

Revisión de tema

# INMUNOTERAPIA A PARTIR DE LINFOCITOS T AUTORREACTIVOS MARCADOS CON ANTÍGENOS TUMORALES

Zackarie Rème Chastanet González<sup>1</sup>, Camilo Alberto Caicedo Montaña<sup>2</sup>

1. Estudiante V semestre, Facultad de Medicina, Fundación Universitaria Sanitas  
2. Médico, docente Facultad de Medicina, Fundación Universitaria Sanitas

## RESUMEN

Los linfocitos T de nuestro sistema inmune tienen la capacidad de reconocer potenciales amenazas para el organismo, tanto extrínsecas como intrínsecas. Algunas de estas células tienen cierto grado de reactividad contra antígenos propios, lo cual les permite modular la respuesta inmune contra células propias (regulando así la aparición de autoinmunidad) y contra células neoplásicas (como parte esencial de la respuesta antitumoral). Este grupo de linfocitos, denominados bajo la categoría de linfocitos T reguladores (Treg) son modulados a su vez por la actividad génica, siendo de forma típica la relación con el gen AIRE, a través del cual se puede codificar la expresión de factores de transcripción esenciales para sus funciones inmunorreguladoras. Recientemente se han descrito dos posibles vías para esta regulación mediada por el gen AIRE, una vía AIRE-dependiente y otra AIRE-independiente, y con el conocimiento de estas vías moleculares se abren posibilidades de inhibir o sobreestimar su expresión, pudiendo llegar a ser la clave para la mejora de la inmunoterapia anticancerosa. Este documento revisa estos fundamentos teóricos de las terapias antitumorales mediadas por linfocitos T.

**Palabras clave:** gen AIRE, autoantígenos, inmunoterapia, anticuerpos antineoplásicos, linfocitos T reguladores, antígenos tumorales.

Recibido: 8 de julio de 2015

Aceptado: 23 de mayo de 2016

Correspondencia: cacaicedo@unisanitas.edu.co

## IMMUNOTHERAPY USING AUTOREACTIVE T LYMPHOCYTES TARGETED TO TUMORAL ANTIGENS

### ABSTRACT

The T cells in our immune system are able to recognize potential threats to both extrinsic and intrinsic antigens, some of these cells have some degree of reactivity against autoantigens enabling them to modulate the immune response against cells themselves (thereby regulating the trigger of autoimmunity) and against neoplastic cells (as an essential part of the anti-tumoral response). This group of cells, known under the category of regulatory T cells (Treg) are up-regulated by the gene expression, typically being described the relationship with the AIRE group of genes, that codifies the expression of transcription factors (essential to their immunoregulatory functions). Recently, there had been described two possible ways for this regulation through AIRE genes, AIRE-dependent and AIRE-independent, and with the knowledge of both of these molecular pathways could be plausible to inhibit or overstimulate its expression, being the key to improve anticancer immunotherapy. This paper reviews the theoretical basis of these Treg-cell-mediated antitumoral therapies.

**Keywords:** AIRE genes, autoantigens, immunotherapy, antineoplastic antibodies, regulatory T cells, tumoral antigens.

### INTRODUCCIÓN

Debido al ciclo celular, un proceso fisiológico de los seres vivos, se acumulan mutaciones sucesivas que inducen la aparición de células potencialmente malignas que día tras día son identificadas y neutralizadas por la respuesta inmune innata. Sin embargo, en muchas ocasiones esta primera barrera no es lo suficientemente eficaz para combatir dichas células y como consecuencia podría llegar a generar proliferaciones anómalas de células, e incluso desdiferenciación, que de forma sucesiva podrían desencadenar el desarrollo de neoplasias.

