, Dmínguez GI, Rodríguez-Cortez O, Alatorre B, Pérez-Cárdenas E, Chacón-Salinas R, Trejo-Becerril C, Taja-Chayeb L, Trujillo JE, et al. Upregulation of NKG2D ligands and enhanced natural killer cell cytotoxicity by hydralazine and valproate. *Int J Oncol* 2011; 39:1491-9; <http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2011.1144>; PMID:21805029

3. LOS TRATAMIENTOS DESMETILANTES DISMINUYEN LA LIBERACION DE MICA, MICB Y ULBP2 EN LA LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA, FAVORECIENDO EL RECONOCIMIENTO INMUNOLÓGICO MEDIADO POR LAS CÉLULAS NK

ANTECEDENTES: La LMA es una enfermedad muy heterogénea desde el punto de vista morfológico y molecular lo cual dificulta tanto el pronóstico como las opciones terapéuticas de estos pacientes. Numerosos estudios han mostrado que los pacientes con LMA presentan frecuentemente mutaciones en genes relacionados con la metilación del ADN (DNMT3A, TET2 e IDH) sugiriendo que la metilación del ADN es un mecanismo importante en el desarrollo de esta patología. Actualmente dos agentes hipometilantes (AZA, Vidaza®; DAC, Dacogen®), aprobados por la FDA, están siendo utilizados para el tratamiento de la LMA. Estos tratamientos muestran consecuencias diversas sobre la viabilidad y el ciclo celular, y además son capaces de modular la expresión de múltiples genes. Sin embargo, los mecanismos o las rutas moleculares específicas sobre los que actúan son aún poco conocidos.

Como hemos descrito previamente, la liberación de los NKG2DL en su forma soluble implica una expresión reducida de estos ligandos en la superficie de la célula tumoral y la internalización del receptor NKG2D en la célula efectora, evitando finalmente el reconocimiento inmunológico. A la vista de estas evidencias, en este trabajo nos hemos propuesto analizar el efecto que los tratamientos hipometilantes tienen en la liberación de los NKG2DL y sus consecuencias funcionales *in vivo* en el tratamiento de la LMA.

Artículo 3: “Increasing TIMP3 expression by hypomethylating agents diminishes soluble MICA, MICB and ULBP2 shedding in acute myeloid leukemia, facilitating NK cell-mediated immune recognition. **Baragaño Raneros A, Minguela Puras A, Rodriguez RM, Colado E, Bernal T, Anguita E, Vasco Mogorron A, Chaparro Gil A, Vidal-Castiñeira JR, Márquez-Kisinousky L, Díaz Bulnes P, Martinez Marin A, García Garay MC, Suárez-Álvarez B, López-Larrea C.** *Oncotarget*. 2017 Mar 29. doi: 10.18632/oncotarget.16657.

RESUMEN: A la vista de estos antecedentes, nos propusimos analizar el efecto del tratamiento con agentes hipometilantes (AZA, DAC) sobre la liberación de los NKG2DL en líneas celulares de LMA (KG1A, NB4). Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con ambos agentes hipometilantes reduce drásticamente los niveles solubles de todos los NKG2DL (MICA/B, ULBPs 1-3) asociándose con un incremento de su expresión en la membrana celular. Además, el bloqueo de la liberación de estos ligandos en su forma soluble permite restaurar la expresión de NKG2D en las células NK y, por lo tanto, incrementar su capacidad citotóxica. Estos resultados fueron corroborados en muestras biológicas de pacientes con LMA tratados con Vidaza® (n=12) donde se observó que los niveles de los NKG2DL solubles en el suero son menores tras el tratamiento. Además, esta disminución está asociada con un aumento de su expresión en la superficie celular de los blastos mieloides favoreciendo el reconocimiento inmunológico mediado por la interacción NKG2D-NKG2DL. Esta inhibición en los niveles de MICA, MICB y ULBP2 soluble se produce como consecuencia del incremento de expresión de *TIMP3*, un inhibidor natural de la actividad de la proteasa ADAM17. El análisis del patrón de metilación de *TIMP3* mediante la técnica de pirosecuenciación mostró que este gen se encuentra aberrantemente metilado en las líneas celulares de LMA. Asimismo, el 25.5% de los pacientes con LMA (n=90) presentaron niveles elevados de metilación para *TIMP3* los cuales se asocian con un pronóstico citogenético adverso de la enfermedad.

CONCLUSIONES: Nuestro estudio sugiere que la inducción de la expresión de *TIMP3* tras el tratamiento con agentes hipometilantes disminuye los niveles solubles de MICA, MICB y ULBP2 manteniendo su expresión en la membrana celular. El análisis del nivel de metilación de *TIMP3* podría ser considerado como un nuevo biomarcador de pronóstico citogenético adverso en el desarrollo de la LMA. Por lo tanto, el tratamiento con Vidaza® supone una buena estrategia terapéutica para desmetilar *TIMP3* potenciando la respuesta inmune frente a la LMA.

Increasing TIMP3 expression by hypomethylating agents diminishes soluble MICA, MICB and ULBP2 shedding in acute myeloid leukemia, facilitating NK cell-mediated immune recognition

Aroa Baragaño Raneros¹, Alfredo Minguela Puras², Ramon M Rodriguez¹, Enrique Colado³, Teresa Bernal³, Eduardo Anguita⁴, Adela Vasco Mogorron², Alberto Chaparro Gil⁴, Vidal-Castiñeira JR¹, Leonardo Márquez-Kisinousky¹, Paula Díaz Bulnes¹, Amelia Martínez Marin⁵, María Carmen García Garay⁶, Beatriz Suárez-Álvarez^{1,*}, Carlos López-Larrea^{1,*}

¹Department of Immunology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

²Immunology Service, Instituto Murciano de Investigación Biosanitaria (IMIB), Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

³Department of Hematology, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Spain

⁴Hematology Department, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos (IdISSC), Department of Medicine, Universidad Complutense de Madrid (UCM), Madrid, Spain

⁵Hematology Service, Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia, Spain

⁶Hematology Service, Hospital General Universitario Santa Lucía, Cartagena, Murcia, Spain

*These authors have contributed equally to this work

Correspondence to: Carlos López-Larrea, **email:** inmuno@hca.es
Beatriz Suárez-Álvarez, **email:** bsuarez@hca.es

Keywords: acute myeloid leukemia (AML), DNA methylation, NKG2DL, NKG2D, TIMP3

Received: September 16, 2016

Accepted: March 16, 2017

Published:

ABSTRACT

Acute myeloid leukemia (AML) is a disease with great morphological and genetic heterogeneity, which complicates its prognosis and treatment. The hypomethylating agents azacitidine (Vidaza[®], AZA) and decitabine (Dacogen[®], DAC) have been approved for the treatment of AML patients, but their mechanisms of action are poorly understood. Natural killer (NK) cells play an important role in the recognition of AML blasts through the interaction of the activating NKG2D receptor with its ligands (NKG2DL: MICA/B and ULBPs1-3). However, soluble NKG2DL (sNKG2DL) can be released from the cell surface, impairing immune recognition. Here, we examined whether hypomethylating agents modulate the release of sNKG2DL from AML cells. Results demonstrated that AZA- and DAC-treated AML cells reduce the release of sNKG2DL, preventing downregulation of NKG2D receptor on the cell surface and promoting immune recognition mediated by NKG2D-NKG2DL engagement. We show that the shedding of MICA, MICB and ULBP2 is inhibited by the increased expression of TIMP3, an ADAM17 inhibitor, after DAC treatment. The *TIMP3* gene is highly methylated in AML cells lines and in AML patients (25.5%), in which it is significantly associated with an adverse cytogenetic prognosis of the disease. Overall, TIMP3 could be a target of the demethylating treatments in AML patients, leading to a decrease in MICA, MICB and ULBP2 shedding and the enhancement of the lytic activity of NK cells through the immune recognition mediated by the NKG2D receptor.

INTRODUCTION

Acute myeloid leukemia (AML) is characterized by the accumulation of myeloid precursors in bone marrow and peripheral blood [1]. AML patients were originally categorized by the French-American-British (FAB) classification on the basis of their cellular morphology. Since 2008, and extended in 2016, the World Health Organization (WHO) has additionally characterized AML patients with respect to specific genetic abnormalities [2]. Both classifications reveal the considerable clinical and biological heterogeneity of this disease, but the therapeutic options remains very limited. Genome-wide epigenetic studies have shown that mutations in genes involved in DNA methylation (DNMT3A, TET2 and IDH) or aging-associated changes are the main causes of the aberrant DNA methylation pattern noted in AML patients [3]. DNA hypomethylating agents are currently approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of patients with AML and myelodysplastic syndromes. Azacitidine (Vidaza®, AZA) and decitabine (Dacogen®, DAC) are cytidine nucleoside analogs whose main advantage over conventional care regimens is less toxicity of the drug, better tolerability and better overall survival of AML patients [4–6]. These hypomethylating drugs affect cell viability, cell cycle, and changes in gene expression profiles [7]. Thus, knowing the molecular patterns that are modulated by these agents could be essential to improving their effectiveness and for identifying new biomarkers that predict the response to these drugs.

Natural killer (NK) cells play an important role in the innate immune response to AML through a balance between activating and inhibiting signals [8]. NKG2D is one of the most important activating receptors expressed in CD8⁺ T cells, NK cells, $\gamma\delta$ T cells and NKT cells [9]. NKG2D recognizes two families of stress-inducible ligands (NKG2DL): the MHC class I-related molecules (MICA/MICB) and the UL-16-binding proteins (ULBP1-6) [10, 11]. The expression of NKG2DL in AML cells is highly heterogeneous and controversial. Some authors have shown that most AML patients express at least one NKG2DL at the cell surface [12], whilst others have reported low or null expression levels of these ligands in AML cells [13, 14]. In addition, AML cells have developed several regulatory mechanisms to downregulate NKG2DL expression and avoid NKG2D-mediated immunosurveillance. Epigenetic modifications have been proposed as being key mechanisms for modulating NKG2DL expression in AML cells. Treatment with valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, enhances MICA, MICB and ULBP1 surface expression in AML blasts, increasing the killing activity of NK cells [15]. In this way, we have previously reported that *MICA*, *ULBP1*, *ULBP2* and *ULBP3* genes are aberrantly hypermethylated in AML cells, and that treatment with demethylating agents increases their expression promoting recognition

and cytotoxicity by NK cells [16]. Moreover, NKG2DL can also be released from the surface of tumor cells, leading to downregulation of their NKG2D receptor and damaging their recognition by cytotoxic NKG2D-positive cells [17]. Some NKG2DL are more susceptible to metalloprotease (MP) cleavage and to release as soluble proteins, whilst other NKG2DL are recruited to exosomes [18–23]. The matrix metalloproteases (MMPs) MMP9 and MMP14, and the ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) family (ADAM9, ADAM10 and ADAM17, also known as TACE) are mainly known for their involvement in NKG2DL cleavage, and some, such as ADAM17, can be found in exosomes [24]. Thus, the different mechanisms of release for NKG2DL could depend on the cell type, the cellular metabolism, and even the availability of MMPs [25].

The tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3), a potent inhibitor of the MMP subfamily and some ADAMs, has been associated with MICA and MICB shedding [26, 27]. The presence of high levels of sNKG2DL in the serum of AML patients has been associated with poor survival and lower complete remission rates [12, 28]. Therefore, a detailed knowledge of the mechanisms involved in the regulation of sNKG2DL could usefully be applied to prevent the immune escape of tumor cells.

In this study, we analyze the effect of hypomethylating agents on the shedding of sNKG2DL in AML cells and their consequences for NK cell-mediated immune recognition. We show that (i) AZA and DAC limit the release of all NKG2DL in the supernatants of AML cell lines; (ii) decreased levels of sNKG2DL prevent the downregulation of the NKG2D receptor and favor the recognition and lysis of AML cells by NK cells; (iii) ADAM17 is the sheddase involved in the release of sNKG2DL in AML cell lines; (iv) demethylation of *TIMP3* gene may be responsible for the lower level of shedding of MICA, MICB and ULBP2 in AML cells; and (v) high *TIMP3* DNA methylation levels in AML patients are associated with an adverse cytogenetic prognosis for the disease. Therefore, our study reveals that hypomethylating treatments in AML cells could modulate the shedding of MICA, MICB and ULBP2 in a *TIMP3* demethylation-dependent manner.

RESULTS

Hypomethylating treatments limit NKG2DL release, promoting NKG2D-mediated NK cell recognition

We determined the effect of the AZA and DAC hypomethylating agents on the release of sNKG2DL (MICA, MICB, ULBPs 1-3) in two AML cell lines (KG1a and NB4) that showed high levels of these soluble molecules in their cellular supernatants at basal level. AML cells were treated with DAC or AZA (1 μ M or

5 μM) for 48 hours, and the presence of sNKG2DL in the cell-free supernatants was quantified by ELISA. The levels of all sNKG2DL were significantly reduced after treatment with both demethylating drugs (Figure 1A). The downregulation was dose-dependent, but the pattern was not identical in the two cell lines, the difference was more pronounced at 1 μM in the NB4 cell line than in the KG1a cells. However, in both cell lines, all sNKG2DL were reduced by more than 90% at the highest doses. As similar effects were obtained with both hypomethylating agents and because DAC treatment is less toxic to the AML cells, further *in vitro* experiments were carried out with DAC alone. Moreover, as shown in Figure 1B, reduced release of sNKG2DL after DAC treatment was associated with the increased expression of these ligands on the surface of AML cells.

The presence of NKG2DL in soluble forms can have a dual effect: on the one hand, it down-modulates the NKG2D

receptor on the surface of NKG2D-positive effector cells, and on the other hand, it damages the immune recognition mediated by cytotoxic cells by blocking the NKG2D-binding site to their NKG2DL expressed on the surface of target cells. To explore those functional consequences after DAC treatment, we first analyzed the effect of sNKG2DL on the expression of NKG2D receptor in NKL cells before and after DAC treatment. NKG2D expression was significantly weaker in the presence of supernatants from untreated AML cells (sNKG2DL-positive; $p = 0.09$ for KG1a and $p = 0.002$ for NB4) whilst the NKG2D expression was partially restored after incubation with DAC-treated supernatants ($p = 0.023$ for KG1a and $p = 0.011$ for NB4) (Figure 2A). Additionally, we assayed the effect of sNKG2DL on the blockage of the NKG2D-NKG2DL engagement. To do this, we carried out cytotoxicity assays using the NKL cell line, which expresses high levels of NKG2D receptor, as a source of effector cells, and, as

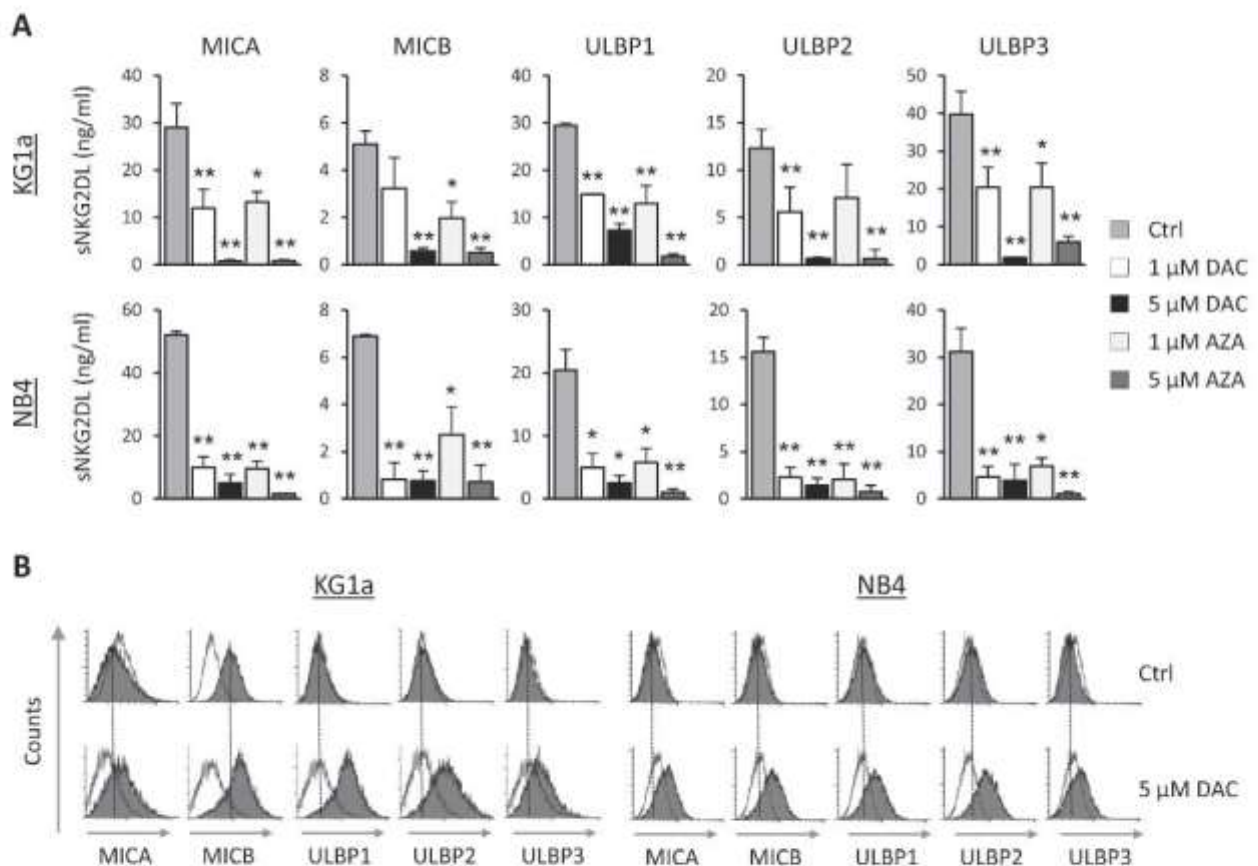


Figure 1: Hypomethylating agents (DAC and AZA) decreases the release of sNKG2DL, inducing their expression on the surface of AML cells. (A) AML cell lines (KG1a and NB4 cells) were treated with DMSO (Ctrl), DAC (1 and 5 μM) or AZA (1 and 5 μM) for 48 hours. Soluble levels of MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 and ULBP3 ligands were quantified by sandwich ELISA. Each bar represents the mean \pm SEM of at least four independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.001$. (B) KG1a and NB4 cells were treated with 5 μM of DAC for 48 hours. Before and after treatment, cell surface expression of NKG2DL was analyzed by flow cytometry using monoclonal antibodies specific to each NKG2DL (MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 and ULBP3), followed by incubation with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG. The white histograms represent the isotype control antibody and shaded grey histograms show the NKG2DL expression. Dotted vertical lines indicate mean fluorescence intensity value in untreated samples.

target cells, the human leukemic cell line K562, which expresses high levels of NKG2DL on the cell surface (data not shown). Effector (E) and target (T) cells were co-cultured, at different E:T ratios, in the presence of cell-free supernatants obtained from untreated and DAC-treated AML cells. As shown in Figure 2B (right panel), immune recognition was dependent on the NKG2D-NKG2DL interaction because blocking NKG2D with an anti-NKG2D monoclonal antibody (mAb) completely inhibited specific lysis. Moreover, no effects on lysis were observed when exogenous DAC was added under basal conditions, confirming that the DAC lack of non-specific

effects on the lytic capacity of NKL cells (Figure 2B, right panel). So, when the cytotoxicity assay was performed in the presence of supernatants (sNKG2DL-positive) from untreated-AML cells (KG1a and NB4), the lytic ability of NKL cells was significantly reduced at all assayed E:T ratios ($p = 0.0045$ for KG1a and $p = 0.14$ for NB4 at 10:1 E:T ratio) (Figure 2B, left and middle panel). However, in the presence of supernatants obtained from DAC-treated AML cells (reduced sNKG2DL), the specific lysis was similar to basal conditions and significantly greater than in supernatants from untreated AML cells ($p = 0.0016$ for KG1a and $p = 0.026$ for NB4 at 10:1 E:T ratio).

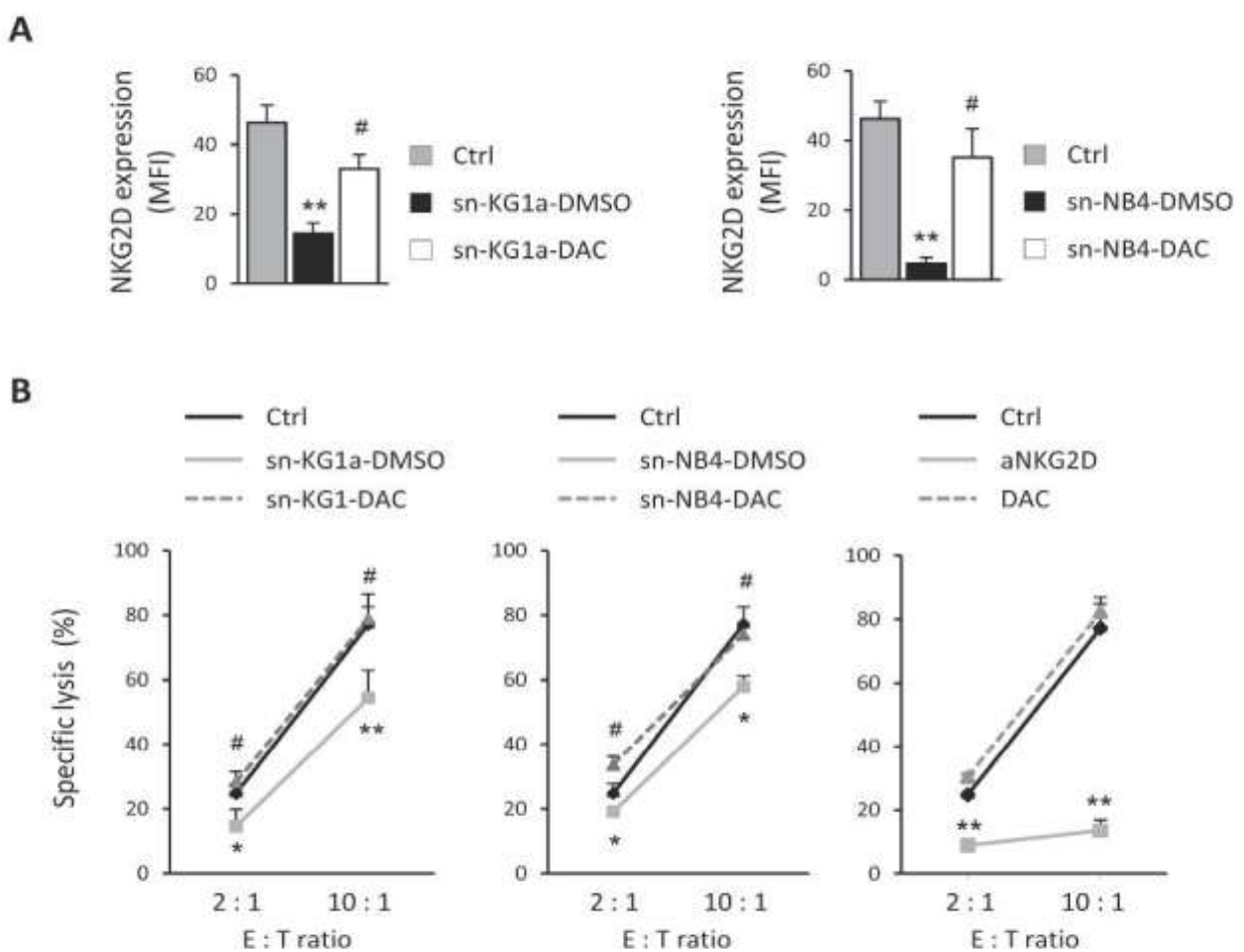


Figure 2: Reduced shedding of sNKG2DL after DAC treatment restores the NKG2D expression and favors the immune recognition mediated by NKG2D-NKG2DL engagement. (A) NKL cells were co-cultured with cell-free supernatants (sn) obtained from KG1a and NB4 cells untreated (sn-DMSO) or treated with 1 μ M DAC for 48 hours (sn-DAC). NKL cells grown in culture medium were considered as a control (Ctrl). NKG2D expression was analyzed by flow cytometry and represented as mean fluorescence intensity (MFI). Each bar represents the mean \pm SEM of three independent experiments. ** versus control and $p < 0.01$; # versus sn-DMSO and $p < 0.05$. (B) NKL cells were co-cultured with K562 cells at the indicated E:T ratio in a cell lysis assay, in the absence (Ctrl) or presence of cellular supernatant derived from KG1a (left panel) and NB4 (middle panel) cells previously treated with DMSO (sn-DMSO) or 1 μ M DAC (sn-DAC) for 48 hours. Specificity of the NKG2D-NKG2DL interaction was corroborated using an anti-NKG2D blocking mAb and the effect of DAC was assayed to analyze the non-specific effects on the lytic capacity of NKL cells (right panel). Measurements were made in duplicate and the mean \pm SEM of the two independent experiments are shown. * versus control and $p < 0.05$; ** versus control and $p < 0.01$; # versus sn-DMSO and $p < 0.05$.

Thus, our results suggest that downregulation of sNKG2DL in AML cells after DAC treatment favors NKL cell-mediated immune recognition through NKG2D-NKG2DL engagement.

ADAM17, but not ADAM10, is involved in NKG2DL shedding by AML cells

Proteolytic shedding of NKG2DL is mediated by different proteases in which ADAM10 and ADAM17 play a key role [17]. We analyzed the involvement of these two proteases in the release of sNKG2DL by AML cells. KG1a and NB4 cells were treated for 48 hours with specific inhibitors for ADAM17 (GW280264X) and ADAM10 (GI254023X), and the presence of sNKG2DL was quantified by ELISA in the culture supernatants. Pharmacological inhibition of ADAM17 produced a significant decrease in all sNKG2DL levels in both AML cell lines but no change was observed after ADAM10 inhibition (Figure 3A). Similar results were observed with TMI 1, an inhibitor of ADAM17 and other MMPs, but not of ADAM10 activity (Supplementary Figure 1). These results suggest that only ADAM17 is mainly involved in the shedding of NKG2DL in AML cell lines.

In order to determine whether DAC treatment induces changes in the expression levels of ADAM17, we quantified ADAM17 expression on the surface of KG1a and NB4 cells before and after DAC treatment by flow cytometry. No changes in the expression of ADAM17 were detected after treatment with DAC for 48 hours (Figure 3B). Nonetheless, we found that DAC significantly reduced ADAM17 activity in untreated and DAC-treated AML cells ($p = 0.01$ for KG1a and $p = 0.039$ for NB4) when analyzed by a fluorometric assay (Figure 3C). Therefore, these findings suggest that the proteolytic activity of ADAM17, and not its expression, could be directly or indirectly damaged upon exposure of AML cells to demethylating treatments, leading to less shedding of NKG2DL.

DAC modulates sMICA, sMICB and sULBP2 release through demethylation of TIMP3

The tissue inhibitor of metalloproteinase-3 (TIMP3) works as a natural inhibitor of ADAM17 and has also been shown to block the release of sNKG2DL [26]. First, we examined whether DAC treatment could induce changes in the expression of TIMP3. To this end, KG1a and NB4 cells were cultured for 48 hours with growing concentrations of DAC and TIMP3 expression was analyzed by qRT-PCR and western blot. While the TIMP3 transcription levels were very low or nearly absent at basal level in both AML cell lines, a significant dose-dependent increase in TIMP3 was observed after DAC treatment (Figure 4A). As a positive control, we analyzed the transcription levels of MICA in KG1a cells,

which our group had previously reported to be highly methylated in this cell line. Moreover, these results are correlated with a clear increase in TIMP3 protein levels relative to basal conditions after DAC treatment in both cell lines (Figure 4B).

These findings led us to hypothesize that epigenetic mechanisms such as DNA methylation might regulate the expression of the *TIMP3* gene in AML cells. To find evidence to support this hypothesis, we determined the *TIMP3* DNA methylation profile by pyrosequencing before and after treating KG1a and NB4 cells with DAC. The analyzed region contains seven CpG sites within a CpG island located between positions +579 bp and +637 bp. Results show that the *TIMP3* gene is highly methylated in KG1a and NB4 cells (91.5% and 92.3%, respectively), whereas these levels were partially reduced (50% in KG1a and 52.7% in NB4) after treatment with DAC (5 μ M, Figure 4C). The decrease in the DNA methylation level for the *TIMP3* gene was DAC dose-dependent, corroborating the specificity of the demethylating agent treatment. However, *TIMP3* was fully unmethylated in the HELR AML cell line, which did not release sNKG2DL (data not shown). These data suggest that demethylation of *TIMP3* could be associated with their increased expression levels in AML cells after DAC treatment.

Next, the direct involvement of TIMP3 in regulating and shedding sNKG2DL was confirmed by gene silencing (Figure 4D). KG1a cells were treated with DAC in order to increase TIMP3 expression, and further TIMP3 was silenced using small interfering RNA (siRNA). While treatment with DAC significantly reduces the levels of all NKG2DL in the cell-free supernatants, specific silencing of TIMP3 restores the shedding and release of soluble MICA ($p = 0.001$), MICB ($p = 0.031$) and ULBP2 ($p = 0.002$) (Figure 4E). However, the soluble ULBP1 and ULBP3 remain unchanged. Thus, the TIMP3 DNA methylation pattern could modulate the sheddase activity of ADAM17 and thereby the release of sMICA, sMICB and sULBP2. Additional mechanisms involved in the ADAM17 regulation and induced by hypomethylating agents could be responsible for the downregulation of the soluble levels for ULBP1 and ULBP3, although this aspect requires further analysis.

Vidaza®-treated AML patients show reduced sNKG2DL release

Two hypomethylating agents (Vidaza® and Dacogen®) are currently approved for the treatment of AML patients. Decitabine is indicated for those aged 65 years or more and who are not considered candidates for induction chemotherapy, while Vidaza® is administered to AML patients as an initial regimen and to those who have relapsed. For these reasons, Vidaza® is used more widely than decitabine in AML patients with high percentage of blasts (> 20%) or myelodysplastic related changes.

We quantified the soluble levels of MICA, MICB and ULBP1-3 by ELISA in the sera of twelve patients obtained before and after treatment with Vidaza[®]. All patients showed soluble levels of two or more NKG2DL. MICB and ULBP3 were the most commonly released NKG2DL (83.3% of the patients), followed by ULBP2 (66.7%), ULBP1 (58.3%) and MICA (50%) (data not shown). When we compared the soluble levels of each NKG2DL before and after treatment, we noted a clear tendency towards the reduction of sNKG2DL after treatment although not significant except for MICB ($p = 0.022$) (Figure 5A). More than 60% of the patients who were positive for some soluble ligand before treatment had lower levels of these ligands after Vidaza[®] treatment.

We were only able to obtain blasts from the bone marrow of five patients before and after Vidaza[®] treatment.

There was a clear increase in the expression of some NKG2DL on the cell surface of blasts of three patients, whilst this increase was more discrete or nonexistent in the other two patients (Figure 5B and 5C). Patients who received the highest number of cycles (between 7 and 13) of Vidaza[®] showed the greatest increase in NKG2DL expression (data not shown).

