



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE CIENCIAS

**BASES MOLECULARES DE LA PÉRDIDA TOTAL DE EXPRESIÓN DE
MOLÉCULAS HLA DE CLASE I Y PÉRDIDA SELECTIVA DE B44 EN
TUMORES DE COLON**

Memoria presentada por D^a. Carmen M.
Cabrera Morales para optar al Grado de Doctor en
Bioquímica por la Universidad de Granada.

Granada, Julio de 2003

El presente trabajo, "**Bases moleculares de la pérdida total de expresión de moléculas HLA de clase I y pérdida selectiva de B44 en tumores de colon**", presentado por D^a. Carmen M. Cabrera Morales para optar al grado de Doctor, ha sido realizado bajo la dirección de los Drs. Francisco Ruiz-Cabello Osuna y Miguel Ángel López Nevot, en el Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada.

Revisado el texto, damos nuestra conformidad para su presentación y valoración.

Granada, 7 de Julio de 2003.

Dr. Francisco Ruiz-Cabello Osuna
Facultativo Especialista de Área
Hospital Universitario Virgen de las Nieves
Profesor asociado de la Universidad de Granada

Dr. Miguel Ángel López Nevot
Facultativo Especialista de Área
Hospital Universitario Virgen de las Nieves

A mis padres y hermanos

*No hay nada vivo más sencillo que una célula
y nada puede llegar a ser más complejo
sin comenzar por ser una célula.*

M. Hoagland

AGRADECIMIENTOS

-A los Drs. Federico Garrido y Francisco Ruiz-Cabello por darme la oportunidad de realizar esta tesis doctoral.

-A mi tutor y codirector de tesis Miguel Ángel, que me ha aconsejado y aleccionado en tantas dudas y dificultades que me han surgido durante la realización de este trabajo y durante mi periodo de residencia. Por sus enriquecedoras conversaciones y por su visión crítica y particular sobre el campo de la Inmunología.

-A la Dra. Teresa Cabrera, con quien comencé la realización de este trabajo. Por su paciencia en los problemas y dificultades surgidos.

-A Carmen Martín, por ser la persona amable y generosa con quién he compartido habitación durante éste tiempo, además de buenos y malos ratos.

-A todas las personas que de alguna u otra forma han colaborado y ayudado en la realización de ésta tesis.

-A mis abuelos José Antonio y Maria Jesús, que aunque hace ya tiempo que se marcharon, su ejemplo de vida y sacrificio han sido y serán siempre referente en todo lo emprendido, y que espero pueda desarrollar en un futuro.

-A Jesús, Raquel y Manuel, por ser los mejores hermanos que se pueden tener, por vuestro apoyo y cariño, y por haber tenido que aguantarme durante todo éste tiempo.

ÍNDICE

1. Introducción

1.1. Oncogénesis en el cáncer colorrectal	Pag. 15
1.1.1. Vía APC/ β -catenina	Pag. 19
1.1.2. Vía de reparación de desemparejamientos de bases de DNA (MMR)	Pag. 28
1.1.3. La vía TGF β /SMAD	Pag. 35
1.1.4. Eventos genéticos adicionales implicados en el desarrollo tumoral	Pag. 36
1.1.5. Inestabilidad genómica en la progresión del cáncer colorrectal	Pag. 37
1.2. Inmunoevasión: implicaciones del defecto de expresión de moléculas HLA-I	
1.2.1. De la inmunovigilancia al escape tumoral	Pag. 42
1.2.2. Generación de fenotipos de "escape tumoral": selección de variantes tumorales ...	Pag. 49
1.2.2.1. Pérdida o defecto de expresión de moléculas MHC de clase I	Pag. 49
1.2.2.2. Ausencia de coestimulación	Pag. 54
1.2.2.3. Citoquinas inmunosupresoras	Pag. 54
1.2.2.4. Señalización defectiva a través de los receptores de muerte	Pag. 55
1.2.2.5. Apoptosis de linfocitos T activados	Pag. 55
1.2.3. Moléculas MHC de clase I: procesamiento y presentación antigénica	Pag. 57
1.3. Inmunoterapia en el cáncer de colon	Pag. 67
1.3.1. Epitopos antigénicos asociados a moléculas HLA de clase I en tumores colorrectales	Pag. 68
1.3.2. Inmunoterapia activa	Pag. 71
1.3.3. Inmunoterapia adoptiva	Pag. 73
1.4. Referencias	Pag. 75

2. Objetivos	Pag. 101
---------------------------	----------

3. Mecanismos moleculares implicados en la pérdida total de moléculas HLA de clase I (fenotipo I) en tumores de colon	Pag. 103
--	----------

4. Alteración del patrón nuclear de los cuerpos de PML en tumores de colon con defecto de expresión de LMP7	Pag. 133
--	----------

5. Pérdida selectiva de HLA-B44 en tumores colorrectales	Pag. 147
---	----------

6. Discusión general	Pag. 173
-----------------------------------	----------

7. Conclusiones	Pag. 187
------------------------------	----------

8. Apéndice	Pag. 191
--------------------------	----------

1

Introducción

1.1. Oncogénesis en el cáncer colorrectal

La progresión tumoral en colon implica la alteración de tres tipos de genes: genes supresores de tumores, genes reparadores de DNA y protooncogenes. Los genes supresores de tumor son aquellos que previenen el crecimiento tumoral directamente a través del control que ejercen sobre el crecimiento y la división celular, como p53, Rb y APC (adenomatous poliposis coli). La inactivación de estos genes contribuye directamente al crecimiento neoplásico, por esta razón se los conoce como genes "gatekeepers". Ya que la restauración de la función *gatekeeper* perdida en las células tumorales conlleva la supresión del crecimiento tumoral.

Además de estos genes supresores de tumor tradicionales hay que considerar a otros genes de susceptibilidad que indirectamente suprimen la neoplasia. Son genes que codifican proteínas reparadoras del DNA y que actúan como "caretakers" del genoma. Como consecuencia de la inactivación de un gen *caretaker* se aumenta enormemente la tasa de mutación de la célula, lo que equivaldría a una exposición constante frente a mutágenos. No es sorprendente por lo tanto que tales defectos conduzcan a cáncer, sin embargo la restauración de la función *caretaker* no necesariamente afecta al crecimiento tumoral.

Igualmente, la ganancia de la función génica de determinados protooncogenes (k-ras y β -catenina) que se activan de forma inapropiada contribuye a la proliferación celular en colon.

En el cáncer de colon es justamente la pérdida de la función génica de APC la que dispara el proceso tumoral, situándose en el origen del mismo. La mayoría de los casos ocurren de forma esporádica y en un pequeño porcentaje (5-10%) aparecen formando parte de síndromes gastrointestinales hereditarios autosómicos dominantes (**Tabla 1**). En cualquier

caso, todos ellos se caracterizan por la aparición de una lesión precursora o pólipo que dependiendo del tipo de que se trate (adenomatoso o hamartoma) tendrá un mayor o menor riesgo de progresión hacia carcinoma.

Considerando la hipótesis de progresión multipaso de Voglstein y col. (1), la inactivación del gen APC en el pólipo adenomatoso daría paso a la aparición de mutaciones inactivadoras en el oncogen K-ras en la fase de adenoma avanzado y la aparición de mutaciones en el gen supresor de tumores p53. Dentro de este esquema, habría que considerar además la inactivación de los genes que intervienen en la reparación de los errores de apareamiento de bases del DNA (MMR) (genes *caretakers*) que ocurre en aquellos tumores de colon que presentan inestabilidad de microsatélites (MSI).

Los pólipos adenomatosos característicos de la poliposis familiar hereditaria (FAP), síndrome de Gardner, síndrome hereditario no-polipósico (HNPCC) y de tumores de colon esporádicos, consisten fundamentalmente en células epiteliales transformadas. A diferencia de los pólipos tipo hamartoma del síndrome de Peutz-Jeghers (PJS) y del síndrome polipósico juvenil (JPS), más benignos que raramente evolucionan hacia adenoma y en donde el componente proliferativo mayoritario es el estromal.

La poliposis familiar hereditaria se caracteriza por la presencia de cientos a miles de pólipos adenomatosos diseminados por colon y recto. Los pólipos aparecen en la infancia, e invariablemente experimentan una transformación maligna que suele ocurrir alrededor de los 40 años de edad. Todos ellos presentan mutaciones que generan codones stop y aparición de una proteína APC truncada. Los pacientes de FAP, presentan además un riesgo alto de padecer tumores extra-colónicos, incluyendo el carcinoma papilar de tiroides,

adenocarcinoma pancreático y pólipos intestinales pre-malignos. Otras lesiones asociadas incluyen la aparición de tumores desmoides, hipertrofia congénita del epitelio pigmentado de la retina y quistes epidermoides. El síndrome de Gardner se caracteriza igualmente por la aparición de pólipos colorrectales, osteomas, quistes epidermoides y fibromas de piel.

Los tumores hereditarios no-polipósicos se asocian con un comienzo temprano de la enfermedad, siendo la edad media de aparición de 44 años. Están originados por mutaciones en los genes MMR, y se caracterizan por el desarrollo de un gran número de pólipos adenomatosos normalmente en la región colónica proximal o ascendente. Suelen ser tumores mucosos y pobremente diferenciados que aparecen en ambos sexos con igual frecuencia. Este síndrome presenta además una mayor incidencia de carcinoma de endometrio, estómago y ovario con respecto al cáncer colorrectal esporádico.

A pesar de que la secuencia adenoma-carcinoma (1) se puede considerar como un modelo canónico en biología tumoral, sobre la base del mismo se originan diferentes vías y mecanismos que dan lugar a tumores con características propias dentro del espectro del cáncer colorrectal: vía APC/ β -catenina; vía de reparación de desemparejamientos de bases (MMR); y vía TGF β /SMAD (**Tabla 2**).

Tabla 1. Síndromes polipósicos gastrointestinales hereditarios

Síndrome	Gen	Localización	Distribución de pólipos	Tipo histológico	Lesiones asociadas
FAP	APC	5q21	Colon	Adenoma	Carcinoma papilar de tiroides
Síndrome de Gardner	APC	5q21	Colon, intestino delgado	Adenoma	Osteomas, fibromas, lipomas, quistes epidermoides, cánceres ampulares
HNPCC	hMSH2 hMSH6 hMLH1 hPMS1 hPMS2	2p22-21 2p16 3p21 2q31-33 7p22	Colon (proximal)	Adenoma	Tumores de endometrio y ovario
PJS	STK11/LKB1	19p13.3	Intestino delgado, colon y estómago	Hamartoma	Pigmentación mucocutánea, tumores de ovario, mama, páncreas y endometrio
JPS	SMAD4 BMPR1	18q21.1 10q21-q22	Intestino delgado, colon y estómago	Hamartoma	Varios defectos congénitos

Abreviaturas: FAP, poliposis familiar hereditaria; HNPCC, síndrome hereditario no-polipósico; PJS, síndrome de Peutz-Jeghers; JPS, síndrome polipósico juvenil.

Tabla 2. Prevalencia de mutaciones en cáncer colorrectal

Gen	Localización cromosómica	Prevalencia de mutaciones	
Oncogenes			
KRAS2	12p	~50%	Mutaciones puntuales activadoras en los codones 12 y 13
CTNNB1	3p22	~4-15%	Identificadas en el 50% de los tumores sin mutaciones en APC; la mayoría aparecen en los sitios de fosforilación de GSK-3 β
Genes supresores de tumores			
APC	5p21	~70%	La mayoría ocurren en el estadio de adenoma temprano, produciendo proteínas truncadas
TP53	17p13	~50-70%	Raramente identificadas en la fase de adenoma avanzado
SMAD4	18q21	16%	Más del 70% de los tumores presentan LOH en 18q
SMAD2	18q21	6%	
DCC	18q21	3%	
Genes MMR			
hMSH2	2p21	~15% ^a	Más del 90% de las mutaciones germinales se han identificado en hMSH2 o hMLH1; en tumores esporádicos MSI se ha descrito hasta un 26% de mutaciones somáticas de hMSH2
hMLH1	3p21		
hPMS1	2q31-33		
hPMS2	7p22		
hMSH6	2p21		

^a15% de los tumores de colon presentan inestabilidad de microsatélites o MSI.

1.1.1. Vía APC/b-catenina

El gen APC se clonó por primera vez en 1991, pertenece al locus 5q21 y codifica una proteína de 2843 Aa y 310 kDa (2, 3). Está constituido por 15 exones y no solamente es responsable de FAP y síndrome de Gardner cuando aparece mutado en la línea germinal, sino que más del 80% de los tumores de colon esporádicos presentan mutaciones somáticas del mismo. Actuando por tanto como un gen supresor de tumores crítico para el inicio del proceso tumoral.

De acuerdo con el modelo de inactivación de Knudson (4), las mutaciones en una copia del gen APC suelen aparecer conjuntamente con deleciones cromosómicas en el segundo alelo salvaje. Sin embargo, la inactivación bialelica puede ocurrir por rutas alternativas. Así, en algunos tumores de pacientes FAP que presentan una mutación germinal de APC, no se observan deleciones del alelo salvaje. Más bien hay deleciones del alelo mutado de la línea germinal, acompañado por mutaciones somáticas en el segundo alelo.

Independientemente del mecanismo por el cual se adquieren las mutaciones en APC, más del 90% de las mismas producen codones sin sentido prematuros que conllevan a la producción de una proteína truncada (5, 6). Este hecho permite emplear para la detección de este tipo de mutaciones, el denominado test de la proteína truncada (PTT). Se basa en la amplificación de cDNA (vía RT-PCR a partir de mRNA) utilizando un primer en forward que lleva en su extremo 5' un promotor T7 seguido de una secuencia eucariota de inicio de traducción (secuencia kozak) con un codon de inicio ATG. Después de la amplificación el producto de PCR se incorpora a un sistema *in vitro* de transcripción-traducción. Para la detección, se suele emplear un Aa marcado que suele

ser Met (metionina), Leu (leucina) o Cys (cisteína). Los polipéptidos así amplificados se separan por tamaño mediante electroforesis en gel SDS-PAGE. De tal modo que las mutaciones que resultan en codones de parada generan proteínas de menor tamaño en comparación con la proteína salvaje.

Según el modelo tumoral multipaso (1), las alteraciones en el gen APC están presentes en la lesión polipósica incipiente no aumentando su prevalencia en el estadio tumoral avanzado. En determinadas familias con mutaciones germinales en APC se han podido establecer ciertas correlaciones entre genotipo y fenotipo. Así, mutaciones entre los codones 463 y 1387 se asocian con hipertrofia congénita del epitelio pigmentado de la retina (7). Mutaciones entre los codones 1445 y 1578 aumentan el riesgo de padecer la formación de tumores desmoides (8). Y mutaciones próximas al codon 157 (9) y al codon 1900 (10) se asocian con una forma atenuada de FAP, en la que aparecen muy pocos pólipos retrasándose la edad de aparición hasta los 60 años. Igualmente se ha encontrado que determinados polimorfismos se asocian con un incremento del riesgo de cáncer colorrectal. Los individuos que tienen el polimorfismo I1307K (cambio de una T por una A en el nucleótido 3920) tienen un riesgo dos veces mayor de desarrollar cáncer de colon con respecto a la población general (11).

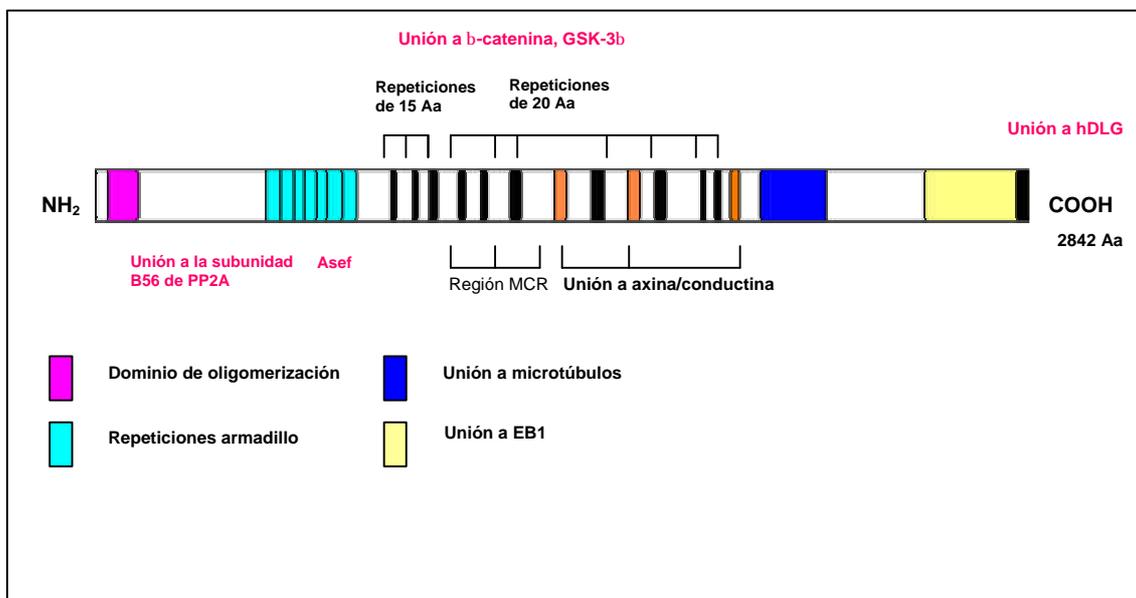
El producto del gen APC codifica una proteína con múltiples dominios funcionales que median tanto la oligomerización como la unión a varias proteínas intracelulares incluyendo: β -catenina, γ -catenina, la enzima glucógeno-sintetasa quinasa (GSK-3 β), axina, tubulina, EB1 y hDLG (12). El progreso en la comprensión de la función de la proteína APC ha sido posible gracias al estudio de su interacción con GSK-3 β y β -

catenina, las cuales forman parte de la ruta de señalización Wingless (Wnt) que fue primero caracterizada en *Drosophila* y ratón.

Estudios inmunohistológicos han observado que la proteína APC suele encontrarse difusamente distribuida en el citoplasma, aunque puede además localizarse tanto en las regiones apicales como laterales de las células epiteliales (13). La proteína APC participa en un gran número de funciones celulares incluyendo proliferación, diferenciación, apoptosis, adhesión, migración y segregación cromosómica (14). Hasta la fecha, la cuestión que queda sin resolver es cual de estas funciones está implicada críticamente en el proceso tumoral cuando el gen APC está inactivado. Una pista para resolver esta cuestión proviene del conocimiento de las proteínas que interaccionan con APC (**Figura 1**). Así por ejemplo, la región N-terminal, se une a la subunidad reguladora B56 de la enzima protein-fosfatasa 2A (15) y a un factor intercambiador de guanina estimulado por APC denominado Asef (APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor) (16). Ambas proteínas parecen estar implicadas en la ruta Wnt, de la cual APC es componente. Otro dominio importante incluye tres repeticiones de 15 Aa que interaccionan con la β -catenina y 7 repeticiones de 20 Aa requeridos para la regulación de β -catenina (17, 18). APC presenta además sitios de unión para axina y conductina, que son dos proteínas inhibitoras de la ruta de señalización Wnt (19, 20). La porción C-terminal de la proteína está implicada en la unión con microtúbulos y con la proteína de unión a microtúbulos EB1 (21). Por último, la proteína APC tiene señales nucleares de importe y exporte, sugiriendo que los diferentes patrones de distribución entre el núcleo y el citoplasma pueden ser igualmente importantes para su función (22, 23).