Se ha demostrado que ciertos tipos de neoplasias son antígeno-específicas, puesto que las células tumorales tienen como precursoras las células sanas de diferentes tejidos del cuerpo y dependiendo de su localización en el organismo, estas células expresan antígenos específicos en mayor o menor medida; por lo tanto, cada célula tumoral dependiendo de su tejido “originario” expresará de manera similar algunos de los antígenos propios disponibles en su material genético-evolutivo e incluso podrían llegar a codificar ARN y proteínas que no deberían ser expresadas en condiciones normales

(1). A continuación expondremos los eventos sucesivos después de la aparición de estos antígenos tumorales en circulación, cómo la respuesta inmune es regulada para controlar esta amenaza y finalmente presentaremos los fundamentos teóricos que explican el posible uso de la inmunomodulación a través de las vías AIRE-dependientes y AIRE-independientes en la terapia antineoplásica.

### RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL

Una vez las células tumorales producen ARN y proteínas de forma anómala (antígenos tumorales), estos antígenos tumorales se comportan como un tipo de Patrones Moleculares Asociados al Daño (DAMP, *Damage-Associated Molecular Pattern*) y una vez ocurra su presentación en el ganglio linfático, activarán la respuesta inmune adaptativa y sus componentes celulares, los linfocitos T y los linfocitos B, generando una respuesta más específica para combatir las células neoplásicas. A continuación describiremos los obstáculos inmunes a los cuales se enfrenta una célula neoplásica, con especial énfasis a los linfocitos T, que restringen su supervivencia y funcionalidad para contrarrestar estas situaciones de adversidad.

El repertorio de los linfocitos T tiene dos subgrupos importantes que se mencionarán a lo largo del documento. El primer grupo, los linfocitos T CD8+ tienen una acción principal al ser en su gran mayoría linfocitos citotóxicos, es decir, que al momento de reconocer los péptidos expresados en la superficie de la célula tumoral, mediante el sistema del Antígeno Leucocitario Humano (HLA, *Human Leukocyte Antigen*) tipo I clásico, inducen la destrucción de la célula tumoral. Esta respuesta la pueden desencadenar a través de dos posibles mecanismos, el primero, la interacción de ligandos y receptores de muerte (Fas y Fas-L, por ejemplo) que al ser activados inducen de forma intracelular una vía de señalización que lleva a apoptosis de la célula tumoral; y la segunda, una vía de predominio extracelular, que requiere la liberación de perforinas que generen poros en la superficie de la célula tumoral, y sobre estos poros se depositen granzimas que permitan la lisis de la célula blanco, en este caso específico, la célula tumoral (2). La meta principal de la inmunoterapia mediada por linfocitos T CD8+ es encontrar derivados que sean altamente reactivos y específicos para antígenos tumorales y, de este modo, poder dirigir la terapia única y específicamente hacia las células neoplásicas seleccionadas.

El segundo subgrupo de linfocitos que mencionaremos son los linfocitos T CD4+, de los cuales se ha descrito que pueden tener menor grado de acción citotóxica, en comparación a las T CD8+, y cuya relevancia en la respuesta antineoplásica se limita a la ampliación de la respuesta inmune mediante la producción de citoquinas (1). Estas células reconocen péptidos presentados por el HLA tipo II, esta restricción impide que los linfocitos CD4+ generen un respuesta eficaz frente a células neoplásicas debido a que estas no la expresan, además de restricciones adicionales como la secreción de reguladores universales, como la interleucina 10 (IL-10) (3,4), que actúan en la autorregulación de los linfocitos T CD4+ impidiendo su reactividad sobre las células neoplásicas. Por lo tanto, el uso de linfocitos T CD4+ en la terapia antineoplásica ha sido limitado hasta el momento.