To determine the *in vivo* effect of the treatment with hypomethylating agents on immune recognition mediated by NK cells, we carried out a cytotoxicity assay using the NKL cell line as effector and C1R-MICA transfectants as target cells, at different E:T ratios. The co-culture assay was performed in the presence of serum from two independent AML patients obtained before and after Vidaza[®] treatment. The specific lysis of target cells was significantly inhibited in the presence of pre-Vidaza[®] sera

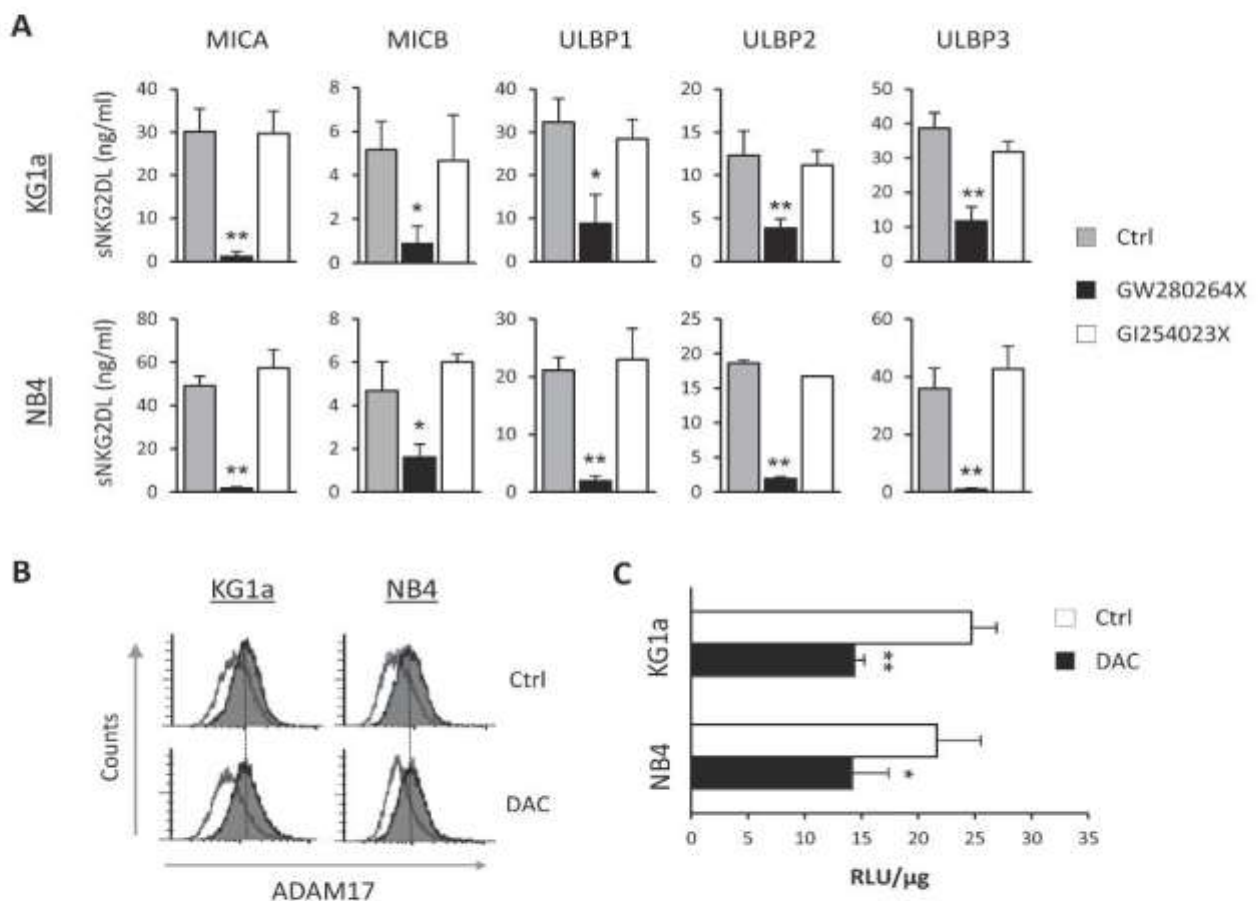


Figure 3: ADAM17, but not ADAM10, regulates NKG2DL shedding in AML cell lines. (A) KG1a and NB4 cells were treated with inhibitors specific to ADAM17 (10 μM GW280264X) and ADAM10 (50 μM of GI254023X) for 48 hours. Levels of soluble NKG2DL (sMICA/B and sULBP1-3) were quantified by sandwich ELISA. Values are the mean ± SEM of at least three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. (B) KG1a and NB4 cells were treated with DMSO (Ctrl) or DAC (1 μM) for 48 hours. After treatment, cell surface expression of ADAM17 was analyzed by flow cytometry using anti-human ADAM17 monoclonal antibody, followed by incubation with FITC-conjugated goat anti-mouse IgG. The white histograms represent the isotype control antibody and the shaded grey histograms show the ADAM17 expression. (C) ADAM17 activity in KG1a and NB4 cells was measured in whole-cell lysates after treatment with DMSO (Ctrl) or DAC (5 μM) for 48 hours. Data are expressed as relative fluorescence units (RLU) at Ex/Em=490/520 nm absorbance normalized with respect to micrograms of total protein (RLU/μg). Values are the mean ± SEM of three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

(positive sNKG2DL) at all analyzed ratios ($p = 0.006$ and $p = 0.01$ at 2.1 E:T ratio for both patients respectively), and was partially restored after co-culture in the presence of post-Vidaza® sera (low levels of sNKG2DL; $p = 0.025$ and $= 0.017$ 01 at 2.1 E:T ratio for both patients) (Figure 6). These results suggest that treatment of AML patients with hypomethylating agents limits the release of soluble NKG2DL in sera, contributing to a stronger immune recognition by NKG2D-positive cytotoxic cells.

Aberrant *TIMP3* DNA methylation is associated with an adverse cytogenetic prognosis

To confirm the results previously obtained in AML cell lines, the *TIMP3* DNA methylation pattern was analyzed in bone marrow cells obtained from 90 AML patients and 25 healthy donors, using the bisulfite pyrosequencing technique. The *TIMP3* DNA methylation levels observed in healthy donors were highly homogeneous

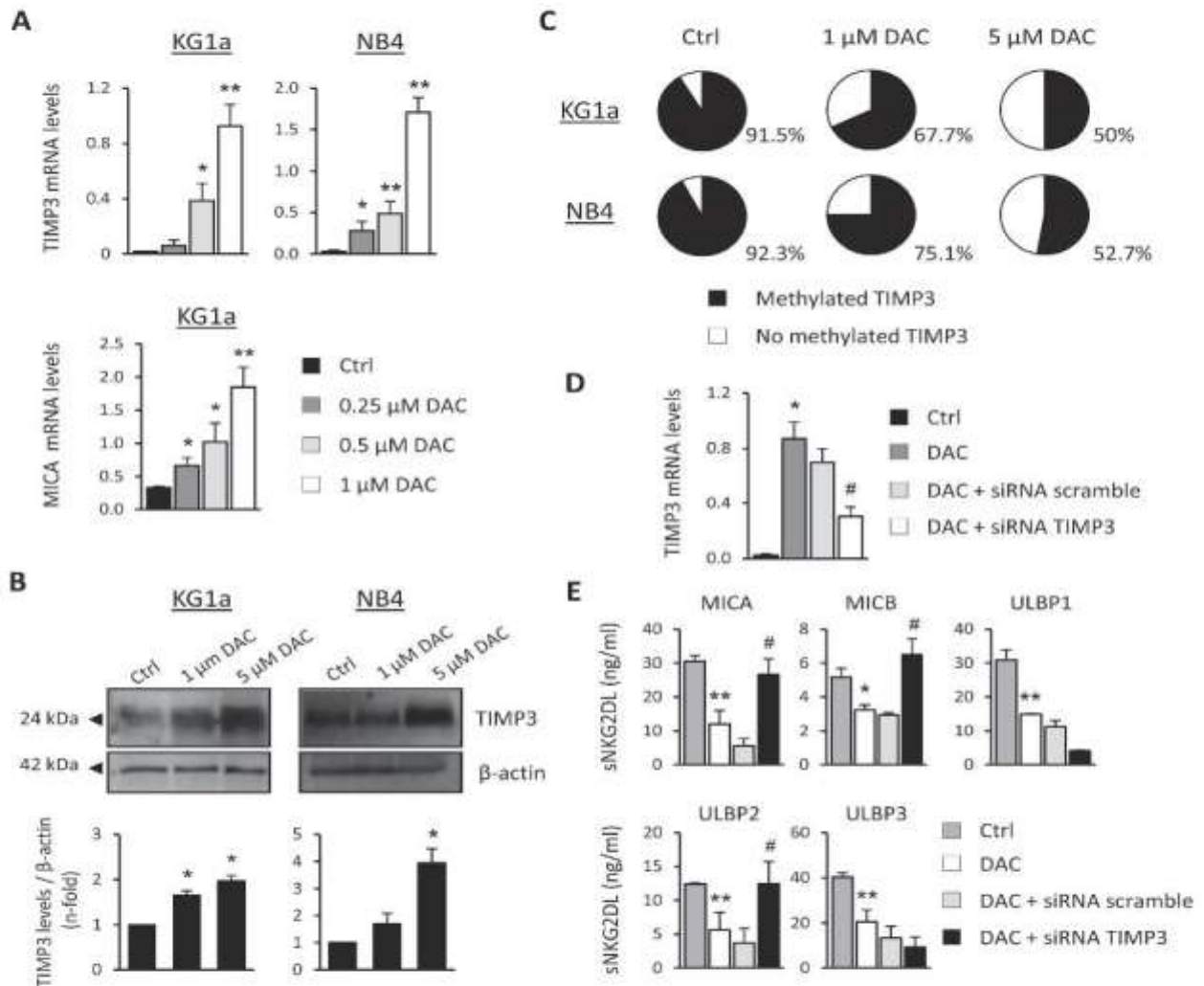


Figure 4: *TIMP3* is involved in the release of sMICA, sMICB and sULBP2 in AML cell lines. (A) KG1a and NB4 cells were treated with DMSO (Ctrl) or DAC (0.25, 0.5 and 1 μ M) for 48 hours, and *TIMP3* expression was analyzed by qRT-PCR. Each bar represents the relative expression of *TIMP3* normalized with respect to the reference gene (*GAPDH*), using the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *MICA* transcription levels in the KG1a cell line untreated (DMSO, Ctrl) or treated with DAC at different concentrations were used as a positive control. Results are summarized as the mean \pm SEM of five independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$. (B) *TIMP3* protein levels were evaluated by western blot in KG1a and NB4 cells after treatment with DMSO (Ctrl) or DAC (1 μ M or 5 μ M) for 48 hours. * $p < 0.05$. (C) The *TIMP3* methylation pattern was quantified by pyrosequencing in AML cell lines (KG1a and NB4 cells) before and after treatment with 1 μ M or 5 μ M DAC. Pie charts show the average percentage of methylation for the CpGs analyzed in the *TIMP3* gene. (D) *TIMP3* expression was inhibited by transfection of KG1a cells previously treated with DAC (1 μ M) with a *TIMP3*-specific siRNA or nonspecific scramble siRNA (200 nM). * $p < 0.05$ (E) Soluble NKG2DL were quantified by sandwich ELISA after *TIMP3* inhibition. Values shown are the mean \pm SEM of three independent experiments. * versus control and $p < 0.05$; ** versus control and $p < 0.01$ # versus nonspecific scramble siRNA and $p < 0.05$.

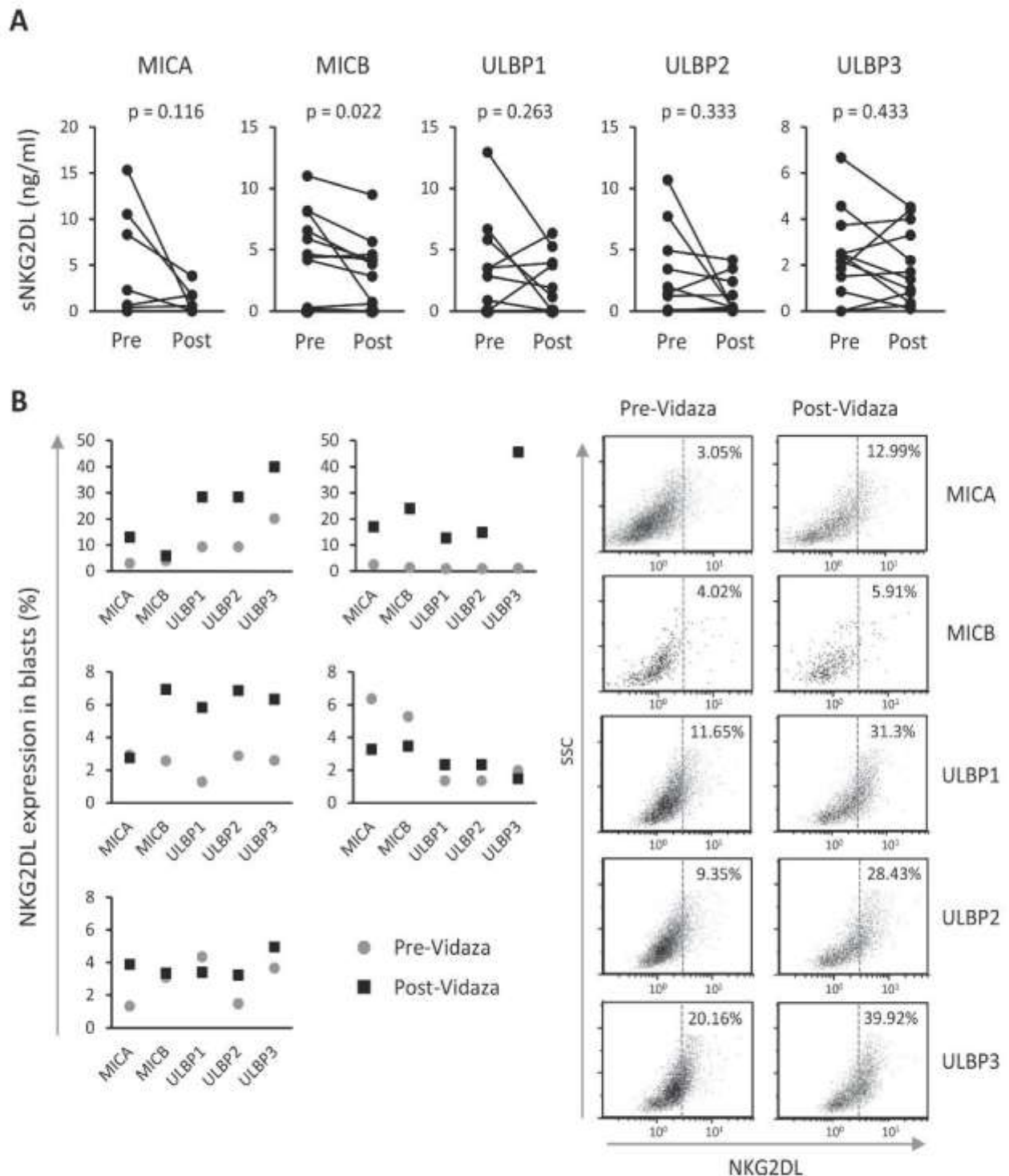


Figure 5: Vidaza®-treated AML patients show lower sNKG2DL levels and enhanced NKG2DL expression in blasts. (A) Soluble NKG2DL were quantified by sandwich ELISA in sera from twelve AML patients before and after Vidaza® treatment. Lines represent the levels of each sNKG2DL (ng/mL) before and after treatment of each individual AML patient. (B) Expression of NKG2DL on the cell surface of blasts from five AML patients before and after Vidaza® treatment (left panel). The right panel shows dot plots of NKG2DL expression on the cell surface of blasts from a representative patient. Numbers included in the figure quadrants indicate the percentage of positive cells for each NKG2DL.

(median: $5 \pm 1.2\%$, range 0 – 8.5%) whilst AML patients show highly variable methylation rates for *TIMP3* (median: $8.8 \pm 13.9\%$; range: 0–89%) (Figure 7A). Comparative analysis showed *TIMP3* to be significantly methylated in AML patients compared with healthy donors ($p < 0.001$). Taking a DNA methylation rate greater than 20% to be anomalous, we found that 25.5% (23/90) of the AML patients exhibited aberrant DNA methylation for *TIMP3*.

To investigate the association between *TIMP3* DNA methylation and the clinical characteristics of AML patients, we classified the patients as unmethylated (*TIMP3* DNA methylation levels $< 20\%$) and methylated (*TIMP3* methylation rate $\geq 20\%$). No statistically significant association was found with age, sex, FAB classification, AML etiology (primary or secondary) or induction therapy (data not shown). In order to analyze the genetic prognosis, AML patients were divided into three groups (favorable, intermediate and adverse cytogenetic prognosis) based on the abnormalities described by Yohe et al. [29]. Data show a significant association between DNA methylation status for *TIMP3* and cytogenetic prognosis ($p = 0.001$) (Figure 7B). AML patients harboring methylated *TIMP3* had a higher frequency of the adverse karyotype (44%) than did those with a favorable or intermediate prognosis (10% each). We also observed that 80% of AML patients with trisomy 11 and 66.7% with deletions linked to TP53 gene loss showed aberrant methylation for *TIMP3* (Table 1). Interestingly, mutations in the FMS-like tyrosine kinase (*FLT3*) gene, specifically internal tandem duplications (*FLT3*-ITD), were clearly

associated with high levels of *TIMP3* methylation ($p = 0.002$) (Table 2). Therefore, aberrant *TIMP3* DNA methylation in AML patients could be associated with an adverse genetic and cytogenetic prognosis, specifically with the presence of trisomy 11 and deletions linked to TP53 pro-oncogene loss.

DISCUSSION

The highly heterogeneous nature of AML makes it a difficult disease to treat effectively. The hypomethylating agents azacitidine and decitabine are currently approved for AML patients who are ineligible for allogeneic stem cell transplantation and induction chemotherapy [30]. Considerable efforts have been made to identify the targets where these drugs exert their function. NKG2D, the main activating receptor of NK cells, plays an important role in the immune recognition of AML blasts through interaction with their NKG2DL (MICA, MICB and ULBP1-3). However, AML cells have developed several mechanisms to evade this recognition, such as NKG2DL release from the cell surface in a soluble form that promotes NKG2D internalization and immune evasion [31]. Therefore, it is of great interest to understand the effect of the hypomethylating agents in the release of sNKG2DL by AML cells and on NKG2D-NKG2DL-mediated recognition. Here, we show that treatment with the hypomethylating agents limits the release of sNKG2DL by AML cells through the inhibition of ADAM17 activity. For MICA, MICB and ULBP2, we demonstrated that

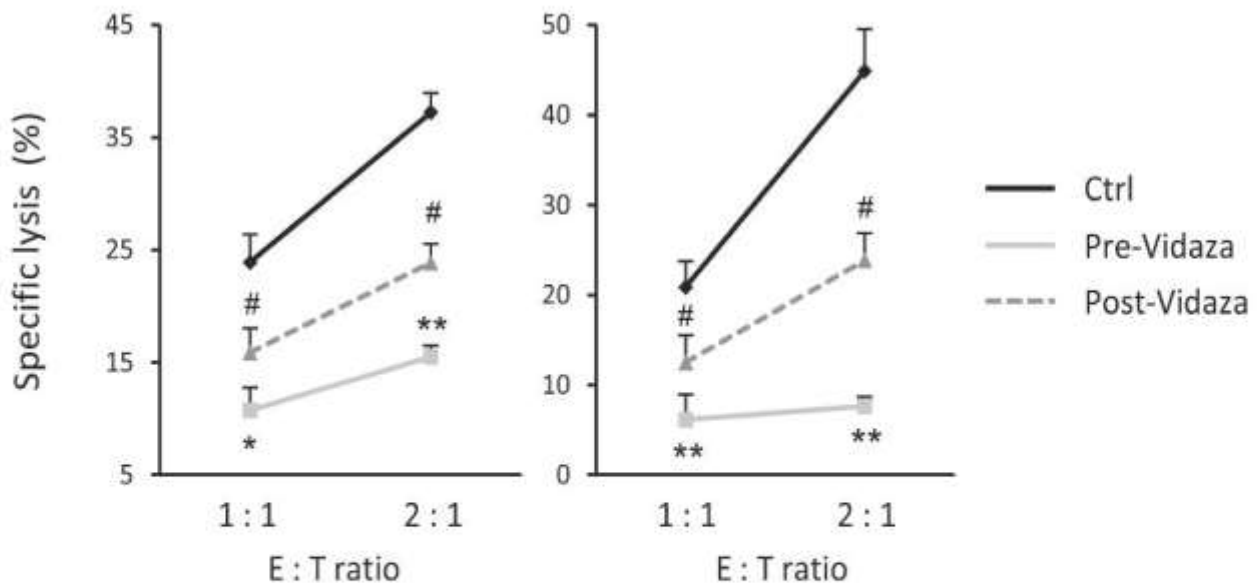


Figure 6: Treatment with Vidaza® enhances the immune recognition mediated by NKG2D-NKG2DL engagement. NKL cells were co-incubated with C1R-MICA transfectants at the indicated E:T ratios (1:1 and 2:1) in a cell lysis assay, in the presence of sera obtained before and after treatment with Vidaza® from two independent AML patients. Values are the mean \pm SEM of the percentage of specific lysis from three independent experiments. * versus control and $p < 0.05$; ** versus control and $p < 0.01$ # versus pre-Vidaza® sera and $p < 0.05$.

Table 1: Genetic alterations of AML patients in association with TIMP3 methylation

Variant	Methylated TIMP3 <i>n</i> = 23 (%)	Unmethylated TIMP3 <i>n</i> = 67 (%)	<i>p</i>
Cytogenetic characteristics			
t (8;21)	1 (20%)	4 (80%)	ns
t (15;17)	1 (7.7%)	12 (92.3%)	ns
inv (16) or t (16;16)	1 (10%)	9 (90%)	ns
t (9;11)	0 (0%)	2 (100%)	ns
-7/-7q	1 (2.5%)	2 (75%)	ns
-21	0 (0%)	5 (100%)	ns
+4	0 (0%)	3 (100%)	ns
+8	2 (33.3%)	4 (66.7%)	ns
+11	4 (80%)	1 (20%)	0.001
+13	0 (0%)	2 (100%)	ns
+21	1 (20%)	4 (80%)	ns
del5q	3 (37.5%)	5 (62.5%)	ns
del7q	2 (28.6%)	5 (71.4%)	ns
del17p (p53)	4 (66.7%)	2 (33.3%)	0.007
Normal karyotype	2 (8.7%)	21 (91.3%)	ns
Complex karyotype	3 (42.8%)	4 (57.2%)	ns
Gene mutations			
NPM1	5 (41.7%)	7 (58.3%)	ns
FLT3-D835	1 (12.5%)	7 (87.5%)	ns
FLT3-ITD	6 (75%)	8 (25%)	0.001
CEBPA	2 (66.7%)	1 (33.3%)	ns

ns: not significant.

blockage of the shedding mediated by ADAM17 is caused by the demethylation of their inhibitor TIMP3. Thus, the use of these hypomethylating drugs could be useful for enhancing the immune recognition mediated by NKG2D-NKG2DL in AML patients.

First, we observed that hypomethylating treatment significantly reduced the release of the soluble form of all NKG2DL (MICA, MICB, ULBPs1-3), and enhanced their expression on the surface of KG1a and NB4 cells. Cell-free supernatants obtained from untreated AML cell lines, which show high levels of soluble NKG2DL, downregulate the expression of the NKG2D receptor, diminishing recognition and lysis by NKL cells. By contrast, supernatants from AML cells treated with DAC have lower soluble levels of these ligands, increased expression on the cell surface and thereby a higher level of recognition by cytotoxic cells.

Analysis of soluble NKG2DL in serum from AML patients before and after Vidaza® treatment confirmed that soluble levels of all NKG2DL are diminished after treatment. Preliminary data from this study suggest that NKG2DL expression on the cell surface of AML

blasts could be enhanced in proportion to the number of cycles of hypomethylating agent received, but we are aware of the limitation of this analysis due to the small number of cases involved. This is the first demonstration of hypomethylating agents controlling the release of sNKG2DL in AML cells. However, further analysis with a larger cohort of patients and samples is needed to verify the functional *in vivo* consequences of these treatments on the release of NKG2DL from AML blasts.

The ADAMs family sheddases, ADAM10 and ADAM17, have been implicated in the proteolytic cleavage of NKG2DL in several types of cancer cells [20, 32–33]. Treatment of AML cell lines (KG1a and NB4) with an ADAM10-specific inhibitor (GI254023X) did not affect the release of sNKG2DL. However, ADAM17-specific inhibitors (GW280264X and TMI-1) significantly restricted the release of all NKG2DL, including sULBP1 and sULBP3. MICA, MICB and ULBP2 are mainly released by MMPs, while ULBP1 and ULBP3 are recruited and released in exosomes [17]. However, these mechanisms are not exclusive and, for example, ULBP3 can be released by the protease ADAM10 in Hodgkin

Table 2: Clinical characteristics of AML patients

Characteristics	AML patients <i>n</i> = 90 (%)
Age (years)	
< 60	44 (45.8%)
> 60	46 (54.2%)
Sex	
Male	52 (57.8%)
Female	38 (42.2%)
FAB classification	
M0	4 (4.5%)
M1	6 (6.7%)
M2	28 (31.1%)
M3	12 (13.3%)
M4	9 (10%)
M5	23 (25.5%)
M6	0 (0%)
M7	5 (5.6%)
Unclassified	3 (3.3%)
Type of AML	
Primary	60 (66.4%)
Secondary to SMD	15 (16.7%)
Secondary to other cancer	15 (16.7%)
Cytogenetic prognosis	
Favorable	29 (32.2%)
Intermediate	20 (22.2%)
Adverse	41 (45.6%)
Therapy	
Chemotherapeutic	42 (46.7%)
Palliative care	14 (15.5%)
Allo-TPH	18 (20%)
Auto-TPH	10 (11.1%)
Missing-data	6 (6.7%)

lymphoma cells [34]. Moreover, some metalloproteases such as ADAM17 can be found in exosomes, where they can be active and release their substrates [24]. Recently, release of ULBP1 from the cell surface has been found to be associated with their endocytosis and proteosomal degradation [35]. Thus, the two mechanisms involved in the shedding of NKG2DL could interact or be dependent on the cellular context, the expression of the different metalloproteases or the trafficking properties of each NKG2DL.

It has been reported that ADAM17 is expressed by cell lines and primary AML cells [36]. Consistent with this, we found that KG1a and NB4 cells express ADAM17 on the cell surface and that this expression is not affected by DAC treatment. Nevertheless, ADAM17

activity was significantly reduced after treatment with the hypomethylating agent, which implies that decitabine may regulate the shedding of sNKG2DL through the modulation of ADAM17 activity. Understanding the mechanisms involved in ADAM17 functionality could be relevant for developing new treatments for AML patients.

Several studies have reported diminished expression of TIMP3, a natural inhibitor of ADAM17 activity, contributing to the invasion and migration of tumor cells of various types of epithelial cancers (e.g., thyroid and lung cancers, melanoma, etc.) [37–39]. Consistent with this, we observed that TIMP3 expression in AML cell lines was very low, but increased after treatment with DAC, suggesting that this gene could be suppressed

by epigenetic mechanisms such as DNA methylation. Changes in the DNA methylation status of various oncogenes or tumor suppressor genes occur frequently during the development of AML. So, mutations in genes encoding enzymes involved in the regulation of DNA methylation such as DNMT3A, IDH or the TET family are frequently found in AML patients [40]. The *TIMP3* gene is hypermethylated in KG1a and NB4 cells, which show high levels of sNKG2DL, but is completely unmethylated in HELR cells, which do not release soluble ligands. Thus, the *TIMP3* methylation rate could help modulate the release of soluble ligands in AML. Further, AML patients (25.5%) showed aberrant DNA methylation for *TIMP3* in blasts obtained from their bone marrows. *TIMP3* DNA methylation has been described

in several epithelial cancers [41, 42], but this is the first time it has been found to be methylated in AML patients. Additionally, in this study, we show that specific silencing of *TIMP3* after treatment with DAC partially restores the soluble levels of MICA, MICB and ULBP2, whereas sULBP1 and sULBP3 levels remain unmodified. Thus, demethylation of *TIMP3* could be the main mechanisms involved in downregulating the shedding of MICA, MICB and ULBP2 in DAC-treated AML blasts. However, additional mechanisms should be sought to explain the reduced levels of sULBP1 and sULBP3 attained after treatment with hypomethylating agents and mediated by the sheddase ADAM17. Independently of *TIMP3*, ADAM17 can be regulated by other mechanisms, such as those involving miRNAs. Thus, it has been reported that

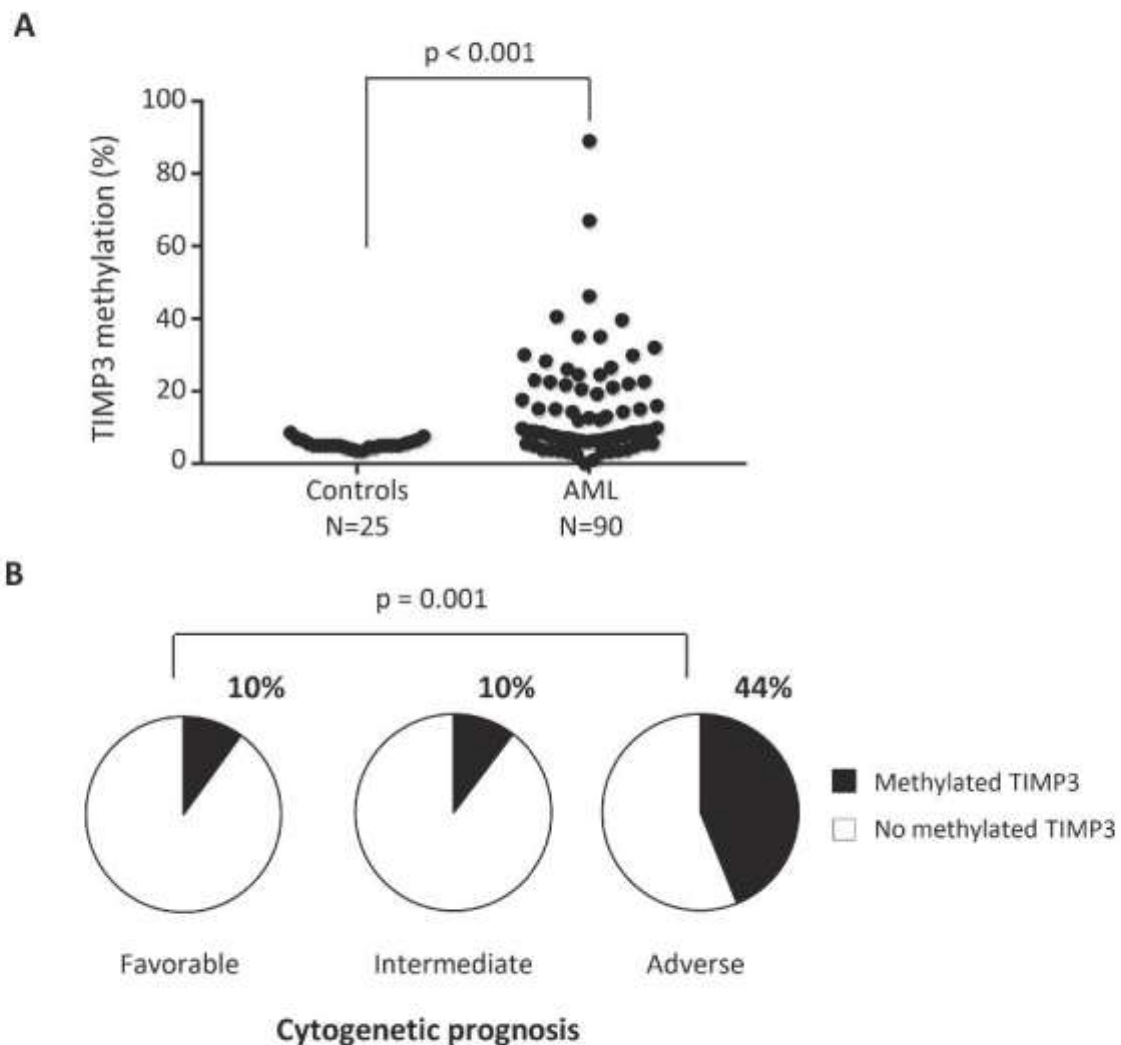


Figure 7: Aberrant *TIMP3* DNA methylation levels in AML patients are associated with an adverse cytogenetic prognosis. (A) The *TIMP3* DNA methylation levels were quantified by pyrosequencing in bone marrow cells obtained at diagnosis from 90 AML patients and from 25 healthy donors. Each sample is represented by a black dot. (B) Pie charts indicating the frequency of AML patients with aberrant DNA methylation levels (> 20%) for *TIMP3* by cytogenetic prognosis group (favorable, intermediate and adverse) of AML patients.

miRNA-145, which is aberrantly methylated in various cancers, negatively regulates the expression of ADAM17 in renal and hepatocellular carcinomas [43, 44]. Moreover, other proteins such as the aminopeptidase N/CD13 and the membrane-anchored glycoprotein RECK, which are regulated by DNA methylation, negatively regulate ADAM17 activity by internalization or direct physical interaction, respectively [36, 45].