El análisis mutacional del gen APC indica que más del 60% de las alteraciones se encuentran en la región central de la proteína (entre los codones 1284-1580), región que recibe el nombre de MCR (mutation cluster región) (24). La región MCR coincide con la región de unión a β -catenina, indicando que la función relacionada es muy importante para la patogénesis del cáncer colorrectal.

Figura 1

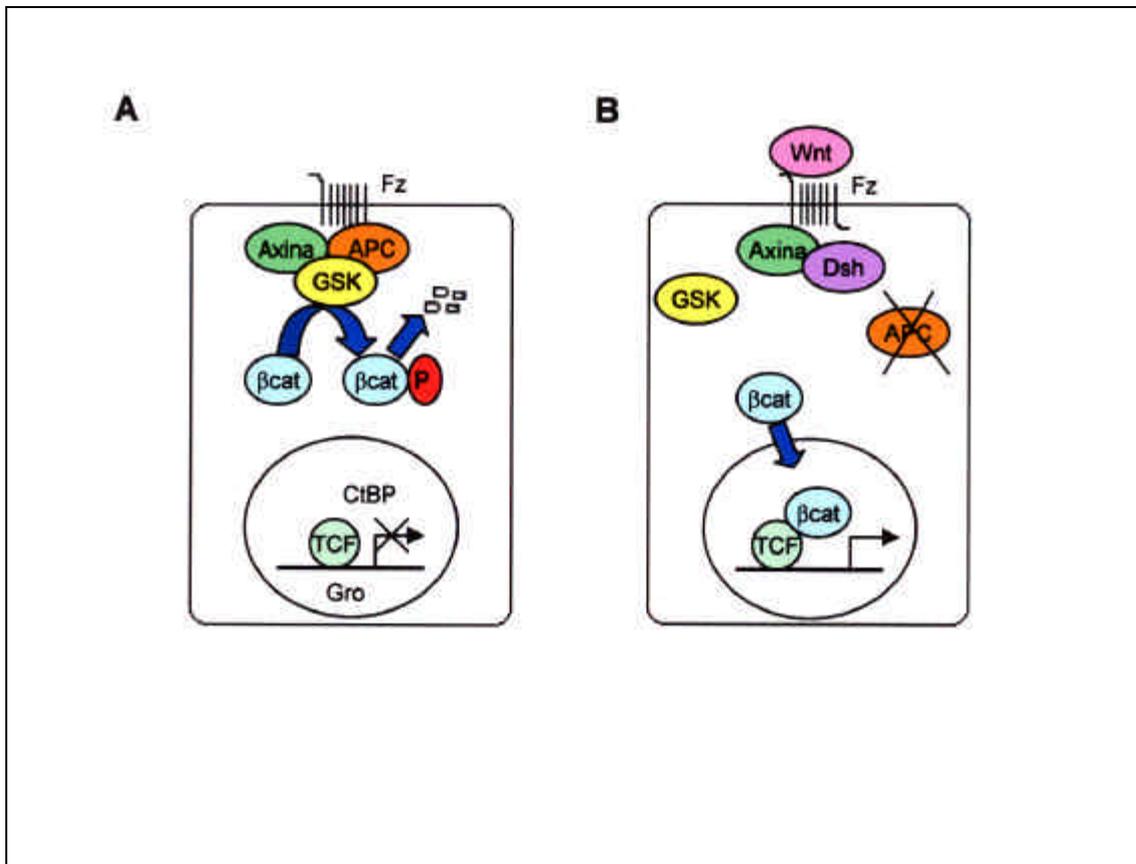


Estructura y dominios de interacción de la proteína APC.

La ruta de señalización Wnt comienza cuando un ligando Wnt (Wnts) perteneciente a una familia de factores de crecimiento secretados que en mamíferos está formada por 16 miembros, se une a su receptor transmembrana Frizzled (fz) e inicia una cascada de señalización intracelular (25, 26) (**Figura 2**). La consecuencia inmediata de esta unión es la activación de una proteína citoplasmática que pertenece a la familia Dishevelled (27), lo que conlleva la inhibición de la enzima GSK-3 β . Esta inhibición es consecuencia de la disociación del complejo formado por axina/conductina, APC y GSK-3 β resultando en la acumulación de β -catenina libre en el citoplasma (28). De esta forma se impide la fosforilación de β -catenina, y se bloquea su degradación proteolítica ubiquitina-dependiente mediada por APC y axina (29). La β -catenina libre no fosforilada se acumula en el citoplasma celular y es transportada al núcleo donde actúa como coactivador de una familia de factores de transcripción TCF/LEF, lo que conlleva la expresión de determinados genes dependientes de la ruta Wnt (30). Dianas de esta vía Wnt/TCF/LEF incluyen protooncogenes como myc (31), ciclooxigenasa-2 (COX-2) (32), ciclina D1 (33), y TCF1 un miembro de la propia familia TCF/LEF (34).

En ausencia de estimulación de la vía Wnt, los niveles reducidos de β -catenina permiten la represión de los genes diana de la ruta mediante la asociación de co-represores transcripcionales como Gro y CtBP con los factores TCF/LEF (35). Siendo por tanto la acumulación de β -catenina crítica para la activación de la respuesta transcripcional mediada en la vía Wnt.

Figura 2



Ruta de señalización Wingless en ausencia (A) y presencia (B) de un ligando Wnt.

Las mutaciones inactivadoras en el gen APC producen una activación constitutiva de la vía Wnt en ausencia de ligandos Wnt, desestabilizando el complejo axina/APC/GSK-3β.

En las células epiteliales de colon el factor de transcripción predominante perteneciente a la familia TCF/LEF es el TCF-4. La activación de esta vía, por tanto puede producirse bien por la inactivación del gen APC o por la activación constitutiva de la β-catenina (CTNNB1) mediante mutaciones activadoras que han sido encontradas en el 50% de los tumores de colon con el gen APC intacto (**Tabla 2**) (36). En total, entre el 4-15% de los

tumores de colon esporádicos presentan mutaciones en el gen CTNNB1, éstas se localizan fundamentalmente en la región reguladora N-terminal (entre los residuos 29-45) del exon 3 donde se encuentran los residuos de serina-treonina que son fosforilados por GSK-3 β (37, 38). Ya que las formas mutantes de β -catenina son capaces de activar constitutivamente a los factores transcripcionales TCF/LEF, hay que considerarla por tanto como un oncogen.

Al igual que ocurre con el gen APC, las mutaciones en β -catenina ocurren en un estadio muy temprano y se encuentran en el origen de la transformación maligna, incluso cuando el gen APC se encuentra intacto. Pero a diferencia del gen APC, la frecuencia de mutaciones de β -catenina en adenomas incipientes (12.5%) disminuye significativamente en los cánceres invasivos (1.4%), sugiriendo que es menos frecuente que adenomas con alteraciones en β -catenina progresen a carcinomas malignos (37). Hasta la fecha no se han encontrado mutaciones en la línea germinal de CTNNB1, ni en GSK-3 β o axina en tumores colorrectales con el gen APC inalterado.

¿De qué forma el complejo β -catenina/TCF induce la proliferación celular? Esto depende en gran medida de los genes diana regulados por este complejo transcripcional. El mecanismo por el cual el gen APC inhibe la proliferación celular se debe al control que ejerce sobre la entrada en la fase S del ciclo celular que lleva a cabo el complejo regulador β -catenina/TCF. Así tenemos que las proteínas c-myc y ciclina D1 controlan la entrada de G1 a S a través del efecto que ejercen sobre el gen supresor de tumores RB (39, 40).

En un estudio realizado por Heinen y col. (41) se muestra cómo células tumorales de colon transfectadas con el gen salvaje APC se detienen en la fase G1 del ciclo celular. Es más, la detención del ciclo celular es eliminada mediante la cotransfección bien de la forma constitutivamente activa de β -catenina o por la combinación de myc+ciclina D1. En este estudio se observó además que en la transfección con el gen salvaje APC se inhibía la fosforilación de RB (retinoblastoma) y se disminuían los niveles de ciclina D1. Este hecho explicaría por qué hay diferentes tipos de tumores que exhiben mutaciones de la vía ciclina D/RB entre los que no se encuentran tumores de colon. Ya que la forma en la cual se regula el paso de G1 a S en los tumores colorrectales es dependiente de las funciones mediadas por el gen APC, no encontrándose por tanto mutaciones en los componentes de la vía ciclina D/RB.

Llegado a este punto habría que hacerse la siguiente pregunta ¿es realmente suficiente el efecto que tiene la inactivación del gen APC sobre el ciclo celular para explicar la formación de un tumor colorrectal? En estudios recientes se demuestra que la inactivación de APC no solo altera el ciclo celular sino que también condiciona la inestabilidad cromosómica (CIN) observada en estos tumores (42, 43). Este efecto parece ser consecuencia de la interacción de la proteína APC con los microtúbulos y con la proteína EB1. La importancia que tiene el gen APC sobre estos dos efectos puede ejemplificarse tomando dos modelos de ratón de cáncer colorrectal. En el modelo clásico que resulta de la presencia de una mutación sin sentido en el codón 850 del gen APC con pérdida de la región de interacción con la β -catenina (APC^{Min}), los animales heterocigotos $APC^{+/Min}$ desarrollan numerosos adenomas en el tubo digestivo (44). El segundo modelo presenta una mutación sin sentido en el codón 1638 (APC^{1638T}) que trunca la región C-terminal de la proteína APC responsable de las funciones

relacionadas con la inestabilidad cromosómica pero que retiene el dominio regulador de β -catenina; consecuentemente las células madre embrionarias aisladas de animales homocigotos APC^{1638T} fueron CIN (45). Sin embargo los ratones originados fueron viables y no desarrollaron tumor. La inestabilidad cromosómica sería por tanto consecuencia de la función del gen APC y no estaría relacionada con el inicio del proceso de transformación maligna, siendo realmente la pérdida del control de la función de la β -catenina la que representaría una ventaja selectiva en la formación tumoral.

1.1.2. Vía de reparación de desemparejamientos de bases de DNA (MMR)

La identificación de los genes responsables del síndrome HNPCC ha hecho posible el conocimiento de un nuevo mecanismo que da origen al proceso tumoral en colon. Se han observado alteraciones en cinco genes diferentes (hMSH2, hMSH6, hMLH1, hPMS1, hPMS2) (**Tabla 2**) implicados en la reparación de los desemparejamientos de bases de DNA, que dan como resultado la aparición del denominado fenotipo mutador (MMP) o inestabilidad de microsatélites (MSI) (46, 47). El fenotipo mutador aparece en el 12-15% de los tumores de colon esporádicos y en el 90% de los tumores hereditarios HNPCC (48, 49). La inestabilidad de microsatélites es el resultado de la inactivación de ambos alelos de un gen MMR que origina la presencia de mutaciones en regiones de repetición de mononucleótidos.

Los tumores que muestran MSI presentan unas características clínicas distintivas que incluyen una localización colónica proximal, se trata de tumores mucosos pobremente

diferenciados, con prominente infiltración linfocitaria y con un mejor pronóstico (50, 51).

La mayoría de los pacientes HNPCC (70%) presentan mutaciones en la línea germinal de MSH2 o MLH1 (52). El síndrome HNPCC, se produce por una mutación simple en la línea germinal acompañada por una segunda alteración somática en el segundo alelo (la pérdida de heterocigosidad o LOH suele ser lo más frecuente). En los tumores MMP esporádicos debe de ocurrir la inactivación somática de ambos alelos para que se manifieste el fenotipo mutador. En los tumores esporádicos MSI los mecanismos epigenéticos son mayoritariamente los responsables. Encontrándose que más del 80% de los mismos presentan hipermetilación de las islas CpG de la región promotora de hMLH1 en ambos alelos (53).

Las mutaciones germinales en el gen hMSH2 y hMLH1 se encuentran ampliamente distribuidas a través de los 16 exones que abarcan 73 kilobases de hMSH2 y los 19 exones de 58 kilobases de hMLH1. La mayoría son mutaciones puntuales con sustituciones de bases, deleciones o inserciones (54).

Los errores de apareamiento de bases en eucariotas son reconocidos por dos complejos heterodiméricos de proteínas relacionadas con la procariota MutS (**Tabla 3**): MSH2/GTBP (MutS α) y MSH2/MSH3 (MutS β) (55, 56). Parece ser que el complejo MutS α es responsable de reconocer los desemparejamientos de una base y que MutS β reconoce fundamentalmente los errores de apareamiento debidos a inserciones/deleciones (**Figura 3**). En cualquier caso, el complejo de reconocimiento se

completa con un segundo complejo heterodimérico de proteínas relacionadas con MutL, el complejo MLH1/PMS2.

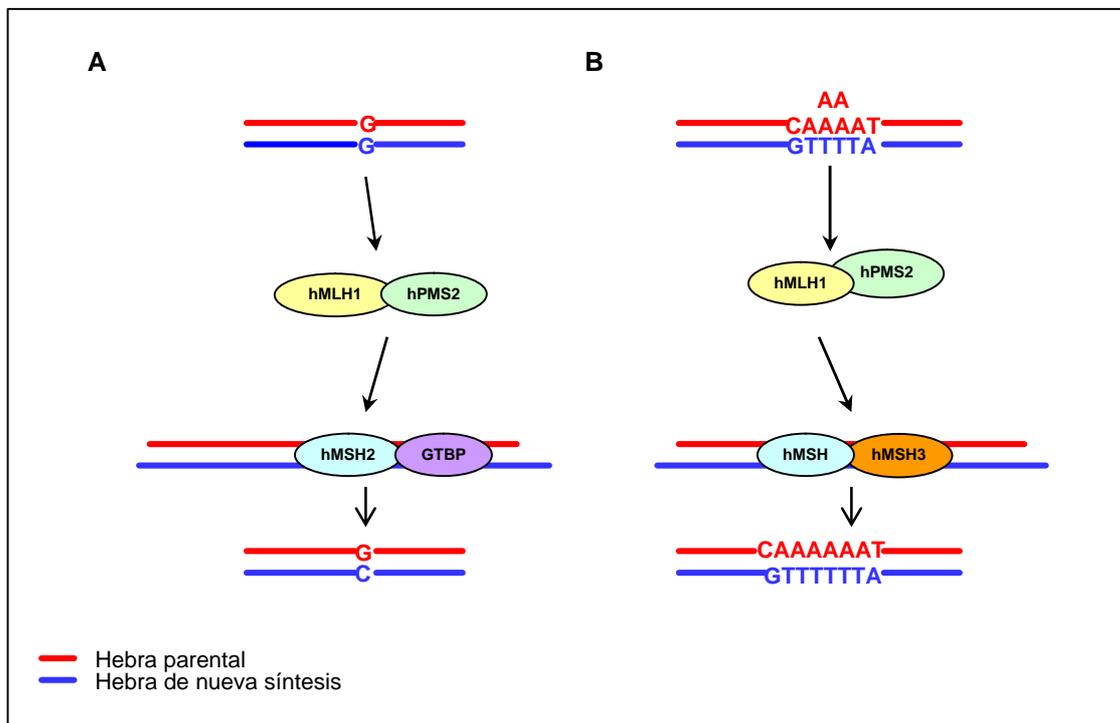
Hay un gran número de proteínas que intervienen igualmente en el proceso de reparación como son: la enzima DNA-polimerasa δ , la proteína de replicación A (RPA), el antígeno nuclear de proliferación nuclear (PCNA), el factor de replicación C (RFC), exonucleasa-1, RAD27 y las exonucleasas asociadas a la DNA-polimerasa δ .

Después de producirse el reconocimiento del error de apareamiento por los complejos de proteínas relacionadas con MutS y MutL la maquinaria de reparación se completa con el conjunto de proteínas anteriormente mencionadas, y gracias a la actividad exonucleasa se forma una mella que abarca de 1 a 2 kilobases desde el desemparejamiento. La degradación continua hasta que se elimina la base mal apareada. Posteriormente el hueco es completado por la actividad de la DNA-polimerasa δ .

Tabla 3. Enzimas reparadoras de apareamientos erróneos de bases en bacterias y sus homólogos humanos

Enzimas bacterianas	Mut S	MutL
Homólogos humanos	hMSH2 GTBP/hMSH6 hMSH3	hMLH1 hPMS1 hPMS2

Figura 3



(A) Reparación de una base mal apareada; (B) eliminación de una doble delección de timina.

La tasa de mutación en las células tumorales MMR se estima en 100-1000 veces mayor de la que aparece en células normales, lo cual permite la rápida acumulación de mutaciones en muchos genes de susceptibilidad a cáncer (57). No es la ausencia de la actividad MMR la que hace por sí misma a una célula tumoral. Sino mas bien la acumulación de mutaciones en "genes diana" que hacen que las células MSI presenten una ventaja selectiva de crecimiento o supervivencia (58, 59). Entre estos genes diana se encuentran proteínas implicadas en la transducción de señales (TGF β 1RII, IGF1R, PTEN) (60-62), apoptosis (BAX, caspasa-5) (63, 64), regulación transcripcional (TCF-4) (65), o incluso genes MMR (hMSH3, hMSH6) (66). El receptor TGF β 1RII fue la primera diana en ser identificada, encontrándose mutaciones frameshift en la región de

repetición A₁₀ como resultado bien de una inserción o delección del nucleótido repetido; se encuentra alterado en cerca del 90% de los tumores MSI (67). Otras dianas adicionales son el gen regulador de apoptosis BAX (68), el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina (69), el factor transcripcional regulador del ciclo celular E2F-4 (70), TCF-4 (65), caspasa-5 (64), el factor intestinal homeobox CDX2 (71), e incluso los propios genes de reparación MMR: hMSH3 y hMSH6 (66) (**Tabla 4**).

Recientemente se ha descrito que las tres proteínas WISP (WISP-1, 2 y 3) pertenecientes a una familia de factores de crecimiento de tejido conectivo (CCN), podrían ser igualmente dianas de la ruta Wnt en tumores MSI. Así se ha encontrado que las proteínas WISP1 y WISP2 se sobreexpresan en una línea celular de epitelio mamario de ratón transformada con Wnt1, así como en ratones transgénicos Wnt1; suponiendo que las proteínas WISPs son dianas inducibles a través de la vía Wnt (72). Sin embargo hasta el momento sólo se ha probado que la proteína WISP-1 sea una diana de la ruta Wnt, que se encuentra regulada por la β -catenina citosólica (73). La tercera proteína perteneciente a esta familia de factores de crecimiento WISP-3 que tiene una elevada homología con WISP-1, presenta una secuencia de repetición A₉ en el exón 4. Por ello se pensó que podría ser un gen candidato de alteración en tumores MSI. Apareciendo un 31% de mutaciones dentro de la secuencia A₉ (74), esto supondría que podría tratarse tal vez de un nuevo gen supresor de tumores.