En relación a estos subgrupos mencionados debemos añadir una clasificación adicional: las células T reguladoras (Treg), que como su nombre lo indica controlan la

actividad de los linfocitos T, tanto por supresión clonal como por la expresión del factor de transcripción Foxp3+, frente a antígenos tanto extraños como propios (Tolerancia Dominante). Este documento se centrará en la acción de los linfocitos T CD8+ mas no específicamente en los Treg, debido a que la acción de las células T reguladoras puede modificar la eficacia de la respuesta de las células TCD8+ altamente reactivas al reconocer antígenos tumorales (5). Por lo tanto, los mecanismos supresores de estas células reguladoras incrementarían la actividad citotóxica de otras células hacia fenómenos neoplásicos. Queda aclarar, que no pueden ser eliminadas o bloqueadas por completo ya que deben seguir funcionales para regular la respuesta luego de la erradicación del tumor primario y prevenir la aparición de posibles enfermedades autoinmunes asociadas (6,7).

En esta revisión no-sistemática de la literatura se examinará la especificidad de los antígenos tumorales, su regulación y expresión genética, para esto, se hará énfasis en la funcionalidad del gen AIRE (*Auto-Immune REgulator*) encargado de la regulación de la presentación de los antígenos tanto propios como extraños. Además se señalarán las posibilidades de la inmunoterapia asociada a la respuesta mediada por linfocitos T CD8+ altamente reactivos. Tener conocimiento de lo anterior, proporciona un fundamento teórico del rol de los linfocitos T marcados contra antígenos tumorales en la inmunoterapia antineoplásica.

## REPERTORIO DE LINFOCITOS T IDENTIFICADORES DE ANTÍGENOS TUMORALES

Dentro de las categorías mencionadas de linfocitos, se pueden diferenciar algunos linfocitos T infiltrantes de tumores (LIT) que tienen la capacidad de reconocer antígenos tumorales y de lisar estas células, lo que les concede el control del crecimiento tumoral (8,9). Los genes, *MAGE-1*, *MAGE-3*, *BAGE* y *GAGE*, codifican antígenos tumorales identificados por los linfocitos T infiltrantes de tumores, estos antígenos son expresados en un repertorio amplio de células de diferentes tipos de melanoma, cáncer de pulmón, de vejiga y sarcomas, mas no expresado por las

células sanas, a excepción de los testículos y la placenta por ser sitios de privilegio inmunológico (Tabla 1) (10-13).

**TABLA 1. GENES QUE REGULAN LA IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS TUMORALES POR LOS LINFOCITOS INFILTRANTES DE TUMORES (LIT)**

FAMILIA DE GENES	NÚMERO DE GENES	LOCÍ	PERMITE IDENTIFICACIÓN DE ANTÍGENOS TUMORALES* DE:
Familia MAGE	40	Xq28 Xp11 15q11	Melanomas
Familia BAGE	2	21p11	Melanomas, cáncer de pulmón y vejiga
Familia BAGE	2	Xp11	Rabdomiosarcomas

Elaboración propia de los autores a partir de información de Boël (10).

\*Existen tejidos que expresan algunas de las proteínas codificadas por estos genes, por lo general sitios de privilegio inmunológico como los testículos y la placenta.

\*Adicionalmente hay tejidos de los cuales no se ha podido demostrar su expresión, por ejemplo, las glándulas mamarias (14).

De igual forma, estudios liderados por Hewitt y colaboradores confirman lo anterior, mencionando la existencia de antígenos específicos para ciertos tumores, aunque excluyendo algunos, como el cáncer de mama, que bajo los mismos métodos no expresan estos antígenos (14).

Las demostraciones previas sugieren que las modificaciones transcripcionales de los genes mencionados y la identificación de los antígenos tumorales que estos codifican, siendo estos compartidos por otros tumores más no expresados en las células sanas, generarían nuevas posibilidades de objetivos farmacológicos para la inmunoterapia antineoplásica (15).