Most AML patients show some chromosomal anomaly or gene mutations [46]. Although mutations of *FLT3*, *NPM1* and *CEBPA* are customarily found in AML, others have emerged in recent years that allow patients to be categorized on the basis of their evolution [29]. Here, we found that aberrant methylation levels in specific genes, in addition to abnormal mutations, could help stratify AML patients and establish a more accurate therapy. In AML patients, aberrant *TIMP3* methylation was significantly associated with an adverse cytogenetic prognosis, whilst methylated *TIMP3* was less prevalent in patients with a favorable or intermediate cytogenetic risk. FMS-like tyrosine kinase 3 (*FLT3*) is a member of the class III receptor tyrosine kinase (RTK) expressed in hematopoietic stem cells, which are involved in processes such as proliferation and cell activation [47]. We found that patients with high levels of *TIMP3* methylation more frequently feature *FLT3* mutations, two of which are clearly defined in AML patients: internal tandem duplications (ITDs) and a point mutation in the Asp 835 of the A-loop (D835) [48, 49]. The frequency of patients with aberrantly methylated *TIMP3* is higher in *FLT3*-ITD (75%) than in *FLT3*-D835 (12.5%) mutations. These results are consistent with the poor prognosis of patients with *FLT3*-ITD mutations [50]. Moreover, specific cytogenetic analysis revealed that high levels of *TIMP3* methylation were also significantly associated with trisomy 11 and deletions linked to TP53 gene loss. These results are in accordance with earlier findings in which trisomy 11 and 17p (p53) deletions were associated with poor prognosis in AML [51–53]. Thus, the DNA methylation levels of *TIMP3* could be a new biomarker that helps establish the cytogenetic prognosis of the disease.

Nowadays, therapies based on alloreactive NK cell transplantation have been proposed to strengthen the immunological response of AML patients [54]. In other types of leukemias, as chronic myeloid leukemia (CML), NK cells are able to kill CD34+ CML cells in the presence of intact HLA inhibitory molecules [55]. However, it is well known that the ability of NK cells to kill autologous leukemic blasts is disrupted by the weak expression of natural cytotoxicity receptors such as NKG2D [56–58]. Overall, our results suggest that hypomethylating based treatments could maximize the immune recognition mediated by NK cells. Moreover, it has recently been reported that long-term culture of NK cells leads to *TIMP3*

over-expression [59]. Although we found no expression of *TIMP3* by NKL cells (data not shown), it would be interesting to examine whether expression of *TIMP3* induced by activated NK cells is an additional strategy by which downregulation of sNKG2DL may be induced by AML blasts.

In summary, our study demonstrates that treatment with hypomethylating agents diminishes the release of sNKG2DL, which in turn promotes NKG2D-NKG2DL engagement. This effect is mediated by *TIMP3* demethylation, which inhibits the activity of ADAM17 sheddase, leading to a more limited release of sMICA, sMICB and sULBP2 from the cell surface of leukemic blasts. Although hypomethylating drugs promote the induction of several genes during oncogenesis, the association found between aberrant DNA methylation of *TIMP3* and poor prognosis for patients with the disease suggests that the *TIMP3* methylation rate could be an additional useful new prognostic biomarker of disease in AML and open the door to new therapeutic approaches by potentiating NK cell anti-leukemic potential.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines, reagents and treatments

The human myeloid leukemia KG1a and NB4 cells lines were purchased from the American Type Culture Collection and the Leibniz-Institute DSMZ GmbH (Germany), respectively. Cells were maintained in RPMI-1640 medium containing 10% heat-inactivated fetal calf serum in a 5% CO₂ incubator at 37°C. Cells were cultured at a density of 0.4 × 10⁶ cells/ml with complete media supplemented with DAC (0.25, 0.5, 1 or 5 μM from Sigma-Aldrich, St Louis, MO), ADAM10 inhibitor (GI254023X, 50 μM; Sigma-Aldrich) or ADAM17 inhibitors (GW280264X at 10 μM; TMI-1 at 10 and 25 μM from Aobious Inc., Gloucester, MA, and Tocris, Bristol, UK, respectively) for 48 hours. A dose-response curve was derived for all drugs to identify the doses that did not affect cell viability (data not shown). Cell viability was determined by staining with 7AAD (Immunostep Inc., Salamanca, Spain).

Patient samples

To analyze *TIMP3* DNA methylation, bone marrow samples were obtained from 25 healthy donors and 90 AML patients at diagnosis (aged 54 ± 24.57 years; 52 males and 38 females) in Hospital Clínico Universitario Virgen de la Arrixaca and Hospital General Universitario Santa Lucía de Cartagena (Murcia, Spain). Patients had been diagnosed with AML during the previous 10 years (2006–2016) according to the morphological and cytochemical criteria of the French-American-British

(FAB) classification. The clinical characteristics of the patients are summarized in Table 2. Soluble NKG2DL was studied in a cohort of twelve AML patients treated with Vidaza® after diagnosis (aged 65 ± 12.9 years; 5 males and 4 females) at the Hospital Universitario Central de Asturias (Asturias, Spain). NKG2DL expression on the cell surface of blasts before and after Vidaza® treatment at different cycles was studied in a cohort of five AML patients from Hospital Clínico San Carlos (Madrid, Spain). All patients and healthy donors gave their written informed consent, in accordance with the Principles of the Declaration of Helsinki. The local hospitals' ethics committees approved the study.

Flow cytometry

AML cell lines (KG1a and NB4) were stained with the human-specific mAb for ADAM17 (Ref: MAB9301; clone #111633) or each NKG2DL: MICA (Ref: MAB1300; clone #159227), MICB (Ref: MAB1599; clone #236511), ULBP1 (Ref: MAB1380; clone #170818), ULBP2 (Ref: MAB1298; clone #165903) and ULBP3 (Ref: MAB1517; #clone 166510). All mAbs were from R&D Systems (Minneapolis, MN). Subsequently, cells were stained with FITC-goat anti-mouse immunoglobulin G (Biolegend, San Diego, CA) and analyzed with a Gallios™ flow cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA). In AML patients, blasts from bone marrow were stained with CD34-PE and CD45-APC antibodies (Biolegend) The specific fluorescence index was calculated by dividing the mean fluorescence obtained with the respective specific mAb by that of the secondary antibody.

ELISA

Soluble NKG2DL (sNKG2DL) was detected using sandwich ELISA. Plates were coated with a specific mAb (4 µg/ml) for each NKG2DL. Coating mAbs are the same clones that we used for the previously described flow cytometry. Subsequently, plates were blocked with 2% BSA-PBS. After blocking, 100 µl of sera or supernatant samples and recombinant human (rh) Fc chimera proteins specific for each NKG2DL (rhMICA Ref: 1300-MA, rhMICB Ref: 1599-MB, rhULBP1 Ref: 1380-UL, rhULBP2 Ref: 1298-UL, and rhULBP3 Ref: 1517-UL all from R&D Systems) were added for 2 hours at RT. After washes, a specific biotinylated polyclonal antibody for each NKG2DL (0.4 µg/ml) (MICA Ref: BAF1300, MICB Ref: BAF1599, ULBP1 Ref: BAF1380, ULBP2 Ref: BAF1298, and ULBP3 Ref: BAF1517, all from R&D Systems) was added for 2 hours at RT. Afterwards, plates were washed and incubated with streptavidin-HRP (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Plates were then washed and developed using TMB (tetramethylbenzidine; Sigma-Aldrich) and absorbance was measured at 450 nm. The detection threshold for each ELISA was less than 400

pg/ml and as a positive control we used the recombinant proteins specific for each ligand.

Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis

Total cellular RNA was extracted with a GeneMATRIX Universal RNA purification kit (EURx, Poland) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription of purified RNA was performed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Next, quantitative gene expression analysis was performed by real-time PCR on a MyiQ™ Single Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) using SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Data were normalized to GAPDH RNA expression and all samples were run in triplicate. Relative mRNA abundance was determined by comparison of threshold values and calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method ($\Delta\Delta CT$: Ct gene test - Ct endogenous control). The following specific primers were used; TIMP3: fwd: 5'-TCCCAGCGCAAGGGGCTGAA-3', rev: 5'-GCCGGATGCAGGCGTAGTGT-3'; MICA: fwd: 5'-AATGGAACCTACCAGACCTGGG-3', rev: 5'-ACATGGAATGTCTGCCAATGACT-3' and GAPDH: fwd: 5'-TCGGAGTCAACGGATTGGTTCGT3', rev: 5'-TGCCATGGGTGGAATCATATTGGA-3'.

TACE activity assay

The activity of TACE (ADAM17) was determined with the Sensolyte 520 TACE Activity Assay Kit (AnaSpec, San Jose, CA) using 20 µg of cell lysate proteins, according to the manufacturer's protocol. This assay uses a 5-FAM (fluorophore) and QXL®520 (quencher) FRET peptide substrate. Upon cleavage of the FRET peptide by the active enzyme, the fluorescence of 5-FAM is recovered and monitored at an excitation of 490 nm and emission of 490/520 nm. Data are expressed as the mean fluorescence intensity per microgram of total protein.

Small interfering RNA (siRNA) transfection

TIMP3 and control non-specific scrambled siRNA were purchased from Qiagen and Dharmacon (Denver, CO), respectively. 2×10^6 cells were plated in 12-well plates and transfected with control or 200 nM of TIMP3-specific siRNA. Transfection was performed using the Cell Line Nucleofector® Solution V and the AMAXA nucleofector apparatus (Lonza, Walkersville, MD). NKG2DL shedding was analyzed by ELISA 48 hours after transfection.

Western blot

AML cell lines (KG1a and NB4) were lysed in RIPA buffer (Cell Signaling Technology Inc., MA)

supplemented with protease inhibitors cocktail (Sigma-Aldrich). Samples were clarified by centrifugation, and stored at -20°C . 20 μg of protein extract were separated on 15% polyacrylamide-SDS gels and blotted onto nitrocellulose membranes. After blocking, primary polyclonal goat anti-human TIMP3 and β -actin (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX) were incubated overnight at 4°C . Membranes were washed and subsequently incubated with horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat IgG (Dakocytomation, Glostrup, Denmark) for 1 hour at room temperature. The blots were developed with the use of a chemiluminescent substrate (ECL Western Blotting Analysis System; Amersham Biosciences, Little Chalfont, UK).

Bisulfite treatment and pyrosequencing

Firstly, genomic DNA was extracted using a DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA). 1 μg of purified DNA was modified with bisulfite using a DNA Methylation-Gold[™] Kit (Zymo Research, Irvine, CA). Modified bisulfite DNA was amplified using specific biotinylated primers for TIMP3 designed by PyroMark Assay Design Software 2.0 (Qiagen). Primer sequences were as follows: fwd: 5'-TGGGTGGGTGTTAGTTGG-3'; rev: 5'-CCCCCTCAAACCAATAAC-3'; seq: 5'-ATTTA GTGGTTT TAGGTGG-3'. Pyrosequencing was performed with the PyroMark[™] Q24 System version 2.0.6, and methylation levels were quantified using PyroMark Q24 Software 2.0 following the manufacturer's instructions (Qiagen).

Cytotoxicity assay

Cytotoxicity was assayed by flow cytometry using the PKH67 Green Fluorescent Cell Linker kit (Sigma-Aldrich). We used the NKL cell line as the effector [60] and the erythroleukemia K562 and CIR-MICA transfectants as target cells [61]. NB4 and KG1a cells were treated beforehand with DMSO or DAC (5 μM) for 48 hours and supernatants were collected. Target cells were previously cell membrane labeled with PKH67 dye (1 μM for 5 minutes) and further co-cultured with the NKL effector cells in the presence of cell-free supernatants from untreated or DAC-treated AML cells for 4 hours at 37°C . In blocking experiments, NKL cells were incubated beforehand with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ anti-human NKG2D blocking mAb (Biolegend) for 1 h at 37°C . For patient cytotoxicity assays, sera from two AML patients before and after Vidaza[®] treatment were used. Cells were then stained with 5 μl of 7AAD and analyzed by flow cytometry. For gating strategy (Supplementary Figure 2), target cells were selected from effector cells by PKH67-positive staining, and further we analyzed the percentage of 7AAD-positive cells within the target cells (dead target cells). Dead cells from the negative control (target cells incubated in the

absence of effector cells) are considered as spontaneous lysis. Percentage specific lysis was calculated as $100 \times [(\% \text{ dead target cells} - \% \text{ spontaneous lysis}) / (100 - \% \text{ spontaneous lysis})]$.

Statistical analysis

Data of soluble NKG2DL are expressed as mean \pm standard error of the mean. All *in vitro* experiments were done at least three times with similar results. Differences between groups were examined using Student's paired-samples *t*-test and the Mann-Whitney *U* test. Comparison between the sNKG2DL levels from the AML patients sera before and after Vidaza treatment was analyzed using Wilcoxon test. The chi-square test was used to compare the TIMP3 methylation status with the clinical characteristics in AML patients. In all cases, statistical significance was concluded for values of $p < 0.05$. Analyses were performed with SPSS version 15.0 (Chicago, IL, USA).

ACKNOWLEDGMENTS AND FUNDING

This work is supported by: Plan Nacional de I+D+I 2008–2011 and European Union Fondos Feder; Instituto de Salud Carlos III [grant number PI12/02587 and PI16/01318]; Red Española de Investigación Renal (REDinREN) [grant number RD12/0021/0021 and RD16/0009/0020] and Plan de Ciencia, Tecnología e Innovación 2013–2017 del Principado de Asturias (reference GRUPIN-14-030)

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest

REFERENCES

1. Saultz JN, Garzon R. Acute myeloid leukemia: a concise review. *J Clin Med*. 2016; 5.
2. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127:2391–2405.
3. Schoofs T, Berdel WE, Müller-Tidow C. Origins of aberrant DNA methylation in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2014; 28:1–14.
4. Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, Sanz G, List AF, Gore S, Seymour JF, Dombret H, Backstrom J, Zimmerman L, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 562–569.

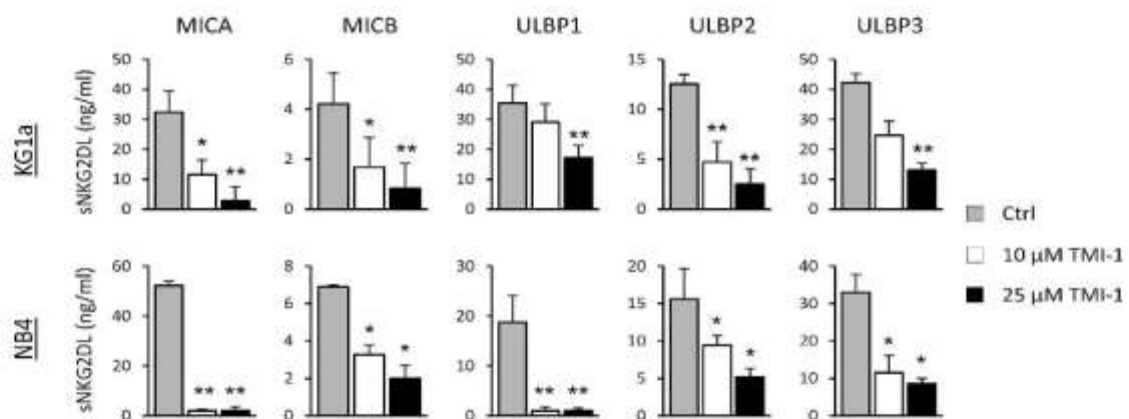
5. Dombret H, Seymour JF, Butrym A, Wierzbowska A, Selleslag D, Jang JH, Kumar R, Cavenagh J, Schuh AC, Candoni A, Récher C, Sandhu I, Bernal del Castillo, et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with > 30% blasts. *Blood*. 2015; 126:291–299.
6. Kantarjian HM, Thomas XG, Dmoszynska A, Wierzbowska A, Mazur G, Mayer J, Gau JP, Chou WC, Buckstein R, Cernak J, Kuo CY, Oriol A, Ravandi F, et al. Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2012; 30:2670–2677.
7. Hollenbach PW, Nguyen AN, Brady H, Williams M, Ning Y, Richard N, Krushel L, Aukerman SL, Heise C, MacBeth KJ. A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS One*. 2010; 5:e9001.
8. Sanchez-Correa B, Morgado S, Gayoso I, Bergua JM, Casado JG, Arcos MJ, Bengochea ML, Duran E, Solana R, Tarazona R. Human NK cells in acute myeloid leukemia patients: analysis of NK cell-activating receptors and their ligands. *Cancer Immunol Immunother*. 2011; 60:1195–1205.
9. López-Larrea C, Suárez-Alvarez B, López-Soto A, López-Vázquez A, Gonzalez S. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med*. 2008; 14:179–189.
10. González S, López-Soto A, Suárez-Alvarez B, López-Vázquez A, López-Larrea C. NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol*. 2008; 29:397–403.
11. Eagle RA, Traherne JA, Hair JR, Jafferji I, Trowsdale J. ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand. *Eur J Immunol*. 2009; 39:3207–3216.
12. Hilpert J, Grosse-Hovest L, Grünbach F, Buechele C, Nuebling T, Raum T, Steinle A, Salih HR. Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses. *J Immunol*. 2012; 189:1360–1371.
13. Nowbakht P, Ionescu MC, Rohner A, Kalberer CP, Rossy E, Mori L, Cosman D, De Libero G, Wodnar-Filipowicz A. Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed up on the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood*. 2005; 105:3615–3622.
14. Pende D, Spaggiari GM, Marcenaro S, Martini S, Rivera P, Capobianco A, Falco M, Lanino E, Pierri I, Zambello R, Bacigalupo A, Mingari MC, Moretta A, et al. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood*. 2005; 105:2066–2073.
15. Diernmayr S, Himmelreich H, Durovic B, Mathys-Schneeberger A, Siegler U, Langenkamp U, Hofsteenge J, Gratwohl A, Tichelli A, Paluszewska M, Wiktor-Jedrzejczak W, Kalberer CP, Wodnar-Filipowicz A. NKG2D ligand expression in AML increases in response to HDAC inhibitor valproic acid and contributes to allorecognition by NK-cell lines with single KIR-HLA class I specificities. *Blood*. 2008; 111:1428–1436.
16. Baragaño Raneros A, Martín-Palanco V, Fernández AF, Rodríguez RM, Fraga MF, López-Larrea C, Suárez-Alvarez B. Methylation of NKG2D ligands contributes to immune system evasion in acute myeloid leukemia. *Genes Immun*. 2015; 16:71–82.
17. Baragaño Raneros A, Suárez-Alvarez B, López-Larrea C. Secretory pathways generating immunosuppressive NKG2D ligands: New targets for therapeutic intervention. *Oncoimmunology*. 2014; 3: e28497.
18. Sun D, Wang X, Zhang H, Deng L, Zhang Y. MMP9 mediates MICA shedding in human osteosarcomas. *Cell Biol Int* 2011; 35:569–574.
19. Liu G, Atteridge CL, Wang X, Lundgren AD, Wu JD. The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. *J Immunol* 2010; 184:3346–3350.
20. Waldhauer I, Goehlsdorf D, Gieseke F, Weinschenk T, Wittenbrink M, Ludwig A, Stevanovic S, Rammensee HG, Steinle A. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res* 2008; 68:6368–6376.
21. Duan X, Mao X, Sun W. ADAM15 is involved in MICB shedding and mediates the effects of gemcitabine on MICB shedding in PANC-1 pancreatic cancer cells. *Mol Med Rep* 2013; 7:991–997.
22. Waldhauer I, Steinle A. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res*. 2006; 66:2520–2506.
23. Fernández-Messina L, Ashiru O, Boutet P, Agüera-González S, Skepper JN, Reyburn HT, Valés-Gómez M. Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *J Biol Chem* 2010; 285:8543–8551.
24. Tellier E, Canault M, Rebsomen L, Bonardo B, Juhán-Vague I, Nalbou G, Peiretti F. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp Cell Res*. 2006; 312:3969–3980.
25. López-Cobo S, Campos-Silva C, Valés-Gómez M. Glycosyl-phosphatidyl-inositol (GPI)-anchors and metalloproteases: their roles in the regulation of exosome composition and NKG2D-mediated immune recognition. *Front Cell Dev Biol*. 2016; 4: 97.
26. Boutet P, Agüera-González S, Atkinson S, Pennington CJ, Edwards DR, Murphy G, Reyburn HT, Valés-Gómez M. Cutting edge: the metalloproteinase ADAM17/TNF-alpha-converting enzyme regulates proteolytic shedding of the MHC class I-related chain B protein. *J Immunol* 2009; 182:49–53.
27. Estes G, Luzón E, Sarmiento E, Gómez-Caro R, Steinle A, Murphy G, Carbone J, Valés-Gómez M, Reyburn HT.

- Altered microRNA expression after infection with human cytomegalovirus leads to TIMP3 downregulation and increased shedding of metalloprotease substrates, including MICA. *J Immunol.* 2014; 193:1344–1352.
28. Salih HR, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG, Steinle A. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 2003;102:1389–1396.
 29. Yohe S. Molecular genetic markers in acute myeloid leukemia. *J Clin Med.* 2015; 4: 460–478.
 30. Griffiths EA, Gore SD. Epigenetic therapies in MDS and AML. *Adv Exp Med Biol.* 2013; 754:253–283.
 31. Chitadze G, Bhat J, Lettau M, Janssen O, Kabelitz D. Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. *Scand J Immunol.* 2013; 78:120–129.
 32. Chitadze G, Lettau M, Bhat J, Wesch D, Steinle A, Fürst D, Mytilineos J, Kalthoff H, Janssen O, Oberg HH, Kabelitz D. Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: heterogeneous involvement of the “a disintegrin and metalloproteases” 10 and 17. *Int J Cancer.* 2013; 133:1557–1566.
 33. Wolpert F, Tritschler I, Steinle A, Weller M, Eisele G. A disintegrin and metalloproteinases 10 and 17 modulate the immunogenicity of glioblastoma-initiating cells. *Neuro Oncol.* 2014; 16:382–391.
 34. Zocchi MR, Camodeca C, Nuti E, Rossello A, Venè R, Tosetti F, Dapino I, Costa D, Musso A, Poggi A. ADAM10 nev selective inhibitors reduce NKG2D ligand release sensitizing Hodgkin lymphoma cells to NKG2D-mediated killing. *Oncoimmunology.* 2015; 5: e1123367.
 35. Fernández-Messina L, Reyburn HT, Valés-Gómez M. A short half-life of ULBP1 at the cell surface due to internalization and proteosomal degradation. *Immunol Cell Biol.* 2016; 94:479–485.
 36. Bouchet S, Tang R, Fava F, Legrand O, Bauvois B. Targeting CD13 (aminopeptidase-N) in turn downregulates ADAM17 by internalization in acute myeloid leukaemia cells. *Oncotarget.* 2014; 5:8211–8222.
 37. Anania MC, Sensi M, Radaelli E, Miranda C, Vizioli MG, Pagliardini S, Favini E, Cleris L, Supino R, Formelli F, Borrello MG, Pierotti MA, Greco A. TIMP3 regulates migration, invasion and *in vivo* tumorigenicity of thyroid tumor cells. *Oncogene.* 2011; 30:3011–3023.
 38. Das AM, Koljenović S, Oude Ophuis CM, van der Klok T, Galjart B, Nigg AL, van Cappellen WA, Noordhoek Hegt V, Dinjens WN, Atmodimedjo PN, Vermeulen CE, Verhoef C, Eggermont AM, et al. Association of TIMP3 expression with vessel density, macrophage infiltration and prognosis in human malignant melanoma. *Eur J Cancer.* 2016; 53:135–143.
 39. Kong L, Zhang P, Li W, Yang Y, Tian Y, Wang X, Chen S, Yang Y, Huang T, Zhao T, Tang L, Su B, Li F, et al. KDM1A promotes tumor cell invasion by silencing TIMP3 in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget.* 2016; 7:27959–27974.
 40. Im AP, Sehgal AR, Carroll MP, Smith BD, Tefferi A, Johnson DE, Boyiadzis M. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia.* 2014; 28:1774–1783.
 41. Ninomiya I, Kawakami K, Fushida S, Fujimura T, Funaki H, Takamura H, Kitagawa H, Nakagawara H, Tajima H, Kayahara M, Ohta T. Quantitative detection of TIMP-3 promoter hypermethylation and its prognostic significance in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2008; 20:1489–1495.
 42. Sun W, Zaboli D, Wang H, Liu Y, Arnaoutakis D, Khan T, Khan Z, Koch WM, Califano JA. Detection of TIMP3 promoter hypermethylation in salivary rinse as an independent predictor of local recurrence-free survival in head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 2012; 18:1082–1091.
 43. Doberstein K, Steinmeyer N, Hartmetz AK, Eberhardt W, Mittelbronn M, Harter PN, Juengel E, Blaheta R, Pfeilschifter J, Gutwein P. MicroRNA-145 targets the metalloprotease ADAM17 and is suppressed in renal cell carcinoma patients. *Neoplasia.* 2013; 15:218–30.
 44. Liu Y, Wu C, Wang Y, Wen S, Wang J, Chen Z, He Q, Feng D. MicroRNA-145 inhibits cell proliferation by directly targeting ADAM17 in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2014; 32:1923–1930.
 45. Hong KJ, Wu DC, Cheng KH, Chen LT, Hung WC. RECK inhibits stemness gene expression and tumorigenicity of gastric cancer cells by suppressing ADAM-mediated Notch1 activation. *J Cell Physiol.* 2014; 229:191–201.
 46. Coombs CC, Tallman MS, Levine RL. Molecular therapy for acute myeloid leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016; 13:305–318.
 47. Levis M, Small D. FLT3. ITD does matter in leukemia. *Leukemia.* 2003; 17:1738–1752.
 48. Thiede C, Steudel C, Mohr B, Schaich M, Schakel U, Platzbecker U, Wermke M, Bornhauser M, Ritter M, Neubauer A, Ehninger G, Illmer T. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood.* 2002; 99:4326–4335.
 49. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, Asou N, Kuriyama K, Yagasaki F, Shimazaki C, Akiyama H, Saito K, Nishimura M, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood* 2001; 97:2434–2439.
 50. Sheikhha MH, Awan A, Tobal K, Liu Yin JA. Prognostic significance of FLT3 ITD and D835 mutations in AML patients. *Hematol J.* 2003; 4:41–46.
 51. Wang SA, Jabbar K, Lu G, Chen SS, Gafili N, Vega F, Jones D, Raza A, Kantarjian H, Garcia-Manero G, McDonnell TJ, Medeiros LJ. Trisomy 11 in myelodysplastic syndromes defines a unique group of disease with aggressive clinicopathologic features. *Leukemia.* 2010; 24:740–747.

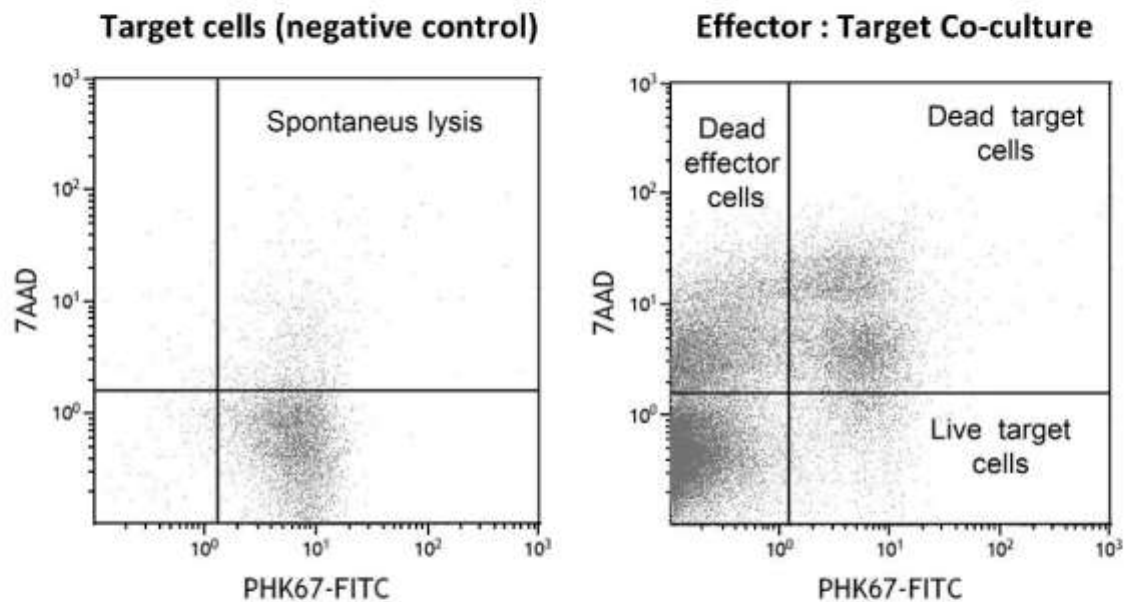
52. Alseraye FM, Zuo Z, Bueso-Ramos C, Wang S, Medeiros LJ, Lu G. Trisomy 11 as an isolated abnormality in acute myeloid leukemia is associated with unfavorable prognosis but not with anNPM1 or KIT mutation. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011; 4:371–377.
53. Seifert H, Mohr B, Thiede C, Oelschlägel U, Schäkel U, Illmer T, Soucek S, Ehninger G, Schaich M; Study Alliance Leukemia (SAL). The prognostic impact of 17p (p53) deletion in 2272 adults with acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2009; 23:656–663.
54. Ruggeri L, Parisi S, Urbani E, Curti A. Alloreactive natural killer cells for the treatment of acute myeloid leukemia: From stem cell transplantation to adoptive immunotherapy. *Front Immunol.* 2015; 6: 479.
55. Sconocchia G, Lau M, Provenzano M, Rezvani K, Wongsena W, Fujiwara H, Hensel N, Melenhorst J, Li J, Ferrone S, Barrett AJ. The antileukemia effect of HLA-matched NK and NK-T cells in chronic myelogenous leukemia involves NKG2D-target-cell interactions. *Blood.* 2005; 106:3666–3672.
56. Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Reviron D, Gastaut JA, Pende D, Olive D, Moretta A. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2002; 99:3661–3667.
57. Sandoval-Borrego D, Moreno-Lafont MC, Vázquez-Sánchez EA, Guiterrez-Hoya A, López-Santiago R, Montiel-Cervantes LA, Ramírez-Saldaña M, Vela-Ojeda J. Overexpression of Cd158 and NKG2A inhibitory receptors and underexpression of NKG2D and NKp46 activating receptors on NK cells in acute myeloid leukemia. *Arch Med Res.* 2016; 47:55–64.
58. Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, Amoulet C, Sainy D, Olive D, Costello RT. Deficient expression of NCR in NKs from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood.* 2007; 109:323–330.
59. Arriga R, Caratelli S, Coppola A, Spagnoli GC, Venditti A, Amadori S, Lanzilli G, Lauro D, Palomba P, Sconocchia T, Del Principe MI, Maurillo L, Buccisano F, et al. Enhancement of anti-leukemia activity of NK cells *in vitro* and *in vivo* by inhibition of leukemia cell-induced NK cell damage. *Oncotarget.* 2016; 7:2070–2079.
60. Robertson MJ, Cochran KJ, Cameron C, Le JM, Tantravahi R, Ritz J. Characterization of a cell line, NKL, derived from aggressive human natural killer cell leukemia. *Exp Hematol.* 1996; 24:406–415.
61. Suárez-Alvarez B, López-Vázquez A, Díaz-Molina B, Bernardo-Rodríguez MJ, Álvarez-López R, Pascual D, Astudillo A, Martínez-Borra J, Lambert JL, González S, López-Larrea C. The predictive value of soluble major histocompatibility complex class I chain-related molecule A (MICA) levels on heart allograft rejection. *Transplantation.* 2006; 82:354–361.