La relación existente entre el fenotipo MSI y la presencia de mutaciones en APC, queda sin establecer. Estudios iniciales sugerían que las mutaciones en APC estaban presentes en sólo un 20% de los tumores MSI, sin embargo en estudios posteriores se ha

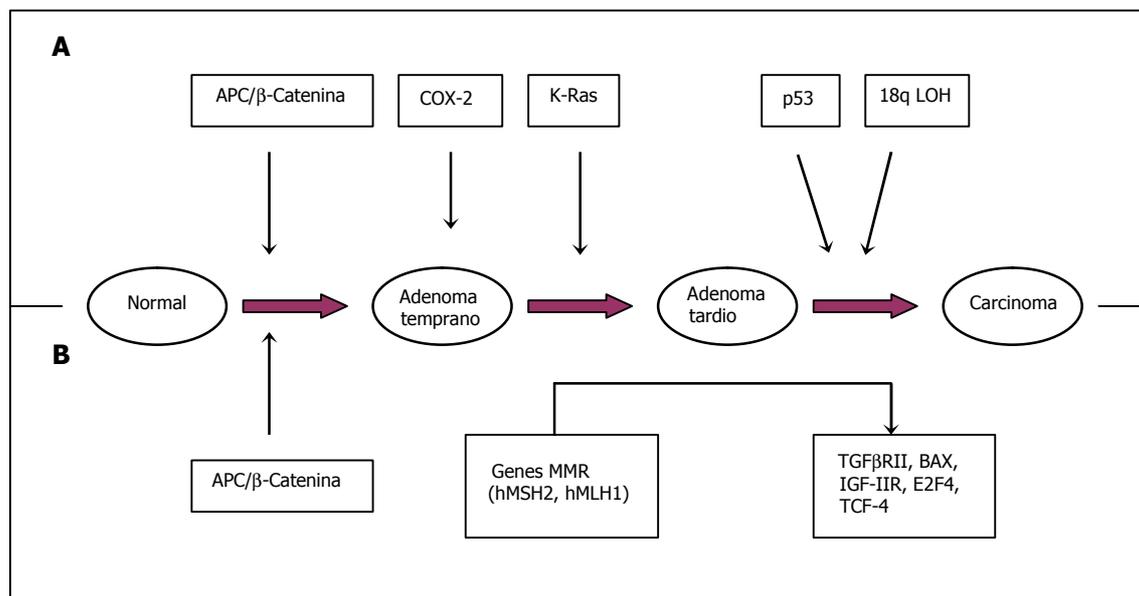
encontrado hasta un 43% de tumores MSI con el gen APC intacto que presentan mutaciones en CTNNB1 e incluso en la axina (75, 76).

Por tanto en los tumores MSI, como eventos tempranos de la carcinogénesis aparecen alteraciones en la vía de señalización Wnt con mutaciones en el gen supresor de tumores APC y en los oncogenes β -catenina y axina. Estas mutaciones conducen a la acumulación de β -catenina citoplasmática y subsecuentemente aumento transcripcional de genes diana.

De lo anteriormente mencionado se deduce que independientemente del status MSI, la ruta APC/ β -catenina se encuentra en el origen del cáncer colorrectal. El mecanismo responsable de la acumulación adicional de mutaciones después del paso inicial de la formación de pólipo diverge dependiendo del proceso que genere la inestabilidad genética. Los tumores que no presentan inestabilidad de microsatélites (MSS) se caracterizan por la existencia de inestabilidad cromosómica (CIN) con presencia de aneuploidias y frecuentes LOHs; en cambio los tumores MSI son fundamentalmente diploides con afectación de secuencias de repetición simples (77). Ambos tipos de inestabilidad genética se observan ya en los pólipos incipientes (78), aunque se desconoce la tasa específica a la cual aparecen las mutaciones subsecuentes durante la transición tumoral (**Figura 4**).

Tabla 4. Prevalencia de mutaciones frameshift en tumores colorectales MSI

Gen	Secuencia diana mutada	Tumores MSI+ (HNPCC)	Tumores esporádicos MSI+
TGFβRII	A ₁₀	78-83%	82-90%
IGF2R	G ₈	13%	9%
BAX	G ₈	52-55%	13-50%
hMSH3	A ₈	50-58%	39-46%
hMSH6	C ₈	33%	28-36%
E2F4	CAG ₁₃	71%	42-57%
Caspasa-5	A ₁₀	-	62%
TCF4	A ₉	-	39%
CDX2	G ₇	5%	-

Figura 4

Eventos genéticos durante el desarrollo tumoral en colon. El 85% de los tumores colorectales presentan inestabilidad cromosómica (CIN); los pasos que ocurren en estos tumores aparecen representados en (A). El 15% restante pertenece al grupo de inestabilidad de microsatélites (B).

1.1.3. La vía TGF β /SMAD

El TGF β (factor de crecimiento transformante β) y miembros relacionados de la familia median una amplia variedad de efectos biológicos, entre ellos se encuentran los potentes efectos inhibidores de proliferación celular (79). El TGF β inicia un amplio espectro de respuestas celulares mediante su unión a un complejo correceptor formado por dos proteínas transmembrana con actividad serina-treonina quinasa en sus dominios citoplasmáticos conocidos como receptor tipo I y tipo II. La cascada de señalización comienza con la unión del TGF β al receptor tipo II que entonces fosforila al receptor tipo I activando consecuentemente su dominio quinasa. El receptor tipo I activado fosforila a una proteína citoplasmática miembro de una familia de mediadores intracelulares conocidos como SMADs (sobre un residuo conservado de serina del extremo C-terminal). Las proteínas SMAD2/3 activadas de esta forma se acumulan en el núcleo donde forman un complejo heterodimérico con la proteína SMAD4 que actúa como un coactivador. En el núcleo el complejo SMAD se une con proteínas de unión a DNA (DBPs) que actúan tanto como coactivadores y correpresores transcripcionales de un gran número de genes, generándose diferentes respuestas biológicas. Entre los genes que son regulados por los factores SMAD se encuentran: el inhibidor del activador del plasminógeno (80), los inhibidores de CDK (quinasa dependiente de ciclina) como p15 y p21 (81, 82), ciclina D1 (83) y el propio TGF β (84), entre otros.

La identificación de mutaciones en el gen TGF β en la mayoría de tumores colorrectales MSI, notó la importancia que esta vía podía tener en el proceso tumoral de colon. Todas las mutaciones han sido encontradas en la región de repetición A₁₀ (85).

En cambio en los tumores que no presentan inestabilidad de microsatélites (MSS), los genes de esta vía que se encuentran alterados son SMAD2 y SMAD4 (18q21), con pérdida de heterocigosidad encontrada en el 70% de los tumores de colon (**Tabla 2**) (86, 87).

1.1.4. Eventos genéticos adicionales implicados en el desarrollo tumoral

El gen KRAS se encuentra mutado aproximadamente en el 50% de los tumores colorrectales, con mutaciones puntuales en los codones 12, 13 y en menor medida 61 (**Tabla 2**). Entre sus muchas funciones, interviene en la transducción de señales que regulan la progresión del ciclo celular (88, 89). Las mutaciones en k-ras se asocian a un aumento en la expresión de la enzima DNA metiltransferasa (DNMT1), ciclina D1 y gastrina. La elevada actividad DNMT1 detectada en tumores de colon podría de esta forma conducir a la aparición de inactivación epigenética de genes supresores de tumores tales como p16, observado en un 28-55% de los tumores de colon (90).

Mutaciones en p53 también se han identificado en un 50% o más de los tumores de colon (**Tabla 2**); mutaciones que se localizan primariamente en los exones 5-8. La mayoría de ellas producen una proteína con una vida media anormalmente larga, pudiéndose detectar la acumulación de la proteína mutante por inmunohistología (91, 92). Las mutaciones inactivadoras de p53 ocurren de forma tardía durante la transición de adenoma a carcinoma y suelen ir acompañadas por deleciones del segundo alelo salvaje.

El gen supresor de tumores DCC (18q21) clonado en 1990, codifica un receptor de superficie para el ligando netrina y aparece delecionado en un elevado porcentaje de

tumores MSS (mas del 70%) (**Tabla 2**). La pérdida de esta proteína se asocia con un peor pronóstico (93). Según parece estaría implicada en la regulación del proceso de apoptosis (94).

Varios genes igualmente se encuentran constitutivamente sobreexpresados pero no mutados en cáncer de colon. La expresión de ciclooxigenasa-2 (COX-2) aparece aumentada en el 43% de los adenomas y en el 86% de los carcinomas (95); parece que interviene en la regulación de la angiogénesis y apoptosis (96). Se ha observado que en líneas tumorales de colon, la inhibición de la actividad COX-2 bloquea el crecimiento de las células (97) y disminuye el número de pólipos intestinales en un modelo de ratón mutante para APC (98). Los avances en el conocimiento de la función COX-2 están permitiendo iniciar nuevas estrategias en la prevención empleando drogas anti-inflamatorias no esteroideas (NSAIDs) (99, 100).

1.1.5. Inestabilidad genómica en la progresión del cáncer colorrectal

Atendiendo al modelo de Vogelstein y col. (1), son necesarias de 5 a 10 alteraciones genéticas para la generación de un fenotipo transformado. Sin embargo, en los tumores de colon con fenotipo mutador Perucho estima que aproximadamente ocurren 100.000 mutaciones, aunque teniendo en cuenta que hay que considerarlo como un caso especial (101). En los tumores esporádicos habría que hacerse las siguientes preguntas: ¿cuántos eventos genómicos ocurren, cuándo ocurren y que fracción de los mismos es relevante en la tumorigénesis? Empleando técnicas de hibridación genómica comparativa (102) e inter-SSR-PCR (simple sequence repeat), se ha estimado que ocurren unos 20 eventos (inserciones, deleciones, y/o duplicaciones) en aproximadamente 1Mb de genoma

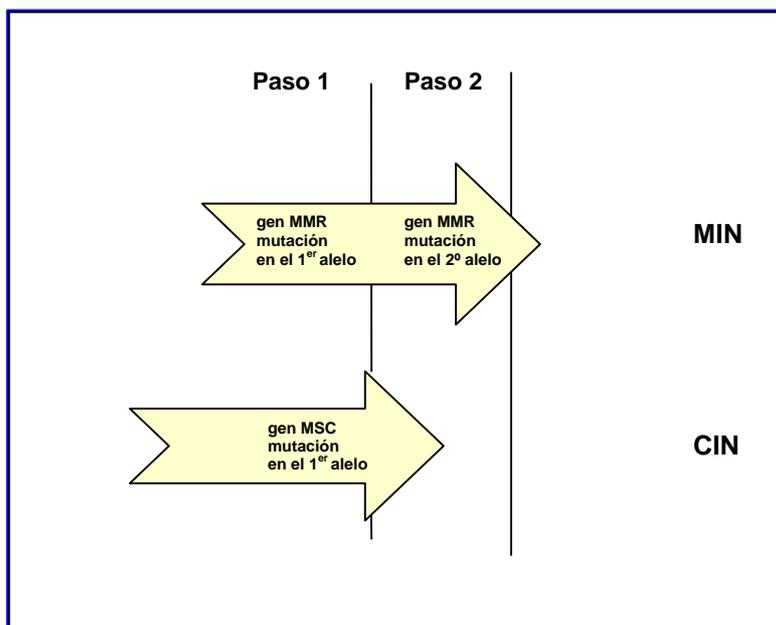
humano (103, 104), es decir unos 11.000 eventos genéticos individuales por célula (105).

En este escenario, ¿cómo se entiende la ruta de progresión de los tumores esporádicos en el modelo de Vogelstein? Si consideramos que el genoma humano tiene unos 100.000 genes, y que ocurren unos 11.000 eventos genéticos por célula es lógico pensar que únicamente un pequeño número de ellos tenga consecuencias en la viabilidad de la célula. Y que los eventos que detectamos durante la progresión tumoral sean realmente aquellos que tienen un importante papel en la desdiferenciación celular. El fenómeno de la inestabilidad en los tumores esporádicos se sitúa igualmente en el inicio del proceso tumoral, en donde la célula va acumulando alteraciones y es la afectación de genes clave la que dispara la progresión tumoral.

En los tumores de colon nos encontramos por tanto con dos tipos de inestabilidad: la inestabilidad observada a nivel de nucleótidos que resulta en sustituciones, deleciones o inserciones de unas pocas bases (MIN); y la inestabilidad observada a nivel cromosómico que resulta en pérdidas o ganancias de cromosomas enteros o de grandes porciones de los mismos (CIN). Existiendo una relación inversa entre CIN y MIN en los tumores colorrectales. De tal modo, que los tumores con alteración de los genes de reparación de errores de apareamiento de bases MMR son generalmente diploides a diferencia de los tumores CIN aneuploides. Cuando se hacen experimentos de fusión de células MIN y CIN (106) los híbridos resultantes presentan el fenotipo CIN pero no el MIN. La complementación de MIN por células CIN es algo esperado, ya que la expresión del gen salvaje MMR en el híbrido restaura la función MMR (107). La incapacidad de las células MIN en complementar el fenotipo CIN, muestra sin embargo que el fenotipo CIN tiene un efecto dominante que puede ser el resultado de la ganancia

de la función génica más que de la inactivación. Esto por otra parte sugiere que se requiere un único evento mutacional ("hit") para producir un fenotipo CIN (**Figura 5**).

Figura 5



Rutas de la inestabilidad genética. MSC (mitotic spindle checkpoint) gen regulador del huso mitótico, como hBUB1.

Las bases moleculares de la inestabilidad cromosómica en los tumores están ahora comenzando a ser objeto de investigación. Ya que la aneuploidia es una característica presente en casi la totalidad de los tumores (108) al igual que en células transformadas *in vitro* (109), se podría pensar que la inestabilidad cromosómica es el resultado de las propiedades de crecimiento y defectos estructurales de las propias células tumorales. Sin embargo, el hecho de que la inestabilidad cromosómica generalmente no ocurra en células tumorales con el fenotipo MIN y que las células tetraploides que resultan de la fusión de dos líneas celulares MIN sean cromosómicamente estables, es una prueba en contra de cualquier factor inespecífico (106).

A diferencia de los tumores MIN, donde un pequeño número de genes son responsables de este fenotipo, en la producción del fenotipo CIN se encuentran implicados un gran número de genes por lo que se desprende de los estudios realizados en levadura (110, 111). Genes que cuando se encuentran alterados conducen a la inestabilidad cromosómica, entre los que se incluyen: genes responsables de la condensación cromosómica; cohesión de las cromátidas hermanas; organización y función del cinetocoro, centrosoma, formación y dinámica de microtúbulos; y genes reguladores de la progresión del ciclo celular (112, 113).

En levadura, la alteración de los genes que controlan la formación del huso mitótico conducen al fenotipo CIN, son células que completan la mitosis pero con una segregación cromosómica anormal. En tumores humanos se han encontrado alteraciones en un pequeño número de genes que intervienen en la mitosis. Concretamente, una pequeña fracción de tumores de colon presenta mutaciones somáticas en los genes hBUB1 o hBUBR1 (114).

En realidad, para que se genere un fenotipo CIN tanto en levadura como en humanos se requiere la alteración de un gran número de genes, por esta razón el fenotipo CIN es muy frecuente en tumores. En este sentido y considerando el caso concreto de los tumores de colon donde la función de la proteína APC parece ser crítica en la inestabilidad cromosómica (gracias a su interacción con los microtúbulos y con la proteína EB1), la alteración de su función génica y probablemente de otras proteínas se encuentre en la base de la misma.

Además de los genes supresores de tumores *gatekeepers* y *caretakers* que se han considerado hasta el momento como responsables bien de forma directa o indirecta de la carcinogénesis de colon, habría que considerar un tercer grupo de genes de susceptibilidad implicados. Los cuales actuarían de forma indirecta en la progresión tumoral a través de su intervención en el reconocimiento por parte de las células del sistema inmune. Genes que no sólo incluyen a las propias moléculas HLA de clase I, sino también a los genes que intervienen y participan en los procesos de procesamiento y presentación antigénica por parte de las propias moléculas HLA de clase I. La alteración de este conjunto de genes es la responsable de una respuesta defectuosa llevada a cabo por el sistema inmune en el reconocimiento de las células tumorales contribuyendo por tanto de forma indirecta a la progresión tumoral.

1.2. Inmunoevasión: implicaciones del defecto de expresión de moléculas HLA-I

1.2.1. De la inmunovigilancia al escape tumoral

El concepto de inmunovigilancia tiene su origen en una idea ya antigua. Se basa en la capacidad que tiene el sistema inmune de poder distinguir las células normales de aquellas que sufren un proceso de desdiferenciación y escapan al control tisular. Este efecto de represión que ejerce el sistema inmune, fue mencionado por primera vez por Paul Ehrlich (115). Pero no es hasta mediados de los años 50, tomando como base estudios de transplante de tejidos realizados por Medawar y col., (116) cuando comienza a surgir esta idea. Las primeras observaciones indicaban que el sistema inmune de un ratón inmunocompetente era capaz de reconocer y destruir tumores transplantados procedentes de cepas de ratón no emparentadas. Pero el desarrollo de cepas singénicas reveló, que lo que realmente se rechazaba en el huésped transplantado era un tejido genéticamente no emparentado y no el tejido tumoral. Sin embargo, el hecho de que ratones inmunizados con células tumorales genéticamente idénticas procedentes de tumores inducidos por carcinógenos químicos, virus o de cualquier otra forma, fuesen capaces de desarrollar una respuesta inmune frente al tumor proporcionó la clave de la hipótesis de inmunovigilancia frente al cáncer (117, 118).

Estas nociones fueron incorporadas a la hipótesis de inmunovigilancia de Burnet M y Thomas L (1957) (119, 120), especulando con la idea de que los linfocitos en este proceso actuarían como centinelas en el reconocimiento y eliminación de células tumorales (121).

La introducción de la hipótesis de inmunovigilancia fue rápidamente seguida por diversos experimentos, que tenían como objetivo probar que ratones huésped con

sistemas inmunes dañados podrían experimentar aumento de la incidencia tanto de tumores espontáneos como inducidos químicamente. En estos ensayos se trataba de explorar si el desarrollo tumoral en ratones se veía influenciado por la inmunosupresión experimental del huésped.

La caracterización e identificación de los ratones atímicos nude (122) en este sentido, permitió tener a los investigadores una herramienta muy útil en el estudio de la formación tumoral en un huésped genéticamente inmunocomprometido. Representando el trabajo de Stutman uno de los usos más extensos de ratones nude en la determinación fisiológica de la inmunovigilancia (123). Stutman encontró que la cepa de ratones nude CBA/H no producía más tumores inducidos químicamente comparados con los salvajes, y que tampoco presentaban un acortamiento del período de latencia tumoral después de la inyección del carcinógeno metilcolantreno (MCA) (124). Los trabajos de Stutman fueron corroborados por diferentes investigadores, como Rygaard y Povlsen (125, 126), demostrando que no existían diferencias significativas entre la incidencia de los tumores espontáneos no virales de ratones nude y ratones de fenotipo salvaje. Los resultados por tanto empleando ratones nude fueron más conclusivos que los basados en la inmunosupresión experimental, y esta contundencia hizo que se abandonase de forma momentánea la hipótesis de inmunovigilancia.