### VÍAS DE REGULACIÓN INMUNOLÓGICA ANTITUMORALES: LAS RUTAS AIRE-DEPENDIENTE Y AIRE-INDEPENDIENTE

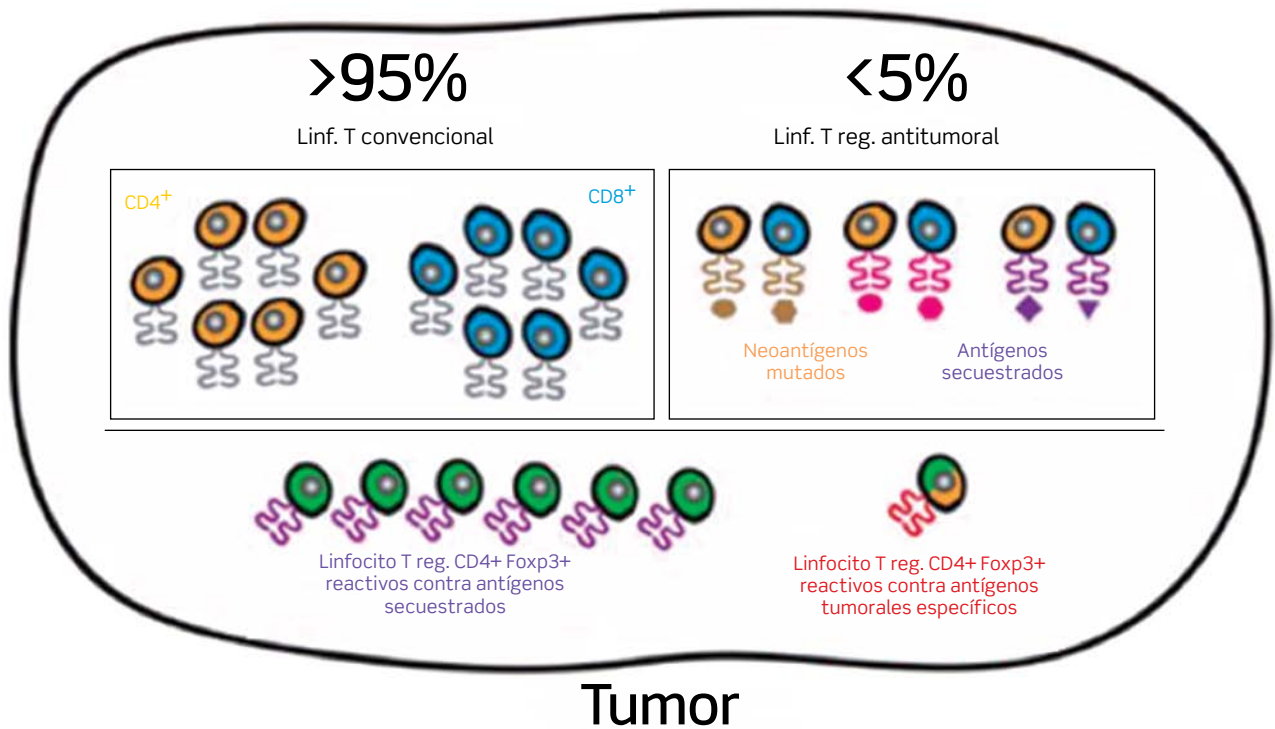
Yee y colaboradores, demostraron la acción citotóxica de los linfocitos T CD8 + , mediante multipolímeros de péptido/HLA para expandir o disminuir la afinidad de estas células por los antígenos tumorales (16). Esta afinidad por los antígenos tumorales depende de tres factores: 1) de la concentración de los antígenos tumorales, 2) de la capacidad de reconocimiento de los antígenos por parte del linfocito y 3) de la regulación inmune estimulada,

especialmente aquella dada por acción del gen AIRE. El siguiente apartado profundiza en el rol de esta modulación génica y sus implicaciones en el control antineoplásico por parte del sistema inmune.