Increasing TIMP3 expression by hypomethylating agents diminishes soluble MICA, MICB and ULBP2 shedding in acute myeloid leukemia, facilitating NK cell-mediated immune recognition

Supplementary Materials



Supplementary Figure 1: ADAM17 modulates the release of sNKG2DL in AML cells. KG1a and NB4 cells were treated with an inhibitor specific to ADAM17 (10 or 25 μM of TMI-1) for 48 hours. Levels of soluble NKG2DL (sMICA/B and sULBP1-3) were quantified by sandwich ELISA. Values are the mean ± SEM of at least three independent experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.



Supplementary Figure 2: Gating strategy followed in the cytotoxicity assays. Target cells were previously cell membrane labeled with PKH67 dye ($1 \mu\text{M}$ for 5 minutes) and further co-cultured with the NKL effector cells for 4 hours under the conditions appropriate for each experiment. Cells were then collected and stained with the 7AAD viability solution. The cytotoxic capacity was analyzed by flow cytometry, selecting the PKH67-labeled target cells which are positive for 7AAD (dead target cells). Dead cells from the negative control (only target cells) are considered as spontaneous lysis. Percentage specific lysis was calculated as $100 \times [(\% \text{ dead target cells} - \% \text{ spontaneous lysis}) / (100 - \% \text{ spontaneous lysis})]$.

IV. DISCUSIÓN

1. LOS LIGANDOS DE NKG2D SE EXPRESAN DE FORMA HETEROGÉNEA EN EL CÁNCER

Como se ha mencionado previamente, los NKG2DL están ausentes o se expresan de forma muy reducida en la mayoría de las células sanas de nuestro cuerpo. Sin embargo, su expresión se induce enormemente ante diversas situaciones de estrés celular como choque térmico, estrés oxidativo, infecciones, daño en el ADN o radiación UV (Groh y col., 1996; Groh y col., 2001; Yamamoto y col., 2001; Borchers y col., 2006). Muchos de estos procesos, como la respuesta al daño mediada por la vía ATM/ATR, se producen durante el desarrollo tumoral induciendo la expresión de estos ligandos en la superficie de las células tumorales y facilitando su reconocimiento por el sistema inmune (Cerboni y col., 2007). Además, durante la carcinogénesis también se induce la expresión de diversos factores de transcripción (*E2F*, *NFκB*, *Sp1*, *Sp3*...) y múltiples oncogenes (*c-Myc*, *p53*, *Ras*...) que a su vez incrementan la expresión de los NKG2DL en la superficie de las células tumorales (Raulet y col., 2013). Por lo tanto, la sobreexpresión de los ligandos de NKG2D en las células tumorales no es consecuencia de un único proceso, sino que múltiples mecanismos asociados al desarrollo tumoral cooperan entre sí para favorecer el reconocimiento inmunológico mediado por la interacción NKG2D-NKG2DL. Como consecuencia de ello, la expresión de los NKG2DL ha sido demostrada en una gran variedad de tumores.

Con el objetivo de caracterizar la expresión los ligandos de NKG2D en diversos tipos tumorales, hemos analizado los niveles de RNA mensajero de MICA, MICB y ULBPs 1-3 en líneas tumorales procedentes de tumores sólidos (hepatocarcinoma, cáncer de mama y cáncer de colon) y hematológicos (LMA, leucemia linfocítica aguda). Nuestros resultados muestran que cada uno de los ligandos de NKG2D se transcribe de forma heterogénea entre los diferentes tipos celulares analizados ya que no se observa un patrón definido, e independientemente del origen del tumor. Además, hemos observado que los niveles de expresión son muy elevados para MICA y MICB en todos los tipos celulares, mientras que la expresión de las ULBPs 1-3, especialmente la de ULBP3, es más reducida.

La principal diferencia que hemos encontrado entre los tumores de origen hematológico y epitelial se encuentra en la frecuencia de expresión de los ligandos de NKG2D. Todas las líneas celulares derivadas de tumores epiteliales expresan dos o más NKG2DL, mientras que el 25% de las líneas celulares de tumores hematológicos expresan un único ligando. Por lo tanto, nuestros resultados ponen de manifiesto que mientras algunas células tumorales van a poder ser reconocidas y eliminadas por el sistema inmune a través de la interacción NKG2D-NKG2DL, otras células carentes de expresión para los NKG2DL serán menos inmunogénicas y, por lo tanto, evadirán la respuesta inmune. En este sentido, el reconocimiento inmunológico mediado por células NKG2D positivas será mucho más deficiente en tumores de origen hematológico que en tumores sólidos.

Previamente, numerosos trabajos han descrito la expresión diferencial de los ligandos de NKG2D en diversos tipos de tumores, aunque aún existen numerosas controversias. En tumores hematológicos se ha observado que las leucemias agudas (linfoides y mieloides) muestran niveles de expresión más bajos para los NKG2DL que las leucemias crónicas por lo que el reconocimiento inmunológico será menor (Hilpert y col., 2012). En la LMA existen resultados contradictorios a la hora de definir el perfil de expresión de los NKG2DL. Algunos autores sugieren que los NKG2DL (MICA, MICB, ULBPs 1-3) no se expresan o lo hacen a niveles muy bajos en pacientes con LMA (Nowbakht y col., 2005; Pende y col., 2005). Además, su expresión podría variar en función de la clasificación de la FAB, siendo ausente en leucemias mieloblásticas (M1-M3) pero expresándose en leucemias monocíticas (M4-M5) (Diermayr y col., 2008). Sin embargo, otros autores sugieren que la expresión de los NKG2DL es muy variable en los blastos mieloides y que, por lo tanto, el reconocimiento inmunológico del tumor variará en función del paciente (Salih y col., 2003; Sánchez-Correa y col., 2011; Hilpert y col., 2012). En concreto, en el 50-70% de los pacientes se expresa al menos un ligando, mientras que sólo un pequeño porcentaje de pacientes (15%) son capaces de expresar múltiples ligandos. En otros tipos de tumores hematológicos, como la leucemia mieloide crónica o la leucemia linfocítica aguda y crónica, los ligandos de NKG2D se expresan igualmente de forma variable y frecuente. Más del 60% de los pacientes con estas patologías expresan al menos un NKG2DL en la superficie celular (Nüchel y col., 2010; Hilpert y col., 2012).

A diferencia de lo que ocurre con la LMA, el patrón de expresión de los NKG2DL está claramente definido en tumores sólidos. Mientras que en tumores hematológicos no existe una clara tendencia de expresión de unos ligandos sobre otros, la mayoría de los trabajos realizados en tumores sólidos (carcinoma hepático, colon, mama, renal, gástrico, cervical, pancreático, pulmón) muestran una alta expresión de MICA, y en menor medida de MICB (McGilvray y col., 2009; De Kruijf y col., 2012; Chen y col., 2013; Dambrauskas y col., 2013; Cho y col., 2014; Kamimura y col., 2014; Ribeiro y col., 2014; Zhang y col., 2016). Aunque se ha descrito una expresión incrementada de las ULBPs 1-3 en colangiocarcinoma, carcinoma de mama, hepatocarcinoma o cáncer ovárico (McGilvray y col., 2009; Kamimura y col., 2010; De Kruijf y col., 2012; Tsukagoshi y col., 2016), existe un gran desconocimiento sobre la expresión de estos ligandos en otros tumores sólidos.

La eficiencia en el reconocimiento de las células tumorales por las células citotóxicas positivas para NKG2D va a depender de los niveles de expresión de los NKG2DL en la superficie celular. Sin embargo, no existen evidencias claras sobre la relación entre una expresión elevada de los NKG2DL en la superficie de las células tumorales y el pronóstico de la enfermedad. Algunos autores sugieren que la expresión de los ligandos MICA, MICB, ULBP1 y ULBP2 se correlaciona positivamente con la supervivencia global o la supervivencia libre de enfermedad mientras que se asocia negativamente con la presencia de metástasis en carcinomas hepáticos y de mama (De Kruijf EM y col., 2012; Kamimura y col., 2012; Wang y col., 2014; Fang y col., 2014). Por el contrario, la presencia de MICA y MICB en pacientes con cáncer gástrico se ha asociado a un mayor crecimiento del tumor (> 5 cm) (Ribeiro y col., 2016) y en pacientes con carcinoma ovárico, la expresión de ULBP2 se asocia negativamente con el pronóstico de la enfermedad (Li y col., 2009; McGilvray R y col., 2010).

En definitiva, nuestros resultados sugieren que el reconocimiento inmunológico mediado por las células NKG2D positivas será menor en tumores de origen hematológico que en tumores sólidos lo que facilitará la progresión de la enfermedad.

2. LA METILACIÓN DEL ADN CONTRIBUYE AL SILENCIAMIENTO GÉNICO DE LOS NKG2DL EN LA LMA

Las modificaciones epigenéticas, incluida la metilación del ADN, regulan la expresión génica durante el desarrollo normal del individuo. Durante la diferenciación hematopoyética se produce la desmetilación global de las células progenitoras CD34+ dando lugar a las diferentes estirpes celulares, cada una de las cuales tendrá su propio perfil de metilación (Calvanese y col., 2012). La desdiferenciación inducida de las células CD34+ diferenciadas (CD34+-iPSC) restaura los niveles iniciales de metilación sugiriendo que la desmetilación del ADN es un mecanismo esencial en el proceso de diferenciación hematopoyética.

Durante la carcinogénesis se producen cambios en el patrón de metilación que conllevan a: una hipometilación global del genoma y/o a la hipermetilación en la región promotora de genes específicos. Como consecuencia de ello se produce el incremento de la expresión de oncogenes y la inhibición de genes supresores tumorales que van a desequilibrar el balance que controla la proliferación en las células normales dando lugar al desarrollo del cáncer (Ehrlich y col., 2002; Esteller, 2002). Por ello, la implicación de la metilación en el ADN en la evolución del cáncer, incluida la LMA, ha sido objeto de estudio en los últimos años. Durante el desarrollo de la LMA, el patrón de metilación se modifica como consecuencia de la presencia de mutaciones en los enzimas que regulan la metilación del ADN (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*) que desencadenan la expresión aberrante o el silenciamiento de genes envueltos en diferentes procesos relacionados con el cáncer como la diferenciación celular, el ciclo celular o la angiogénesis (Chou y col., 2011; Im AP y col., 2014; Spencer y col., 2017). Además, diversas alteraciones cromosómicas y moleculares han sido asociadas con la presencia de hipometilación (CBFb-MYH11 inv(16) t(16;16); mutación *DNMT3A*...), hipermetilación (mutación *TERT2*, mutación *IDH1/2*...) o incluso de ambas (PML-RARa t(15;17); AML/ETO t(8;21); mutación *NPM1*...) en pacientes con LMA (Schoofs y col., 2014). Esto ha supuesto la identificación de hasta 16 perfiles diferentes de metilación, 11 de los cuales se corresponden con los subtipos de la LMA definidos por la clasificación de la OMS, indicando la importancia de la

metilación del ADN en el pronóstico de la LMA (Figuroa y col., 2010). Además, el análisis del perfil de metilación del ADN tiene valor predictivo tanto de supervivencia como de respuesta al tratamiento hipometilante lo cual es esencial para mejorar el cuidado y las opciones terapéuticas de los pacientes con LMA (Bullinger y col., 2010; Achille y col., 2016; Luskin y col., 2016; Zhang y col., 2016).

Debido a que durante el desarrollo de la LMA se produce la metilación aberrante de múltiples genes, quizá cambios en el perfil de metilación de genes específicos podrían condicionar la respuesta inmune durante el desarrollo tumoral. Por ello, nos planteamos estudiar el papel de la metilación del ADN en la regulación de la expresión de los NKG2DL (MICA, MICB, ULBPs 1-3) en líneas celulares de tumores sólidos (hepatocarcinoma, cáncer de mama y cáncer de colon) y hematológicos (LMA y leucemia linfocítica aguda). En primer lugar, mediante la técnica de secuenciación de bisulfito, se delimitaron las CpG susceptibles de metilación mediante el análisis de una región promotora próxima al inicio de transcripción que engloba 18-38 CpG para cada ligando. Posteriormente, los niveles de metilación para las CpG seleccionadas fueron cuantificados mediante la técnica de pirosecuenciación en los distintos tipos celulares. El perfil de metilación del ADN en los genes *MICA*, *ULBP1*, *ULBP2* y *ULBP3* indica que estos ligandos están aberrantemente metilados (> 60% de metilación) en al menos una de las líneas celulares analizadas. A diferencia de lo que ocurre con el resto de ligandos, *MICB* se encuentra desmetilado en la mayoría de las líneas celulares, y únicamente en dos líneas de LMA (KG1A, NB4) y una de cáncer de colon (HT29) la metilación de *MICB* fue parcial (40-60%). El análisis comparativo entre los diferentes subtipos tumorales muestra que los ligandos de NKG2D están metilados más frecuentemente en las líneas de LMA, lo cual se correlaciona con los bajos niveles de transcripción observados en estas líneas celulares. Este resultado, junto con la ausencia de expresión de los NKG2DL, sugiere que las células de LMA serán menos inmunogénicas que las del resto de tipos tumorales analizados.

Para determinar si el patrón de metilación observado para cada ligando en las líneas celulares de LMA es similar en pacientes, se cuantificaron los niveles de metilación de los NKG2DL (MICA, MICB, ULBPs 1-3) mediante pirosecuenciación en muestras biológicas de pacientes con LMA (n=60). Los datos presentados en esta tesis doctoral muestran que los

niveles de metilación de *MICA*, *ULBP1*, *ULBP2* y *ULBP3* son significativamente superiores a los observados en controles sanos. Además, la frecuencia de metilación de los NKG2DL es elevada, ya que el 59% de los pacientes con LMA presentan una metilación aberrante para al menos un ligando. Para corroborar que la metilación de los ligandos de NKG2D es un evento característico del desarrollo de la LMA y no un fenómeno habitual en las células hematológicas, se analizó el perfil de metilación de cada ligando en diferentes subpoblaciones celulares (monocitos, linfocitos y células polimorfonucleares) de individuos sanos. Todos los NKG2DL se encuentran hipometilados en las diferentes poblaciones celulares analizadas sugiriendo que la metilación de los ligandos ocurre exclusivamente durante el desarrollo de la LMA. Estos resultados se correlacionan con la presencia de los ligandos (*ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3*) en diversas subpoblaciones celulares como plaquetas, granulocitos, monocitos y células B (Nowbakht y col., 2005).

A diferencia de lo que ocurre en la LMA, los NKG2DL (*MICA*, *MICB*, *ULBPs 1-3*) están desmetilados en muestras pareadas de tejido normal y tumoral procedente de pacientes con cáncer de colon (n=44). En cambio, hay trabajos que muestran que los ligandos *ULBP2* y *ULBP3* se encuentran hipermetilados en líneas celulares de cáncer de colon (Sers y col., 2009; Bormann y col., 2011). Quizás las diferencias observadas entre estos estudios y nuestro trabajo sean consecuencia de la diferente región promotora analizada para cada ligando, tratándose en nuestro caso de una región promotora más cercana al inicio de transcripción.

Aparte de los trabajos realizados en cáncer de colon, se desconoce cuál es la implicación de la metilación del ADN en los ligandos en otros tipos tumorales. Por lo tanto, esta es la primera vez que se ha demostrado que la metilación del ADN regula la expresión de los NKG2DL tanto en líneas celulares como en pacientes con LMA. Además, la ausencia de metilación de los NKG2DL en controles sanos sugiere que la metilación de estos genes es un evento característico del desarrollo de la enfermedad.

3. EL TRATAMIENTO CON AGENTES DESMETILANTES FAVORECE EL RECONOCIMIENTO INMUNOLÓGICO MEDIADO POR LA INTERACCIÓN NKG2D-NKG2DL

La principal función del sistema inmune en la inmunovigilancia del cáncer consiste en la identificación y eliminación de las células tumorales a través del reconocimiento de antígenos específicos del tumor o de moléculas inducidas por estrés celular. Las células T CD8+ y las NK juegan un papel importante en el reconocimiento inmune del tumor a través de la liberación de gránulos citotóxicos (perforina y granzima) que van a provocar la lisis de la célula diana. De hecho, la carencia de perforina en modelos murinos genera una mayor incidencia de cáncer (Smyth y col., 2000). Además, para que tenga lugar la respuesta citotóxica es necesaria la infiltración de estas células en el tumor. Así, múltiples estudios han puesto de manifiesto la correlación positiva existente entre la infiltración de los linfocitos T CD8+ y la supervivencia a diferentes tipos tumorales (leucemia linfocítica crónica, cáncer de mama, carcinoma renal, urotelial o esofágico) (Nakano y col., 2001; Schumacher y col., 2001; Sharma y col., 2007; Gonzalez-Rodriguez y col., 2010; Liu y col., 2012). Del mismo modo, la infiltración de las células NK en el tumor desencadena la actividad citotóxica de estas células lo cual se relaciona con un mejor pronóstico de la enfermedad (Coca y col., 1997; Ishigami y col., 2000; Villegas y col., 2002). Sin embargo, uno de los trabajos más relevantes sobre la implicación de las células NK en la inmunovigilancia del cáncer fue el realizado por Imai y col. (Imai y col., 2000). Este estudio epidemiológico de 11 años de seguimiento, realizado en 3625 individuos japoneses con una edad superior a 40 años, muestra que aquellos individuos que tienen células NK con menor poder citotóxico tendrán un mayor riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer en el futuro. Todos estos trabajos ponen de manifiesto la relevancia de las células citotóxicas en el reconocimiento y eliminación del tumor.

La actividad lítica de las células NK está controlada por un balance exhaustivo entre señales de activación y de inhibición. La interacción de NKG2D, uno de los principales receptores de activación de las células NK, con sus ligandos es esencial en el reconocimiento inmunológico ya que la deficiencia en modelos murinos de este gen desencadena una mayor incidencia de cáncer (Guerra y col., 2008). Sin embargo, como

mecanismos de evasión tumoral, las células NK pierden su capacidad citotóxica en la LMA debido a la expresión reducida de NKG2D y de otros receptores de activación (DNAM-1, NCRs) y al aumento en la expresión de receptores de inhibición (KIR) (Verheyden y col., 2004; Nguyen y col., 2005; Ingram y col., 2009; Lion y col., 2012; Khaznadar y col., 2012; Sanchez-Correa y col., 2012; Sandoval-Borrego y col., 2016). Esto, en combinación con la reducida expresión de los ligandos de NKG2D así como de otros ligandos de activación, (PVR, Nectin-2) dificulta el reconocimiento inmune de las células tumorales (Nowbakht y col., 2005; Diermayr y col., 2008; Kearney y col., 2016). Como consecuencia de ello, las estrategias terapéuticas actuales están dirigidas a restaurar la actividad funcional de las células NK como, por ejemplo, a través del incremento en la expresión de los NKG2DL en la superficie de las células tumorales.

Por lo tanto, y debido a la aberrante hipermetilación de los NKG2DL (MICA, ULBP1-3) en células de LMA, nos planteamos que el tratamiento con inhibidores de las DNMTs (AZA, DAC) podría suponer una buena estrategia terapéutica para facilitar la interacción de NKG2D con sus ligandos. Primeramente, hemos demostrado que el tratamiento con ambos agentes desmetilantes incrementa la transcripción de los NKG2DL (MICA, ULBP1, ULBP2, ULBP3) que estaban altamente metilados en las líneas celulares de LMA, leucemia linfocítica aguda y cáncer de mama. Aunque este incremento transcripcional únicamente se traduce en un aumento de estas proteínas en la superficie celular en las líneas de LMA (HL60, KG1A, NB4). Por lo tanto, la metilación del ADN en las regiones reguladoras de los ligandos de NKG2D es un mecanismo reversible cuya inhibición facilita la re-expresión de estos ligandos en la superficie de las células tumorales.

Posteriormente, para analizar si este incremento en las células tumorales podría facilitar el reconocimiento inmune, llevamos a cabo ensayos de citotoxicidad con la línea celular NKL, la cual expresa altos niveles del receptor NKG2D y bajos para los receptores de inhibición. Los resultados muestran que tras el tratamiento desmetilante (AZA, DAC) en las líneas celulares de LMA (HL60, KG1A, NB4) se produce un incremento en la capacidad lítica de las células NKL. Para demostrar la especificidad del tratamiento sobre la interacción NKG2D-NKG2DL, se realizaron ensayos de bloqueo utilizando un anticuerpo específico frente NKG2D observando una reducción en el porcentaje de lisis específica.

Además, el efecto sobre la capacidad citotóxica de las células NKL varía en función de la línea celular de LMA. Así, el incremento de la capacidad citotóxica es mayor tras el tratamiento con AZA en algunas líneas celulares de LMA (HL60, KG1A), mientras que otras (NB4) responden mejor al tratamiento con DAC. Estos resultados fueron corroborados mediante el análisis de la producción de IFN- γ por las células NKL tras entrar en contacto con las células de LMA antes y después del tratamiento con AZA y DAC observando un incremento en la producción de la citocina tras el tratamiento con ambos fármacos. Estos resultados apoyan trabajos previos en los que se había observado que el tratamiento con agentes hipometilantes solos o en combinación con otras drogas incrementan la expresión de los NKG2DL facilitando el reconocimiento inmune de las células tumorales (Rohner y col., 2007; Tang y col., 2008; Schmiedel y col., 2011).

Cuando utilizamos células NK procedentes de controles sanos para ensayos de degranulación, los resultados son más variables. Algunas células NK de controles sanos son capaces de lisar las células HELR, la cual expresa todos los NKG2DL, mientras que no reconocen las células donde los NKG2DL se encuentran metilados (HL60, KG1A, NB4), mostrando que la metilación del ADN juega un papel muy importante en el reconocimiento inmunológico mediado por NKG2D-NKG2DL. Sin embargo, otras células NK son incapaces de reconocer y lisar a las células HELR pero sí a las líneas HL60, KG1A y NB4. Esto es debido a que el reconocimiento inmunológico no depende exclusivamente de la interacción de NKG2D con sus ligandos, sino que existen múltiples receptores tanto de inhibición (KIR, LIR, NKG2A) como de activación (NKG2D, NCRs, DNAM-1, 2B4) que pueden modular este proceso. Además, los tratamientos desmetilantes no solo modulan la interacción NKG2D-NKG2DL, sino que también son capaces de inducir la expresión de algunos receptores de inhibición de las células NK, concretamente, los receptores KIR (KIR2DL, KIR2DL3, KIR3DL1 o KIR3DL2) (Gao y col., 2009; Sohlberg y col., 2015). De hecho, hemos observado niveles elevados de expresión de la molécula inhibitoria HLA-I en la línea celular HELR. Sin embargo, las líneas celulares metiladas para los NKG2DL (HL60, KG1A, NB4) tienen una expresión reducida para HLA-I, pero presentan niveles elevados de expresión para CD48, ligando del receptor de activación 2B4. Sin embargo, el bloqueo de 2B4 en las células NK de un donante no respondedor (no reconoce HELR pero sí las líneas celulares metiladas) no produce ningún cambio en la degranulación de las células NK. En

cambio, la degranulación frente a la línea HELR aumenta tras el bloqueo del receptor de inhibición NKG2A. Por lo tanto, estos datos indican que el repertorio de receptores de activación y de inhibición de las células NK determinará la capacidad de reconocimiento inmunológico de las células tumorales. A diferencia de lo que ocurre con las células NK, la degranulación de las células CD8+ T de donantes sanos aumenta claramente tras el tratamiento con AZA y DAC.

Además de la modulación de los ligandos de receptores de NK, otra de las estrategias terapéuticas que se están llevando a cabo actualmente para potenciar el reconocimiento inmunológico de las células de LMA es el trasplante de células NK aloreactivas. En ratones NOD/SCID, a los que previamente se les injertaron células de LMA, el trasplante de células NK aloreactivas promueve la eliminación de las células leucémicas mejorando tanto la tasa de recaída como la de supervivencia de la enfermedad (Ruggeri y col., 2002). Actualmente, debido a que las células NK aloreactivas tienen la capacidad de expandirse y de mantener sus funciones citotóxicas intactas, se está llevando a cabo la transfusión de estas células a pacientes con idéntico HLA-I con el fin de eliminar las células leucémicas remanentes que hayan quedado después de los tratamientos de quimioterapia (Miller y col., 2005; Locatelli y col., 2009).

En conclusión, aunque es cierto que la actividad de las células NK está regulada por un exhaustivo balance entre señales de activación y de inhibición, nuestros resultados sugieren que la inducción de los NKG2DL tras el tratamiento con agentes hipometilantes favorecería un mayor reconocimiento inmunológico del tumor (**Figura 10**).

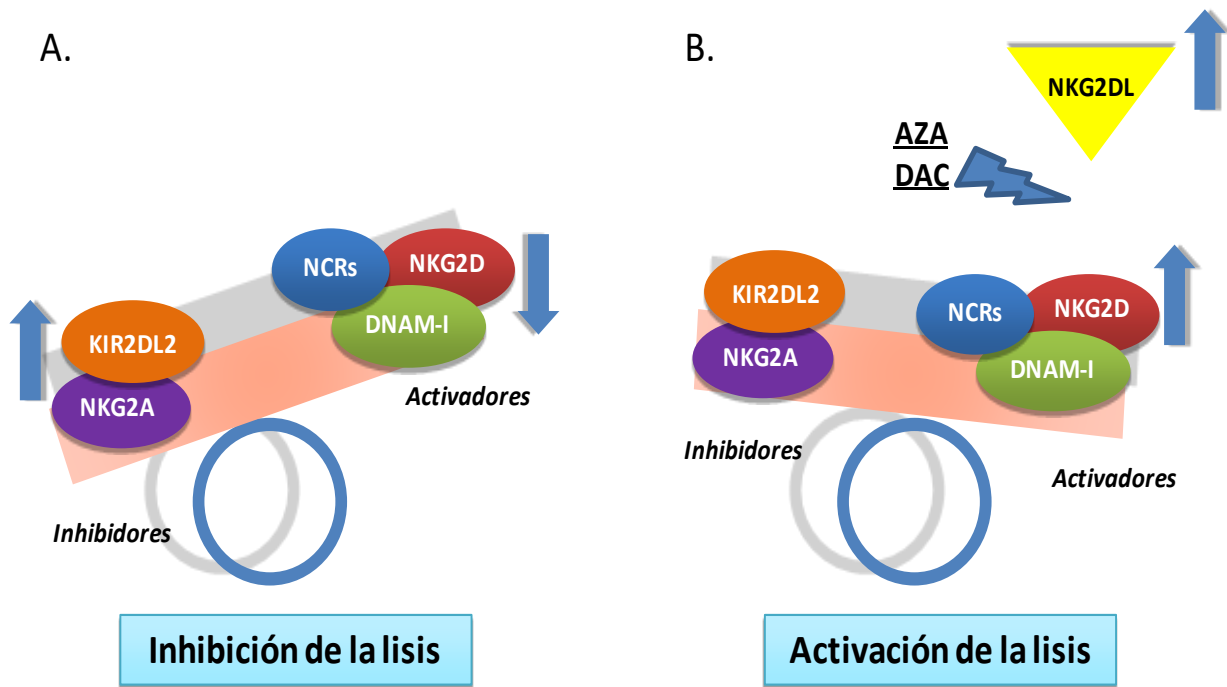


Figura 11. Papel de las células NK en el reconocimiento de los blastos mieloides. (A) En la LMA la expresión de los receptores de inhibición se incrementa mientras que disminuye la expresión de los receptores de activación inhibiendo la lisis celular. (B) El tratamiento con agentes hipometilantes (AZA, DAC) incrementa la expresión tanto de NKG2D como de sus ligandos inclinando la balanza hacia la activación de la lisis celular favoreciendo el reconocimiento inmunológico del tumor.

4. LIBERACIÓN DE LOS LIGANDOS DE NKG2D: MECANISMOS IMPLICADOS Y POSIBLES ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS

El principal mecanismo de evasión desarrollado por las células tumorales consiste en la liberación de los NKG2DL en su forma soluble desde la superficie al medio extracelular. La presencia de los ligandos de NKG2D se ha demostrado en el suero de pacientes con múltiples patologías tumorales, tanto de origen epitelial como hematológico, pero existen diferencias entre un subtipo y otro. Al igual que ocurre con los niveles de expresión en la membrana celular, MICA es el ligando liberado con mayor frecuencia en tumores sólidos (cáncer cervical, hepatocarcinoma, neuroblastoma, carcinoma de cabeza y cuello de células escamosas) (Raffaghello y col., 2004; Jinushi y

col., 2005; Arreygue-García y col., 2008; Klöß y col., 2007). Si bien es cierto que muy pocos trabajos han analizado la presencia del resto de ligandos, principalmente ULBPs, en este tipo de tumores. Únicamente se ha mostrado la presencia de niveles elevados de MICB y ULBP2 solubles en pacientes con cáncer pancreático, de pulmón o melanoma (Paschen y col., 2009; Yamaguchi y col., 2012; Chen y col., 2016). A diferencia de esto, todos los ligandos de NKG2D han sido detectados en su forma soluble en el suero de pacientes con diversos tumores hematológicos (LMA, leucemia mieloide crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica) (Salih y col., 2003; Diermayr y col., 2008; Nüchel y col., 2010; Hilpert y col., 2012; Huergo-Zapico y col., 2012).