Son dos hallazgos clave entre 1994 y 1998, los que hacen de nuevo renacer el concepto de inmunovigilancia frente al cáncer. El primero de ellos se debió al descubrimiento del efecto protector que tiene el IFN γ producido endógenamente tanto frente al crecimiento de tumores transplantados, tumores primarios inducidos químicamente y frente a tumores espontáneos. Empleando una aproximación de trasplante de células tumorales

encontraron que los fibrosarcomas inmunogénicos crecían más rápido y más eficazmente en ratones tratados con anticuerpos monoclonales neutralizantes específicos para IFN γ (127). Igualmente ocurría con ratones que eran defectivos para el receptor de IFN γ (IFNGR1 $^{-/-}$), STAT-1 $^{-/-}$ (factor transcripcional que media la señalización a través de IFNGR1) y para el mismo IFN γ ; siendo de 10 a 20 veces más sensibles que los ratones normales en cuanto a la capacidad de producir tumores inducidos por MCA y con un menor tiempo de latencia tumoral (128).

El segundo hallazgo clave fue en ratones perforina $^{-/-}$ (C57BL/6), siendo más propensos a los tumores inducidos por MCA comparados con ratones salvajes (129). Los ratones perforina $^{-/-}$ no tratados con MCA mostraban una alta incidencia de linfomas espontáneos diseminados (130). Ambos puntos introducen una idea nueva al concepto de inmunovigilancia que hasta la fecha no se había considerado, y es que la respuesta innata (IFN γ , perforina) se sitúa en el origen del reconocimiento del desarrollo tumoral.

Basándose en los estudios anteriores, era lógico pensar que si la hipótesis de inmunovigilancia era cierta cabría esperar una mayor incidencia de tumores en pacientes con inmunodeficiencias o inmunodeprimidos. Así, estudios de seguimiento realizados en pacientes transplantados que fueron inmunosuprimidos (131) e individuos con inmunodeficiencias primarias (132) revelaron un aumento del riesgo relativo de incidencia de cáncer. En algunos de estos casos, estaba claro que el tumor era de origen viral. Así por ejemplo, en registros de transplante recogidos en diversos países se ha observado una alta tasa de incidencia de linfoma no-Hodgkin, sarcoma de Kaposi, y carcinomas genitourinarios y de regiones anogenitales. Muchos de estos tumores son de origen viral y han sido originados como consecuencia de la infección en estos pacientes

inmunodeprimidos por diferentes virus: virus de Epstein-Barr (linfoma no-Hodgkin), herpesvirus 8 (sarcoma de Kaposi) y papilomavirus (genitourinarios y anogenitales) (133). Se trata de un grupo de tumores que es muy frecuente en pacientes inmunodeprimidos por VIH. Sin embargo, estos datos no invalidan un aumento del riesgo relativo en un gran número de tumores de etiología no viral aparente (134-137).

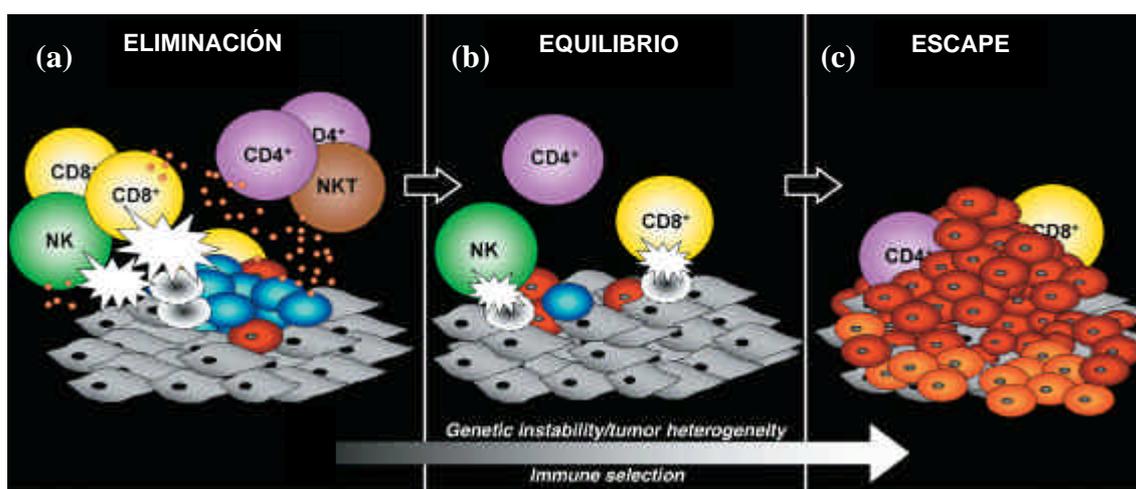
Sí como premisa suponemos entonces la existencia de una inmunovigilancia fisiológica, la pregunta siguiente sería: ¿por qué entonces se desarrollan los tumores en individuos inmunocompetentes? Durante mucho tiempo se ha especulado con la posibilidad de que el sistema inmune intervenga durante la formación tumoral seleccionando variantes poco inmunógenas que tienen por tanto una mayor capacidad de sobrevivir en un ambiente inmunológicamente intacto. De tal forma, que los tumores se verían influenciados por el ambiente inmunológico en el que se forman. Este proceso de modificación (imprinting) puede a menudo resultar en la generación de tumores que están mejor adaptados a sobrevivir en el huésped. Las alteraciones que deben de ocurrir en esta escultura inmunológica de un tumor en desarrollo son probablemente facilitadas por la inestabilidad genética inherente a las células tumorales (138). Siendo algunas de las posibles dianas de este proceso de selección genes que codifican antígenos tumorales, componentes de la maquinaria de procesamiento y presentación antigénica, o componentes de la señalización del $\text{IFN}\gamma$ (128). Según esta hipótesis la escultura inmunológica sobre los tumores ocurre continuamente, pero los principales efectos de este proceso son más prominentes de forma muy temprana cuando el tumor es histológicamente (pero no clínicamente) detectable.

Ya que el sistema inmune tiene una doble vertiente, tanto en la protección del huésped como en el efecto moldeador sobre el propio tumor, el término de inmunovigilancia que incluye la primera parte del proceso no es totalmente correcto. Ampliándose por ello el concepto al de "cáncer inmunoeediting" (139), que se concibe como el resultado de tres etapas: eliminación, equilibrio y escape (**Figura 6**). La inmunovigilancia ocurriría durante la etapa de eliminación, mientras que la selección de variantes tumorales tendría lugar en la etapa de equilibrio. La cual daría paso si el tumor no se erradica, al escape y a la aparición clínica de tumores aparentes. En realidad el proceso de eliminación equivaldría al de inmunovigilancia, ya que cuando se lleva a cabo de forma satisfactoria es capaz de eliminar el tumor. En la fase de eliminación, una vez que el tumor sólido adquiere un cierto tamaño, empieza a crecer invasivamente y requiere para ello un suplemento de metabolitos, formando nuevos vasos (neovascularización) como resultado de la producción de factores angiogénicos y estromagénicos (140) (**Figura 7**). El crecimiento invasor altera la estructura del tejido que lo rodea, lo cual induciría señales inflamatorias que reclutarían células de la respuesta innata (NKT, NK, $LT\gamma\delta$, macrófagos y células dendríticas) a esa región (141-143). Determinadas estructuras expresadas sobre las células transformadas (bien como resultado del proceso de transformación o inducidas por la respuesta inflamatoria) serían reconocidas por los linfocitos infiltrados: NKT, NK o $LT\gamma\delta$, los cuales son estimulados en la producción de $IFN\gamma$ (144, 145). En una segunda fase, el $IFN\gamma$ que fue inicialmente producido puede inducir una cantidad limitada de muerte tumoral por mecanismos antiproliferativos (146) y antiapoptóticos (147). Sin embargo el $IFN\gamma$ también induce la producción de quimioquinas por parte tanto de las propias células tumorales como del estroma normal: CXCL10 (o la proteína 10 inducible por $IFN\gamma$, IP10) (148); CXCL9 (como la monoquina inducida por $IFN\gamma$, MIG) (149) y CXCL11 (I-TAC, quimioquina

quimiotáctica- α de LT inducible por interferon) (150). Algunas de estas quimioquinas tienen efectos angiostáticos potentes y pueden bloquear la formación de nuevos vasos dentro del tumor. Los restos de células tumorales formados son ingeridos por células dendríticas locales, que migrarían a los ganglios linfáticos regionales. En una tercera fase las células NK y los macrófagos infiltrados se activan mutuamente mediante la producción de IFN γ e IL-12 matando a las células tumorales por mecanismos que implican apoptosis mediada por TNF-L, perforina y los intermediarios de oxígeno y nitrógeno reactivos (151-153). En los ganglios linfáticos regionales, las células dendríticas llevarían a cabo el priming y cross-priming con producción de LT-CD4 y LT-CD8 activados, que destruirían a las células que expresan antígenos tumorales y cuya inmunogenicidad ha sido aumentada tras la exposición local al IFN γ (154).

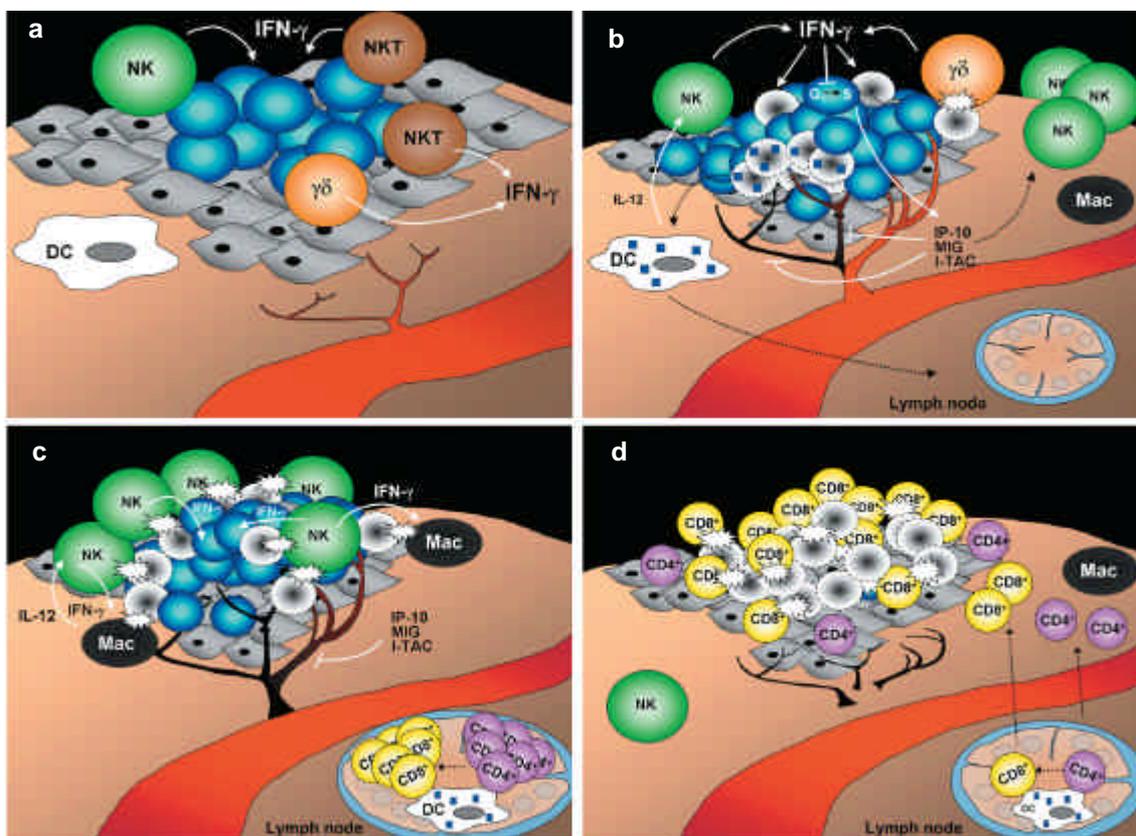
Figura 6

Cáncer inmunoeediting: (a) eliminación, (b) equilibrio, (c) escape. En (a) y (b) se representa en color azul células tumorales en desarrollo, variantes tumorales en rojo y células estromales y no transformadas (gris). En (c) aparecen representadas otras variantes tumorales (naranja) que se han originado como resultado del proceso de equilibrio. (Dun GP y col., Nature 2002, 3:991-998).



En la última fase del inmunoeediting, el sistema inmune del hospedador y cualquier variante tumoral que haya sobrevivido al proceso de eliminación entra en un equilibrio dinámico. En este proceso, los linfocitos y el IFN γ ejercen una potente presión sobre las células tumorales que es suficiente para contener, pero no para extinguir completamente un nido tumoral con células tumorales inestables genéticamente y con una gran capacidad de mutación. Durante el proceso de selección muchas de estas variantes tumorales son destruidas, pero otras son resistentes al ataque del sistema inmune, expandiéndose las variantes sobrevivientes de una forma incontrolada.

Figura 7



Modelo propuesto que explica la fase de eliminación del proceso de "cáncer inmunoeediting". (a) Los linfocitos de la respuesta innata (NK, NKT, LT $\gamma\delta$) reconocen las células transformadas y son estimulados en la producción de IFN γ . (b) El IFN γ desencadena una cascada de la respuesta inmune innata: producción de quimioquinas; factores angiostáticos; efecto antiproliferativo del IFN γ sobre las células tumorales; actividad citotóxica. Los restos de células tumorales son ingeridos por células dendríticas. (c) Desarrollo de la respuesta adaptativa en un ganglio linfático (priming, y cross-priming). (d) Respuesta citotóxica llevada a cabo por LT CD4+ y LT CD8+ activados, con destrucción de las células tumorales. (Dun GP y col., Nature 2002, 3:991-998).

1.2.2. Generación de fenotipos de "escape tumoral": selección de variantes tumorales

Durante el inicio del proceso tumoral pueden surgir determinados clones de células malignas que escapan al control de la inmunovigilancia. Clones poco inmunogénicos que se originaron como resultado del efecto de modelado que ejerce el sistema inmune sobre el tumor o inmunoeediting. El origen de esa enorme diversidad y heterogeneidad encontrada hay que buscarla en la inestabilidad genómica, propiedad inherente compartida por todos los tumores. Y es sobre la base de esa diversidad donde opera la fuerza de la selección. El resultado de este proceso pasivo viene determinado por múltiples factores en el microambiente tumoral, como la presencia de determinados factores de crecimiento, suplemento de nutrientes y la presión ejercida por el sistema inmune. La inestabilidad genómica simplemente crea un vasto repertorio de células tumorales que pueden ser seleccionadas posteriormente de acuerdo a la acción ejercida por los factores ambientales. En realidad, lo que tendría lugar es la progresión diferencial de determinados clones tumorales en virtud de la presencia de un fenotipo que les permite tener ventajas de crecimiento, y no la adquisición activa de determinadas características o fenotipos.

1.2.2.1. Pérdida o defecto de expresión de moléculas MHC de clase I

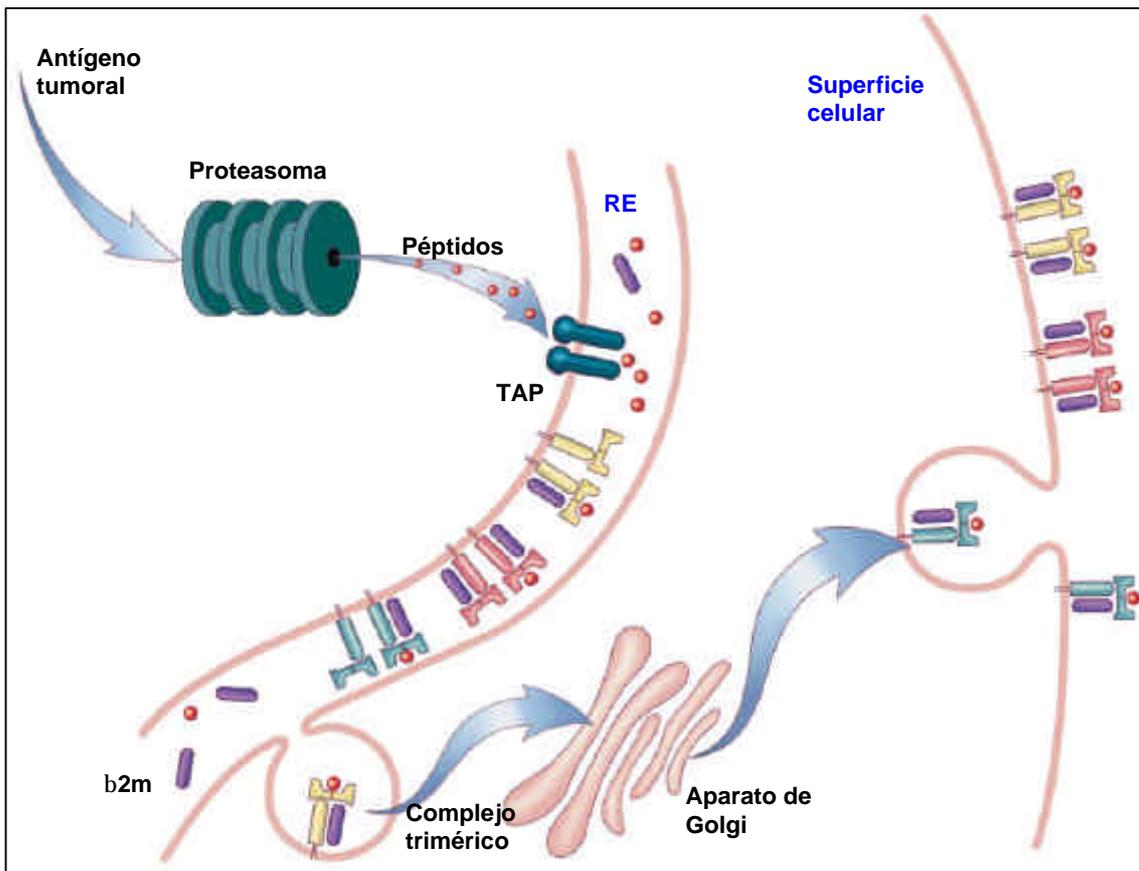
La pérdida total de expresión de moléculas HLA de clase I es un fenómeno frecuente en tumores de diferente histología, como colon, y adenocarcinoma de próstata (155). En carcinoma de mama la frecuencia se sitúa por encima del 50% (156). Por lo tanto es posible que variantes defectivas en la expresión de HLA-I puedan ser el resultado del efecto de escultura inmunológica en lesiones tumorales tempranas (139). Tal vez, por el contrario puede tratarse de un proceso activo como resultado del escape al ataque

inmune que tendría lugar en una etapa avanzada del proceso tumoral, como podemos deducir de la ausencia de expresión de moléculas MHC-I asociada a lesiones metastásicas e invasivas (157).

Los mecanismos responsables de la pérdida de moléculas de clase I incluyen mutaciones en una copia del gen de β 2-microglobulina en asociación con pérdida de heterocigosidad (LOH) en el segundo alelo (158) (**Figura 8**). Otras causas de pérdida total incluyen defectos de regulación en los genes MHC y en la maquinaria de procesamiento y presentación antigénica. Defectos en la expresión de las subunidades LMP2 y LMP7 del complejo multicatalítico del proteasoma y de los transportadores de péptidos TAP1 y TAP2 se han encontrado en diferentes tumores, incluyendo carcinoma de pulmón de células pequeñas (159), carcinoma de próstata (160) y carcinoma de células renales (161). En todos ellos la ausencia de expresión de HLA-I se aumentó tras la exposición a $\text{IFN}\gamma$.