Los resultados del mencionado estudio de Yee y colaboradores, concluyeron que una baja afinidad al antígeno puede permitir atacar la célula tumoral pero no necesariamente eliminarla, en contraste una alta afinidad, ataca y lisa la célula. Lo anterior demuestra que generar células autorreactivas contra células neoplásicas promete una respuesta más efectiva, no obstante, estas células son supremamente escasas, al interior del tumor, clasificadas como incluso el 5% del repertorio de células T únicas en tener tal especificidad frente a antígenos tumorales; el 95% restante son totalmente irrelevantes o generan algún tipo de regulación que impediría la efectividad y especificidad mencionada anteriormente (Figura 1). Asimismo, los estudios liderados por Valmori y colaboradores confirman que sometiendo el 5% de células T CD8 + , específicas para antígenos tumorales, a las citocinas IL-7 y IL-10 (17,19), el reducido porcentaje podría incrementarse, generando células T CD8 + de alta afinidad y por lo tanto se incrementa la respuesta inmune ante el antígeno tumoral presentado. Lo mencionado anteriormente, fue puesto a prueba en pacientes con melanoma por Ferone y colaboradores con resultados, la mayoría, exitosos (16-18). Las conclusiones de dichas pruebas permitirían afirmar que a pesar que las células T CD8 + reactivas contra antígenos tumorales constituyan menos del 5% de los tejidos afectados, podrían sufrir expansión clonal inducida y optimizar la respuesta antitumoral *in vivo*, inicialmente en pacientes con melanoma, pero en un futuro podrían ser utilizados en otros tipos de neoplasias.

Teniendo en cuenta que sólo el 5% de las células T logran tener esta actividad, se pueden diferenciar en dos grupos de acuerdo a la activación o no del gen AIRE, que se convierte en un factor determinante de la afinidad por el antígeno tumoral. Savage y colaboradores proponen una clasificación en ese sentido (1), en primer lugar, un tipo de tolerancia inmunológica denominada AIRE-dependiente, que requiere la presentación de autoantígenos por las células epiteliales tímicas medulares (mTEC) y es principalmente mediada en la periferia por linfocitos T

FIGURA 1. Porcentaje de células T infiltrantes de tumor



Adaptado por los autores a partir de Savage (1). Modelo que ejemplifica la distribución del porcentaje de células T infiltrantes de tumores, por resultados del seguimiento de un melanoma infiltrado por este tipo de linfocitos (21, 22), que demostró que la frecuencia de linfocitos específicos para antígenos tumorales es limitada, menor a 5%, mientras los linfocitos específicos para antígenos convencionales y desconocidos muestran un porcentaje mayor al 95%. (1,16).

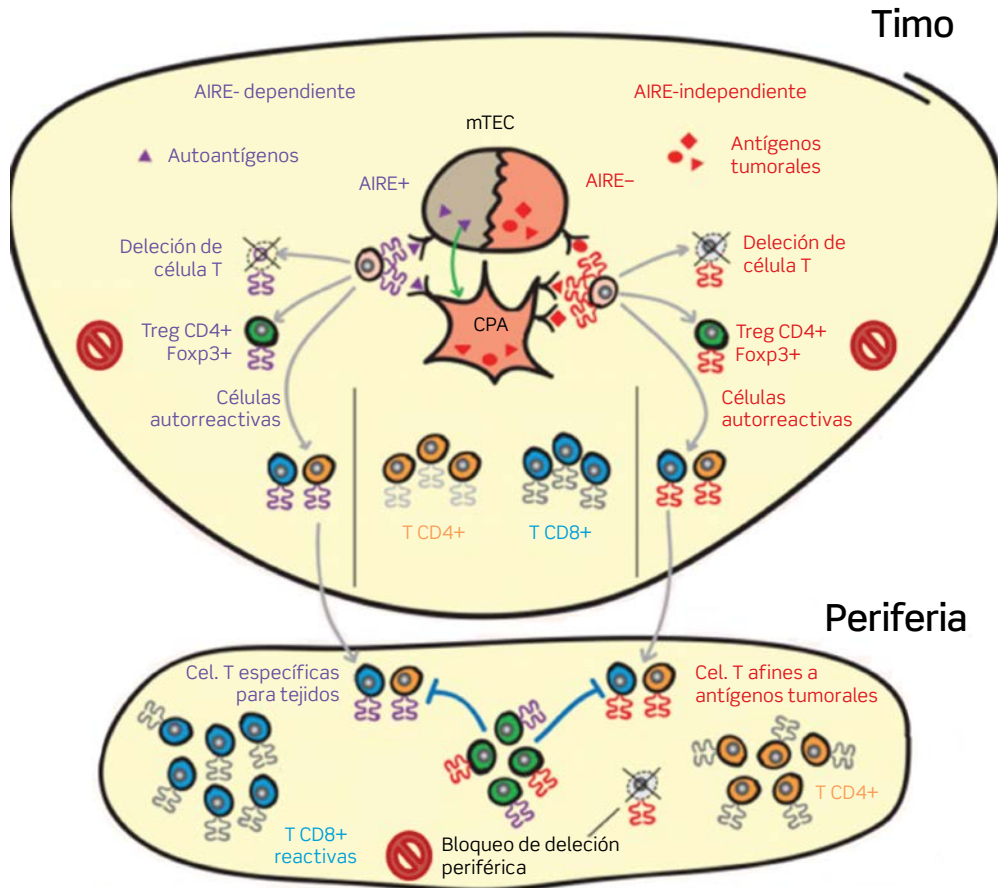
CD8+ y permite el desarrollo de células Treg Foxp3+ / + (Figura 2, cuadro inferior izquierdo). Esta ruta AIRE-dependiente parece estar en relación con el control de células neoplásicas en vísceras macizas principalmente (20,21) (Tabla 2).