Estas formas solubles conllevan a dos importantes consecuencias, por un lado, la disminución de la expresión de los NKG2DL en la superficie celular y por otro, el bloqueo e internalización de su receptor NKG2D (López-Cobo y col., 2016). Por lo que cabría esperar que el reconocimiento inmunológico mediado por la interacción NKG2D-NKG2DL sea menor en tumores hematológicos donde existe un mayor nivel de ligandos solubles. Y que la presencia de estos ligandos solubles se asocie a un peor pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, son pocos los estudios que se conocen sobre la implicación clínica que tienen estas proteínas solubles en los tumores de origen hematológico. Se sabe que en la LMA la supervivencia a un año y la tasa de remisión de la enfermedad es mayor en aquellos pacientes en los que la liberación de MICB, ULBP2 o ULBP1 es menor (Hilpert y col., 2012). En otros tumores hematológicos, como la leucemia linfocítica aguda y crónica y en mieloma, la liberación de MICA, MICB y/o ULBP2 se asocia con un peor pronóstico de la enfermedad y con una peor supervivencia libre de tratamiento (Rebmann y col., 2007; Nüchel y col., 2010; Hilpert y col., 2012). Por el contrario, la asociación entre la presencia de ligandos solubles, fundamentalmente MICA, y la peor evolución del tumor ha sido claramente demostrada en tumores sólidos. Niveles elevados de MICA, MICB o ULBP2 soluble se han asociado a una peor supervivencia global en pacientes con tumores de hepatocarcinoma, cáncer pancreático, melanoma y cáncer de pulmón (Paschen y col., 2009; Tamaki y col., 2010; Duan y col., 2011; Kumar y col., 2012; Yamaguchi y col., 2012; Chen y col., 2016).

Además, la presencia de estos ligandos solubles puede ser considerada como un marcador por sí mismos, independientemente de los biomarcadores actualmente utilizados como específicos de la enfermedad. Así, algunos estudios concluyen que los niveles de liberación de MICA y ULBP2 permite clasificar a los pacientes con mieloma múltiple y cáncer pancreático en función de su supervivencia (Rebmann y col., 2007; Chen y col., 2016). En otras patologías como el melanoma la cuantificación de los niveles de MICB y ULBP2 permite agrupar a los pacientes en función de la supervivencia y el estadio de la enfermedad (Paschen y col., 2009; Wu y col., 2013).

Debido a la frecuente liberación de los NKG2DL solubles y a su implicación en el pronóstico del cáncer, el conocimiento de los mecanismos implicados en la regulación de este proceso podría ser de gran relevancia en el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a favorecer el reconocimiento inmunológico del tumor. La digestión proteolítica mediada por la acción de MPs y la liberación dentro de partículas exosomales son los dos mecanismos principales de liberación de los NKG2DL (**Figura 12**).

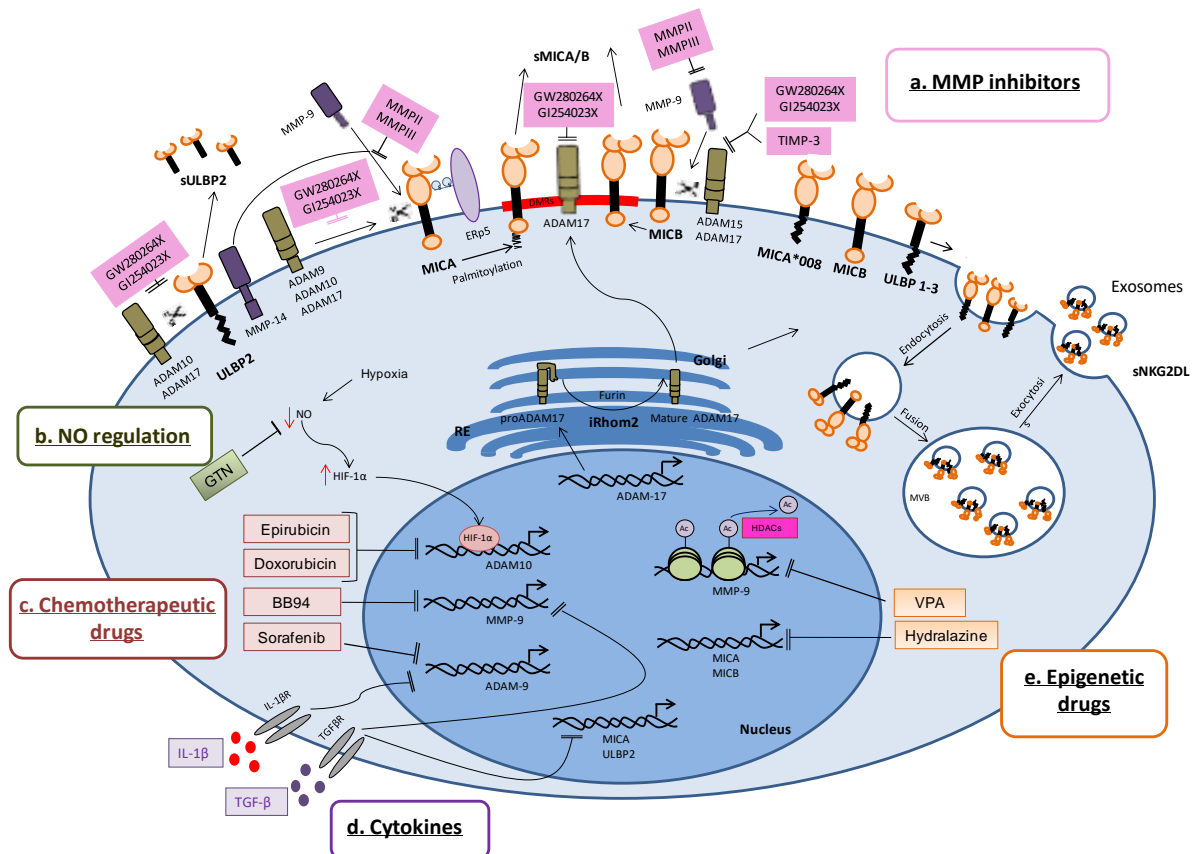


Figura 12. Mecanismos envueltos en la liberación de los sNKG2DL estrategias de bloqueo. Los sNKG2DL son liberados mediante la acción de MPs o dentro de partículas exosomales. El bloqueo de estos mecanismos facilitaría el reconocimiento inmunológico. Diferentes estrategias terapéuticas han sido propuestas para evitar la liberación de los sNKG2DL. Estas estrategias incluyen: (A) Inhibidores farmacológicos de la actividad de las MMP (MMPI II, MMPI III) y de las ADAM (GW280264X, GI254023X) así como TIMP3, un inhibidor natural de ADAM17. (B) Nitroglicerina (GTN) restaura los niveles de óxido nítrico durante la hipoxia inhibiendo la transcripción de HIF1 α (*Hypoxia inducible factor 1, α subunit*) y de ADAM10 bloqueando la liberación de sMICA y sMICB. (C) Diferentes agentes quimioterapéuticos pueden regular la producción de sNKG2DL a través de la disminución de la expresión génica de diversas MPs. (D) Citocinas como IL-1 β (*Interleukin-1 β*) o TGF- β (*Transforming growth factor β*) reducen la transcripción de ADAM9 y de los NKG2DL. (E) Drogas epigenéticas como el valproato y la hidralacina disminuyen la transcripción de MMP9.

Los ligandos MICA, MICB y ULBP2 son liberados, principalmente, por la acción de dos familias de metaloproteasas: MMPs y ADAMs. Ambas participan en procesos claves del desarrollo tumoral como son el crecimiento celular, la angiogénesis, la migración y la invasión (Noël y col., 2012; Duffy y col., 2011). Diversas MMPs (MMP2, MMP9, MM14) han sido implicadas en la liberación de MICA y/o MICB en tumores sólidos (carcinoma renal, mama, próstata o glioma) (Kim y col., 2004; Eisele y col., 2006; Liu y col., 2010; Sun y col., 2011; Yamanegi y col., 2012; Yamanegi y col., 2012; Yang y col., 2014). Sin embargo, las proteasas más relevantes son la familia de las ADAM, ya que además de provocar la liberación de MICA y MICB, regulan la liberación de ULBP2 (Chitadze y col., 2013). ADAM9 y ADAM15 han sido implicadas en la liberación de MICA y MICB, respectivamente (Kogha y col., 2010; Kogha y col., 2012; Duan y col., 2013); pero ADAM10 y ADAM17 son las proteasas mejor caracterizadas hasta la fecha. Ambas regulan la liberación de MICA, MICB y ULBP2 tanto en líneas celulares como en tumores primarios de origen epitelial (cáncer de próstata, cáncer mama, glioma) (Waldahuer y col., 2008; Boutet y col., 2009; Barsoum y col., 2011; Chitadze y col., 2013; Wolpert y col., 2014). Sin embargo, se desconoce su implicación en la liberación de los ligandos de NKG2D en tumores de origen hematológico, como la LMA.

A diferencia de lo que ocurre con MICA, MICB y ULBP2, poco se conoce sobre los mecanismos implicados en la liberación de ULBP1 y ULBP3. Aunque recientemente, ha sido sugerido que ULBP3 puede ser liberado por la acción de ADAM10 (Camodeca y col., 2016), el principal mecanismo de liberación propuesto para estos es la liberación dentro

de partículas exosomales (Hedlund y col., 2009; Fernández-Messina y col., 2010; Hedlund y col., 2011). Del mismo modo, el alelo MICA*008, el único que debido a una mutación consistente en la inserción de un nucleótido en el exón que codifica para la región TM generando GPI de anclaje a la membrana plasmática, se libera dentro de partículas exosomales sugiriendo que la presencia de este dominio de anclaje a la membrana es el responsable de la aparición de este alelo en exosomas (Ashiru y col., 2013). Al igual que ocurre con los NKG2DL liberados mediante proteólisis, la presencia de ligandos solubles en los exosomas también se ha relacionado con una disminución de la expresión de NKG2D en la superficie de células de mesotelioma maligno (Clayton y col., 2008). Sin embargo, a pesar de las múltiples evidencias que sugieren que los exosomas juegan un papel fundamental en cáncer (Azmi y col., 2013), poco se conoce sobre los mecanismos que regulan su liberación. Por ello, son necesarios estudios en profundidad para determinar su regulación y su papel en la inmunovigilancia del cáncer mediada por NKG2D-NKG2DL.

Diversas estrategias terapéuticas dirigidas a bloquear la actividad de las metaloproteasas han sido propuestas para incrementar la expresión de los ligandos en la membrana celular y en último término, favorecer el reconocimiento inmunológico. Se conocen tres tipos de tratamientos capaces de modular la actividad de las MPs: inhibidores farmacológicos de las MP, fármacos quimioterapéuticos utilizados en clínica y el uso de drogas **epigenéticas (Tabla 7)**.

Tipo	Tratamiento	MP	Ligando soluble	Tipo celular	Ref
Inhibidores sintéticos de las MP	MMPI II, MMPI III	Inhibidores amplio espectro	MICA, ULBP2	Transfectos (C1R-MICA, C1R-ULBP2)	Waldhauer y col., 2006 Waldhauer y col., 2008
	GW280264X	ADAM10, ADAM17	MICA	Transfectos (C1R-ULBP2)	Waldhauer y col., 2008
	GI254023X	ADAM10	MICA	Transfectos (C1R-ULBP2)	Waldhauer y col., 2008
Agentes quimioterapéuticos	BB94 (Batismatat)	MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9	MICA, MICB, ULBP2	Transfectos: C1R-MICA, C1R-ULBP2, C1V-MICB	Waldhauer y col., 2006 Waldhauer y col., 2008 Boutet y col., 2009
	Epirubicina, doxorubicina	ADAM10	MICA	Líneas celulares de hepatocarcinoma (HEPG2, PLC/PRF/5)	Kohga y col., 2009
	Sorafenib	ADAM9	MICA	Líneas celulares de hepatocarcinoma (HEPG2, PLC/PRF/5)	Kohga y col., 2009
Drogas epigenéticas	Valproato (HDACi)	MMP9	MICA, MICB	Líneas celulares de osteosarcoma (U-2 OS, SaOs-2)	Yamanegi y col., 2012
	Hidralacina (DNMTi)	Desconocido	MICA, sMICB	Líneas celulares de cáncer de próstata (DU145), colon (SW480), mama (T47D), cervical (Caski)	Chávez-Blanco y col., 2011

Tabla 7. Estrategias terapéuticas para la inhibición de las MP involucradas en la liberación de los sNKG2DL.

Diversos inhibidores farmacológicos de la actividad de las MPs de amplio espectro (MMPI II, MMPI III) o más específicos (GW280264X: ADAM10 y ADAM17, GI254023X: ADAM10) son capaces de modular la liberación de MICA, MICB y ULBP2 en líneas celulares de tumores sólidos (Waldhauer y col., 2006; Waldhauer y col., 2008). Sin embargo, la baja especificidad de estos tratamientos hace complicado su uso en clínica promoviendo la búsqueda de terapias alternativas. El uso de tratamientos quimioterapéuticos también puede modular la liberación de los sNKG2DL. El batismatat, la epirubicina, la doxorubicina o el sorafenib, todos ellos tratamientos frente al hepatocarcinoma o cáncer de mama, son capaces de inhibir la actividad tanto de las MMP (MMP2, MMP9) como de las ADAM (ADAM9, ADAM10) reduciendo la liberación de MICA,

MICB y ULBP2 (Waldhauer y col., 2006; Waldhauer y col., 2008; Kohga y col., 2009; Kohga y col., 2010). Además, tratamientos epigenéticos como inhibidores de HDACs (VPA) o inhibidores de DNMTs (hidralazina) (inhibidor de HDAC) reducen la liberación de MICA y MICB en diversas células tumorales (osteosarcoma, cáncer de próstata, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer cervical) sugiriendo que los mecanismos de regulación epigenética pueden tener un papel clave en la liberación de los NKG2DL (Yamanegi y col., 2012; Chávez-Blanco y col., 2011). Sin embargo, se desconoce el papel de los agentes epigenéticos sobre la regulación de las ULBPs. A la vista de estos resultados, es necesario seguir investigando sobre el efecto que los tratamientos desmetilantes, algunos utilizados en la práctica clínica, tienen en la liberación de estos ligandos solubles.

5. LOS AGENTES DESMETILANTES BLOQUEAN LA LIBERACIÓN DE LOS NKG2DL FAVORECIENDO LA INTERACCIÓN CON EL RECEPTOR NKG2D

Como se ha mencionado previamente, el abordaje terapéutico de numerosos tumores se centra en evitar la liberación de los ligandos de NKG2D en su forma soluble, favoreciendo su expresión estable en la superficie celular y por lo tanto el reconocimiento por células inmunes positivas para NKG2D. Los tratamientos epigenéticos, y en concreto los basados en inhibir las enzimas DNMTs solos o en combinación con otras drogas (Vitamina D3, briostatina-1, ácido transretinoico, tricostatina A) han mostrado su efecto en diversos tumores al inducir la expresión de los NKG2DL en la superficie celular (Rohner y col., 2007; López-Soto y col., 2009; Sers y col., 2009; Schmiedel y col., 2010; Tang y col., 2010; Bormann y col., 2011). Sin embargo, poco se conoce sobre el efecto de estos tratamientos hipometilantes en la liberación de los ligandos en su forma soluble. De hecho, solo se sabe que el valproato y la hidralazina inhiben la liberación de MICA y MICB en algunos tumores sólidos (Chávez-Blanco y col., 2010; Yamanegi y col., 2012). Por lo tanto, consideramos que es de gran interés analizar el efecto que los tratamientos desmetilantes tienen en la liberación de los ligandos de NKG2D en una patología como la

LMA, donde tanto los ligandos solubles como el uso actual de estos tratamientos juegan un papel relevante.

La LMA es una enfermedad caracterizada por presentar una gran heterogeneidad clonal que se va incrementando con la progresión o la recaída de la enfermedad (Mardis y col., 2009; Walter y col., 2012; Ding y col., 2012; Welch y col., 2012). Es decir, en un tumor, todas las células comparten las mismas mutaciones somáticas que las del clon inicial reflejando la clonalidad de la enfermedad. Pero a medida que el tumor evoluciona, se van acumulando mutaciones adicionales que van a definir los diferentes subclones de la enfermedad. Debido a esa gran variabilidad, resulta complicado encontrar un tratamiento efectivo para la LMA. Actualmente, los tratamientos de primera línea se basan en la administración de drogas quimioterapéuticas (citarabina, antraciclina) y en algunos casos en el trasplante de precursores hematopoyéticos (Roboz, 2011). Sin embargo, la elevada tasa de recaída de la enfermedad después de estos tratamientos sugiere que los blastos leucémicos son capaces de escapar al sistema inmune. Además, estos tratamientos no son recomendados en personas de edad avanzada o con mal pronóstico ya que se asocian con elevadas tasas de mortalidad. Por ello, los agentes hipometilantes AZA (Vidaza®) y DAC (Dacogen®) han sido aprobados por la FDA como tratamientos alternativos para estos pacientes (Griffiths y col., 2013) debido a que mejoran su supervivencia y su calidad de vida (menor fatiga, disnea y trastornos psicológicos, así como una mayor movilidad) (Kornblith y col., 2002). El fundamento de estos tratamientos se basa en provocar daño en el ADN y la lisis de las células leucémicas, pero a pesar de su uso habitual en la práctica clínica, aún se desconocen cuáles son los mecanismos moleculares y las dianas terapéuticas concretas sobre las que actúan.

A la vista de estos antecedentes, nos planteamos determinar el papel que los tratamientos desmetilantes AZA y DAC ejercen en la liberación de los ligandos solubles durante la LMA. Se observó que las líneas celulares KG1A y NB4, las cuales liberan niveles elevados de MICA, MICB y ULBPs1-3 al sobrenadante celular, disminuyen drásticamente la liberación de estos ligandos tras el tratamiento *in vitro* con ambos agentes desmetilantes. Esta disminución en la liberación de los ligandos solubles es acompañada por un incremento de la expresión de estas proteínas en la superficie celular, sugiriendo

que los tratamientos desmetilantes podrían afectar directamente a los mecanismos de liberación o corte proteolítico de los NKG2DL.

Una de las principales consecuencias de la liberación de los NKG2DL es el bloqueo e internalización de su receptor NKG2D, llevando a la pérdida de su funcionalidad (Salih y col., 2008). De hecho, los sobrenadantes de las líneas celulares de LMA KG1A y NB4 son capaces de disminuir la expresión del receptor NKG2D en la línea celular NKL así como de bloquear la interacción de NKG2D con sus ligandos en un ensayo de citotoxicidad. Por el contrario, el tratamiento previo de estas líneas celulares con AZA y DAC bloquea o revierte ambos efectos. En definitiva, los tratamientos desmetilantes no sólo son capaces de regular la liberación de los ligandos de NKG2D en las células mieloides, sino también de restaurar el reconocimiento inmune mediado por el receptor NKG2D.

Estos resultados han podido ser trasladados al análisis llevado a cabo en pacientes diagnosticados con LMA a los cuales se les ha administrado un tratamiento con Vidaza® durante varios ciclos. En el suero de todos los pacientes analizados se detectó la presencia de uno o más ligandos solubles siendo MICB y ULBP3 los ligandos liberados con mayor frecuencia (83.3% de los casos), seguido de ULBP2 (66.7%), ULBP1 (58.3%) y MICA (50%). Estos resultados se correlacionan con estudios previos donde se había observado que los NKG2DL son liberados frecuentemente al suero de pacientes con LMA llegando a encontrarse liberación para dos o más ligandos en el 90% de los casos (Salih y col., 2003; Diermayr y col., 2008; Hilpert y col., 2012). Tras el tratamiento con Vidaza®, el 60% de los pacientes disminuyeron la presencia de estos ligandos solubles, corroborando nuestros estudios previos en las líneas celulares de LMA. Además, se pudo comprobar que la disminución de los NKG2DL solubles en el suero de los pacientes tratados con Vidaza® es capaz de revertir el bloqueo de la citotoxicidad mediada por la interacción NKG2D-NKG2DL observada con el suero obtenido previo al tratamiento. Asimismo, el tratamiento con Vidaza® incrementa la expresión de los NKG2DL en la superficie de los blastos mieloides procedentes de medula ósea en comparación a la expresión observada antes del tratamiento. El incremento en la expresión de los NKG2DL en la superficie celular podría estar asociada con el número de ciclos de Vidaza® recibidos, ya que los dos de los pacientes que habían recibido un menor número de ciclos (2-3) se corresponde con

aquellos en los que el incremento en la expresión es menor o casi inexistente. Estos resultados junto con los trabajos previos publicados en células de tumores sólidos (Yamanegi y col., 2012; Chávez-Blanco y col., 2011) muestran que el tratamiento con moduladores epigenético es eficaz a la hora de potenciar el reconocimiento inmunológico mediado por las células NK a través de la inhibición de la liberación de los NKG2DL. Sin embargo, estos resultados necesitan ser confirmados en estudios posteriores con un mayor número de pacientes, debido a la dificultad de obtener estas muestras y al número reducido de pacientes con LMA tratados con esta droga.

Como resumen de nuestros datos, podemos afirmar que el tratamiento con Vidaza® en pacientes con LMA interfiere en los mecanismos de liberación asociados a los ligandos de NKG2D favoreciendo su expresión en la membrana celular de los blastos mieloides y en definitiva, el reconocimiento inmunológico. Sin embargo, no podemos dejar de tener en cuenta que estos tratamientos tienen efectos adicionales en la expresión de diversos antígenos asociados a tumores (CTA, *cancer-testis antigen*; NY-ESO-1, *New York Esophageal Squamous Cell Carcinoma-1*), en genes supresores tumorales (por ejemplo, inhibidores de las ciclinas) (Wolf y col., 2017) o en moléculas costimuladoras como PD-1, PD-1L o PD-L2 (Ørskov y col., 2015) los cuales se asocian con una mayor resistencia al tratamiento, una mayor progresión de la enfermedad y una menor supervivencia.

6. LA HIPOMETILACION DE TIMP3 BLOQUEA LA LIBERACIÓN DE MICA, MICB Y ULBP2 Y SE ASOCIA A UN MEJOR PRONÓSTICO CITOGENÉTICO

Nuestro siguiente objetivo fue determinar el mecanismo implicado en el bloqueo de la liberación de los ligandos de NKG2D mediado por los agentes hipometilantes AZA y DAC. Como se mencionó anteriormente, la familia de metaloproteasas ADAM y en concreto ADAM10 y ADAM17 han sido descritas como claves en el procesamiento y liberación de los ligandos de NKG2D. Además, estas proteasas participan en otros procesos de angiogénesis, migración, invasión y crecimiento íntimamente relacionados

con la progresión tumoral (Kessenbrock y col., 2010). Aunque su papel en la LMA ha sido pobremente descrito.

En consecuencia, lo primero que analizamos fue el efecto de los inhibidores específicos de estas MPs (GW280264X y TMI-1 como inhibidores de ADAM17, GI250023X como inhibidor de ADAM10) en la liberación de los NKG2DL en las líneas de LMA, KG1A y NB4. Se observó que los inhibidores específicos de la actividad de ADAM17 reducen la liberación de todos los ligandos mientras que el inhibidor de ADAM10 no tiene ningún efecto. Esta es la primera vez que ADAM17 se asocia con el procesamiento y liberación de los NKG2DL en la LMA, y en concreto con los ligandos ULBP1 y ULBP3, los cuales hasta hace poco se consideraba que se liberaban exclusivamente dentro de partículas exosomales. Aunque estudios recientes también mostraron que la inhibición farmacológica de ADAM10 o su silenciamiento específico mediante siRNA reduce la liberación tanto de MICB como de ULBP3 en líneas celulares de linfoma de Hodgkin (Zocchi y col., 2015; Camodeca y col., 2016). Además, se ha descrito que la estabilidad de ULBP1 en la membrana celular es menor que la del resto de ligandos y que podría ser eliminado de la superficie celular por un proceso de endocitosis y degradación en el proteasoma (Fernández-Messina y col., 2016). Por lo tanto, se especula que la liberación de los ligandos de NKG2D mediante uno u otro mecanismo va a ser dependiente del tipo celular, de la expresión y funcionalidad de las diferentes proteasas, así como del tráfico celular de los NKG2DL.

En la LMA, los inhibidores de ADAM17 han sido propuestos como tratamiento para aumentar la activación de las células NK frente a los blastos leucémicos. Se sabe que una vez que las células NK reconocen a la célula tumoral, la expresión del receptor CD16 en la membrana se reduce como consecuencia de su liberación proteolítica mediada por ADAM17. De hecho, el tratamiento con un anticuerpo humanizado CD16 x 33 BIKE el cual se une a las células NK a través de CD16 y permite el reconocimiento de las células de LMA CD33+ incrementando la capacidad citotóxica de las células NK y la producción de citocinas (Wiernik y col., 2013). Si este anticuerpo se utiliza en combinación con inhibidores específicos de ADAM17, el incremento de la activación de las células NK es aún mayor ya que la inhibición de ADAM17 impide la liberación de CD16. Además, se ha

demostrado que ADAM17 se expresa en células de LMA e interacciona con la aminopeptidasa CD13 regulando procesos relacionados con el crecimiento celular, la movilidad y la secreción de citoquinas inflamatorias y angiogénicas (Bouchet y col., 2014). El uso de anticuerpos frente CD13 podría ser utilizado como tratamiento para la LMA ya que promueven la internalización tanto de CD13 como de ADAM17 provocando la apoptosis de los blastos mieloides. Mucho menos se conoce sobre el papel de ADAM10 en la LMA ya que únicamente se ha descrito que esta proteasa se expresa en aquellos pacientes que presentan la mutación en el gen *MLL* (*Mixed lineage leukemia*) (Poppe y col., 2004). Por lo tanto, nuestros resultados muestran un papel adicional de ADAM17 en la LMA a través del bloqueo de la liberación de los ligandos de NKG2D.

Para demostrar el efecto de estos agentes desmetilantes sobre la expresión y/o actividad de ADAM17, analizamos la expresión de ADAM17 en la superficie celular de las líneas KG1A y NB4 y su actividad fue determinada mediante ensayos de basados en la fluorescencia generada tras la escisión de un sustrato específico para ADAM17. Nuestros resultados indican que ADAM17 se expresa en condiciones basales en las líneas de LMA y esta no se modifica tras el tratamiento con DAC. Por el contrario, si se observó un descenso significativo de la actividad proteolítica de ADAM17 en ambas líneas celulares cuando estas eran tratadas previamente con el agente hipometilante DAC. En definitiva, la disminución en la liberación de los ligandos de NKG2D podría ser consecuencia de la inhibición de la actividad enzimática de ADAM17 inducida por los agentes desmetilantes. Aunque nuestros datos parecen indicar que el efecto de los desmetilantes no es directamente sobre la expresión de ADAM17 sino a través de intermediarios implicados en regular su actividad proteolítica.

Con el objetivo de demostrar esta hipótesis, se analizó la implicación de los tratamientos desmetilantes en la regulación del inhibidor TIMP3. TIMP3 es un inhibidor natural de ADAM17 que es capaz de inhibir el crecimiento celular, la invasión y el desarrollo de metástasis por lo que se considera un gen supresor tumoral. Inhibidores farmacológicos de ADAM17, como GW280264X, han sido propuestos como tratamiento antitumoral ya que bloquean la liberación de los NKG2DL en líneas celulares tumorales. Sin embargo, estos tratamientos son de amplio espectro lo que dificulta su uso en la

práctica clínica de ahí que se estén buscando inhibidores más específicos de las MP, como por ejemplo TIMP3. Diversos estudios han puesto de manifiesto que el gen *TIMP3* se encuentra aberrantemente metilado en algunos tumores sólidos (melanoma, hepatocarcinoma, cáncer de tiroides, de cabeza y cuello, cervical, de pulmón o gástrico) asociado a una mayor angiogénesis e invasión celular y a una peor supervivencia (Anania y col., 2011; Yu y col., 2014; Siegel y col., 2015; Das y col., 2016; Kong y col., 2016; Das y col., 2016; Shen y col., 2016; Zhang y col., 2016). Un estudio realizado en líneas celulares de LMA muestra que la hipometilación y sobreexpresión de TIMP3 es un hecho asociado a la translocación del gen *MLL*, que ocurre en el 5% de los casos de LMA, y que se correlaciona con un mal pronóstico de la enfermedad (Röhrs y col., 2009).

Nuestros resultados mostraron que TIMP3 no se expresa o lo hace a muy bajos niveles en las líneas celulares KG1A y NB4 pero se induce claramente tras el tratamiento con DAC tanto a nivel transcripcional como de proteína y de forma dependiente de la dosis. De manera que la expresión de TIMP3 en las células de LMA podría estar directamente regulada por la metilación del ADN. Para verificar esto, se analizó el patrón de metilación de *TIMP3* tanto en líneas celulares de LMA como en muestras de ADN procedentes de medula ósea de pacientes diagnosticados de LMA, mediante técnicas de pirosecuenciación. Nuestros datos mostraron que este gen se encuentra hipermetilado (> 90% metilación) en las líneas celulares de LMA y el tratamiento con DAC induce su desmetilación de forma dependiente de la dosis. Además, el 25.5% de los pacientes analizados (n=90) con LMA muestran una metilación aberrante para *TIMP3*. Por lo tanto, estos resultados indican que quizá la metilación de TIMP3 podría ser el motivo de la liberación de los NKG2DL en la LMA.

Para corroborar la implicación de TIMP3 en la liberación de los ligandos solubles en LMA, se analizaron los niveles de los NKG2DL solubles en células de LMA silenciadas para TIMP3 antes y después del tratamiento con DAC. Como cabría esperar, los niveles solubles de MICA, MICB y ULBP2 son disminuidos tras el silenciamiento de TIMP3 pero estos se recuperan cuando las células son previamente tratadas con el agente desmetilante DAC. De manera que podemos concluir que la desmetilación de TIMP3 por agentes desmetilantes es la responsable del bloqueo de la liberación de MICA, MICB y

ULBP2 en la LMA. Sin embargo, no se observaron cambios en los niveles solubles de ULBP1 y ULBP3 sugiriendo que otros mecanismos alternativos de regulación de ADAM17, podrían estar regulando la liberación de estos ligandos. Uno de estos mecanismos implicados podría ser la regulación por microRNAs, como el miR-145, que regula negativamente la actividad de ADAM17 en carcinoma renal y hepatocelular y que ha sido encontrado aberrantemente metilado en cáncer (Doberstein y col., 2013; Liu y col., 2014). Además, proteínas como la aminopeptidasa CD13 y la glicoproteína RECK, cuya expresión es regulada por metilación, también inhiben ADAM17 mediante internalización o interacción física directa (Bouchet y col., 2014; Hong y col., 2014). Estos mecanismos regulados por la metilación del ADN deberán ser explorados en detalle para determinar su implicación adicional en la regulación de los NKG2DL en la LMA.