Los tumores igualmente pueden presentar pérdida selectiva de haplotipos HLA de clase I, locus o alelos. La pérdida de haplotipo puede deberse a la pérdida de heterocigosidad o LOH en 6p21.3 (162). Varios mecanismos están implicados en la falta de expresión de locus, que es más frecuente con antígenos HLA-B que con HLA-A. En melanomas, el aumento de expresión del oncogen c-Myc se correlaciona con la ausencia de expresión selectiva del locus HLA-B (163). Igualmente la ausencia de factores de transcripción locus-específicos puede inducir un defecto de locus HLA-B en líneas de colon (164). Los defectos responsables para las pérdidas selectivas de alelos incluyen mutaciones en los genes que codifican la cadena pesada de clase I (165).

Figura 8



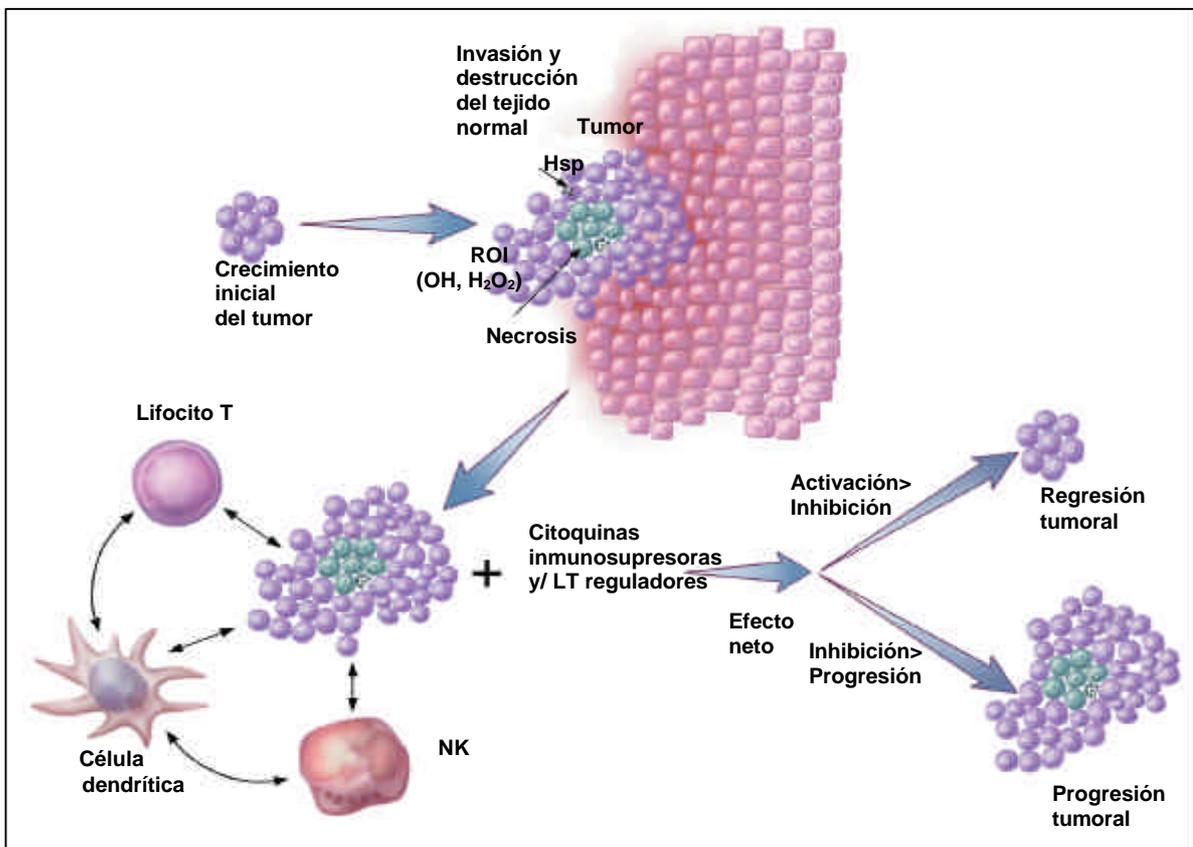
Mecanismos moleculares responsables de la expresión alterada de moléculas HLA de clase I: (a) Defectos en los componentes de la maquinaria de procesamiento y presentación antigénica (tales como LMP2, LMP7, TAP1 y TAP2). (b) LOH en el cromosoma 6, con pérdida de haplotipo HLA; defectos en la regulación transcripcional de genes HLA de clase I con pérdida de locus HLA; mutaciones puntuales o deleciones génicas de la cadena pesada de clase I, que generan pérdidas selectivas de alelos HLA. (c) mutaciones y/o LOH de $\beta 2m$. (Khong HT y col., Nature 2002, 999-1005).

Las descripciones de la pérdida parcial o completa de moléculas HLA-I así como los mecanismos de escape inmune, sin embargo fracasan en la consideración de un aumento de la susceptibilidad a la lisis por parte de las células NK que es una consecuencia directa de tales pérdidas (166). ¿Por qué las variantes tumorales defectivas para HLA-I continúan creciendo y no son destruidas por las células NK? Las células NK expresan

receptores activadores como NKG2D los cuales unen ligandos inducidos por estrés (MICA y MICB), que pueden estar aumentados en diferentes tumores. La activación de las células NK a través de esta vía de señalización podría contrarrestar el efecto inhibitorio de la unión de HLA-I con los receptores KIRs (167, 168). Por lo tanto aunque los tumores HLA-I-negativos pueden ser susceptibles de muerte por parte de las células NK, la ausencia de expresión de MICA o MICB permitiría tener a los tumores una ventaja de crecimiento y representaría una potencial estrategia de escape, aunque se trata de una idea que aún no se ha demostrado en tumores humanos (169).

Explicaciones alternativas de por qué las células tumorales que han perdido la expresión de HLA-I no son destruidas por las células NK pueden derivarse del modelo de activación-inhibición (**Figura 9**). Las células NK son rápidamente activadas en la presencia de factores estimuladores como la interleuquina 12 (IL-12), IL-2, IL-15 o IFNs tipo I en respuesta a condiciones inflamatorias asociadas con una infección microbiana. En ambientes "estériles", estos efectos estimuladores puede que no se produzcan (170). Además, la ausencia de expresión de moléculas coestimuladoras como B7-1, B7-2, CD40 y CD70 por parte de los tumores puede también impedir la activación óptima de las células NK a través de la ruta de coestimulación CD28 y CD27 (171-173). Es posible que en algunas situaciones los tumores puedan producir citoquinas inmunomoduladoras, como el factor de crecimiento transformante- β (TGF β) o el factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF) (174), que pueden directamente inhibir la activación y función de las células NK.

Figura 9



Modelo de activación/inhibición durante el progreso tumoral. La activación inmune durante los estadios iniciales de la progresión tumoral puede ser consecuencia de la expresión de neoantígenos. Otros factores que pueden producir la activación inmune incluyen la generación de Hsps (heat shock protein) que resultan del estrés celular y los intermediarios de oxígeno reactivos (ROI). Al mismo tiempo, la activación inmune puede estar impedida por la ausencia de una coestimulación apropiada, la presencia de citoquinas inmunosupresoras ($TGF\beta$) y células inmunoregulatoras (LT $CD4^+$ $CD25^+$, y NKT). El desarrollo del tumor en esta situación, podría ser por tanto el resultado del efecto neto entre activación e inhibición inmune. (Khong HT y col., Nature 2002, 999-1005).

1.2.2.2. Ausencia de coestimulación

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los tumores parece ser que crecen en un microambiente no-inflamatorio, en donde por tanto no tendría lugar la activación inmune. El reconocimiento de los antígenos tumorales por parte de las células dendríticas (DCs) en estas condiciones no daría lugar a la activación y maduración de las mismas. Además hay que tener en cuenta que la ausencia de expresión de moléculas coestimuladoras por parte de las células tumorales podría conducir a la anergia de LT (175) y a una activación subóptima de NK.

1.2.2.3. Citoquinas inmunosupresoras

La activación o inhibición de las células T puede también depender de la presencia o ausencia de citoquinas en su microambiente. Las células tumorales producen una variedad de citoquinas y quimioquinas que pueden afectar negativamente a la maduración y función de las células inmunes. Como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que es una citoquina secretada por la mayoría de los tumores (176). Estudios *in vitro* muestran que VEGF inhibe la diferenciación y la maduración de células dendríticas mediante la supresión del factor transcripcional NFκB en células stem hematopoyéticas (177). La tinción inmunohistoquímica de secciones de carcinoma gástrico reveló una correlación inversa entre la densidad de células dendríticas y la expresión de VEGF. Este hallazgo estuvo igualmente asociado con un peor pronóstico (178). En pacientes con cáncer de pulmón, cabeza y cuello, y de mama hubo un descenso en la función y número de células dendríticas maduras, que se asoció a un aumento de la concentración plasmática de VEGF (179). Igualmente, además del aumento de la concentración plasmática de VEGF en pacientes con cáncer, también se encuentran aumentados los niveles de IL-10 sérica. La IL-10 puede ejercer

un efecto inhibitor de la diferenciación de las células dendríticas a partir de precursores de la médula ósea (180).

El factor proinflamatorio prostaglandina E₂ (PGE₂), es otra citoquina expresada por tumores como resultado de un aumento de expresión de la enzima ciclooxigenasa-2 (COX2) en varios tumores humanos (181-183). La prostaglandina PGE₂ aumenta la producción de IL-10 por parte de linfocitos y macrófagos e inhibe la producción de IL-12 por los macrófagos (184). Altas concentraciones de TGFβ también se han encontrado en pacientes con cáncer, lo que estuvo asociado con la progresión de la enfermedad (185) y una pobre respuesta a la inmunoterapia (186).

1.2.2.4. Señalización defectiva a través de los receptores de muerte

Dos ligandos de receptores de muerte juegan un importante papel en la inmunovigilancia frente al desarrollo tumoral: Fas-ligando (FasL) y TRAIL (187-189). La señalización defectuosa a través de los receptores de muerte celular es un mecanismo que puede contribuir a la supervivencia y proliferación de las células tumorales. El inhibidor de la caspasa-8 (cFLIP) es expresado en varios tumores, en estos casos cFLIP haría a las células tumorales resistentes a la apoptosis inducida a través de receptores de muerte (190). La pérdida de expresión de Fas en los tumores igualmente contribuye a una resistencia a la apoptosis (191, 192).

1.2.2.5. Apoptosis de linfocitos T activados

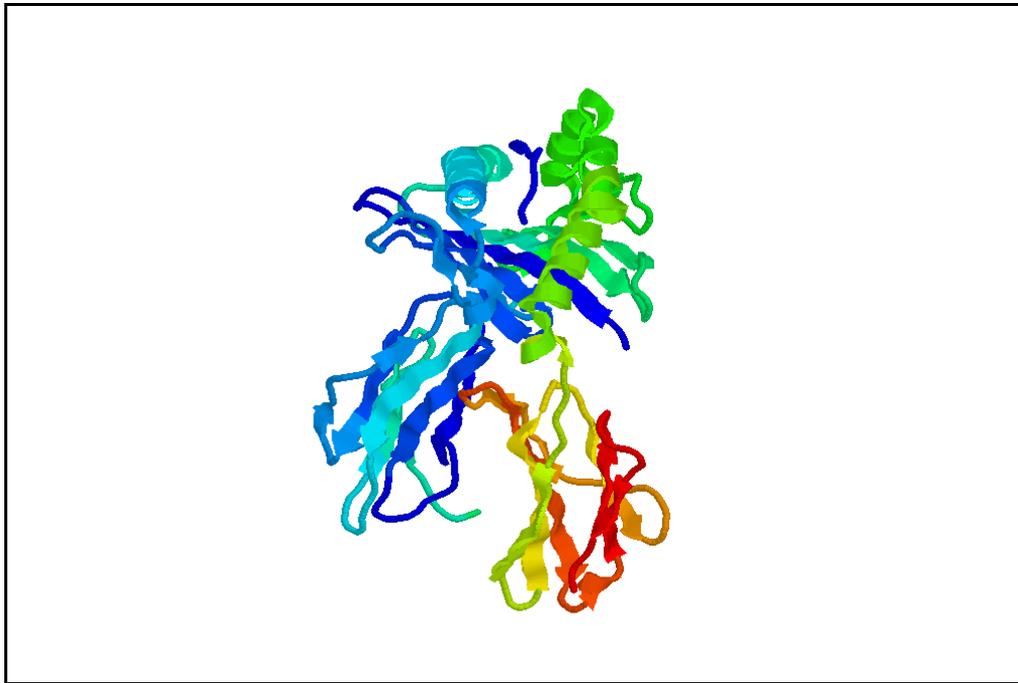
Uno de los mecanismos más controvertidos de escape tumoral es la expresión de ligandos de receptores de muerte por parte de las células tumorales. Así una amplia variedad de tumores expresan Fas-L, induciendo apoptosis sobre células diana

susceptibles Fas+. Entre ellos, carcinoma de pulmón (193), melanoma (194), carcinoma de colon (195) y carcinoma hepatocelular (196). Bajo la activación de los LT como resultado del reconocimiento de antígenos tumorales, las células tumorales expresan niveles altos de Fas-L, induciendo la apoptosis de las propias células T ("suicida") y entre las propias células T ("fratricida") (197, 198).

1.2.3. Moléculas MHC de clase I: procesamiento y presentación antigénica

Las moléculas MHC de clase I están constituidas por cadenas pesadas-MHC unidas no covalentemente a una cadena ligera soluble no polimorfica denominada β 2-microglobulina (199). La gruta de unión al péptido antigénico, tercer componente del complejo MHC-I expresado en superficie, está formada por dos dominios altamente polimorficos α 1 y α 2. Ambos dominios conforman una estructura formada por dos hélices α que delimitan los bordes de la gruta y láminas β antiparalelas. Aunque cada molécula MHC-I es capaz de unir diferentes péptidos, hay algunas restricciones tanto en longitud como en secuencia (200). Como la gruta de unión se encuentra cerrada por ambos extremos, las moléculas de clase I únicamente pueden unir péptidos de 8 a 10 residuos de longitud (**Figura 10**).

Figura 10



Estructura tridimensional del complejo trimérico formado por: cadena pesada HLA de clase I, β 2-m, y péptido antigénico.

Los péptidos presentados por las moléculas MHC-I tienen unas características propias: presentan en el extremo C-terminal residuos hidrofóbicos o básicos, y diferentes residuos de anclaje que son los que interaccionan con aminoácidos polimórficos de moléculas HLA-I. El cambio de un residuo de anclaje puede ocasionar que un determinado péptido se una a un alelo particular HLA y no a otro.

La mayoría de los péptidos que unen las moléculas MHC-I son derivados de proteínas sintetizadas en el citoplasma celular (201). Siempre se había considerado que estos péptidos procedían de proteínas celulares degradadas en el citoplasma en virtud del proceso de recambio celular de estructuras deterioradas o envejecidas. Sin embargo, estudios recientes indican que la principal fuente de péptidos presentados por MHC-I procede de proteínas nuevas recién sintetizadas (202, 203). Entre el 30-80% de las proteínas recién sintetizadas son rápidamente degradadas. Estos sustratos han sido denominados productos defectivos ribosomales o DRiPs, y representan polipéptidos sintetizados prematuramente que no tienen la longitud correcta o proteínas mal plegadas (misfolded). Estos productos generan una fuente rica de péptidos para la presentación antigénica por parte de moléculas MHC-I, y al mismo tiempo este sistema permite una rápida detección de productos virales o bien de células alteradas.

Gran parte de la actividad proteolítica del citoplasma es mediada por el proteasoma (204). La mayoría de los sustratos del proteasoma se encuentran modificados covalentemente mediante la unión a ubiquitina. Tanto polipéptidos como proteínas mal plegadas y los DRiPs pueden unirse a ubiquitina para ser degradados por este complejo. Por lo tanto no es sorprendente que el proteasoma genere la principal fuente de péptidos presentados por MHC-I (205). Esta función fue claramente demostrada con el empleo

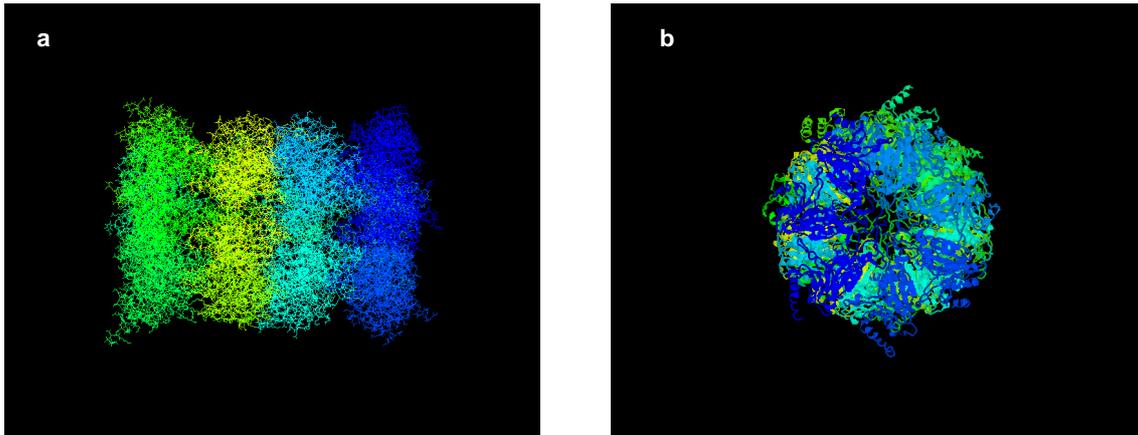
de inhibidores específicos que interaccionan con los centros catalíticos del proteasoma (206).

El proteasoma es un complejo constituido por 28 subunidades con estructura cilíndrica. Las diferentes subunidades se ordenan en cuatro anillos apilados formados cada uno por 7 de ellas, con un núcleo hueco recubierto por los centros activos de las subunidades catalíticas (207) (**Figura 11**). Tres subunidades constitutivas y sus correspondientes subunidades inducibles por $\text{IFN}\gamma$ constituyen los centros catalíticos del proteasoma. Las subunidades inducibles LMP2 y LMP7 están codificadas en la región del MHC cerca de los genes TAP, y la tercera MECL-1 se codifica en una región diferente del MHC. La sustitución de las subunidades constitutivas por las inducibles cambia la especificidad del proteasoma hacia su sustratos: generándose péptidos con extremos C-terminales de residuos hidrofóbicos y básicos, y reduciéndose la rotura en residuos ácidos; que por otro lado son los péptidos preferidos para la presentación por moléculas MHC-I y que también son los péptidos preferentemente transportados por los transportadores de péptidos TAP.

La función del proteasoma está controlada a varios niveles. El "core" del proteasoma (constituido por las 28 subunidades) o proteasoma 20S es inherentemente inactivo. Ello es debido a que sus centros catalíticos están localizados dentro del "lumen ahuecado" de su estructura cilíndrica, y por tanto físicamente es imposible que los sustratos puedan acceder al interior del cilindro donde se encuentran los centros activos (207, 208). Esta restricción se solventa a través de la unión de proteínas activadoras específicas que inducen un cambio conformacional en el proteasoma creándose estrechos poros a través de los cuales los sustratos pueden acceder al interior del mismo (209). Uno de estos

activadores es el PA28, una molécula en forma de anillo constituida por dos subunidades: PA28 α y PA28 β (210, 211). La unión de PA28 a uno o ambos extremos del proteasoma activa la hidrólisis de péptidos cortos, pero no de proteínas (212, 213).