En comparación, se ha propuesto una tolerancia inmunológica por una segunda vía, la vía AIRE-independiente que está mediada en gran medida por los linfocitos T CD4+ en la periferia (Figura 2, cuadro inferior derecho) que reconocen un mayor repertorio de antígenos

TABLA 2. MECANISMOS DE TOLERANCIA INMUNE AIRE-DEPENDIENTE Y AIRE-INDEPENDIENTE		
CARACTERÍSTICA	TOLERANCIA INMUNE AIRE-DEPENDIENTE (AIRE <sup>+/+</sup> )	TOLERANCIA INMUNE AIRE-INDEPENDIENTE (AIRE <sup>-/-</sup> )
Antígenos	Restringidos a tejidos y presentados en ganglios linfáticos, o Presentados por células epiteliales tímicas medulares (mTECs)	Dispersos
Células	Linfocitos T CD8+ reactivos a antígenos de tejidos específicos	Linfocitos T CD4+ reactivos a múltiples antígenos
Posibles respuestas	1. Selección negativa 2. Desarrollo de células Treg Foxp3+/ 3. Escape de la selección negativa	1. Desarrollo de células Treg Foxp3+/-
Control del cáncer	Control de neoplasias en vísceras sólidas	Control de neoplasias en vísceras huecas y otros tipos de tejidos

Elaboración propia de los autores a partir de la información de Savage (1) y Yee (16).

FIGURA 2. Tolerancia inmune a través de las vías AIRE-dependiente y AIRE-independiente



Adaptado por los autores a partir de Savage (1,5). Modelo que ejemplifica los mecanismos de tolerancia central y periférica si se modificara el gen AIRE expresado por las células epiteliales tímicas medulares (mTEC en inglés). Durante la tolerancia central en el timo las mTECs con la ayuda de las células presentadoras de antígenos (CPA), presentan los antígenos a los linfocitos T. Una vez el antígeno es reconocido pueden suceder tres acontecimientos: 1) Selección negativa, 2) Diferenciación del linfocito T a un linfocito T regulador (Treg) o 3) Aparición de linfocitos reactivos que evaden los mecanismos de delección clonal. Respecto a esta última vía, las posibles modificaciones transcripcionales del gen AIRE para que este incrementara el reconocimiento de antígenos tumorales por las células Treg (señalado con una equis roja), permitiría el aumento de células T autorreactivas contra los antígenos tumorales en circulación periférica. Acorde a Yee y colaboradores es pertinente realizar nuevos estudios que confirmen esta posible utilidad como terapia antineoplásica (1).

tumorales y podrían estar en relación con el control de células neoplásicas de vísceras huecas y otros tipos de tejidos como la piel y las células hemáticas. Los autores de dicho estudio reconocen la necesidad de realizar nuevos estudios que confirmen esta clasificación y su posible utilidad en terapia antineoplásica (22).