La citogenética ha demostrado ser una herramienta muy eficaz para establecer el pronóstico de los pacientes con LMA. Las mutaciones más características de la LMA utilizadas en la práctica clínica para establecer el pronóstico citogenético son FLT3, NPM1 y CEBPA. La presencia de mutaciones en el gen *FLT3*, en forma de duplicaciones en tándem (*FLT3-ITD*), está asociada con un peor pronóstico de la LMA (Sheikhha y col., 2003). Estos datos están en concordancia con nuestros resultados ya que hemos observado que aquellos pacientes que presentan la mutación FLT3-ITD presentan una mayor frecuencia de metilación de *TIMP3* (75%) en comparación con los pacientes que presentan la mutación *FLT3-D835* (12.5%). El análisis citogenético de nuestra cohorte de pacientes revela que la metilación aberrante de *TIMP3* se asocia con deleciones en *TP53* y con la trisomía del cromosoma 11. *TP53* es un gen supresor tumoral encargado de la parada del ciclo celular para inducir los mecanismos de respuesta al daño en el ADN o para provocar la apoptosis de la célula diana. Por lo tanto, las deleciones en *TP53* causan la inactivación del gen promoviendo el desarrollo del tumor (Seifert y col., 2009). La trisomía 11 es la segunda trisomía más frecuente en pacientes con LMA y está asociada con un pronóstico adverso de la enfermedad puesto que se relaciona con diversas mutaciones asociadas a la progresión de la enfermedad (*MLL-PTD*, *DNMT3A*, *U2AF1*, *FLT3-ITD* y *IDH2*) (Eisfeld y col., 2016). Los continuos avances en el campo de la genética y la epigenética revelan nuevas mutaciones y aberraciones cromosómicas que pueden ser utilizadas para estratificar a los pacientes en base a su pronóstico (favorable, intermedio

o adverso) (Yohe S., 2015). En nuestro estudio, hemos observado que los pacientes que tienen niveles elevados de metilación para *TIMP3* muestran un peor pronóstico citogenético que aquellos en los que este gen se encuentra desmetilado. En definitiva, y a falta de estudios más amplios, podemos proponer que la metilación de *TIMP3* podría ser considerada como un marcador adicional en el pronóstico de la enfermedad.

En conclusión, los resultados derivados de nuestro trabajo proponen que el tratamiento con agentes desmetilantes en la LMA facilita el reconocimiento inmune mediado por la interacción NKG2D-NKG2DL a través del bloqueo de la liberación de los NKG2DL. Este efecto es mediado por la desmetilación de *TIMP3* que inhibe la actividad de ADAM17 disminuyendo la liberación de MICA, MICB y ULBP2 en los blastos mieloides (**Figura 11**).

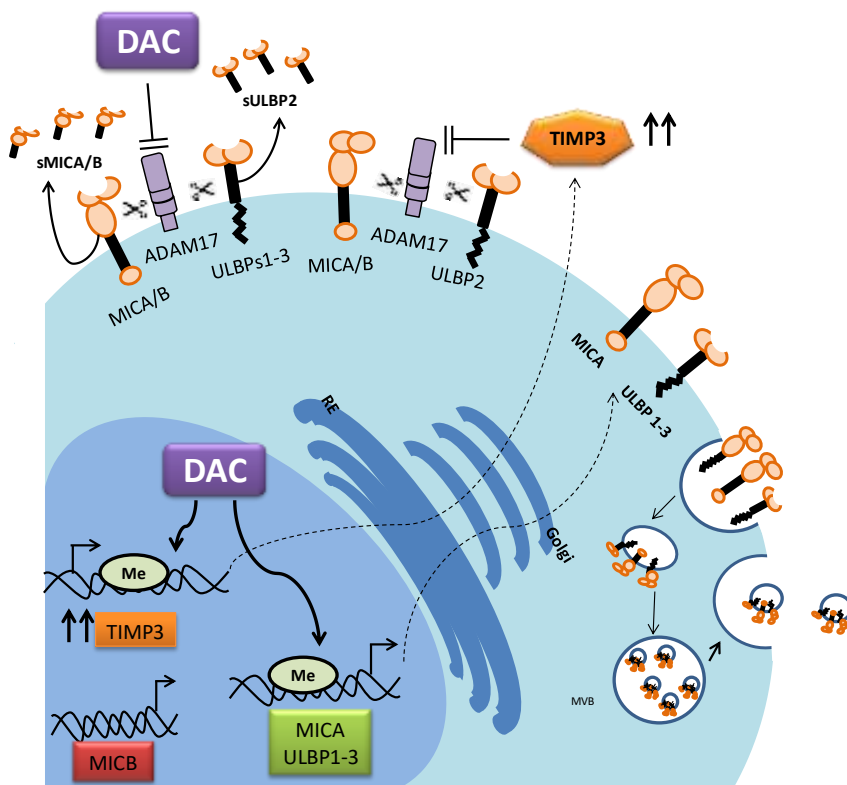


Figura 9. Efecto de los agentes hipometilantes sobre la regulación de los sNKG2DL en la LMA. Los agentes desmetilantes afectan tanto a la expresión como a la liberación de los NKG2DL. Por un lado, producen la desmetilación de la región promotora de los NKG2DL (*MICA*, *ULBP1*, *ULBP2*, *ULBP3*) favoreciendo su expresión en la superficie celular. Por otro lado, se produce la desmetilación de *TIMP3* lo que provoca la inhibición de ADAM17, impidiendo la liberación de MICA, MICB y ULBP2 y por lo tanto, favoreciendo su expresión en la superficie celular.

VI. CONCLUSIONES

1. Los ligandos de NKG2D (MICA, MICB y ULBPs 1-3) se expresan de forma heterogénea en líneas celulares procedentes de tumores sólidos y hematológicos. Mientras que en los tumores sólidos es frecuente la expresión conjunta de dos o más ligandos, un único ligando es expresado en el 25% de las líneas de tumores hematológicos.
2. La hipermetilación de los ligandos de NKG2D, excepto de *MICB*, está asociada con la ausencia de transcripción en líneas celulares de LMA. En tumores sólidos, los ligandos de NKG2D están mayoritariamente desmetilados sugiriendo que la metilación aberrante de estos ligandos es un hecho característico de la LMA.
3. Asimismo, el nivel de metilación de *MICA*, *ULBP1* y *ULBP2* está significativamente incrementado en pacientes con LMA respecto a controles sanos mientras que en tumores de colon todos los ligandos de NKG2D están desmetilados.
4. El tratamiento con agentes desmetilantes, 5-azacitidina y 5-aza-2'-deoxicitidina, restaura la expresión de los ligandos MICA y ULBPs 1-3 en la superficie de células leucémicas confirmando el papel esencial de la metilación del ADN en la regulación de los ligandos en esta patología.
5. Este incremento en la expresión de los ligandos de NKG2D en la superficie celular se asocia a un mayor reconocimiento y eliminación de las células leucémicas por células citotóxicas NKG2D positivas (células NK y linfocitos T CD8+), revirtiendo así la evasión inmune.
6. El tratamiento con drogas desmetilantes, como Vidaza®, reduce significativamente la liberación de los NKG2DL solubles en líneas celulares y en el suero de pacientes con LMA, facilitando su expresión en la superficie celular y promoviendo el reconocimiento inmune.

7. La metaloproteasa ADAM17 controla la liberación proteolítica de los ligandos de NKG2D en células de LMA.
8. El gen *TIMP3*, inhibidor de ADAM17, está aberrantemente metilado en líneas celulares de LMA y en el 25.5% de los pacientes con LMA. Por lo tanto, la hipermetilación de *TIMP3* puede contribuir a los altos niveles de MICA, MICB y ULBP2 solubles detectados en los pacientes con LMA.
9. Altos niveles de metilación en *TIMP3* se asocian con un pronóstico citogenético adverso, definido por la mutación FLT3-ITD, la trisomía del cromosoma 11 y deleciones en *TP53*, sugiriendo el nivel de metilación de *TIMP3* como un potencial biomarcador de la enfermedad.

Los trabajos realizados en esta tesis han permitido demostrar que la hipermetilación del ADN juega un papel fundamental en la evasión inmune de las células de LMA a través de la metilación de los ligandos de NKG2D y de *TIMP3*, el cual favorece la liberación de MICA, MICB y ULBP2 en su forma soluble. El tratamiento con fármacos desmetilantes abre nuevas estrategias terapéuticas para potenciar el reconocimiento inmune de la LMA.

VI. BIBLIOGRAFÍA

A

- Acebes-Huerta A**, Lorenzo-Herrero S, Folgueras AR, Huergo-Zapico L, Lopez-Larrea C, López-Soto A, Gonzalez S. Drug-induced hyperploidy stimulates an antitumor NK cell response mediated by NKG2D and DNAM-1 receptors. *Oncoimmunology*. 2015; 5(2):e1074378.
- Achille NJ**, Othus M, Phelan K, Zhang S, Cooper K, Godwin JE, Appelbaum FR, Radich JP, Erba HP, Nand S, Zeleznik-Le NJ. Association between early promoter-specific DNA methylation changes and outcome in older acute myeloid leukemia patients. *Leuk Res*. 2016; 42:68-74.
- Agüera-González S**, Gross CC, Fernández-Messina L, Ashiru O, Estes G, Hang HC, Reyburn HT, Long EO, Valés-Gómez M. Palmitoylation of MICA, a ligand for NKG2D, mediates its recruitment to membrane microdomains and promotes its shedding. *Eur J Immunol*. 2011; 41(12):3667-3676.
- Allfrey VG**, Faulkner R, Mirsky AE. Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1964; 51:786-794.
- Alonso-Arias R**, Lopez-Vazquez A, Diaz-Pena R, Sampere A, Tricas L, Asensi V, Rodrigo L, Lopez-Larrea C. CD8dim and NKG2D expression defines related subsets of CD4+ T cells in HIV-infected patients with worse prognostic factors. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2009; 51(4):390-398.
- Alonso-Arias R**, Moro-García MA, López-Vázquez A, Rodrigo L, Baltar J, García FM, Jaurrieta JJ, López-Larrea C. NKG2D expression in CD4+ T lymphocytes as a marker of senescence in the aged immune system. *Age (Dordr)*. 2011; 33(4):591-605.
- Anania MC**, Sensi M, Radaelli E, Miranda C, Vizioli MG, Pagliardini S, Favini E, Cleris L, Supino R, Formelli F, Borrello MG, Pierotti MA, Greco A. TIMP3 regulates migration, invasion and in vivo tumorigenicity of thyroid tumor cells. *Oncogene*. 2011; 30(27):3011-3023.
- Arber DA**, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127(20):2391-2405.
- Armeanu S**, Bitzer M, Lauer UM, Venturelli S, Pathil A, Krusch M, Kaiser S, Jobst J, Smirnow I, Wagner A, Steinle A, Salih HR. Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate. *Cancer Res*. 2005; 65(14):6321-6329.
- Arreygue-Garcia NA**, Daneri-Navarro A, del Toro-Arreola A, Cid-Arregui A, Gonzalez-Ramella O, Jave-Suarez LF, Aguilar-Lemarroy A, Troyo-Sanroman R, Bravo-Cuellar A, Delgado-Rizo V, Garcia-Iglesias T, Hernandez-Flores G, Del Toro-Arreola S. Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer*. 2008; 8:16.
- Arriga R**, Caratelli S, Coppola A, Spagnoli GC, Venditti A, Amadori S, Lanzilli G, Lauro D, Palomba P, Sconocchia T, Del Principe MI, Maurillo L, Buccisano F, Capuani B, Ferrone S, Sconocchia G. Enhancement of anti-leukemia activity of NK cells in vitro and in vivo by inhibition of leukemia cell-induced NK cell damage. *Oncotarget*. 2016; 7(2):2070-2079.
- Ashiru O**, Boutet P, Fernández-Messina L, Agüera-González S, Skepper JN, Valés-Gómez M, Reyburn HT. 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; 70(2):481-489.
- Ashiru O**, Lopez-Cobo S, Fernandez-Messina L, Pontes-Quero S, Pandolfi R, Reyburn HT, Valés-Gómez M. A GPI anchor explains the unique biological features of the common NKG2D-ligand allele MICA*008. *Biochem J*. 2013; 454(2):295-302.

Azmi AS, Bao B, Sarkar FH. Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer Metastasis Rev.* 2013; 32(3-4):623-642.

B

Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci.* 2002; 115(Pt 19):3719-3727.

Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* 2011; 21(3):381-395.

Baragaño Raneros A, Suarez-Álvarez B, López-Larrea C. Secretory pathways generating immunosuppressive NKG2D ligands: New targets for therapeutic intervention. *Oncoimmunology.* 2014; 3:e28497.

Barragán E, Montesinos P, Camos M, González M, Calasanz MJ, Román-Gómez J, Gómez-Casares MT, Ayala R, López J, Fuster Ó, Colomer D, Chillón C, Larrayoz MJ, Sánchez-Godoy P, González-Campos J, Manso F, Amador ML, Vellenga E, Lowenberg B, Sanz MA; PETHEMA; HOVON Groups. Prognostic value of FLT3 mutations in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and anthracycline monochemotherapy. *Haematologica.* 2011; 96(10):1470-1477.

Barrett AJ, Le Blanc K. Immunotherapy prospects for acute myeloid leukaemia. *Clin Exp Immunol.* 2010; 161(2):223-232.

Barsoum IB, Hamilton TK, Li X, Cotechini T, Miles EA, Siemens DR, Graham CH. Hypoxia induces escape from innate immunity in cancer cells via increased expression of ADAM10: role of nitric oxide. *Cancer Res.* 2011; 71(24):7433-7441.

Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL, Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science.* 1999; 285(5428):727-729.

Baylin SB, Fearon ER, Vogelstein B, de Bustros A, Sharkis SJ, Burke PJ, Staal SP, Nelkin BD. Hypermethylation of the 5' region of the calcitonin gene is a property of human lymphoid and acute myeloid malignancies. *Blood.* 1987; 70(2):412-417.

Bedel R, Thiery-Vuillemin A, Grandclement C, Balland J, Remy-Martin JP, Kantelip B, Pallandre JR, Pivot X, Ferrand C, Tiberghien P, Borg C. Novel role for STAT3 in transcriptional regulation of NK immune cell targeting receptor MICA on cancer cells. *Cancer Res.* 2011; 71(5):1615-1626.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976; 33(4):451-458.

Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev.* 2009; 23(7):781-783.

Berghuis D, Schilham MW, Vos HI, Santos SJ, Kloess S, Buddingh' EP, Egeler RM, Hogendoorn PC, Lankester AC. Histone deacetylase inhibitors enhance expression of NKG2D ligands in Ewing sarcoma and sensitize for natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Clin Sarcoma Res.* 2012; 2(1):8.

Blum W, Garzon R, Klisovic RB, Schwind S, Walker A, Geyer S, Liu S, Havelange V, Becker H, Schaaf L, Mickle J, Devine H, Kefauver C, Devine SM, Chan KK, Heerema NA, Bloomfield CD, Grever MR, Byrd JC, Villalona-Calero M, Croce CM, Marcucci G. Clinical response and miR-29b predictive significance in older AML patients treated with a 10-day schedule of decitabine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(16):7473-7478.

- Borchers MT**, Harris NL, Wesselkamper SC, Vitucci M, Cosman D. NKG2D ligands are expressed on stressed human airway epithelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006; 291(2):L222–231.
- Bormann F**, Sers C, Seliger B, Handke D, Bergmann T, Seibt S, Lehrach H, Dahl A. Methylation-specific ligation detection reaction (msLDR): a new approach for multiplex evaluation of methylation patterns. *Mol Genet Genomics*. 2011; 286(3-4):279-291.
- Bouchet S**, Tang R, Fava F, Legrand O, Bauvois B. Targeting CD13 (aminopeptidase-N) in turn downregulates ADAM17 by internalization in acute myeloid leukaemia cells. *Oncotarget*. 2014; 5(18):8211-8222.
- Bourboulia D**, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Semin Cancer Biol*. 2010; 20(3):161-168.
- Boutet P**, Agüera-González S, Atkinson S, Pennington CJ, Edwards DR, Murphy G, Reyburn HT, Valés-Gómez M. Cutting edge: the metalloproteinase ADAM17/TNF-alpha-converting enzyme regulates proteolytic shedding of the MHC class I-related chain B protein. *J Immunol*. 2009; 182(1):49–53.
- Brandt CS**, Baratin M, Yi EC, Kennedy J, Gao Z, Fox B, Haldeman B, Ostrander CD, Kaifu T, Chabannon C, Moretta A, West R, Xu W, Vivier E, Levin SD. The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans. *J Exp Med*. 2009; 206(7): 1495-1503.
- Brew K**, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1803(1):55-71.
- Bullinger L**, Ehrich M, Döhner K, Schlenk RF, Döhner H, Nelson MR, van den Boom D. Quantitative DNA methylation predicts survival in adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010; 115(3):636-642.
- Burnet FM**. Immunological surveillance in neoplasia. *Transplant Rev* 1971; 7:3–25.
- Busque L**, Patel JP, Figueroa ME, Vasanthakumar A, Provost S, Hamilou Z, Mollica L, Li J, Viale A, Heguy A, Hassimi M, Succi N, Bhatt PK, Gonen M, Mason CE, Melnick A, Godley LA, Brennan CW, Abdel-Wahab O, Levine RL. Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis. *Nat Genet*. 2012; 44(11):1179-1181.

C

- Caligiuri MA**. Human natural killer cells. *Blood*. 2008; 112(3):461-469.
- Calvanese V**, Fernández AF, Urduñuigo RG, Suárez-Alvarez B, Mangas C, Pérez-García V, Bueno C, Montes R, Ramos-Mejía V, Martínez-Cambor P, Ferrero C, Assenov Y, Bock C, Menendez P, Carrera AC, Lopez-Larrea C, Fraga MF. A promoter DNA demethylation landscape of human hematopoietic differentiation. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(1):116-131.
- Camodeca C**, Nuti E, Tepshi L, Boero S, Tuccinardi T, Stura EA, Poggi A, Zocchi MR, Rossello A. Discovery of a new selective inhibitor of A Disintegrin And Metalloprotease 10 (ADAM-10) able to reduce the shedding of NKG2D ligands in Hodgkin's lymphoma cell models. *Eur J Med Chem*. 2016; 111:193-201.
- Cancer Genome Atlas Research Network**, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, Robertson A, Hoadley K, Triche TJ Jr, Laird PW, Baty JD, Fulton LL, Fulton R, Heath SE, Kalicki-Veizer J, Kandoth C, Klco JM, Koboldt DC, Kanchi KL, Kulkarni S, Lamprecht TL, Larson DE, Lin L, Lu C, McLellan MD, McMichael JF, Payton J, Schmidt H, Spencer DH, Tomasson MH, Wallis JW, Wartman LD, Watson MA, Welch J, Wendl MC, Ally A, Balasundaram M, Birol I, Butterfield Y, Chiu R, Chu A, Chuah E, Chun HJ, Corbett R, Dhalla N, Guin R, He A, Hirst C, Hirst M, Holt RA, Jones S, Karsan A, Lee D, Li HI, Marra MA, Mayo M, Moore RA, Mungall K, Parker J, Pleasance E, Plettner P, Schein J, Stoll D, Swanson L, Tam A, Thiessen N, Varhol R, Wye N, Zhao Y, Gabriel S, Getz G, Sougnez C, Zou L, Leiserson MD, Vandin F,

- Wu HT, Applebaum F, Baylin SB, Akbani R, Broom BM, Chen K, Motter TC, Nguyen K, Weinstein JN, Zhang N, Ferguson ML, Adams C, Black A, Bowen J, Gastier-Foster J, Grossman T, Lichtenberg T, Wise L, Davidsen T, Demchok JA, Shaw KR, Sheth M, Sofia HJ, Yang L, Downing JR, Eley G. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013; 368(22):2059-2074.
- Cao W**, Xi X, Hao Z, Li W, Kong Y, Cui L, Ma C, Ba D, He W. RAET1E2, a soluble isoform of the UL16-binding protein RAET1E produced by tumor cells, inhibits NKG2D-mediated NK cytotoxicity. *J Biol Chem*. 2007; 282(26):18922-18928.
- Cashen AF**, Schiller GJ, O'Donnell, DiPersio JF. Multicenter, phase II study of decitabine for the first-line treatment of older patients with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010; 28(4):556-561.
- Carboni C**, Zingoni A, Cippitelli M, Piccoli M, Frati L, Santoni A. Antigenactivated human T lymphocytes express cell-surface NKG2D ligands via an ATM/ATR-dependent mechanism and become susceptible to autologous NK cell lysis. *Blood*. 2007; 110(2):606-615.
- Chamuleau ME**, van de Loosdrecht AA, Hess CJ, Janssen JJ, Zevenbergen A, Delwel R, Valk PJ, Lowenberg B, Ossenkoppele GJ. High INDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) mRNA level in blasts of acute myeloid leukemia patients predicts poor clinical outcome. *Haematologica*. 2008; 93(12):1894-1898.
- Chang C**, Dietrich J, Harpur AG, Lindquist JA, Haude A, Loke YW, King A, Colonna M, Trowsdale J, Wilson MJ. Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties. *J Immunol*. 1999; 163(9):4651-4654.
- Chávez-Blanco A**, De la Cruz-Hernández E, Domínguez GI, Rodríguez-Cortez O, Alatorre B, Pérez-Cárdenas E, Chacón-Salinas R, Trejo-Becerril C, Taja-Chayeb L, Trujillo JE, Contreras-Paredes A, Dueñas-González A. Upregulation of NKG2D ligands and enhanced natural killer cell cytotoxicity by hydralazine and valproate. *Int J Oncol*. 2011; 39(6):1491-1499.
- Chen J**, Zhu XX, Xu H, Fang HZ, Zhao JQ. Expression and prognostic significance of unique ULBPs in pancreatic cancer. *Oncotargets Ther*. 2016; 9:5271-5279.
- Chen Y**, Lin G, Guo ZQ, Zhou ZF, He ZY, Ye YB. Effects of MICA expression on the prognosis of advanced non-small cell lung cancer and the efficacy of CIK therapy. *PLoS One*. 2013; 8(7):e69044.
- Chitadze G**, Lettau M, Bhat J, Wesch D, Steinle A, Fürst D, Mytilineos J, Kalthoff H, Janssen O, Oberg HH, Kabelitz D. Shedding of endogenous MHC class I-related chain molecules A and B from different human tumor entities: heterogeneous involvement of the "a disintegrin and metalloproteases" 10 and 17. *Int J Cancer*. 2013; 133(7):1557-1566.
- Cho H**, Chung JY, Kim S, Braunschweig T, Kang TH, Kim J, Chung EJ, Hewitt SM, Kim JH. MICA/B and ULBP1 NKG2D ligands are independent predictors of good prognosis in cervical cancer. *BMC Cancer*. 2014; 14:957.
- Chung HW**, Lim JB. Clinical significance of serum levels of immune-associated molecules, uric acid and soluble MHC class I chain-related molecules A and B, as diagnostic tumor markers for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Sci*. 2011; 102(9):1673-1679.
- Clayton A**, Mitchell JP, Court J, Linnane S, Mason MD, Tabi Z. Human tumor-derived exosomes down-modulate NKG2D expression. *J Immunol*. 2008; 180(11):7249-7258.
- Coca S**, Perez-Piqueras J, Martinez D, Colmenarejo A, Saez MA, Vallejo C, Martos JA, Moreno M. The prognostic significance of intratumoral natural killer cells in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 1997; 79(12):2320-2328.

- Corm S**, Berthon C, Imbenotte M, Biggio V, Lhermitte M, Dupont C, Briche I, Quesnel B. Indoleamine 2,3-dioxygenase activity of acute myeloid leukemia cells can be measured from patients' sera by HPLC and is inducible by IFN-gamma. *Leuk Res* 2009; 33(3):490–494.
- Cosman D**, Müllberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W, Kubin M, Chalupny NJ. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*. 2001; 14(2):23–33.
- Costello RT**, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Reviron D, Gastaut JA, Pende D, Olive D, Moretta A. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002; 99(10): 3661-3667.

D

- Dambrauskas Z**, Svensson H, Joshi M, Hyltander A, Naredi P, Iresjö BM. Expression of major histocompatibility complex class I-related chain A/B (MICA/B) in pancreatic carcinoma. *Int J Oncol*. 2014; 44(1):99-104.
- Das AM**, Koljenović S, Oude Ophuis CM, van der Klok T, Galjart B, Nigg AL, van Cappellen WA, Noordhoek Hegt V, Dinjens WN, Atmodimedjo PN, Vermeulen CE, Verhoef C, Eggermont AM, ten Hagen TL. Association of TIMP3 expression with vessel density, macrophage infiltration and prognosis in human malignant melanoma. *Eur J Cancer*. 2016; 53:135-143.
- De Kouchkovsky I**, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood Cancer J*. 2016; 6(7):e441.
- De Kruijf EM**, Sajet A, van Nes JG, Putter H, Smit VT, Eagle RA, Jafferji I, Trowsdale J, Liefers GJ, van de Velde CJ, Kuppen PJ. NKG2D ligand tumor expression and association with clinical outcome in early breast cancer patients: an observational study. *BMC Cancer*. 2012; 12:24
- Diermayr S**, Himmelreich H, Durovic B, Mathys-Schneeberger A, Siegler U, Langenkamp U, Hofsteenge J, Gratwohl A, Tichelli A, Paluszewska M, Wiktor-Jedrzejczak W, Kalberer CP, Wodnar-Filipowicz A. NKG2D ligand expression in AML increases in response to HDAC inhibitor valproic acid and contributes to allorecognition by NK-cell lines with single KIR-HLA class I specificities. *Blood*. 2008; 111(3):1428-36
- Diesch J**, Zwick A, Garz AK, Palau A, Buschbeck M, Götze KS. A clinical-molecular update on azanucleoside-based therapy for the treatment of hematologic cancers. *Clin Epigenetics*. 2016; 8:71.
- Ding L**, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, Ritchey JK, Young MA, Lamprecht T, McLellan MD, McMichael JF, Wallis JW, Lu C, Shen D, Harris CC, Dooling DJ, Fulton RS, Fulton LL, Chen K, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, Magrini VJ, Cook L, McGrath SD, Vickery TL, Wendl MC, Heath S, Watson MA, Link DC, Tomasson MH, Shannon WD, Payton JE, Kulkarni S, Westervelt P, Walter MJ, Graubert TA, Mardis ER, Wilson RK, DiPersio JF. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012; 481(7382): 506-510.
- Doberstein K**, Steinmeyer N, Hartmetz AK, Eberhardt W, Mittelbronn M, Harter PN, Juengel E, Blaheta R, Pfeilschifter J, Gutwein P. MicroRNA-145 targets the metalloprotease ADAM17 and is suppressed in renal cell carcinoma patients. *Neoplasia*. 2013; 15(2):218-230.
- Doble BW**, Woodgett JR. GSK-3: tricks of the trade for a multi-tasking kinase. *J Cell Sci*. 2003; 116(Pt 7):1175-1186.
- Döhner H**, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, Tallman MS, Löwenberg B, Bloomfield CD; European LeukemiaNet. Diagnosis and management of acute myeloid

leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010; 115(3):453-474.

Domaica CI, Fuertes MB, Rossi LE, Girart MV, Avila DE, Rabinovich GA, Zwirner NW. Tumour-experienced T cells promote NK cell activity through trogocytosis of NKG2D and NKp46 ligands. *EMBO Rep*. 2009; 10(8):908-915.

Dombret H, Seymour JF, Butrym A, Wierzbowska A, Selleslag D, Jang JH, Kumar R, Cavenagh J, Schuh AC, Candoni A, Récher C, Sandhu I, Bernal del Castillo T, Al-Ali HK, Martinelli G, Falantes J, Noppeney R, Stone RM, Minden MD, McIntyre H, Songer S, Lucy LM, Beach CL, Döhner H. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood*. 2015; 126(3):291-299.

Duan X, Deng L, Chen X, Lu Y, Zhang Q, Zhang K, Hu Y, Zeng J, Sun W. Clinical significance of the immunostimulatory MHC class I chain-related molecule A and NKG2D receptor on NK cells in pancreatic cancer. *Med Oncol*. 2011; 28(2):466-474.

Duan X, Mao X, Sun W. ADAM15 is involved in MICB shedding and mediates the effects of gemcitabine on MICB shedding in PANC-1 pancreatic cancer cells. *Mol Med Rep*. 2013; 7(3):991-997.

Duffy MJ, Mullooly M, O'Donovan N, Sukor S, Crown J, Pierce A, McGowan PM. The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer?. *Clin Proteomics*. 2011; 8(1):9.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004; 21(2):137-148.

E

Eagle RA, Flack G, Warford A, Martínez-Borra J, Jafferji I, Traherne JA, Ohashi M, Boyle LH, Barrow AD, Caillat-Zucman S, Young NT, Trowsdale J. Cellular expression, trafficking, and function of two isoforms of human ULBP5/RAET1G. *PLoS One*. 2009; 4(2):e4503.

Eagle RA, Traherne JA, Hair JR, Jafferji I, Trowsdale J. ULBP6/RAET1L is an additional human NKG2D ligand. *Eur J Immunol*. 2009; 39(11):3207-3216.

Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*. 2002; 21(35):5400-5413.

Ehrlich P. Ueber den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk* 1909; 5:73–290.

Eisele G, Wischhusen J, Mittelbronn M, Meyermann R, Waldhauer I, Steinle A, Weller M, Friese MA. TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells. *Brain*. 2006; 129 (Pt 9):2416-2425.

Eisfeld AK, Kohlschmidt J, Mrózek K, Blachly JS, Nicolet D, Kroll K, Orwick S, Carroll AJ, Stone RM, de la Chapelle A, Byrd JC, Bloomfield CD. Adult acute myeloid leukemia with trisomy 11 as the sole abnormality is characterized by the presence of five distinct gene mutations: MLL-PTD, DNMT3A, U2AF1, FLT3-ITD and IDH2. *Leukemia*. 2016; 30(11):2254-2258.

Elsner L, Flügge PF, Lozano J, Muppala V, Eiz-Vesper B, Demiroglu SY, Malzahn D, Herrmann T, Brunner E, Bickeböller H, Multhoff G, Walter L, Dressel R. The endogenous danger signals HSP70 and MICA cooperate in the activation of cytotoxic effector functions of NK cells. *J Cell Mol Med*. 2010; 14(4):992-1002.

Espinoza JL, Takami A, Yoshioka K, Nakata K, Sato T, Kasahara Y, Nakao S. Human microRNA-1245 down-regulates the NKG2D receptor in natural killer cells and impairs NKG2D-mediated functions. *Haematologica*. 2012; 97(9):1295-1303.

- Esteller M.** CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*. 2002; 21(35):542740.
- Esteller M.** Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet*. 2007; 8(4):286-298.
- Esteller M.** Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet*. 2007; 1:R50-9.
- Esteller M.** Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*. 2008; 358(11):1148-1159.
- Estey E, Döhner H.** Acute myeloid leukemia. *Lancet*. 2006; 368(9550): 1894–1907.