Figura 11



Estructura del proteasoma de mamíferos. (a) Sección longitudinal, donde se observan en diferente color los cuatro anillos; (b) sección transversal con las 7 subunidades que forman cada uno de los cuatro anillos.

La función del proteasoma es también controlada por otro activador, el PA700 (conocido también como 19Scap) (214, 215). Igualmente PA700 puede unirse a uno o ambos extremos del proteasoma generando péptidos cortos (216). Sin embargo, PA700 es capaz de producir la degradación selectiva de proteínas covalentemente unidas a ubiquitina, y por lo tanto se requiere para la degradación de gran número de proteínas celulares (214, 215).

Las moléculas MHC-I no solamente presentan péptidos derivados de proteínas citosólicas sino también de proteínas de membrana y secretadas, como por ejemplo proteínas de la envoltura vírica (217, 218). Las glicoproteínas de membrana y las

secretadas se translocan normalmente al lumen del retículo endoplasmático (RE) durante su biosíntesis. Sin embargo, los péptidos presentados por moléculas HLA de clase I indican que estas proteínas son degradadas en el citosol. Al parecer las proteínas del RE pueden regresar al citosol mediante el mismo sistema de translocación por el que fueron inicialmente transportadas a través de la membrana del retículo (219). Esta translocación inversa sería el procedimiento normal por el que proteínas mal plegadas en el RE son degradadas. Una vez en el citosol los polipéptidos son degradados vía ubiquitina-proteasoma y los péptidos resultantes pueden ser transportados de nuevo al lumen del RE mediante los transportadores de péptidos TAP (220).

El proteasoma genera péptidos de una longitud de 15 a 20 residuos, sin embargo las moléculas MHC de clase I presentan péptidos de 8-10 residuos. ¿Cómo se generan entonces los péptidos de longitud adecuada? Gracias a la actuación de un conjunto de aminopeptidasas que eliminan residuos del extremo N-terminal, incluyendo la leucina-aminopeptidasa inducible por IFN γ , la aminopeptidasa sensible a puromicina y la sensible a bleomicina (221). La mayoría de los péptidos generados son completamente degradados en el citosol y solamente unos pocos consiguen llegar al borde del RE siendo transportados al interior gracias a un sistema ATP dependiente, constituido por las proteínas TAP1 y TAP2 (transportadores asociados con el procesamiento antigénico), que permiten el transporte selectivo de péptidos de 8 a 15 Aa. Dentro del RE, las moléculas MHC-I vacías esperan a cargarse con estos péptidos. Qué ocurre con los péptidos que entran al RE de un tamaño mayor al permitido por las moléculas de clase I. Recientemente se ha identificado una nueva aminopeptidasa en el lumen del RE que parece ser esencial en la producción de péptidos presentados por moléculas MHC-I. Aminopeptidasa denominada ERAAP-de aminopeptidasa del RE asociada al

procesamiento antigénico. La enzima ERAAP, es un miembro de la familia de metaloproteasas de zinc M1, caracterizadas por un motivo altamente conservado en el centro del dominio catalítico (222). Se expresa en todos los tejidos, siendo muy alta en hígado, pulmón, bazo y timo-tejidos que expresan elevadas concentraciones de moléculas HLA de clase I (223). Es inducible por $\text{IFN}\gamma$ al igual que otros componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico. La ERAAP rompe residuos N-terminales de Lys (K), Leu (L), Tyr (Y) y Asn (N). Es incapaz de romper residuos X-Pro, siendo ésta una característica compartida por las aminopeptidasas del RE y supone una fuerte evidencia de que muchos de los péptidos presentados por las moléculas de clase I tengan la secuencia "X-Pro-Xn" (224).

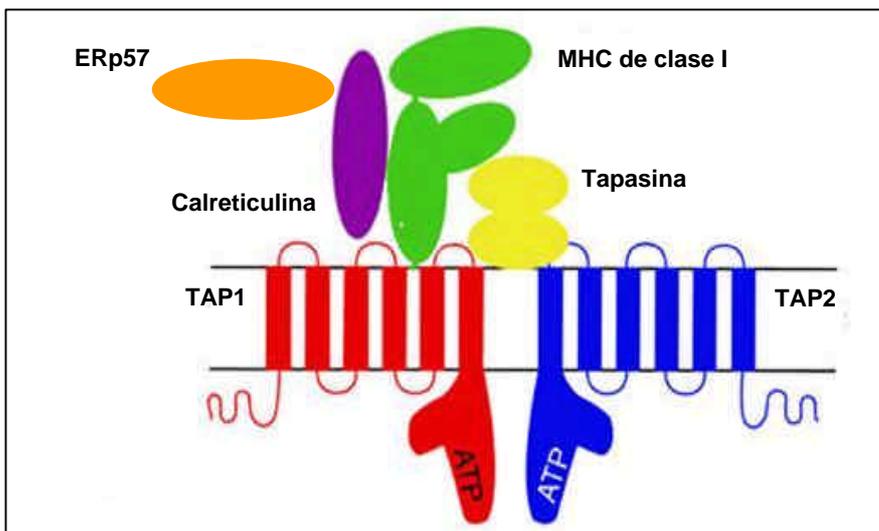
Diferentes estudios han puesto de manifiesto que la proteólisis de precursores antigénicos en el citoplasma raramente produce o rinde el péptido final (225-227). Si los péptidos en el interior del RE son demasiado largos, sus extremos N-terminales son acortados por la enzima ERAAP hasta que adquieren la longitud óptima. La actuación de esta enzima explicaría por qué los péptidos presentados por las moléculas MHC-I poseen la longitud precisa. Los péptidos que no son capaces de unirse a moléculas MHC-I son completamente destruidos por ERAAP y por esta causa no se encuentran extractos en células intactas (228). Cuando se inhibe la expresión de la enzima ERAAP se disminuye la expresión de moléculas de clase I en 1/3 y la presentación de diferentes péptidos se ve también diferentemente afectada; algunos péptidos no se afectan por la ausencia de la enzima, otros desaparecen y otros son presentados más de lo normal (223).

La mayoría de los oligopéptidos que se generan por acción del proteasoma son posteriormente degradados por aminopeptidasas y endopeptidasas en el citoplasma celular, siendo empleados los aminoácidos resultantes como fuente metabólica para la biosíntesis de proteínas o bien para el catabolismo celular (204). Sin embargo, una fracción de estos péptidos son translocados al interior del lumen del RE mediante transportadores TAP (201). TAP, es una proteína integral del RE formada por dos subunidades, TAP1 y TAP2 codificadas dentro del MHC, próximas a LMP2 y LMP7. Y al igual que LMP2 y LMP7, la expresión de TAP1 y TAP2 es promovida tras la exposición de las células a IFN γ . No se conoce como se realiza el transporte de péptidos a través el complejo TAP, tal vez la unión del péptido induzca un cambio conformacional responsable de la hidrólisis de ATP, que induciría la apertura del poro, liberación del péptido de TAP y difusión hacia el interior del RE (229). En células deficientes en TAP, los heterodímeros de clase I no pueden ensamblarse con los péptidos (230, 231). En estas circunstancias las cadenas pesadas de clase I no ensambladas son posteriormente translocadas hacia el citosol y degradadas por el proteasoma. Por lo tanto, células deficientes en TAP presentan muy baja expresión de moléculas de clase I en superficie, exhibiendo una baja respuesta frente a linfocitos T citotóxicos (CTLs). Sin embargo, igualmente se han descrito rutas independientes de TAP y del proteasoma para la presentación de péptidos (201), que generan respuestas de CTLs. Aunque probablemente tengan un pequeño papel en la expresión de péptidos por parte de las moléculas MHC-I, pueden tener importancia en la generación de una respuesta efectiva de CTLs in vivo.

La carga de moléculas MHC-I con péptidos en el RE es un proceso altamente regulado que implica a varias proteínas accesorias (201, 232, 233). Los pasos iniciales del

ensamblaje de moléculas de clase I están controlados por chaperonas con dominios tipo lectina, como son la calnexina y calreticulina, ambas reconocen proteínas N-glicosiladas (201). Inmediatamente después de su síntesis, MHC-I se une a la proteína calnexina. La unión de β_2m a cadena pesada induce el intercambio de calnexina por calreticulina en células humanas. Aunque la asociación de calnexina con cadena pesada de clase I es indispensable, su importancia para el ensamblaje de MHC-I no está clara, así se ha descrito que este proceso se produce normalmente en una línea celular humana deficiente para calnexina (234). Una posible explicación para este fenómeno, es que en células humanas, otras chaperonas tales como la proteína BiP (proteína de unión a cadena pesada tipo inmunoglobulina) suplan la función de calnexina. Hay evidencia de hecho, de que en humanos la proteína BiP se une a la cadena pesada de clase I durante los pasos tempranos del ensamblaje (235). La calreticulina en cambio, sí que juega un papel crítico en el ensamblaje de clase I, así células de ratón deficientes para calreticulina presentan un profundo defecto en la carga de péptidos a las moléculas de clase I (236).

Los heterodímeros de clase I que se encuentran unidos a calreticulina se asocian con otras proteínas residentes del RE, incluyendo la oxido-reductasa tiol-dependiente ERp57/ER60, las dos subunidades de TAP y la tapasina (o glicoproteína asociada a TAP) (232, 237). Este complejo proteico multifactorial se denomina "complejo de carga peptídico de MHC-I" (**Figura 12**).

Figura 12

Complejo de carga peptídico formado por las proteínas: MHC de clase I asociada a calreticulina, ERp57, tapasina, y el heterodímero TAP1/TAP2.

La tapasina forma un enlace físico entre las dos subunidades de TAP y los heterodímeros de clase I (238, 239). El dominio N-terminal de la tapasina interacciona con los dominios $\alpha 2$ y $\alpha 3$ de la cadena pesada de clase I, mientras que la región citoplasmática C-terminal y el dominio transmembrana interaccionan con TAP (232).

La calreticulina interacciona directamente con N-glicanos de cadena pesada de clase I (240), y parece ser que se une de forma no-covalente con ERp57 (241). Y ERp57 interacciona covalentemente con la tapasina a través de un puente disulfuro intercatenario (242).

La tapasina es un componente crítico del complejo de carga peptídico. En su ausencia, la calreticulina y ERp57 tienen una menor asociación con los heterodímeros de clase I (232, 243). El orden preciso del ensamblaje de los diferentes componentes del complejo

no está claro. Parece ser que inicialmente los heterodímeros TAP interactúan con la tapasina y ERp57, el cual se encuentra unido no covalentemente a calnexina (244). Este complejo posteriormente se uniría a los heterodímeros clase I/ β 2m, con liberación de la calnexina y reclutamiento de la calreticulina, para generar el complejo de carga maduro (244).

En células deficientes en tapasina (245), la mayoría de las moléculas MHC-I están cargadas con péptidos de baja afinidad, que son inestables a temperaturas fisiológicas. Estas células por tanto expresan pocas moléculas de clase I en superficie y son defectivas en la presentación antigénica restringida a MHC-I. Resultando que una de las funciones de la tapasina es editar el repertorio de péptidos catalizando el reemplazamiento de péptidos de baja afinidad por péptidos de alta afinidad (232, 233, 237, 246).

La unión covalente entre la tapasina y ERp57 se ha observado que tiene una gran importancia para la completa oxidación de la cadena pesada (242). Así, mutaciones en la tapasina que impiden su unión con ERp57 no solamente impiden la completa oxidación de las moléculas de clase I sino que también previenen la carga de moléculas MHC-I con péptidos de alta afinidad (242). Este hallazgo sugiere que la tapasina influye en el repertorio de péptidos de las moléculas MHC-I al facilitar la formación de los puentes disulfuro de la cadena pesada de clase I.

1.3. Inmunoterapia en el cáncer de colon

Los linfocitos T citotóxicos o CTLs se generan en el curso de la activación de una reacción inmune a partir de linfocitos T precursores o *naive*, los cuales requieren al menos dos señales secuenciales.

La primera señal viene determinada por la interacción específica del receptor clonotípico de linfocitos T o TCR con el antígeno procesado y presentado por las células presentadoras de antígenos (APC) en el proceso denominado priming o cross-priming. La activación del linfocito T requiere además la participación de señales coestimuladoras mediadas por la interacción de diferentes moléculas sobre la superficie de la APC y del LT. La interacción mejor caracterizada se realiza entre el receptor CD28 expresado por los CTLs y el ligando CD80 (B7.1) que presentan las APC (247). Esta unión permite la supervivencia y expansión clonal del LT antígeno-específico mediante la expresión de proteínas anti-apoptóticas de la familia bcl-2 (248) y la producción de IL-2 (249, 250). Parece ser que la coestimulación mediada por CD28 se requiere únicamente para la proliferación de las células T, sin embargo no parece ser esencial en la lisis de la célula diana (251). Ya que todas las células somáticas maduras expresan el complejo MHC-I/péptido pero carecen del ligando CD80, la ausencia de esta señal coestimuladora representa un mecanismo efectivo que previene la activación de los CTLs, frente a componentes del tejido normal (252).

Una vez que los CTLs se activan tienen una alta actividad citolítica frente a células tumorales que presentan el determinante antigénico apropiado. Proteasas del tipo granzimas y perforina son liberadas en la sinapsis entre las dos células, ocasionando la muerte celular por alteración de la membrana y activación de la cascada apoptótica

(253). Un mecanismo citotóxico alternativo es mediado por la interacción Fas-Fas-L (254), ambas moléculas son miembros de la superfamilia TNF/NGF (factor de necrosis tumoral/factor de crecimiento neuronal) y presentan un importante papel en la muerte celular por apoptosis. Mientras que el receptor Fas (45kDa) es expresado de forma ubicua por células normales y tumorales, su ligando Fas-L (40kDa) se expresa únicamente en linfocitos T activados, células NK, células de sertoli testiculares, y en células epiteliales de retina y córnea (255). La unión de Fas-L expresado sobre CTLs con el receptor Fas de la célula diana, activa una cascada de muerte celular mediada por caspasas que causa la fragmentación del DNA y apoptosis de la misma (256). Sin embargo las células tumorales son capaces igualmente de expresar Fas-L induciendo la muerte de los LT, constituyendo por tanto un mecanismo de inmunoevasión (257, 258).

1.3.1. Epitopos antigénicos asociados a moléculas HLA de clase I en tumores colorrectales

La mayoría de los epitopos antigénicos de antígenos asociados a tumor (TAA) caracterizados hasta el momento en tumores de colon son nonapéptidos presentados por HLA-A2, lo cual se explica por la alta prevalencia de HLA-A2 en la población caucásica (**Tabla 5**).

En todos los ensayos que emplean LT específicos frente a TAA, se han realizado mediante expansión y estimulación *in vitro* tanto de linfocitos infiltrados (TIL) como de linfocitos de sangre periférica. La única excepción la constituye el estudio de Nagorsen y col. en el que identifican la existencia de CTLs dirigidos frente a los epitopos de CEA, Ep-CAM y her-2/neu asociados a HLA-A2 en aproximadamente un tercio de pacientes con cáncer colorrectal (285). Estos CTLs fueron capaces de secretar IFN γ *in vitro*,

aunque su capacidad citolítica frente a las células tumorales no se ensayó. En este estudio la respuesta positiva de CTLs solamente se observó en estados avanzados de la enfermedad (estadio C y D de Duke), sugiriendo que la invasión de los ganglios linfáticos por las células tumorales sería un prerrequisito para la inducción de una respuesta de CTLs frente a un TAA. Una explicación alternativa sería que en casos de enfermedad limitada, los CTLs se encuentran restringidos en el tumor primario como TIL, mientras que únicamente en casos diseminados podría detectarse respuesta de CTLs en sangre periférica.

Tabla 5. Epitopos antigénicos MHC de clase I en tumores de colon

TAA	Residuos	Secuencia antigénica	HLA	Referencia
CEA	571-579	YLSGANLNL	A0201	259, 260
CEA	694-702	GVLVGALI	A0201	261
CEA	652-660	TYACFVSNL	A2402	262
CEA	268-277	QYSWFVNG	A24	263
CEA	652-660	TYACFVSNL	A24	263
CEA	61-69	HLFGYSWYK	A0301,A1101,A3101, A3301, A6801	264
Ep-CAM	263-271	GLKAGVIAV	A0201	259
EP-CAM	184-192	ILYENNVIT	A0201	265
Ep-CAM	184-193	ILYENNVITI	A0201	265
her-2/neu	654-662	IISAVVGIL	A0201	266, 267
her-2/neu	8-16	RWGLLLALL	A24	268
her-2/neu	369-377	KIFGSLAFL	A2	269, 270
her-2/neu	754-762	VLRENTSPK	A0301, A1101, A3101,	264
WP p53	149-157	STPPPGTRV	A0201	271
WP p53	264-272	LLGRNSFEV	A0201	271
WP p53	161-169	AIYKQSQHM	A24	272
hTERT	540-548	ILAKFLHWL	A0201	273, 274
hTERT	865-873	RLVDDFLLV	A0201	273
FBP	191-199	EIWITHSTKV	A2	275
SART1	690-698	EYRGFTQDF	A24	276, 277
SART1	736-744	KGSGKMKTE	A26	277, 278
SART3	302-310	LLQAEAPRL	A0201, A0207	279
SART3	309-317	RLAEYQAYI	A0201, A0207	279
p21 ras	1-25	MTEYKLVVVGAGA VGKSALTIQLIQ	B12(B44)	280
MUC1	141-148	APDTRPAP	A2	281
MUC1	130-138	STAPPAHGV	A2	281
MUC1	12-20	LLLITVLTV	A2	282
MUC1	950-958	STAPPHVNV	A2	282
MUC1	9-17	STAPPAHGV	A11	283
MUC2	476-484	LLNQLQVNL	A2	284
MUC2	654-662	MLWGWREHV	A2	284

Abreviaturas: TAA, antígeno asociado a tumor; CEA, antígeno carcinoembrionario; Ep-CAM, molécula de adhesión de células epiteliales; her-2/neu (C-erbB2, p185), glicoproteína transmembrana de 185 kDa con actividad tirosin-quinasa; WP p53, gen supresor de tumores p53; hTERT, telomerasa; FBP, proteína de unión a folato; SART1, 3; antígeno 1 y 3 de rechazo de tumor escamoso; MUC1, 2, mucinas 1 y 2.

1.3.2. Inmunoterapia activa

La inmunoterapia activa emplea bien los propios antígenos asociados a tumor (TAA) enteros o epitopos de los mismos administrados de forma sistemática solos o en combinación con otros inmunógenos, con el objeto de estimular la propia respuesta inmune de CTLs del paciente.