Como ya se mencionó anteriormente, el gen AIRE es una clave fundamental para el reconocimiento de los antígenos tumorales, y posibles modificaciones *in vitro* en este, y en los mecanismos de tolerancia central y periférica, expandan su funcionalidad permitiendo que los antígenos tumorales sean mayormente visualizados

por los linfocitos T infiltrantes de tumores (LIT) amplificando la protección antineoplásica por parte de estos últimos (23) y aportando nuevos elementos conceptuales a la inmunología en la lucha contra el cáncer. Aunque, es necesario tener en cuenta que mutaciones sobre el gen AIRE pueden generar autoinmunidad (24, 25), por lo tanto deben realizarse nuevos estudios para poder ejecutar las modificaciones transcripcionales del gen AIRE para promover la respuesta antineoplásica sin generar autoinmunidad, creando mayor seguridad para el paciente y optimizando la inmunorregulación antineoplásica.

## CONCLUSIONES

Con las investigaciones disponibles en la actualidad se pueden aportar nuevos elementos conceptuales a la inmunoterapia antineoplásica, en primer lugar la existencia de genes como los de las familias MAGE, BAGE y GAGE que codifican para antígenos tumorales específicos y su reconocimiento por linfocitos T (en especial T CD8+ y LIT) ha sido fundamental en el desarrollo de inmunobiológicos. Adicionalmente la inducción de los linfocitos T CD8+ autorreactivos anti-células neoplásicas, modificando sus mecanismos de tolerancia central y periférica podría ser fundamental para mejorar la efectividad de dicha inmunoterapia. Estos elementos conceptuales deben complementarse con nuevos estudios que permitan dilucidar el rol de la tolerancia inmunológica AIRE-dependiente y AIRE-independiente. Por último es pertinente resaltar que la posibilidad de encontrar antígenos que sean compartidos entre neoplasias permite que las patentes de inmunoterapia sean universales, de igual forma también se puede trabajar en aquellos antígenos que son específicos de tejido para crear nuevos inmunobiológicos

cada vez más específicos y con mejores resultados para el tratamiento de los pacientes.

## AGRADECIMIENTOS

ZRC: A mi mamá por hacer todo lo posible para que pueda ser médico, y por supuesto a mi colaborador CCM por darme parte de su tiempo para que este artículo fuera posible.

## DECLARACIÓN DE CONFLICTO DE INTERESES

Los autores del artículo “Inmunoterapia a partir de células T autorreactivas marcadas con antígenos tumorales” declaramos que al momento de la elaboración y de la remisión del trabajo no tenemos ningún conflicto económico, comercial, personal o de cualquier otro tipo.

## FINANCIACIÓN

Los autores declaramos no tener ninguna fuente de financiación para la realización del artículo.

## REFERENCIAS

1. Savage PA, Malchow S, Leventhal DS. Shaping the repertoire of tumor-infiltrating effector and regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2014 May; 259(1): 245–258.
2. Baas M, Besancon A, Goncalves T, et al. TGFβ-dependent expression of PD-1 and PD-L1 controls CD8+T cell anergy in transplant tolerance. *eLife.* 2016; 5: e08133.
3. Saito K, Pignon P, Ayyoub M, Valmori D. Modulation of Cytokine Secretion Allows CD4 T Cells Secreting IL-10 and IL-17 to Simultaneously Participate in Maintaining Tolerance and Immunity. *PlosONE.* 2015. 10.1371/journal.pone.0145788.
4. Nova-Lamperti E, Fanelli G, Hernández-Fuentes MP, et al. IL-10-produced by human transitional B-cells down regulates CD86 expression on B-cells leading to inhibition of CD4+T-cell responses. *Sci Rep.* 2016; 6:20044.
5. Savage PA, Malchow S, Leventhal DS. Basic principles of tumor-associated regulatory T cell biology. *Trends in Immunology.* 2012 Sep.
6. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001; 27(1): 20–21.
7. Gavin MA, Togerson TR, Houston E, et al. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(17): 6659–666.
8. Renkvist N, Castelli C, Pamiani G. A listing of human tumor recognized by T cells. 2015 Jun (7): 4.
9. Van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science.* 1991 Dec 13. 254: 1643.