F

- Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, La Starza R, Diverio D, Colombo E, Santucci A, Bigerna B, Pacini R, Pucciarini A, Liso A, Vignetti M, Fazi P, Meani N, Pettirossi V, Saglio G, Mandelli F, Lo-Coco F, Pelicci PG, Martelli MF; GIMEMA Acute Leukemia Working Party.** Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005; 352(3):254-266.
- Falini B, Martelli MP, Bolli N, Sportoletti P, Liso A, Tiacci E, Haferlach T.** Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity?. *Blood*. 2011; 117(4):1109-1120.
- Fang L, Gong J, Wang Y, Liu R, Li Z, Wang Z, Zhang Y, Zhang C, Song C, Yang A, Ting JP, Jin B, Chen L.** MICA/B expression is inhibited by unfolded protein response and associated with poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*. 2014; 33:76.
- Farag SS, Fehniger TA, Ruggeri L, Velardi A, Caligiuri MA.** Natural killer cell receptors: new biology and insights into the graft-versus-leukemia effect. *Blood*. 2002; 100(6):1935-1947.
- Fenaux P, Mufti GJ, Hellström-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, Sanz G, List AF, Gore S, Seymour JF, Dombret H, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach CL, Silverman LR.** Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010; 28(4):562-569.
- Fernández AF, Bayón GF, Urduñigo RG, Toraño EG, García MG, Carella A, Petrus-Reurer S, Ferrero C, Martínez-Cambor P, Cubillo I, García-Castro J, Delgado-Calle J, Pérez-Campo FM, Riancho JA, Bueno C, Menéndez P, Mentink A, Mareschi K, Claire F, Fagnani C, Medda E, Toccaceli V, Brescianini S, Moran S, Esteller M, Stolzing A, de Boer J, Nisticò L, Stazi MA, Fraga MF.** Genome H3K4me1 marks DNA regions hypomethylated during aging in human stem and differentiated cells. *Res*. 2015; 25(1):27-40.
- Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM, Racevskis J, Dewald GW, Ketterling RP, Bennett JM, Rowe JM, Lazarus HM, Tallman MS.** Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2009; 361(26): 1249–1259.
- Fernández-Messina L, Ashiru O, Boutet P, Agüera-González S, Skepper JN, Reyburn HT, Valés-Gómez M.** Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *J Biol Chem*. 2010; 285(12):8543-8551.
- Fernández-Messina L, Ashiru O, Agüera-González S, Reyburn HT, Valés-Gómez M.** The human NKG2D ligand ULBP2 can be expressed at the cell surface with or without a GPI anchor and both forms can activate NK cells. *J Cell Sci*. 2011; 124 (Pt 3):321-327.
- Fernández-Messina L, Reyburn HT, Valés-Gómez M.** A short half-life of ULBP1 at the cell surface due to internalization and proteosomal degradation. *Immunol Cell Biol*. 2016; 94(5):479-485.

Fernández-Sánchez A, Baragaño Raneros A, Carvajal Palao R, Sanz AB, Ortiz A, Ortega F, Suárez-Álvarez B, López-Larrea C. DNA demethylation and histone H3K9 acetylation determine the active transcription of the NKG2D gene in human CD8+ T and NK cells. *Epigenetics.*; 8(1):66-78.

Figueroa ME, Lugthart S, Li Y, Erpelinck-Verschueren C, Deng X, Christos PJ, Schifano E, Booth J, van Putten W, Skrabanek L, Campagne F, Mazumdar M, Greally JM, Valk PJ, Lowenberg B, Delwel R, Melnick A. DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell.* 2010; 17(1):13–27.

Fraga MF, Esteller M. Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet.* 2007; 23(8):413-418.

Friedreich N. Ein never fall von leukämie. *Arch Pathol Anat.* 1857; 12: 37.

G

Gao XN, Lin J, Wang LL, Yu L. Demethylating treatment suppresses natural killer cell cytolytic activity. *Mol Immunol.* 2009; 46(10): 2064-2070.wal

Gasser S, Orsulic S, Brown EJ, Raulet DH. The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 2005; 436(7054):1186–1190.

Ghobadi A, Choi J, Fiala MA, Fletcher T, Liu J, Eissenberg LG, Abboud C, Cashen A, Vij R, Schroeder MA, Pusic I, Stockerl-Goldstein K, Jacoby M, Uy G, DiPersio J, Westervelt P. Phase I study of azacitidine following donor lymphocyte infusion for relapsed acute myeloid leukemia post allogeneic stem cell transplantation. *Leuk Res.* 2016; 49:1-6.

Glienke J, Sobanov Y, Brostjan C, Steffens C, Nguyen C, Lehrach H, Hofer E, Francis F. The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics.* 1998; 48(3):163-73.

González S, Groh V, Spies T. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006; 298:121-38.

González S, López-Soto A, Suarez-Alvarez B, López-Vázquez A, López-Larrea C. NKG2D ligands: key targets of the immune response. *Trends Immunol.* 2008; 29(8):397-403.

Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Huergo-Zapico L, Lopez-Soto A, Fernández-Guizán A, Acebes-Huerta A, Gonzalez-Huerta AJ, Gonzalez E, Fernandez-Alvarez C, Gonzalez S. Prognostic significance of CD8 and CD4 T cells in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma.* 2010; 51(10):1829-1836.

Grafone T, Palmisano M, Nicci C, Storti S. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncol Rev.* 2012; 6(1):e8.

Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol.* 2010; 28(16):2739-2747.

Griffiths EA, Gore SD. Epigenetic therapies in MDS and AML. *Adv Exp Med Biol.* 2013; 754:253-283.

Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M, Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; 93(22):12445-12450.

Groh V, Rhinehart R, Randolph-Habecker J, Topp MS, Riddell SR, Spies T. Costimulation of CD8 α T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat Immunol.* 2001; 2(3): 255–260.

Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002; 419(6908):734–738.

Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(16):9452-9457.

Guerra N, Tan YX, Joncker NT, Choy A, Gallardo F, Xiong N, Knoblaugh S, Cado D, Greenberg NM, Raulet DH. NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity*. 2008; 28(4):571-80.

H

Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM, Gartler SM. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(25):14412-14417.

Hedlund M, Stenqvist AC, Nagaeva O, Kjellberg L, Wulff M, Baranov V, Mincheva-Nilsson L. Human placenta expresses and secretes NKG2D ligands via exosomes that down-modulate the cognate receptor expression: evidence for immunosuppressive function. *J Immunol*. 2009; 183(1):340-351.

Hedlund M, Nagaeva O, Kargl D, Baranov V, Mincheva-Nilsson L. Thermal- and oxidative stress causes enhanced release of NKG2D ligand-bearing immunosuppressive exosomes in leukemia/lymphoma T and B cells. *PLoS One*. 2011; 6(2):e16899.

Hilpert J, Grosse-Hovest L, Grünebach F, Buechele C, Nuebling T, Raum T, Steinle A, Salih HR. Comprehensive analysis of NKG2D ligand expression and release in leukemia: implications for NKG2D-mediated NK cell responses. *J Immunol*. 2012; 189(3):1360-1371.

Hirayasu K, Arase H. Functional and genetic diversity of leukocyte immunoglobulin-like receptor and implication for disease associations. *J Hum Genet*. 2015; 60(11):703-708.

Hollenbach PW, Nguyen AN, Brady H, Williams M, Ning Y, Richard N, Krushel L, Aukerman SL, Heise C, MacBeth KJ. A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS One*. 2010; 5(2):e9001.

Hong KJ, Wu DC, Cheng KH, Chen LT, Hung WC. RECK inhibits stemness gene expression and tumorigenicity of gastric cancer cells by suppressing ADAM-mediated Notch1 activation. *J Cell Physiol*. 2014; 229(2):191-201.

Kornblith AB, Herndon JE 2nd, Silverman LR, Demakos EP, Odchimar-Reissig R, Holland JF, Powell BL, DeCastro C, Ellerton J, Larson RA, Schiffer CA, Holland JC. Impact of azacytidine on the quality of life of patients with myelodysplastic syndrome treated in a randomized phase III trial: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol*. 2002; 20(10):2441-2452.

Houchins JP, Yabe T, McSherry C, Bach FH. DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med*. 1991; 173(4):1017-1020.

Huang B, Sikorski R, Sampath P, Thorne SH. Modulation of NKG2D-ligand cell surface expression enhances immune cell therapy of cancer. *J Immunother*. 2011; 34(3):289-96.

Huergo-Zapico L, Gonzalez-Rodriguez AP, Contesti J, Gonzalez E, López-Soto A, Fernandez-Guizan A, Acebes-Huerta A, de Los Toyos JR, Lopez-Larrea C, Groh V, Spies T, Gonzalez S. Expression of ERp5 and GRP78 on the membrane of chronic lymphocytic leukemia cells: association with soluble MICA shedding. *Cancer Immunol Immunother*. 2012; 61(8):1201-1210.

I

- Im AP**, Sehgal AR, Carroll MP, Smith BD, Tefferi A, Johnson DE, Boyiadzis M. DNMT3A and IDH mutations in acute myeloid leukemia and other myeloid malignancies: associations with prognosis and potential treatment strategies. *Leukemia*. 2014; 28(9):1774-1783.
- Imai K**, Matsuyama S, Miyake S, Suga K, Nakachi K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *Lancet*. 2000; 356(9244):1795-1799.
- Ingram W**, Chan L, Guven H, Darling D, Kordasti S, Hardwick N, Barber L, Mufti GJ, Farzaneh F. Human CD80/IL2 lentivirus-transduced acute myeloid leukaemia (AML) cells promote natural killer (NK) cell activation and cytolytic activity: implications for a phase I clinical study. *Br J Haematol*. 2009; 145(6):749-760.
- Ishigami S**, Natsugoe S, Tokuda K, Nakajo A, Che X, Iwashige H, Aridome K, Hokita S, Aikou T. Prognostic value of intratumoral natural killer cells in gastric carcinoma. *Cancer*. 2000; 88(3):577-583.

J

- Jaiswal S**, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, Lindsley RC, Mermel CH, Burt N, Chavez A, Higgins JM, Moltchanov V, Kuo FC, Kluk MJ, Henderson B, Kinnunen L, Koistinen HA, Ladenvall C, Getz G, Correa A, Banahan BF, Gabriel S, Kathiresan S, Stringham HM, McCarthy MI, Boehnke M, Tuomilehto J, Haiman C, Groop L, Atzmon G, Wilson JG, Neuberg D, Altshuler D, Ebert BL. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. *N Engl J Med*. 2014; 371(26): 2488-2498.
- Javierre BM**, Esteller M, Ballestar E. Epigenetic connections between autoimmune disorders and haematological malignancies. *Trends Immunol*. 2008; 29(12):616-623.
- Ji H**, Ehrlich LI, Seita J, Murakami P, Doi A, Lindau P, Lee H, Aryee MJ, Irizarry RA, Kim K, Rossi DJ, Inlay MA, Serwold T, Karsunky H, Ho L, Daley GQ, Weissman IL, Feinberg AP. Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature*. 2010; 467(7313):338-342.
- Jing Y**, Jin X, Wang L, Dou L, Wang Q, Yao Y, Lian S, Zhou J, Zhu H, Yao Z, Gao L, Wang L, Li Y, Bai X, Fang M, Yu L. Decitabine-based chemotherapy followed by haploidentical lymphocyte infusion improves the effectiveness in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2016. doi: 10.18632/oncotarget.11183
- Jinushi M**, Takehara T, Tatsumi T, Hiramatsu N, Sakamori R, Yamaguchi S, Hayashi N. Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *J Hepatol*. 2005; 43(6):1013-1020.
- Jung H**, Hsiung B, Pestal K, Procyk E, Raulet DH. RAE-1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by E2F transcription factors, which control cell cycle entry. *J Exp Med*. 2012; 209(13):2409-2422.

K

- Kaiser BK**, Yim D, Chow IT, Gonzalez S, Dai Z, Mann HH, Strong RK, Groh V, Spies T. Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands. *Nature*. 2007; 447(7143):482-486.
- Kamimura H**, Yamagiwa S, Tsuchiya A, Takamura M, Matsuda Y, Ohkoshi S, Inoue M, Wakai T, Shirai Y, Nomoto M, Aoyagi Y. Reduced NKG2D ligand expression in hepatocellular carcinoma correlates with early recurrence. *J Hepatol*. 2012; 56(2):381-388.

- Kantarjian H**, Ravandi F, O'Brien S, Cortes J, Faderl S, Garcia-Manero G, Jabbour E, Wierda W, Kadia T, Pierce S, Shan J, Keating M, Freireich EJ. Intensive chemotherapy does not benefit most older patients (age 70 years or older) with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010; 116(22):4422-4429.
- Kantarjian HM**, Thomas XG, Dmoszynska A, Wierzbowska A, Mazur G, Mayer J, Gau JP, Chou WC, Buckstein R, Cermak J, Kuo CY, Oriol A, Ravandi F, Faderl S, Delaunay J, Lysák D, Minden M, Arthur C. Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2012; 30(21):2670-2677.
- Kato N**, Tanaka J, Sugita J, Toubai T, Miura Y, Iyata M, Syono Y, Ota S, Kondo T, Asaka M, Imamura M. Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia*. 2007; 21(10):2103-2108.
- Kearney CJ**, Ramsbottom KM, Voskoboinik I, Darcy PK, Oliaro J. Loss of DNAM-1 ligand expression by acute myeloid leukemia cells renders them resistant to NK cell killing. *Oncoimmunology*. 2016 Jun 27; 5(8):e1196308.
- Kessenbrock K**, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010; 141(1):52-67
- Khan N**, Hantel A, Knoebel RW, Artz A, Larson RA, Godley LA, Thirman MJ, Liu H, Churpek JE, King D, Odenike O, Stock W. Efficacy of single-agent decitabine in relapsed and refractory acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2017; 20:1-7.
- Khaznadar Z**, Boissel N, Agaugué S, Henry G, Cheok M, Vignon M, Geromin D, Cayuela JM, Castaigne S, Pautas C, Raffoux E, Lachuer J, Sigaux F, Preudhomme C, Dombret H, Dulphy N, Toubert A. Defective NK Cells in Acute Myeloid Leukemia Patients at Diagnosis Are Associated with Blast Transcriptional Signatures of Immune Evasion. *J Immunol*. 2015; 195(6):2580-2590.
- Kikushige Y**, Yoshimoto G, Miyamoto T, Iino T, Mori Y, Iwasaki H, Niino H, Takenaka K, Nagafuji K, Harada M, Ishikawa F, Akashi K. Human Flt3 is expressed at the hematopoietic stem cell and the granulocyte/macrophage progenitor stages to maintain cell survival. *J Immunol*. 2008; 180(11):7358-7367.
- Kim ES**, Kim MS, Moon A. 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; 25(5):1375-1382
- Klöß S**, Chambron N, Gardlowski T, Arseniev L, Koch J, Esser R, Glienke W, Seitz O, Koch J, Steinle A, Watzl C, Mandelboim O. Activating natural cytotoxicity receptors of natural killer cells in cancer and infection. *Trends Immunol* 2013; 34(4):182-191.
- Kohga K**, Takehara T, Tatsumi T, Miyagi T, Ishida H, Ohkawa K, Kanto T, Hiramatsu N, Hayashi N. Anticancer chemotherapy inhibits MHC class I-related chain a ectodomain shedding by downregulating ADAM10 expression in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2009; 69(20):8050-8057.
- Kohga K**, Takehara T, Tatsumi T, Ishida H, Miyagi T, Hosui A, Hayashi N. Sorafenib inhibits the shedding of major histocompatibility complex class I-related chain A on hepatocellular carcinoma cells by down-regulating a disintegrin and metalloproteinase 9. *Hepatology*. 2010; 51(4):1264-1273.
- Kohga K**, Tatsumi T, Tsunematsu H, Aono S, Shimizu S, Kodama T, Hikita H, Yamamoto M, Oze T, Aketa H, Hosui A, Miyagi T, Ishida H, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. Interleukin-1 β enhances the production of soluble MICA in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2012; 61(9):1425-1432.

- Kong L**, Zhang P, Li W, Yang Y, Tian Y, Wang X, Chen S, Yang Y, Huang T, Zhao T2, Tang L, Su B, Li F, Liu XS, Zhang F. KDM1A promotes tumor cell invasion by silencing TIMP3 in non-small cell lung cancer cells. *Oncotarget*. 2016; 7(19):27959-27974.
- Koschmieder S**, Halmos B, Levantini E, Tenen DG. Dysregulation of the C/EBPalpha differentiation pathway in human cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(4):619–628.
- Kouzarides T**. Chromatin modifications and their function. *Cell*. 2007; 128(4):693-705.
- Kuchenbauer F**, Kern W, Schoch C, Kohlmann A, Hiddemann W, Haferlach T, Schnittger S. Detailed analysis of FLT3 expression levels in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2005; 90(12):1617-1625.
- Kumar V**, Yi Lo PH, Sawai H, Kato N, Takahashi A, Deng Z, Urabe Y, Mbarek H, Tokunaga K, Tanaka Y, Sugiyama M, Mizokami M, Muroyama R, Tateishi R, Omata M, Koike K, Tanikawa C, Kamatani N, Kubo M, Nakamura Y, Matsuda K. Soluble MICA and a MICA variation as possible prognostic biomarkers for HBV-induced hepatocellular carcinoma. *PLoS One*. 2012; 7(9):e44743.

L

- Lanier LL**. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol*. 2008; 9(5):495-502.
- Lanier LL**. NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res*. 2015; 3(6):575-582.
- Ley TJ**, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, Kandoth C, Payton JE, Baty J, Welch J, Harris CC, Lichti CF, Townsend RR, Fulton RS, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Zhang Q, Osborne JR, Lin L, O'Laughlin M, McMichael JF, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Magrini VJ, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Conyers JJ, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie T, Walker J, Kalicki J, Watson MA, Heath S, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Westervelt P, Tomasson MH, Link DC, Graubert TA, DiPersio JF, Mardis ER, Wilson RK. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010; 363(25):2424-2433.
- Li E**, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 1992; 69(6):915–926
- Li HY**, Deng DH, Huang Y, Ye FH, Huang LL, Xiao Q, Zhang B, Ye BB, Lai YR, Mo ZN, Liu ZF. Favorable prognosis of biallelic CEBPA gene mutations in acute myeloid leukemia patients: a meta-analysis. *Eur J Haematol*. 2015; 94(5): 439-448.
- Li K**, Mandai M, Hamanishi J, Matsumura N, Suzuki A, Yagi H, Yamaguchi K, Baba T, Fujii S, Konishi I. Clinical significance of the NKG2D ligands, MICA/B and ULBP2 in ovarian cancer: high expression of ULBP2 is an indicator of poor prognosis. *Cancer Immunol Immunother*. 2009; 58(5):641-652.
- Li Y**, Xu Q, Lv N, Wang L, Zhao H, Wang X, Guo J, Chen C, Li Y, Yu L. Clinical implications of genome-wide DNA methylation studies in acute myeloid leukemia. *J Hematol Oncol*. 2017; 10(1):41.
- Lim O**, Jung MY, Hwang YK, Shin EC. Present and Future of Allogeneic Natural Killer Cell Therapy. *Front Immunol*. 2015; 6:286.
- Lion E**, Willems Y, Berneman ZN, Van Tendeloo VF, Smits EL. Natural killer cell immune escape in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012; 26(9):2019-2026.
- Liu G**, Atteridge CL, Wang X, Lundgren AD, Wu JD. The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. *J Immunol*. 2010; 184(7):3346-3350.

- Liu S**, Lachapelle J, Leung S, Gao D, Foulkes WD, Nielsen TO. CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2012; 14(2):R48.
- Liu XV**, Ho SS, Tan JJ, Kamran N, Gasser S. Ras activation induces expression of Raet1 family NK receptor ligands. *J Immunol.* 2012; 189(4):1826-1834.
- Liu Y**, Wu C, Wang Y, Wen S, Wang J, Chen Z, He Q, Feng D. MicroRNA-145 inhibits cell proliferation by directly targeting ADAM17 in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2014; 32(5):1923-1930.
- Long EO**. Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm. *Immunol Rev.* 2008; 224:70-84.
- Long EO**, Kim HS, Liu D, Peterson ME, Rajagopalan S. Controlling natural killer cell responses: integration of signals for activation and inhibition. *Annu Rev Immunol.* 2013; 31:227-258.
- López-Cobo S**, Romera-Cárdenas G, García-Cuesta EM1, Reyburn HT, Valés-Gómez M. Transfer of the human NKG2D ligands UL16 binding proteins (ULBP) 1-3 is related to lytic granule release and leads to ligand retransfer and killing of ULBP-recipient natural killer cells. *Immunology.* 2015; 146(1):70-80.
- López-Cobo S**, Campos-Silva C, Valés-Gómez M. Glycosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anchors and Metalloproteases: Their Roles in the Regulation of Exosome Composition and NKG2D-Mediated Immune Recognition. *Front Cell Dev Biol.* 2016; 4:97.
- López-Larrea C**, Suárez-Alvarez B, López-Soto A, López-Vázquez A, Gonzalez S. The NKG2D receptor: sensing stressed cells. *Trends Mol Med.* 2008; 14(4):179-189.
- López-Soto A**, Quiñones-Lombraña A, López-Arbesú R, López-Larrea C, González S. Transcriptional regulation of ULBP1, a human ligand of the NKG2D receptor. *J Biol Chem.* 2006; 281(41):30419-30430.
- López-Soto A**, Folgueras AR, Seto E, Gonzalez S. HDAC3 represses the expression of NKG2D ligands ULBPs in epithelial tumour cells: potential implications for the immunosurveillance of cancer. *Oncogene.* 2009; 28(25):2370-2382.
- Lu X**, Ohata K, Kondo Y, Espinoza JL, Qi Z, Nakao S. Hydroxyurea upregulates NKG2D ligand expression in myeloid leukemia cells synergistically with valproic acid and potentially enhances susceptibility of leukemic cells to natural killer cell-mediated cytolysis. *Cancer Sci.* 2010; 101(3):609-615.
- Luskin MR**, Gimotty PA, Smith C, Loren AW, Figueroa ME, Harrison J, Sun Z, Tallman MS, Paietta EM, Litzow MR, Melnick AM, Levine RL, Fernandez HF, Luger SM, Carroll M, Master SR, Wertheim GB. A clinical measure of DNA methylation predicts outcome in de novo acute myeloid leukemia. *JCI Insight.* 2016;1(9). pii: e87323.

M

- Mardis ER**, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, Koboldt DC, Fulton RS, Delehaunty KD, McGrath SD, Fulton LA, Locke DP, Magrini VJ, Abbott RM, Vickery TL, Reed JS, Robinson JS, Wylie T, Smith SM, Carmichael L, Eldred JM, Harris CC, Walker J, Peck JB, Du F, Dukes AF, Sanderson GE, Brummett AM, Clark E, McMichael JF, Meyer RJ, Schindler JK, Pohl CS, Wallis JW, Shi X, Lin L, Schmidt H, Tang Y, Haipok C, Wiechert ME, Ivy JV, Kalicki J, Elliott G, Ries RE, Payton JE, Westervelt P, Tomasson MH, Watson MA, Baty J, Heath S, Shannon WD, Nagarajan R, Link DC, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Wilson RK, Ley TJ. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med.* 2009; 361(11):1058-1066.

- McCann FE**, Eissmann P, Onfelt B, Leung R, Davis DM. 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; 178(6):3418-3426.
- McGilvray RW**, Eagle RA, Watson NF, Al-Attar A, Ball G, Jafferji I, Trowsdale J, Durrant LG. NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoediting. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(22):6993-7002.
- McGilvray RW**, Eagle RA, Rolland P, Jafferji I, Trowsdale J, Durrant LG. ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients. *Int J Cancer.* 2010; 127(26):1412-1420.
- Metzeler KH**, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Becker H, Curfman J, Holland KB, Schwind S, Whitman SP, Wu YZ, Blum W, Powell BL, Carter TH, Wetzler M, Moore JO, Kowitz JE, Baer MR, Carroll AJ, Larson RA, Caligiuri MA, Marcucci G, Bloomfield CD. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 2011; 29(10):1373-1381.
- Mistry AR**, O'Callaghan CA. Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology.* 2007; 121(4):439-447.
- Molfetta R**, Quatrini L, Zitti B, Capuano C, Galandrini R, Santoni A, Paolini R. Regulation of NKG2D Expression and Signaling by Endocytosis. *Trends Immunol.* 2016; 37(11):790-802.
- Molinero LL**, Fuertes MB, Girart MV, Fainboim L, Rabinovich GA, Costas MA, Zwirner NW. NF-kappa B regulates expression of the MHC class I-related chain A gene in activated T lymphocytes. *J Immunol.* 2004; 173(9):5583-5590.
- Mulero-Navarro S**, Esteller M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008; 68(1):1-11.
- Mussai F**, De Santo C, Abu-Dayyeh I, Booth S, Quek L, McEwen-Smith RM, Qureshi A, Dazzi F, Vyas P, Cerundolo V. Acute myeloid leukemia creates an arginase-dependent immunosuppressive microenvironment. *Blood.* 2013; 122(5):749-758.

N

- Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, Suzuki Y, Shintaku I, Nagura H, Ohtani H.** Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.* 2001; 61(13):5132-6.
- Nanbakhsh A**, Pochon C, Mallavialle A, Amsellem S, Bourhis JH, Chouaib S. c-Myc regulates expression of NKG2D ligands ULBP1/2/3 in AML and modulates their susceptibility to NK-mediated lysis. *Blood.* 2014; 123(23):3585-3595.
- Naoe T**, Suzuki T, Kiyoi H, Urano T. Nucleophosmin: a versatile molecule associated with hematological malignancies. *Cancer Sci.* 2006; 97(10):963-969.
- Nausch N**, Cerwenka A. NKG2D ligands in tumor immunity. *Oncogene.* 2008; 27(45): 5944–5958.
- Neumann E.** Das Gesetz über die Verbreitung des gelben und roten Knochenmarks. *Centralblatt für die Med Wissenschaft.* 1882; 18:321–323
- Niu C**, Jin H, Li M, Zhu S, Zhou L, Jin F, Zhou Y, Xu D, Xu J, Zhao L, Hao S, Li W, Cui J. Low-dose bortezomib increases the expression of NKG2D and DNAM-1 ligands and enhances induced NK and $\gamma\delta$ T cell-mediated lysis in multiple myeloma. *Oncotarget.* 2017; 8(4):5954-5964.

Nguyen S, Dhedin N, Vernant JP, Kuentz M, Al Jijakli A, Rouas-Freiss N, Carosella ED, Boudifa A, Debré P, Vieillard V. NK-cell reconstitution after haploidentical hematopoietic stem-cell transplantations: immaturity of NK cells and inhibitory effect of NKG2A override GvL effect. *Blood*. 2005; 105(10):4135-4142.

Nobili L, Lionetti M1, Neri A. Long non-coding RNAs in normal and malignant hematopoiesis. *Oncotarget*. 2016; 7(31):50666-50681.

Noël A, Gutiérrez-Fernández A, Sounni NE, Behrendt N, Maquoi E, Lund IK, Cal S, Hoyer-Hansen G, López-Otín C. New and paradoxical roles of matrix metalloproteinases in the tumor microenvironment. *Front Pharmacol*. 2012; 3:140.

Nowbakht P, Ionescu MC, Rohner A, Kalberer CP, Rossy E, Mori L, Cosman D, De Libero G, Wodnar-Filipowicz A. Ligands for natural killer cell-activating receptors are expressed upon the maturation of normal myelomonocytic cells but at low levels in acute myeloid leukemias. *Blood*. 2005; 105(9):3615-3622.

Nückel H, Switala M, Sellmann L, Horn PA, Dürig J, Dührsen U, Küppers R, Grosse-Wilde H, Rebmann V. The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2010; 24(6):1152-1159.

O

Ofran Y, Rowe JM. Genetic profiling in acute myeloid leukaemia--where are we and what is its role in patient management. *Br J Haematol*. 2013; 160(3):303-320.

Ogbomo H, Michaelis M, Kreuter J, Doerr HW, Cinatl J. Histone deacetylase inhibitors suppress natural killer cell cytolytic activity. *FEBS Lett*. 2007; 581(7):1317-1322.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*. 1999; 99(3):247-257.

Ørskov AD, Treppendahl MB, Skovbo A, Holm MS, Friis LS, Hokland M, Grønbaek K. Hypomethylation and up-regulation of PD-1 in T cells by azacytidine in MDS/AML patients: A rationale for combined targeting of PD-1 and DNA methylation. *Oncotarget*. 2015; 6(11):9612-9626.

P

Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, Behre G, Hiddemann W, Tenen DG. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2001; 27(3):263-270.

Pacis A, Tailleux L, Morin AM, Lambourne J, Maclsaac JL, Yotova V, Dumaine A, Danckaert A, Luca F, Grenier JC, Hansen KD, Gicquel B, Yu M, Pai A, He C, Tung J, Pastinen T, Kobor MS, Pique-Regi R7, Gilad Y, Barreiro LB. Bacterial infection remodels the DNA methylation landscape of human dendritic cells. *Genome Res*. 2015; 25(12):1801-1811.

Pal S, Tyler JK. Epigenetics and aging. *Sci Adv*. 2016; 2(7):e1600584.

Parameswaran R, Ramakrishnan P, Moreton SA, Xia Z, Hou Y, Lee DA, Gupta K, deLima M, Beck RC, Wald DN. Repression of GSK3 restores NK cell cytotoxicity in AML patients. *Nat Commun*. 2016; 7:11154.

Pariente B, Mocan I, Camus M, Dutertre CA, Ettersperger J, Cattan P, Gornet JM, Dulphy N, Charron D, Lémann M, Toubert A, Allez M. Activation of the receptor NKG2D leads to production of Th17 cytokines in CD4+ T cells of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2011; 141(1):217-26, 226.e1-2.

- Paschen A**, Sucker A, Hill B, Moll I, Zapatka M, Nguyen XD, Sim GC, Gutmann I, Hassel J, Becker JC, Steinle A, Schadendorf D, Ugurel S. Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. *Clin Cancer Res*. 2009; 15(16):5208-5215.
- Patel JP**, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, Van Vlierberghe P, Dolgalev I, Thomas S, Aminova O, Huberman K, Cheng J, Viale A, Socci ND, Heguy A, Cherry A, Vance G, Higgins RR, Ketterling RP, Gallagher RE, Litzow M, van den Brink MR, Lazarus HM, Rowe JM, Luger S, Ferrando A, Paietta E, Tallman MS, Melnick A, Abdel-Wahab O, Levine RL. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012; 366(12):1079-1089.
- Pegram HJ**, Andrews DM, Smyth MJ, Darcy PK, Kershaw MH. Activating and inhibitory receptors of natural killer cells. *Immunol Cell Biol*. 2011; 89(2):216-224.
- Pende D**, Spaggiari GM, Marcenaro S, Martini S, Rivera P, Capobianco A, Falco M, Lanino E, Pierri I, Zambello R, Bacigalupo A, Mingari MC, Moretta A, Moretta L. Analysis of the receptor-ligand interactions in the natural killer-mediated lysis of freshly isolated myeloid or lymphoblastic leukemias: evidence for the involvement of the Poliovirus receptor (CD155) and Nectin-2 (CD112). *Blood*. 2005; 105(5):2066-2073.
- Pitt JM**, Charrier M, Viaud S, André F, Besse B, Chaput N, Zitvogel L. Dendritic cell-derived exosomes as immunotherapies in the fight against cancer. *J Immunol*. 2014; 193(3):1006-1011.
- Pleyer L**, Burgstaller S, Girschikofsky M, Linkesch W, Stauder R, Pfeilstocker M, Schreder M, Tinchon C, Sliwa T, Lang A, Sperr WR, Krippel P, Geissler D, Voskova D, Schlick K, Thaler J, Machherndl-Spandl S, Theiler G, Eckmüllner O, Greil R. Azacitidine in 302 patients with WHO-defined acute myeloid leukemia: results from the Austrian Azacitidine Registry of the AGMT-Study Group. *Ann Hematol*. 2014; 93(11):1825-38.
- Poggi A**, Catellani S, Garuti A, Pierri I, Gobbi M, Zocchi MR. Effective in vivo induction of NKG2D ligands in acute myeloid leukaemias by all-trans-retinoic acid. *Leukemia*. 2009; 23(4):641-648.
- Poppe B**, Vandesompele J, Schoch C, Lindvall C, Mrozek K, Bloomfield CD, Beverloo HB, Michaux L, Dastugue N, Herens C, Yigit N, De Paepe A, Hagemeijer A, Speleman F. Expression analyses identify MLL as a prominent target of 11q23 amplification and support an etiologic role for MLL gain of function in myeloid malignancies. *Blood*. 2004; 103(1):229-235.
- Port M**, Böttcher M, Thol F, Ganser A, Schlenk R, Wasem J, Neumann A, Pouryamout L. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann Hematol*. 2014; 93(8):1279-1286.

R

- Raffaghello L**, Prigione I, Airoidi I, Camoriano M, Levreri I, Gambini C, Pende D, Steinle A, Ferrone S, Pistoia V. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia*. 2004; 6(5):558-568.
- Raulet DH**. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(10):781-790
- Raulet DH**. Missing self recognition and self tolerance of natural killer (NK) cells. *Semin Immunol*. 2006; 18(3):145-150.
- Raulet DH**, Gasser S, Gowen BG, Deng W, Jung H. Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol*. 2013; 31:413-441.

- Rebmann V**, Schütt P, Brandhorst D, Opalka B, Moritz T, Nowrousian MR, Grosse-Wilde H. Soluble MICA as an independent prognostic factor for the overall survival and progression-free survival of multiple myeloma patients. *Clin Immunol.* 2007; 123(1):114-120.
- Reddy KL**, Feinberg AP. Higher order chromatin organization in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2013; 23(2):109-115.
- Ribeiro CH**, Kramm K, Gálvez-Jirón F, Pola V, Bustamante M, Contreras HR, Sabag A, Garrido-Tapia M, Hernández CJ, Zúñiga R, Collazo N, Sotelo PH, Morales C, Mercado L, Catalán D, Aguillón JC, Molina MC. Clinical significance of tumor expression of major histocompatibility complex class I-related chains A and B (MICA/B) in gastric cancer patients. *Oncol Rep.* 2016; 35(3):1309-1317.
- Roboz GJ**. Novel approaches to the treatment of acute myeloid leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2011; 2011:43-50.
- Roda-Navarro P**, Vales-Gomez M, Chisholm SE, Reyburn HT. 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; 103(30):11258-11263.
- Rodríguez-Paredes M**, Esteller M. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med.* 2011; 17(3):330-339.
- Rohner A**, Langenkamp U, Siegler U, Kalberer CP, Wodnar-Filipowicz A. Differentiation-promoting drugs up-regulate NKG2D ligand expression and enhance the susceptibility of acute myeloid leukemia cells to natural killer cell-mediated lysis. *Leuk Res.* 2007; 31(10):1393-1402.
- Röhrs S**, Dirks WG, Meyer C, Marschalek R, Scherr M, Slany R, Wallace A, Drexler HG, Quentmeier H. Hypomethylation and expression of BEX2, IGSF4 and TIMP3 indicative of MLL translocations in acute myeloid leukemia. *Mol Cancer.* 2009; 8:86.
- Rossetto D**, Avvakumov N, Côté J. Histone phosphorylation: a chromatin modification involved in diverse nuclear events. *Epigenetics.* 2012; 7(10):1098-1108.
- Rossi DJ**, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, Wagers AJ, Weissman IL. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005; 102(26):9194-9199.
- Rowley JD**. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann Genet.* 1973; 16(2):109-112.
- Rowley JD**, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet.* 1977; 1(8010):549-550.
- Rygaard J**, Povlsen CO. The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours. An argument against immunological surveillance. *Acta Pathol Microbiol Scand B Microbiol Immunol.* 1974; 82(1):99-106.

S

- Sáez-Borderías A**, Gumá M, Angulo A, Bellosillo B, Pende D, López-Botet M. Expression and function of NKG2D in CD4+ T cells specific for human cytomegalovirus. *Eur J Immunol.* 2006; 36(12):3198-3206.
- Salih HR**, Rammensee HG, Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol.* 2002; 169(8):4098-4102.
- Salih HR**, Antropius H, Gieseke F, Lutz SZ, Kanz L, Rammensee HG, Steinle A. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood.* 2003; 102(4):1389-1396.

- Salih HR**, Holdenrieder S, Steinle A. Soluble NKG2D ligands: prevalence, release, and functional impact. *Front Biosci.* 2008; 13:3448-3456.
- Sanchez-Correa B**, Morgado S, Gayoso I, Bergua JM, Casado JG, Arcos MJ, Bengochea ML, Duran E, Solana R, Tarazona R. Human NK cells in acute myeloid leukaemia patients: analysis of NK cell-activating receptors and their ligands. *Cancer Immunol Immunother.* 2011; 60(8):1195-1205.
- Sanchez-Correa B**, Gayoso I, Bergua JM, Casado JG, Morgado S, Solana R, Tarazona R. Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. *Immunol Cell Biol.* 2012; 90(1):109-115.
- Sandoval-Borrego D**, Moreno-Lafont MC, Vazquez-Sanchez EA, Gutierrez-Hoya A, López-Santiago R, Montiel-Cervantes LA, Ramírez-Saldaña M, Vela-Ojeda J. Overexpression of CD158 and NKG2A Inhibitory Receptors and Underexpression of NKG2D and NKp46 Activating Receptors on NK Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Arch Med Res.* 2016; 47(1):55-64.
- Saultz JN**, Garzon R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *J Clin Med.* 2016; 5(3). pii: E33.
- Schmiedel BJ**, Arélin V, Gruenebach F, Krush M, Schmidt SM, Salih HR. Azacytidine impairs NK cell reactivity while decitabine augments NK cell responsiveness toward stimulation. *Int J Cancer* 2011; 128(12): 2911–2922.
- Schneider F**, Hoster E, Unterhalt M, Schneider S, Dufour A, Benthaus T, Mellert G, Zellmeier E, Bohlander SK, Feuring-Buske M, Buske C, Braess J, Fritsch S, Heinecke A, Sauerland MC, Berdel WE, Buechner T, Woermann BJ, Hiddemann W, Spiekermann K. NPM1 but not FLT3-ITD mutations predict early blast cell clearance and CR rate in patients with normal karyotype AML (NK-AML) or high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood.* 2009; 113(21):5250-5253.
- Schoofs T**, Berdel WE, Müller-Tidow C. Origins of aberrant DNA methylation in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2014; 28(1):1-14.
- Schumacher K**, Haensch W, Roefzaad C, Schlag PM. Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer Res.* 2001; 61(10): 3932–3936.
- Schuster IS**, Coudert JD, Andoniou CE, Degli-Esposti MA. "Natural Regulators": NK Cells as Modulators of T Cell Immunity. *Front Immunol.* 2016; 7:235.
- Schwinn N**, Vokhminova D, Sucker A, Textor S, Striegel S, Moll I, Nausch N, Tuettenberg J, Steinle A, Cerwenka A, Schadendorf D, Paschen A. Interferon-gamma down-regulates NKG2D ligand expression and impairs the NKG2D-mediated cytotoxicity of MHC class I-deficient melanoma by natural killer cells. *Int J Cancer.* 2009; 124(7):1594-1604.
- Seifert H**, Mohr B, Thiede C, Oelschlägel U, Schäkel U, Illmer T, Soucek S, Ehninger G, Schaich M; Study Alliance Leukemia (SAL). The prognostic impact of 17p (p53) deletion in 2272 adults with acute myeloid leukemia. *Leukemia.* 2009; 23(4):656-663.
- Sekeres MA**, Steensma DP. Boulevard of broken dreams: drug approval for older adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 2012; 30(33):4061-4063.
- Sers C**, Kuner R, Falk CS, Lund P, Sueltmann H, Braun M, Buness A, Ruschhaupt M, Conrad J, Mang-Fatehi S, Stelniec I, Krapfenbauer U, Poustka A, Schäfer R. Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *Int J Cancer.* 2009; 125(7):1626-1639.

- Shankaran V**, Ikeda H, Bruce AT, White JM, Swanson PE, Old LJ, Schreiber RD. IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature*. 2001; 410(6832):1107-1111.
- Sheikhha MH**, Awan A, Tobal K, Liu Yin JA. Prognostic significance of FLT3 ITD and D835 mutations in AML patients. *Hematol J*. 2003; 4(1):41-46.
- Shen B**, Wu N, Yang JM, Gould SJ. Protein targeting to exosomes/microvesicles by plasma membrane anchors. *J Biol Chem*. 2011; 286(16):14383-14395.
- Shen B**, Jiang Y, Chen YR, Zheng HC, Zeng W, Li YY, Yin A, Nie Y. Expression and inhibitory role of TIMP-3 in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*. 2016; 36(1):494-502.
- Shi C**, Li H, Couturier JP, Yang K, Guo X, He D, Lewis DE, Zhou X. Allele Specific Expression of MICA Variants in Human Fibroblasts Suggests a Pathogenic Mechanism. *Open Rheumatol J*. 2015; 9:60-64.
- Shiraishi K**, Mimura K, Kua LF, Koh V, Siang LK, Nakajima S, Fujii H, Shabbir A, Yong WP, So J, Takenoshita S, Kono K. Inhibition of MMP activity can restore NKG2D ligand expression in gastric cancer, leading to improved NK cell susceptibility. *J Gastroenterol*. 2016; 51(12):1101-1111.
- Sohlberg E**, Pfefferle A, Andersson S, Baumann BC, Hellström-Lindberg E, Malmberg KJ. Imprint of 5-azacytidine on the natural killer cell repertoire during systemic treatment for high-risk myelodysplastic syndrome. *Oncotarget*. 2015; 6(33):34178-34190.
- Soung YH**, Ford S, Zhang V, Chung J. Exosomes in Cancer Diagnostics. *Cancers (Basel)*. 2017; 9(1). pii: E8.
- Sharma P, Shen Y, Wen S, Yamada S, Jungbluth AA, Gnjjatic S, Bajorin DF, Reuter VE, Herr H, Old LJ, Sato E**. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle-invasive urothelial carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(10):3967-72.
- Siegel EM**, Riggs BM, Delmas AL, Koch A, Hakam A, Brown KD. Quantitative DNA methylation analysis of candidate genes in cervical cancer. *PLoS One*. 2015; 10(3):e0122495.
- Smith ZD**, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet*. 2013; 14(3):204-220.
- Smyth MJ**, Thia KY, Street SE, MacGregor D, Godfrey DI, Trapani JA. Perforin-mediated cytotoxicity is critical for surveillance of spontaneous lymphoma. *J Exp Med*. 2000;192(5):755-760.
- Sorm F**, Pískala A, Cihák A, Veselý J. 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia*. 1964; 20(4):202-203.
- Spaggiari GM**, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell (MSC) /natural killer (NK) cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSC while MSC can inhibit IL-2-induced NK cell proliferation. *Blood*. 2005; 107(4):1484-1490.
- Spencer DH**, Russler-Germain DA, Ketkar S, Helton NM, Lamprecht TL, Fulton RS, Fronick CC, O'Laughlin M, Heath SE, Shinawi M, Westervelt P, Payton JE, Wartman LD, Welch JS, Wilson RK, Walter MJ, Link DC, DiPersio JF, Ley TJ. CpG Island Hypermethylation Mediated by DNMT3A Is a Consequence of AML Progression. *Cell*. 2017; 168(5):801-816.
- Stutman O**. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science*. 1974; 183(4124):534-536.
- Sun D**, Wang X, Zhang H, Deng L, Zhang Y. MMP9 mediates MICA shedding in human osteosarcomas. *Cell Biol Int*. 2011; 35(6):569-574.

- Tahiliani M**, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009; 324(5929):930-935.
- Tamaki S**, Kawakami M, Ishitani A, Kawashima W, Kasuda S, Yamanaka Y, Shimomura H, Imai Y, Nakagawa Y, Hatake K, Kirita T. Soluble MICB serum levels correlate with disease stage and survival rate in patients with oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*. 2010; 30(10):4097-4101.
- Tan A**, De La Peña H, Seifalian AM. The application of exosomes as a nanoscale cancer vaccine. *Int J Nanomedicine*. 2010; 5:889-900.
- Tang KF**, He CX, Zeng GL, Wu J, Song GB, Shi YS, Zhang WG, Huang AL, Steinle A, Ren H. Induction of MHC class I-related chain B (MICB) by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 370(4):578-583.
- Taskesen E**, Bullinger L, Corbacioglu A, Sanders MA, Erpelinck CA, Wouters BJ, van der Poel-van de Luytgaarde SC, Damm F, Krauter J, Ganser A, Schlenk RF, Löwenberg B, Delwel R, Döhner H, Valk PJ, Döhner K. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood*. 2011; 117(8):2469-2475.
- Tefferi A**, Lim KH, Levine R. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009; 361(11):1117.
- Tellier E**, Canault M, Rebsomen L, Bonardo B, Juhan-Vague I, Nalbone G, Peiretti F. The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts. *Exp Cell Res*. 2006; 312(20):3969-3980.
- Terme M**, Borg C, Guilhot F, Masurier C, Flament C, Wagner EF, Caillat-Zucman S, Bernheim A, Turhan AG, Caignard A, Zitvogel L. BCR/ABL promotes dendritic cell-mediated natural killer cell activation. *Cancer Res*. 2005; 65(14): 6409-6417.
- Textor S**, Fiegler N, Arnold A, Porgador A, Hofmann TG, Cerwenka A. Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2. *Cancer Res*. 2011; 71(18):5998-6009.
- Thépot S**, Itzykson R, Seegers V, Recher C, Raffoux E, Quesnel B, Delaunay J, Cluzeau T, Marfaing Koka A, Stamatoullas A, Chaury MP, Dartigeas C, Cheze S, Banos A, Morel P, Plantier I, Taksin AL, Marolleau JP, Pautas C, Thomas X, Isnard F, Beve B, Chait Y, Guerci A, Vey N, Dreyfus F, Ades L, Ifrah N, Dombret H, Fenaux P, Gardin C; Groupe Francophone des Myélodysplasies (GFM), Acute Leukemia French Association (ALFA); Groupe Ouest-Est des Leucémies Aiguës; Maladies du Sang (GOELAMS). Azacitidine in untreated acute myeloid leukemia: a report on 149 patients. *Am J Hematol*. 2014; 89(4):410-416.
- Thomas L**. On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med*. 1982; 55(3-4):329-333.
- Topham NJ**, Hewitt EW. Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger? *Immunology*. 2009; 128(1):7-15.
- Tsukagoshi M**, Wada S, Yokobori T, Altan B, Ishii N, Watanabe A, Kubo N, Saito F, Araki K, Suzuki H, Hosouchi Y, Kuwano H. Overexpression of natural killer group 2 member D ligands predicts favorable prognosis in cholangiocarcinoma. *Cancer Sci*. 2016; 107(2):116-122.

U

- Ullrich E**, Koch J, Cerwenka A, Steinle A. New prospects on the NKG2D/NKG2DL system for oncology. *Oncoimmunology*. 2013; 2(10):e26097.

V

- Vardiman JW**, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, Harris NL, Le Beau MM, Hellström-Lindberg E, Tefferi A, Bloomfield CD. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009; 114(5):937-951.
- Venkataraman GM**, Suci D, Groh V, Boss JM, Spies T. 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; 178(2):961-969.
- Verhaak RG**, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, Uitterlinden AG, Erpelinck CA, Delwel R, Löwenberg B, Valk PJ. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. 2005; 106(12):3747-3754.
- Verheyden S**, Bernier M, Demanet C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia* 2004; 18(12):2002–2007.
- Versluis J**, Hazenberg CL, Passweg JR, van Putten WL, Maertens J, Biemond BJ, Theobald M, Graux C, Kuball J, Schouten HC, Pabst T, Löwenberg B, Ossenkoppele G, Vellenga E, Cornelissen JJ, HOVON, SAKK Leukaemia Groups. Post-remission treatment with allogeneic stem cell transplantation in patients aged 60 years and older with acute myeloid leukaemia: a time-dependent analysis. *Lancet Haematol*. 2015; 2(10):e427-436.
- Vetter CS**, Lieb W, Bröcker EB, Becker JC. Loss of nonclassical MHC molecules MIC-A/B expression during progression of uveal melanoma. *Br J Cancer*. 2004; 91(8):1495-1499.
- Viaud S**, Terme M, Flament C, Taieb J, André F, Novault S, Escudier B, Robert C, Caillat-Zucman S, Tursz T, Zitvogel L, Chaput N. Dendritic cell-derived exosomes promote natural killer cell activation and proliferation: a role for NKG2D ligands and IL-15Ralpha. *PLoS One*. 2009; 4(3):e4942.
- Villegas FR**, Coca S, Villarrubia VG, Jiménez R, Chillón MJ, Jareño J, Zuñi M, Callol L. Prognostic significance of tumor infiltrating natural killer cells subset CD57 in patients with squamous cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2002; 35(1):23-28.
- Von Hoff DD**, Slavik M, Muggia FM. 5-Azacytidine. A new anticancer drug with effectiveness in acute myelogenous leukemia. *Ann Intern Med*. 1976; 85(2):237-245.

W

- Waddington CH**. The epigenotype. *Endeavor* 1942; 1:18–20. Reprinted in *Int J Epidemiol* 2012; 41:10–13.
- Waldhauer I**, Steinle A. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res*. 2006; 66(5):2520-2526.
- Waldhauer I**, Goehlsdorf D, Gieseke F, Weinschenk T, Wittenbrink M, Ludwig A, Stevanovic S, Rammensee HG, Steinle A. Tumor-associated MICA is shed by ADAM proteases. *Cancer Res*. 2008; 68(15): 6368–6376.
- Walter MJ**, Shen D, Ding L, Shao J, Koboldt DC, Chen K, Larson DE, McLellan MD, Dooling D, Abbott R, Fulton R, Magrini V, Schmidt H, Kalicki-Veizer J, O’Laughlin M, Fan X, Grilott M, Witowski S, Heath S, Frater JL, Eades W, Tomasson M, Westervelt P, DiPersio JF, Link DC, Mardis ER, Ley TJ, Wilson RK, Graubert TA. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012; 366(12):1090-1098.

- Wang B**, Wang Q, Wang Z, Jiang J, Yu SC, Ping YF, Yang J, Xu SL, Ye XZ, Xu C, Yang L, Qian C, Wang JM, Cui YH, Zhang X, Bian XW. Metastatic consequences of immune escape from NK cell cytotoxicity by human breast cancerstem cells. *Cancer Res.* 2014; 74(20):5746-5757.
- Wang Y**, Bai J, Li F, Wang H, Fu X, Zhao T, Xu W, Zhang J, Ni B, Wu Y. Characteristics of expanded CD4+CD28null T cells in patients with chronic hepatitis B. *Immunol Invest.* 2009; 38(5):434-46.
- Ward PS**, Patel J, Wise DR, Abdel-Wahab O, Bennett BD, Collier HA, Cross JR, Fantin VR, Hedvat CV, Perl AE, Rabinowitz JD, Carroll M, Su SM, Sharp KA, Levine RL, Thompson CB. The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzyme activity converting alpha-ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell.* 2010; 17(3):225-234.
- Wei Wang**, Amy K. Erbe, Jacquelyn A. Hank, Zachary S. Morris, Paul M. Sondel. NK Cell-Mediated Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity in Cancer Immunotherapy. *Front Immunol.* 2015; 6:368.
- Welch JS**, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, Wartman LD, Lamprecht TL, Liu F, Xia J, Kandoth C, Fulton RS, McLellan MD, Dooling DJ, Wallis JW, Chen K, Harris CC, Schmidt HK, Kalicki-Veizer JM, Lu C, Zhang Q, Lin L, O'Laughlin MD, McMichael JF, Delehaunty KD, Fulton LA, Magrini VJ, McGrath SD, Demeter RT, Vickery TL, Hundal J, Cook LL, Swift GW, Reed JP, Alldredge PA, Wylie TN, Walker JR, Watson MA, Heath SE, Shannon WD, Varghese N, Nagarajan R, Payton JE, Baty JD, Kulkarni S, Klcio JM, Tomasson MH, Westervelt P, Walter MJ, Graubert TA, DiPersio JF, Ding L, Mardis ER, Wilson RK. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell.* 2012; 150(2):264-278.
- Wiernik A**, Foley B, Zhang B, Verneris MR, Warlick E, Gleason MK, Ross JA, Luo X, Weisdorf DJ, Walcheck B, Vallera DA, Miller JS. Targeting natural killer cells to acute myeloid leukemia in vitro with a CD16 x 33 bispecific killer cell engager and ADAM17 inhibition. *Clin Cancer Res.* 2013; 19(14):3844-3855.
- Wolff F**, Leisch M, Greil R, Risch A, Pleyer. The double-edged sword of (re)expression of genes by hypomethylating agents: from viral mimicry to exploitation as priming agents for targeted immune checkpoint modulation. *Cell Commun Signal.* 2017; 15(1):13.
- Wolpert F**, Tritschler I, Steinle A, Weller M, Eisele G. A disintegrin and metalloproteinases 10 and 17 modulate the immunogenicity of glioblastoma-initiating cells. *Neuro Oncol.* 2014; 16(3):382-391.
- Wouters BJ**, Sanders MA, Lugthart S, Geertsma-Kleinekoort WM, van Druenen E, Beverloo HB, Löwenberg B, Valk PJ, Delwel R. Segmental uniparental disomy as a recurrent mechanism for homozygous CEBPA mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2007; 21(11): 2382–2384.
- Wouters BJ**, Lowenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood* 2009; 113(13): 3088–3091.
- Wouters BJ**, Delwel R. Epigenetics and approaches to targeted epigenetic therapy in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2016; 127(1):42-52.
- Wu BJ**, Li WP, Qian C, Ding W, Zhou ZW, Jiang H. Serum soluble MICB (sMICB) correlates with disease progression and survival in melanoma patients. *Tumour Biol.* 2013; 34(1):565-569.
- Wu J**, Song Y, Bakker AB, Bauer S, Spies T, Lanier LL, Phillips JH. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science.* 1999; 285(5428):730-732.
- Wu J**, Lanier LL. Natural killer cells and cancer. *Adv Cancer Res.* 2003; 90: 127–156.
- Wu JD**, Atteridge CL, Wang X, Seya T, Plymate SR. Obstructing shedding of the immunostimulatory MHC class I chain-related gene B prevents tumor formation. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(2):632-640.

Wu X, Tao Y, Hou J, Meng X, Shi J. Valproic acid upregulates NKG2D ligand expression through an ERK-dependent mechanism and potentially enhances NK cell-mediated lysis of myeloma. *Neoplasia*. 2012; 14(12):1178-1189.

Y

Yamaguchi K, Chikumi H, Shimizu A, Takata M, Kinoshita N, Hashimoto K, Nakamoto M, Matsunaga S, Kurai J, Miyake N, Matsumoto S, Watanabe M, Yamasaki A, Igishi T, Burioka N, Shimizu E. Diagnostic and prognostic impact of serum-soluble UL16-binding protein 2 in lung cancer patients. *Cancer Sci*. 2012; 103(8):1405-1413.

Yamamoto K, Fujiyama Y, Andoh A, Bamba T, Okabe H. Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in a human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim Biophys Acta*. 2001; 1526(1):10-12.

Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, Kato-Kogoe N, Ohyama H, Nakasho K, Yamada N, Hata M, Fukunaga S, Futani H, Okamura H, Terada N. Valproic acid cooperates with hydralazine to augment the susceptibility of human osteosarcoma cells to Fas- and NK cell-mediated cell death. *Int J Oncol*. 2012; 41(1):83-91.

Yamanegi K, Yamane J, Kobayashi K, Ohyama H, Nakasho K, Yamada N, Hata M, Fukunaga S, Futani H, Okamura H, Terada N. Downregulation of matrix metalloproteinase-9 mRNA by valproic acid plays a role in inhibiting the shedding of MHC class I-related molecules A and B on the surface of human osteosarcoma cells. *Oncol Rep*. 2012; 28(5):1585-1590.

Yang F, Shao Y, Yang F, Liu M, Huang J, Zhu K, Guo C, Luo J, Li W, Yang B, Shi J, Zheng J. Valproic acid upregulates NKG2D ligand expression and enhances susceptibility of human renal carcinoma cells to NK cell-mediated cytotoxicity. *Med Sci*. 2013; 9(2):323-331.

Yang FQ, Liu M, Yang FP, Zhang XL, Yang B, Guo CC, Huang JH, Che JP, Yan Y, Zheng JH. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) mediates MHC class I polypeptide-related sequence A (MICA) shedding in renal cell carcinoma. *Actas Urol Esp*. 2014; 38(3):172-178.

Yohe S. Molecular Genetic Markers in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med*. 2015; 4(3):460-478.

Yu JL, Lv P, Han J, Zhu X, Hong LL, Zhu WY, Wang XB, Wu YC, Li P, Ling ZQ. Methylated TIMP-3 DNA in body fluids is an independent prognostic factor for gastric cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2014; 138(11):1466-1473.

Z

Zhang HG, Grizzle WE. Exosomes and cancer: a newly described pathway of immune suppression. *Clin Cancer Res*. 2011; 17(5):959-964.

Zhang HZ, Shan CG, Huang AP, Wang JM. Characterization of gene methylation in human papillomavirus associated-head and neck squamous cell carcinoma. *Genet Mol Res*. 2016; 15(3).

Zhang LY, Yuan YQ, Zhou DM, Wang ZY, Ju SG, Sun Y, Li J, Fu JX. Impact of Global and Gene-Specific DNA Methylation in de Novo or Relapsed Acute Myeloid Leukemia Patients Treated with Decitabine. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17(1):431-437.

Zhang X, Rao A, Sette P, Deibert C, Pomerantz A, Kim WJ, Kohanbash G, Chang Y, Park Y, Engh J, Choi J, Chan T, Okada H, Lotze M, Grandi P, Amankulor N. IDH mutant gliomas escape natural killer cell immune surveillance by downregulation of NKG2D ligand expression. *Neuro Oncol*. 2016; 18(10):1402-1412.

- Zhang X**, Yan L, Jiao W, Ren J, Xing N, Zhang Y, Zang Y, Wang J, Xu Z. The clinical and biological significance of MICA in clear cell renal cell carcinoma patients. *Tumour Biol.* 2016; 37(2):2153-2159.
- Zheng R**, Levis M, Piloto O, Brown P, Baldwin BR, Gorin NC, Beran M, Zhu Z, Ludwig D, Hicklin D, Witte L, Li Y, Small D. FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. *Blood.* 2004; 103(1): 267–274.
- Zhang X**, Yuan X, Shi H, Wu L, Qian H, Xu W. Exosomes in cancer: small particle, big player. *J Hematol Oncol.* 2015; 8:83.
- Zhu Z**, Lu X, Jiang L, Sun X, Zhou H, Jia Z, Zhang X, Ma L. STAT3 signaling pathway is involved in decitabine induced biological phenotype regulation of acute myeloid leukemia cells. *Am J Transl Res.* 2015; 7(10):1896-1907.
- Zocchi MR**, Camodeca C, Nuti E, Rossello A, Venè R, Tosetti F, Dapino I, Costa D, Musso A, Poggi A. ADAM10 new selective inhibitors reduce NKG2D ligand release sensitizing Hodgkin lymphoma cells to NKG2D-mediated killing. *Oncoimmunology.* 2015; 5(5):e1123367.
- Zou Y**, Mirbaha F, Stastny P. Contact inhibition causes strong downregulation of expression of MICA in human fibroblasts and decreased NK cell killing. *Hum Immunol.* 2006; 67(3):183-187.
- Zou Z**, Nomura M, Takihara Y, Yasunaga T, Shimada K. Isolation and characterization of retinoic acid-inducible cDNA clones in F9 cells: a novel cDNA family encodes cell surface proteins sharing partial homology with MHC class I molecules. *J Biochem.* 1996; 119(2):319-328.

VIII. ANEXOS

Esta Tesis ha sido realizada gracias a la financiación del Programa Severo Ochoa de Ayudas Predoctorales para la formación en investigación y docencia del Principado de Asturias para el año 2010 (BP10-116).

Otros trabajos publicados durante la realización de esta Tesis doctoral:

1. Fernández-Sánchez A, **Baragaño Raneros A**, Carvajal Palao R, Sanz AB, Ortiz A, Ortega F, Suárez-Álvarez B, López-Larrea C.
DNA demethylation and histone H3K9 acetylation determine the active transcription of the NKG2D gene in human CD8+ T and NK cells.
Epigenetics. 2013; 8:66-78.
2. Suárez-Álvarez B, **Baragaño Raneros A**, Ortega F, López-Larrea C.
Epigenetic modulation of the immune function: a potential target for tolerance.
Epigenetics. 2013; 8:694-702.
3. Suarez-Álvarez B, Rodríguez RM, Schlangen K, **Raneros AB**, Márquez-Kisinousky L, Fernández AF, Díaz-Corte C, Aransay AM, López-Larrea C.
Phenotypic characteristics of aged CD4+ CD28null T lymphocytes are determined by changes in the whole-genome DNA methylation pattern.
Aging Cell. 2017; 16:293-303.
4. Rodriguez RM, Suarez-Alvarez B, Lavín JL, Mosén-Ansorena D, **Baragaño Raneros A**, Márquez-Kisinousky L, Aransay AM, Lopez-Larrea C.
Epigenetic Networks Regulate the Transcriptional Program in Memory and Terminally Differentiated CD8+ T Cells.
J Immunol. 2017; 198:937-949.

IX. AGRADECIMIENTOS

Mucho tiempo ha pasado desde que pisé por primera vez el laboratorio de Inmunología y llegué con la ilusión de poder aportar mi granito de arena en el complicado mundo de la investigación. ¡Muchos momentos buenos y a la vez, algún que otro momento de creer que no podía, pero al final todo llega y por fin se ha acabado!

Mucha gente ha formado parte de esta etapa de mi vida y solo puedo decir...

GRACIAS A TODOS de corazón. Y en especial:

Quiero agradecer a mis directores de Tesis, **Carlos** y **Bea**, por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación y por poner a mi alcance todos los medios y recursos necesarios para la realización de esta tesis doctoral. Y sobre todo por grabarme en la frente que “el que quiere...puede”.

A mis compañeros actuales de laboratorio: **Jose**, **Ramón**, **Leo** y **Paula**. A Jose porque son muchos años aguantándonos mutuamente y siempre has estado ahí para ayudarme y echarme un cable cuando lo necesité. A Ramón porque siempre estás dispuesto a ayudarme con mis experimentos y por los momentos de los congresos, me lo he pasado genial. A Leo porque sin tus cánticos mañaneros el laboratorio no sería lo mismo. Y a Paula, pero.... ¡Qué gran descubrimiento! Somos el más vivo ejemplo de que una Sportinguista y una Carbayona pueden llevarse a las mil maravillas. Te quiero mucho “Pili”.

A todos aquellos que han pasado por el Laboratorio de Inmunología y ya no están, así como al Servicio de Inmunología. Y a todos aquellos que sin su colaboración esta tesis no habría sido posible.

Y como no... a los tres pilares de mi vida:

A *mis padres*, pero ¿qué haría yo sin vosotros? Sois mi bastón, mi fiel apoyo... siempre con la frase adecuada para darme ánimos para luchar y seguir adelante en el camino de la vida. Todo lo que soy os lo debo a vosotros.

A *David*, mi otra mitad. Porque tus abrazos han sido mi mejor refugio, aquel lugar donde todos mis “dramas experimentales” desaparecían. Cualquier cosa que diga será insuficiente para describir todo lo que significas para mí.

Habéis aguantado carros y carretas, pero al FIN se acabó. Ahora solo nos queda.... ¡¡CELEBRARLO!!

Y finalmente al resto de mi familia porque siempre estáis ahí para lo bueno y para lo malo. Y a los que ya no estáis, porque sé que allí donde estéis estaríais muy orgullosos de mí.

Si tú sabes lo que vales, ve y consigue lo que mereces, pero tendrás que soportar los golpes.