10. Boël, P., C. Wildmann, M.-L. Sensi, R. Brasseur, J.-C. Renauld, P. Coulie, T. Boon, and P. van der bruggen. 1995. BAGE, anew gene encoding antigen recognized on human melanomas by cytolic T lymphocytes. *Immunity*. 2 :167-175
11. Brasseur, F.,D. rimoldi, D. Liénard, B. Lethé, S. Carrel, F. Arenti, L. Suter, R. Vanwijck,A. Bourlond, Y. Humblet, A. Vaccas, et al. 1995. Expression of MAGE genes in primary and metastatic cutaneous melanoma. *Int. J. Cancer*. 56 :826-829
12. Gaugler, B., B. Van den Eynde, P. van der Bruggen, P. Romero, J.J. Gafotio, E. De laen, B. Lethé, F. Brasseur, and T. Boon. 1994. Human gene MAGE-3 codes for an antigen recognized on a melanoma by autologous cytolytic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 170 ;921-930
13. HUGO Gene Nomenclature Committee. Artículos genes: AIRE, MAGE, BAGE, GAGE. Fecha de consulta: 11 de febrero de 2016.
14. Hewitt HB, Blake ER, Walder AS. A critique of the evidence for active host defense against cancer, based on personal studies of 27 murine tumors of spontaneous origin. *Br J Cancer*. 1976 Mar.33:241.
15. Boon, T., van der Bruggen, P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *The Journal of experimental medicine*, 1996; 183(3), 725-729.
16. Yee C, Savage PA, Lee PP, et al. Isolation of high avidity melanoma- reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers. *J Immunol*. 1999 Feb 15. 162: 2227.
17. Tsai, V., I. Kawashima, E. Keogh, K. Daly, A. Sette, E. Celis. 1998. In vitro immunization and expansion of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes for adoptive immunotherapy using peptide-pulsed dendritic cells. *Crit. Rev. Immunol*. 18: 65
18. Romero P, et al. Ex vivo staining of metastatic lymph nodes by class I major histocompatibility complex tetramers reveals high numbers of antigen-experienced tumor-specific cytolytic T lymphocytes. *J Exp Med*. 1998 Nov 2.188:1641.
19. Chan IH, Wu V, McCauley S, Grimm EA, Mumm JB. IL-10: Expanding the Immune Oncology Horizon. *Receptors & clinical investigation*. 2015;2(4):1041.
20. Perniola R, Musco G. The biophysical and biochemical properties of the autoimmune regulator (AIRE) protein. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Feb; 1842(2): 326-37.
21. Ferrone S, Marincola FM. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today*. 1995; 16: 487-494.
22. Kvistborg P, et al. TIL therapy broadens the tumor-reactive CD8 (+) T cell compartment in melanoma patients. *Oncoimmunology*. 2012 Jul 1.1:409.
23. Andersen RS, et al. Dissection of T-cell antigen specificity in human melanoma. *Cancer Res*. 2012 Apr 1.72:1642.
24. Su MA, et al. Mechanisms of an autoimmunity syndrome in mice caused by a dominant mutation in AIRE. *J Clin Invest*. 2008 May.118:1712.
25. Kuroda N, et al. Development of autoimmunity against transcriptionally unrepressed target antigen in the thymus of AIRE-deficient mice. *J Immunol*. 2005 Feb 15.174:1862.