Los primeros ensayos incluyeron los siguientes inmunógenos: el bacilo de Calmette-Guerin (BCG), levamisol, citoquinas, células tumorales autólogas, extractos de células tumorales y mezcla de antígenos. Aunque algunos de estos ensayos (286-288) han mostrado una regresión ocasional y mejora de la supervivencia del paciente, hay que considerar que la respuesta inmune celular se ha medido únicamente con el empleo de tests cutáneos de sensibilidad retardada. Sin embargo, la ausencia de una respuesta clínica cuantificable junto con los problemas derivados del empleo de células tumorales como antígenos (por ejemplo la dificultad de obtener suficientes células para la immunoestimulación y la posible transmisión de virus contaminantes del tumor) han hecho que esta aproximación sea poco fiable.

El objetivo de la inmunoterapia activa es la estimulación del sistema inmune frente a antígenos diana administrados y combinados en forma de vacunas. Como por ejemplo el empleo de vacunas basadas en péptidos sintéticos junto a adyuvantes, células dendríticas y antígenos insertados en vectores virales (virus avipox, virus vacunal).

La estrategia más simple de estimular la respuesta inmune del hospedador frente a antígenos tumorales es la inyección subcutánea de péptidos derivados de TAA relevantes, a veces acompañados con un inmunoadyuvante. La inmunización con

péptidos ofrece la posibilidad de dirigir específicamente la respuesta inmune frente a epítopos tumorales expresados, evitando la posible inducción de autorreactividad hacia secuencias presentes en el resto de la proteína. La administración de péptidos sintéticos de ras conjuntamente con el factor estimulador de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) genera una respuesta inmune satisfactoria en pacientes con cáncer colorrectal que ya se encuentra en fase clínica (estadio II) (289).

Una segunda aproximación es el empleo de DC como vehículos para el transporte de antígenos, gracias a que se las puede considerar como las células presentadoras de antígenos más potentes y que además pueden obtenerse fácilmente *in vitro* a partir de células mononucleares de sangre periférica (290-292). Las DCs obtenidas de esta forma pueden cargarse con antígenos, siendo administradas posteriormente a pacientes con escasos efectos secundarios y aumentando la inmunidad anti-tumoral específica T (293). Con esta técnica Nair y col. han inducido de forma satisfactoria respuesta de CTLs frente al CEA, después de la estimulación *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica de pacientes con cáncer de colon avanzado con DC autólogas transfectadas que expresan el epítopo CAP-1 de CEA (294).

Otra alternativa es el empleo de vectores, como el vector de replicación defectivo avipox (ALVAC) específico para CEA en pacientes HLA-A2+ (295). Después de la vacunación, las células mononucleares de sangre periférica se incubaron con el epítopo CAP-1 e IL-2, detectándose actividad citotóxica de CTLs frente a células de líneas de colon HLA-A2. Esto demuestra que el vector ALVAC-CEA puede ser empleado en ensayos de vacunación de pacientes con cáncer de colon. En otro ensayo perteneciente a la misma línea se empleó el vector ALVAC-CEA/B7.1 para vacunar a pacientes con

adenocarcinomas avanzados que presentaban expresión de CEA. 12 de 15 pacientes HLA-A2+ que pudieron ser analizados mostraron aumento de precursores de CTLs específicos para CEA después de la vacunación en un ensayo ELISPOT (296).

1.3.3. Inmunoterapia adoptiva

La inmunoterapia adoptiva emplea CTLs generados y seleccionados in vitro frente a un determinado TAA, que posteriormente son administrados a un huésped que exprese ese antígeno tumoral mediando la regresión tumoral. Tanto las células mononucleares de sangre periférica como los TIL pueden ser empleados como fuente de células citolíticas, aunque parece ser que los TIL expandidos son los efectores más eficientes (297). En algunos casos se administran CTLs conjuntamente con un adyuvante que potencia su actividad (298), frecuentemente IL-2 (299), IFN α (300), IFN γ (301) e IL-6 (301, 302).

En el trabajo de Kim y col. (262) se genera un CTL específico para CEA a partir de células mononucleares de sangre periférica de un donante sano después de varios ciclos de estimulación in vitro empleando bolitas de látex que portan el antígeno CEA unido sobre su superficie. La población celular resultante contenía un 72% de LT CD8+ que fueron capaces de lisar células diana y líneas tumorales positivas para CEA. Las mismas células efectoras igualmente fueron capaces de lisar dianas HLA-A2402 restringidas a CEA, demostrando que un antígeno exógeno unido a bolitas de látex puede ser capturado por DC y generar una respuesta citotóxica. Se trata de un método con gran aplicabilidad para generar CTLs capaces de responder policlonalmente a varios epitopos de TAA.

Una forma alternativa de obtener una respuesta de CTLs por inmunoterapia adoptiva incluye el empleo de anticuerpos monoclonales bi-específicos (bi-mAb). Se caracterizan por presentar un doble reconocimiento, por un lado un fragmento Fv reconoce el antígeno CD3 de los linfocitos T y el otro reconoce un epitopo TAA. Estos anticuerpos que carecen de la fracción Fc son capaces de activar directamente a LTs mediante la interacción directa con el epitopo TAA expresado sobre las células tumorales y la molécula CD3 de un LT sin necesidad del reconocimiento TCR-HLA/péptido. De esta forma se ha generado el anticuerpo monoclonal bi-específico OKT3/NSI 19-9 por fusión somática de dos líneas de hibridoma productoras de anticuerpos frente a CD3 y CA 19-9 respectivamente (303). Este anticuerpo monoclonal en combinación con el anticuerpo monoclonal coestimulador anti-CD28 es capaz de activar a células T, y por tanto puede lisar a células tumorales-CA 19-9 in vitro. Sin embargo, la administración de bi-mAbs a pacientes presenta severos efectos secundarios como resultado de la activación inespecífica de células T.

1.4. Referencias

1. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61:759-767.
2. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, Sargeant L, Krapcho K, Wolff E, Burt R, Hughes JP, Warrington J, McPherson J, Wasmuth J, Le Paslier D, Abderrahim H, Cohen D, Leppert M, White R. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; 66:589-600.
3. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P, Markham A, Krush AJ, Petersen G, Hamilton SR, Nilbert MC, Levy DB, Bryan TM, Preisinger AC, Smith KJ, Su L-K, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991; 253:665-669.
4. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68:820-823.
5. Miyake M, Konishi M, Kikuchi-Yanoshita R, Enomoto M, Igari T, Tanaka K, Muraoka M, Takahashi H, Amada Y, Fukayama M, Maeda Y, Iwama T, Mishima Y, Mori T, Koike M. Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res* 1994; 54:3011-3020.
6. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1992; 1:229-233.
7. Olschwang S, Tiret A, Laurent-Puig P, Muleris M, Parc R, Thomas G. Restriction of ocular fundus lesions to a specific subgroup of APC mutations in adenomatous polyposis coli patients. *Cell* 1993; 75:959-968.
8. Caspari R, Olschwang S, Friedl W, Mandl M, Boisson C, Boker T, Augustin A, Kadmon M, Moslein G, Thomas G, Al E. Familial adenomatous polyposis: desmoid tumors and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444. *Hum Mol Genet* 1995; 4:337-340.
9. Spirio L, Olschwang S, Groden J, Robertson M, Samowitz W, Joslyn G, Gelbert L, Thliveris A, Carlson M, Otterud B, Lynch H, Watson P, Lynch P, Laurent-Puig P, Burt R, Hughes JP, Thomas G, Leppert M, White R. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 1993; 75:951-957.
10. Gardner RJM, Kool D, Edkins E, Walpole IR, Macrae FA, Nasioulas S, Scott WJH. The clinical correlates of a 3' truncating mutation (codons 1982-1983) in the adenomatous polyposis gene. *Gastroenterology* 1997; 113:326-331.
11. Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Ostrer H, Giardiello FM, Hamilton SR, Hampel H, Markowitz A, Klimstra D, Jhanwar S, Winawer S, Offit K, Luce

- MC, Kinzler KW, Vogelstein B. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet* 1997; 17:79-83.
12. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87:159-170.
 13. Midgley CA, White S, Howitt R, Save V, Dunlop MG, Hall PA, Lane DP, Wyllie AH, Bubb VJ. APC expression in normal human tissues. *J Pathol* 1997; 181:426-433.
 14. van Es JH, Giles RH, Clevers HC. The many faces of the tumor suppressor gene APC. *Exp Cell Res* 2001; 264:126-134.
 15. Seeling JM, Miller JR, Gil R, Moon RT, White R, Virshup DM. Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science* 1999; 283:2089-2091.
 16. Kawasaki Y, Senda T, Ishidate T, Koyama R, Morishita T, Iwayama Y, Higuchi O, Akiyama T. Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science* 2000; 289:1194-1197.
 17. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Muller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P. Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 1993; 262:1731-1734.
 18. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 1993; 262:1734-1737.
 19. Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 1998; 280:596-599.
 20. Kishida S, Yamamoto H, Ikeda S, Kishida M, Sakamoto I, Koyama S, Kikuchi A. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem* 1998; 273:10823-10826.
 21. Su LK, Burrell M, Hill DE, Gyuris J, Brent R, Wiltshire R, Trent J, Vogelstein B, Kinzler KW. APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res* 1995; 55:2972-2977.
 22. Neufeld KL, Nix DA, Bogerd H, Kang Y, Beckerle MC, Cullen BR, White RL. Adenomatous polyposis coli protein contains two nuclear export signals and shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:12085-12090.
 23. Henderson BR. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol* 2000; 2:653-660.

24. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1992; 1:229-233.
25. Polakis P. The oncogenic activation of β -catenin. *Current Opin Genet Dev* 1999; 9:15-21.
26. Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 1997; 11:3286-3305.
27. Boutros M, Mlodzik M. Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. *Mech Dev* 1999; 83:27-37.
28. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P. Binding of GSK3 β to the APC- β -catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 1996; 272:1023-1026.
29. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. Beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 1997; 16:3797-3804.
30. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M. Functional interaction of β -catenin with the transcription factor LEF1. *Nature* 1996; 383:638-642.
31. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281:1509-1512.
32. Howe LR, Subbaramaiah K, Chung WJ. Transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in Wnt-1-transformed mouse mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1999; 59:1572-1577.
33. Testu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398:422-426.
34. Roose J, Huls G, van Beest M. Synergy between tumor suppressor APC and the β -catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* 1999; 285:1923-1926.
35. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000; 14:1837-1851.
36. Sparks AB, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutational analysis of the APC/ β -catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:1130-1134.
37. Samowitz WS, Powers MD, Spirio LN, Nollet F, van Roy F, Slattery ML. Beta-catenin mutations are more frequent in small colorectal adenomas than in larger adenomas and invasive carcinomas. *Cancer Res* 1999; 59:1442-1444.
38. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin of APC. *Science* 1997; 275:1787-1790.

39. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998; 281:1509-1512.
40. Testu O, McCormick F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 1999; 398:422-426.
41. Heinen CD, Gross KH, Cornelius JR, Babcock GF, Knudsen ES, Kowalik T, Groden J. The APC tumor suppressor controls entry into S-phase through its ability to regulate the cyclin D/Rb pathway. *Gastroenterology* 2002; 123:751-763.
42. Kaplan KB, Burds AA, Swedlow JR, Bekir SS, Sorger PK, Nathke IS. A role for the adenomatous polyposis coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 2001; 3:429-432.
43. Fodde R, Kuipers J, Rosenberg C, Smits R, Kielman M, Gaspar C, van Es JH, Breukel C, Wiegant J, Giles RH, Clevers H. Mutations in the APC tumor suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol* 2001; 3:433-438.
44. Su LK, Kinzler KW, Vogelstein B, Preisinger AC, Moser AR, Luongo C, Gould KA, Dove WF. Multiple intestinal neoplasia caused by a mutation in the murine homolog of the APC gene. *Science* 1992; 256:668-670.
45. Smits R, Kielman MF, Breukel C, Zurcher C, Neufeld K, Jagmohan-Changur S, Hofland N, van Dijk J, White R, Edelmann W, Kucherlapati R, Khan PM, Fodde R. Apc1638T: a mouse model delineating critical domains of the adenomatous polyposis coli protein involved in tumorigenesis and development. *Genes Dev* 1999; 13:1309-1321.
46. Wijnen JT, Vasen HRA, Khan PM, Zwinderman AH, van der Klift H, Mulder A, Tops C, Moller P, Fodde R. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998; 339:511-518.
47. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomaki P, De La Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996; 2:169-174.
48. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveals a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363:558-561.
49. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260:816-819.
50. Wu Y, Nystrom-Lahti M, Osinga J, Looman MW, Peltomaki P, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Hofstra RM, Buys CH. MSH2 and MLH1 mutations in sporadic replication error-positive colorectal carcinoma as assessed by two-dimensional DNA electrophoresis. *Genes Chromosomes Cancer* 1997; 18:269-278.

51. Gryfe R, Kim H, Hsieh ETK, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342:69-77.
52. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomaki P, De La Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996; 2:169-174.
53. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JJ, Markowitz S, Willson JKV, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:6870-6875.
54. Peltomaki P, Vasen HFA. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. *Gastroenterology* 1997; 113:1146-1158.
55. Marsischky GT, Filosi N, Kane MF, Kolodner R. Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes Dev* 1996; 10:407-420.
56. Sia EA, Kokoska RJ, Dominska M, Greenwell P, Petes TD. Microsatellite instability in yeast: dependence on repeat unit size and DNA mismatch repair genes. *Mol Cell Biol* 1997; 17:2851-2858.
57. Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B, Modrich P. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 1993; 75:1227-1236.
58. Koi M, Umar A, Chauhan DP, Cherian SP, Carethers JM, Kunkel TA, Boland CR. Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. *Cancer Res* 1994; 54:4308-4312.
59. Hawn MT, Umar A, Carethers JM, Marra G, Kunkel TA, Boland CR, Koi M. Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Res* 1995; 55:3721-3721.
60. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268:1336-1338.
61. Souza RF, Appel R, Yin J, Wang S, Smolinski KN, Abraham JM, Zou TT, Shi YQ, Lei J, Cottrell J, Cymes K, Biden K, Simms L, Leggett B, Lynch PM, Frazier M, Powell SM, Harpaz N, Sugimura H, Young J, Meltzer SJ. Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat Genet* 1996; 14:255-257.

62. Guanti G, Resta N, Simone C, Cariola F, Demma I, Fiorente P, Gentile M. Involvement of PTEN mutations in the genetic pathways of colorectal cancerogenesis. *Hum Mol Genet* 2000; 9:283-287.
63. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275:967-969.
64. Schwartz S Jr, Yamamoto H, Navarro M, Maestro M, Reventos J, Perucho M. Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res* 1999; 59:2995-3002.
65. Duval A, Gayet J, Zhou XP, Iacopetta B, Thomas G, Hamelin R. Frequent frameshifts mutations of the TCF-4 gene in colorectal cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1999; 59:4213-4215.
66. Malkhosyan S, Rampino N, Yamamoto H, Perucho M. Frameshift mutator mutations. *Nature* 1996; 382:499-500.
67. Markowitz S, Roberts A. Tumor suppressor activity of the TGF- β pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* 1996; 7:93-102.
68. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275:967-969.
69. Souza RF, Appel R, Yin J, Wang S, Smolinski KN, Abraham JM, Zou TT, Shi YQ, Lei J, Cottrell J, Cymes K, Biden K, Simms L, Leggett B, Lynch PM, Frazier M, Powell SM, Harpaz N, Sugimura H, Young J, Meltzer SJ. Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat Genet* 1996; 14:255-257.
70. Yoshitaka T, Matsubara N, Ikeda M, Tanino M, Hanafusa H, Tanaka N, Shimizu K. Mutations of E2F-4 trinucleotide repeats in colorectal cancer with microsatellite instability. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 227:553:557.
71. Wicking C, Simms LA, Evans T, Walsh M, Chawengsaksophak K, Beck F, Chenevix-Trench G, Young J, Jass J, Leggett B, Wainwright B. CDX2, a human homologue of *Drosophila* caudal, is mutated in both alleles in a replication error positive colorectal cancer. *Oncogene* 1998; 17:657-659.
72. Pennica D, Swanson TA, Welsh JW, Roy MA, Lawrence DA, Lee J, Brush J, Taneyhill LA, Deuel B, Lew M, Watanabe C, Cohen RL, Melhem MF, Finley GG, Quirke P, Goddard AD, Hillan KJ, Gurney AL, Botstein D, Levine AJ. WISP genes are members of the connective tissue growth factor family that are up-regulated in wnt-1-transformed cells and aberrantly expressed in human colon tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:14717-14722.

73. Xu L, Corcoran RB, Welsh JW, Pennica D, Levine AJ. WISP-1 is a Wnt-1- and beta-catenin-responsive oncogene. *Genes Dev* 2000; 14:585-595.
74. Thorstensen L, Diep CB, Meling GI, Aagesen TH, Ahrens CH, Rognum TO, Lothe RA. Wnt1 inducible signaling pathway protein 3, WISP-3, a novel target gene in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Gastroenterology* 2001; 121:1275-1280.
75. Miyaki M, Iijima T, Kimura J, Yasuno M, Mori T, Hayashi Y, Koike M, Shitara N, Iwama T, Kuroki T. Frequent mutation of beta-catenin and APC genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 1999; 59:4506-4509.
76. Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, Halling KC, Cunningham JM, Boardman LA, Qian C, Christensen E, Schmidt SS, Roche PC, Smith DI, Thibodeau SN. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF-signaling. *Nat Genet* 2000; 26:146-147.
77. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997; 386:623-627.
78. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JKV, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998; 392:300-303.
79. Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. TGF-beta signaling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390:465-471.
80. Keeton MR, Curriden SA, van Zonneveld AJ, Loskutoff DJ. Identification of regulatory sequences in the type I plasminogen activator inhibitor gene responsive to transforming growth factor β . *J Biol Chem* 1991; 266:23048-23052.
81. Li JM, Nichols MA, Chandrasekharan S, Xiong Y, Wang XF. Transforming growth factor β activates the promoter of cyclin-dependent kinase inhibitor p15INK4B through a Sp1 consensus site. *J Biol Chem* 1995; 270:26750-26753.
82. Datto MB, Yu Y, Wang XF. Functional analysis of the transforming growth factor β responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. *J Biol Chem* 1995; 270:28623-28628.
83. Ko TC, Sheng HM, Reisman D, Thompson EA, Beauchamp RD. Transforming growth factor- β 1 inhibits cyclin D1 expression in intestinal epithelial cells. *Oncogene* 1995; 10:117-184.
84. Kim SJ, Angel P, Lafyatis R, Hattori K, Kim KY, Sporn MB, Karin M, Roberts AB. Autoinduction of transforming growth factor β 1 is mediated by the AP-1 complex. *Mol Cell Biol* 1990; 10:1492-1497.

85. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan R, Zborowska E, Kinzler K, Vogelstein B, Brattain M, Willson J. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268:1336-1338.
86. Tarafa G, Villanueva A, Farre L, Rodriguez J, Musulen E, Reyes G, Seminago R, Olmedo E, Paules AB, Peinado MA, Bachs O, Capella G. DCC and SMAD4 alterations in human colorectal and pancreatic tumor dissemination. *Oncogene* 2000; 19:546-555.
87. Akiyama Y, Arai T, Nagasaki H, Yagi OK, Nakahata A, Nakajima T, Ohkura Y, Iwai T, Saitoh K, Yuasa Y. Frequent allelic imbalance on chromosome 18q21 in early superficial colorectal cancers. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90:1329-1337.
88. Rommel C, Hafen E. Ras: a versatile cellular switch. *Curr Opin Genet Dev* 1998; 8:412-418.
89. Pronk GJ, Bos JL. The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Biochem Biophys Acta* 1994; 1198:131-147.
90. Guan RJ, Fu Y, Holt PR, Pardee AB. Association of K-ras mutations with p16 methylation in human colon cancer. *Gastroenterology* 1999; 116:1063-1071.
91. Ko LJ, Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996; 10:1054-1072.
92. Prives C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 1998; 95:5-8.
93. Shibata D, Reale MA, Lavin P, Silverman M, Fearon ER, Steele G, Jessup JM, Loda M, Summerhayes IC. The DCC protein and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1996; 335:1727-1732.
94. Chen YQ, Hsieh JT, Yao F, Fang B, Pong RC, Cipriano SC, Krepulat F. Induction of apoptosis and G2/M cell cycle arrest by DCC. *Oncogene* 1999; 18:2747-2754.
95. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, Dubois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1997; 107:1183-1188.
96. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* 1998; 93:705-716.
97. Sheng H, Shao J, Kirkland SC, Isakson P, Coffey RJ, Morrow J, Beauchamp RD, DuBois RN. Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J Clin Invest* 1997; 99:2254-2259.
98. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM. Suppression of intestinal polyposis in Apc delta 716 knockout mice by inhibition in cyclooxygenase 2 (COX2). *Cell* 1996; 87:803-809.

99. Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, Hashimoto S, Kawai S. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors show a differential ability to inhibit proliferation and induce apoptosis of colon adenocarcinoma cells. *FEBS Lett* 2002; 531:278-284.
100. Dang CT, Shapiro CL, Hudis CA. Potential role of selective COX-2 inhibitors in cancer management. *Oncology (Huntingt)* 2002; 16:30-36.
101. Perucho M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Biol Chem* 1996; 377:675-684.
102. Pinkel D, Seagraves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat Genet* 1998; 20:207-211.
103. Nagai H, Hirotsune S, Komatsubara H, Hatada I, Mukai T, Hayashizaki Y, Matsubara K. Genomic analysis of human hepatocellular carcinomas using restriction landmark genomic scanning. *Cancer Detect Prev* 1993; 17:399-404.
104. Konishi N, Hiasa Y, Nakamura M, Kitahori Y, Matsubara K, Nagai H. Different patterns of DNA alterations detected by restriction landmark genomic scanning in heterogeneous prostate carcinomas. *Am J Pathol* 1997; 150:305-314.
105. Stoler DL, Chen N, Basik M, Kahlenberg MS, Rodriguez-Bigas MA, Petrelli NJ, Anderson GR. The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:15121-15126.
106. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* 1997; 386:623-627.
107. Koi M, Umar A, Chauhan DP, Cherian SP, Carethers JM, Kunkel TA, Boland CR. Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. *Cancer Res* 1994; 54:4308-4312.
108. Mitelman F, Johansson B, Mertens F. Catalog of Chromosome Aberrations in Cancer Vol. 2 (Wiley-Liss, New York, 1994).
109. Li R, Yerganian G, Duesberg P, Kramer A, Willer A, Rausch C, Hehlmann R. Aneuploidy correlated 100% with chemical transformation of chinese hamster cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:14506-14511.
110. Murray AW. The genetics of cell cycle checkpoints. *Curr Opin Genet Dev* 1995; 5:5-11.
111. Nasmyth K. At the heart of the budding yeast cell cycle. *Trends Genet* 1996; 12:405-412.
112. Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. *Science* 1996; 274:1664-1672.

113. Pulovich AG, Toczyski DP, Hartwell LH. When checkpoints fail. *Cell* 1997; 88:315-321.
114. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Wilson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoints genes in human cancers. *Nature* 1998; 392:300-303.
115. Ehrlich P. Ueber den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneeskd* 1909; 5:273-290.
116. Silverstein AM. A History of Immunology (Academic, San Diego, CA, 1989).
117. Old LJ, Boyse EA. Immunology of experimental tumors. *Annu Rev Med* 1964; 15:167-186.
118. Klein G. Tumor antigens. *Annu Rev Microbiol* 1966; 20:223-252.
119. Burnet FM. Cancer-a biological approach. *Brit Med J* 1957; 1:841-847.
120. Thomas L. In Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States (ed. Lawrence, HS) (Hoeber-Harper; New York, 1959) 529-532.
121. Burnet FM. The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 1970; 13:1-27.
122. Pantelouris EM. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 1968; 217:370-371.
123. Stutman O. Tumor development after 3-methylcholanthrene in immunologically deficient athymic-nude mice. *Science* 1974; 183:534-536.
124. Stutman O. In Proceedings of the International Workshop on Nude Mice Vol. I (eds. Rygaard, Jand Poulsen, C) (Gustav Fisher, Stuttgart 1973) 257-264.
125. Rygaard J, Povlsen CO. Is immunological surveillance not a cell-mediated immune function? *Transplantation* 1974; 17:135-136.
126. 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; 82:99-106.
127. Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN- γ receptors. *Immunity* 1994; 1:447-456.
128. Kaplan DH, Shankaran V, Dighe AS, Stockert E, Aguet M, Old LJ, Schreiber RD. Demonstration of an interferon γ -dependent tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:7556-7561.

129. van den Broek MF, Kagi D, Ossendorp F, Toes R, Vamvakas S, Lutz WK, Melief CJ, Zinkernagel RM, Hengartner H. Decreased tumor surveillance in perforin-deficient mice. *J Exp Med* 1996; 184:1781-1790.
130. 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; 192:755-760.
131. Penn I. Malignant Tumors in Organ Transplant Recipients (Springer-Verlag, New York, 1970).
132. Gratti RA, Good RA. Occurrence of malignancy in immunodeficiency diseases. A literature review. *Cancer* 1971; 28:89-98.
133. Boshoff C, Weiss R. AIDS-related malignancies. *Nature Rev Cancer* 2002; 2:373-382.
134. Sheil AG. Cancer after transplantation. *World J Surg* 1986; 10:389-396.
135. Penn I. Malignant melanoma in organ allograft recipients. *Transplantation* 1996; 61:274-278.
136. Penn I. Sarcomas in organ allograft recipients. *Transplantation* 1995; 60:1485-1491.
137. Pham SM, Kormos RL, Landreneau RJ, Kawai A, Gonzalez-Cancel I, Hardesty RL, Hattler BG, Griffith BP. Solid tumors after heart transplantation: lethality of lung cancer. *Ann Thorac Surg* 1995; 60:1623-1626.
138. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396:643-649.
139. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature* 2002; 415:239-245.
140. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; 86:353-364.
141. Girardi M, Oppenheim DE, Steele CR, Lewis JM, Glusac E, Filler R, Hobby P, Sutton B, Tigelaar RE, Hayday AC. Regulation of cutaneous malignancy by $\gamma\delta$ T cells. *Science* 2001; 294:605-609.
142. Smyth MJ, Godfrey DI, Trapani JA. A fresh look at tumor immunosurveillance and immunotherapy. *Nature Immunol* 2001; 2:293-299.
143. Matzinger P. Tolerance, danger; and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:991-1045.
144. Yokoyama WM. Now you see it, now you don't! *Nature Immunol* 2000; 1:95-97.

145. Diefenbach A, Jensen ER, Jamieson AM, Raulet DH. Rael and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity. *Nature* 2001; 413:165-171.
146. Bromberg JF, Horvath CM, Wen Z, Schreiber RD, Darnell JE Jr. Transcriptionally active Stat I is required for the antiproliferative effects of both interferon α and interferon γ . *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:7673-7678.
147. Kumar A, Commune M, Flickinger TW, Horvath CM, Stark GR. Defective TNF- α -induced apoptosis in STAT1-null cells due to low constitutive levels of caspases. *Science* 1997; 278:1630-1632.
148. Luster AD, Ravetch JV. Biochemical characterization of a γ interferon-inducible cytokine (IP10). *J Exp Med* 1987; 166: 1084-1097.
149. Liao F, Rabin RL, Yannelli JR, Koniaris LG, Vanguri P, Farber JM. Human Mig chemokine: biochemical and functional characterization. *J Exp Med* 1995; 182:1301-1314.
150. Cole KE, Strick CA, Paradis TJ, Ogborne KT, Loetscher M, Glaude RP, Lin W, Boyd JG, Moser B, Wood DE, Sahagan BG, Noete K. Interferon-inducible T cell α chemoattractant (I-TAC): a novel non-ELR CXC chemokine with potent activity on activated T cells through selective high affinity binding to CXCR3. *J Exp Med* 1998; 187:2009-2021.
151. Trinchieri G. Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Ann Rev Immunol* 1995; 13:251-276.
152. Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN γ in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth factor Rev* 2002; 13:95-105.
153. Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immunosurveillance against tumor development. *J Exp Med* 2002; 195:161-169.
154. 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; 410:1107-1111.
155. Algarra I, Collado A, Garrido F. Altered MHC class I antigens in tumors. *Int Clin Lab Res* 1997; 27:95-102.
156. Cabrera T, Fernández MA, Sierra A, Garrido A, Herruzo A, Escobedo A, Fabra A, Garrido F. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive breast carcinomas. *Hum Immunol* 1996; 50:127-134.
157. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez- Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumors. *Immunol Today* 1997; 18:89-95.

158. Hicklin DJ, Wang Z, Arienti F, Rivoltini L, Parmiani G, Ferrone S. β 2-microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J Clin Invest* 1998; 101:2720-2729.
159. Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, Bennink JR. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med* 1993; 177: 265-272.
160. Sanda MG, Restifo NP, Walsh JC, Kawakami Y, Nelson WG, Pardoll DM, Simons JW. Molecular characterization of defective antigen processing in human prostate cancer. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:280-285.
161. Seliger B, Hohne A, Jung D, Kallfelz M, Knuth A, Jaeger E, Bernhard H, Momburg F, Tampe R, Huber C. Expression and function of the peptide transporters in escape variants of human renal cell carcinomas. *Exp Hematol* 1997; 25:608-614.
162. Ramal LM, Maleno I, Cabrera T, Collado A, Ferron A, Lopez-Nevot MA, Garrido F. Molecular strategies to define HLA haplotype loss in microdissected tumor cells. *Hum Immunol* 2000; 61:1001-1012.
163. Versteeg R, Kruse-Wolters KM, Plomp AC, van Leeuwen A, Stam NJ, Ploegh HL, Ruiters DJ, Schrier PI. Suppression of class I human histocompatibility leukocyte antigen by c-myc is locus specific. *J Exp Med* 1989; 170:621-635.
164. Soong TW, Hui KM. Locus-specific transcriptional control of HLA genes. *J Immunol* 1992; 149:2008-2020.
165. Koopman LA, van Der S, Giphart MJ, Fleuren GJ. Human leukocyte antigen class I gene mutations in cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:1669-1677.
166. Porgador A, Mandelboim O, Restifo NP, Strominger JL. Natural killer cell lines kill autologous β 2-microglobulin-deficient melanoma cells: implications for cancer immunotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:13140-13145.
167. 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; 285:727-729.
168. Groh V, Rhinehart R, Secrist H, Bauer S, Grabstein KH, Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived $\gamma\delta$ T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:6879-6884.
169. Garrido F, Algarra I. MHC antigens and tumor escape from immunosurveillance. *Adv Cancer Res* 2001; 83:117-158.
170. Gerosa F, Baldani-Guerra B, Nisii C, Marchesini V, Carra G, Trinchieri G. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J Exp Med* 2002; 195:327-333.

171. Galea-Lauri J, Darling D, Gan SU, Krivochtchapov L, Kuiper M, Gaken J, Souberbielle B, Farzaneh F. Expression of a variant of CD28 on a subpopulation of human NK cells: implications for B7-mediated stimulation of NK cells. *J Immunol* 1999; 163:62-70.
172. Carbone E, Ruggiero G, Terrazzano G, Palomba C, Manzo C, Fontana S, Spits H, Karre K, Zappacosta S. A new mechanism of NK cell cytotoxicity activation: the CD40-CD40 ligand interaction. *J Exp Med* 1997; 185:2053-2060.
173. Takeda K, Oshima H, Hayakawa Y, Akiba H, Atsuta M, Kobata T, Kobayashi K, Ito M, Yagita H, Okumura K. CD27-mediated activation of murine NK cells. *J Immunol* 2000; 164:1741-1745.
174. Apte RS, Mayhew E, Niederkorn JY. Local inhibition of natural killer cell activity promotes the progressive growth of intraocular tumors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:1277-1282.
175. Schwart RH. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science* 1990; 248:1349-1356.
176. Toi M, Taniguchi T, Yamamoto Y, Kurisaki T, Suzuki H, Tominaga T. Clinical significance of the determination of angiogenic factors. *Eur J Cancer* 1996; 32:2513-2519.
177. Oyama T, Ran S, Ishida T, Nadaf S, Kerr L, Carbone DP, Gabrilovich DI. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor- κ B activation in hemopoietic progenitor cells. *J Immunol* 1998; 160:1224-1232.
178. Saito H, Tsujitani S, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N. Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue. *Br J Cancer* 1998; 78:1573-1577.
179. Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP, Gabrilovich DI. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res* 2000; 6:1755-1766.
180. Girolomoni G, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells hold promise for immunotherapy. *Immunol Today* 1997; 18:102-104.
181. Ristimaki A, Honkanen N, Jankala H, Sipponen P, Harkonen M. Expression of cyclooxygenase-2 in human gastric carcinoma. *Cancer Res* 1997; 57:1276-1280.
182. Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T. Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55:3785-3789.
183. Wolff H, Saukkonen K, Anttila S, Karjalainen A, Vainio H, Ristimaki A. Expression of cyclooxygenase-2 in human lung carcinoma. *Cancer Res* 1998; 58:4997-5001.

184. Huang M, Stolina M, Sharma S, Mao JT, Zhu L, Miller PW, Wollman J, Herschman H, Dubinett SM. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res* 1998; 58:1208-1216.
185. Gorsh SM, Memoli VA, Stukol TA, Gold LI, Arrick BA. Immunohistochemical staining for transforming growth factor β 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res* 1992; 52:6949-6952.
186. Doran T, Stuhlmiller H, Kim JA, Martin EW, Triozzi PL. Oncogene and cytokine expression of human colorectal tumors responding to immunotherapy. *J Immunother* 1997; 20:372-376.
187. Takeda K, Smyth MJ, Cretney E, Hayakawa Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K. Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development. *J Exp Med* 2002; 195:161-169.
188. Straus SE, Jaffe ES, Puck JM, Dale JK, Elkon KB, Rosen-Wolff A, Peters AM, Sneller MC, Hallahan CW, Wang J, Fisher RE, Jackson CM, Lin AY, Baumler C, Siegert E, Marx A, Vaishnaw AK, Grodzicky T, Fleisher TA, Lenardo MJ. The development of lymphomas in families with autoimmune lymphoproliferative syndrome with germline Fas mutations and defective lymphocyte apoptosis. *Blood* 2001; 98:194-200.
189. Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Kayagaki N, Yamaguchi N, Kakuta S, Iwakura Y, Yagita H, Okumura K. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature Med* 2001; 7:94-100.
190. Irmeler M, Thome M, Hahne M, Schneider P, Hofmann K, Steiner V, Bodmer JL, Schroter M, Burns K, Mattmann C, Rimoldi D, French LE, Tschopp J. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* 1997; 388:190-195.
191. Landowski TH, Qu N, Buyuksal I, Painter JS, Salton WS. Mutations in the Fas antigen in patients with multiple myeloma. *Blood* 1997; 90:4266-4270.
192. Shin MS, Park WS, Kim SY, Kim HS, Kang SJ, Song KY, Park JY, Dong SM, Pi JH, Oh RR, Lee JY, Yoo NJ, Lee SH. Alterations of Fas (Apo-I/CD95) gene in cutaneous malignant melanoma. *Am J Pathol* 1999; 154:1785-1791.
193. Niehans GA, Brunner T, Frizelle SP, Liston JC, Salerno CT, Knapp DJ, Green DR, Kratzke RA. Human lung carcinomas express Fas ligand. *Cancer Res* 1997; 57:1007-1012.
194. Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreiber M, French LE, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J, Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas(Apo-I/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 1996; 274:1363-1366.

195. O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 1996; 184:1075-1082.
196. Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-I/Fas) ligand-expressing tumor cells—a mechanism of immune evasion? *Nature Med* 1996; 2:1361-1366.
197. Chappell DB, Zaks TZ, Rosenberg SA, Restifo NP. Human melanoma cells do not express Fas (APO-I/CD95) ligand. *Cancer Res* 1999; 59:59-62.
198. Zaks TZ, Chappell DB, Rosenberg SA, Restifo NP. Fas-mediated suicide of tumor-reactive T cells following activation by specific tumor: selective rescue by caspase inhibition. *J Immunol* 1999; 162:3273-3279.
199. Jones EY. MHC class I and class II structures. *Curr Opin Immunol* 1997; 9:75-79.
200. Rammensee HG. Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules. *Curr Opin Immunol* 1995; 7:85-96.
201. Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu Rev Immunol* 1998; 16:323-358.
202. Reits EA, Vos JC, Gromme M, Neefjes J. The major substrates for TAP in vivo are derived from newly synthesized proteins. *Nature* 2000; 404:774-778.
203. Schubert U, Anton LC, Gibbs J, Norbury CC, Yewdell JW, Bennink JR. Rapid degradation of a large fraction of newly synthesized proteins by proteasomes. *Nature* 2000; 404:770-774.
204. Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Ann Rev Biochem* 1999; 67:425-479.
205. Rock KL, Goldberg AL. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Ann Rev Immunol* 1999; 17:739-779.
206. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994; 78:761-771.
207. Bochtler M, Ditzel L, Groll M, Hartmann C, Huber R. The proteasome. *Ann Rev Biophys Biomol Struct* 1999; 28:295-317.
208. Baumeister W, Waiz J, Zühl F, Seemüller E. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* 1998; 92:367-380.
209. Larsen CN, Finley D. Protein translocation channels in the proteasome and other proteases. *Cell* 1997; 91:431-434.

210. Song X, Mott JD, von Kampen J, Pramanik B, Tanaka K, Slaughter CA, DeMartino GN. A model for the quaternary structure of the proteasome activator PA28. *J Biol Chem* 1996; 271:26410-26417.
211. Rechsteiner M, Realini C, Ustrell V. The proteasome activator 11S REG (PA28) and class I antigen presentation. *Biochem J* 2000; 345:1-15.
212. Dubiel W, Pratt G, Ferrell K, Rechsteiner M. Purification of an 11S regulator of the multicatalytic protease. *J Biol Chem* 1992; 267:22369-22377.
213. Gray CW, Slaughter CA, DeMartino GN. PA28 activator protein forms regulatory caps on proteasome stacked rings. *J Mol Biol* 1994; 236:7-15.
214. Coux O, Tanaka K, Goldberg AL. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Ann Rev Biochem* 1996; 65:801-847.
215. Voges D, Zwickl P, Baumeister W. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Ann Rev Biochem* 1999; 68:1015-1068.
216. Adams GM, Falke S, Goldberg AL, Slaughter CA, DeMartino GN, Gogol EP. Structural and functional effects of PA700 and modulator protein on proteasomes. *J Mol Biol* 1997; 273:646-657.
217. Brodsky JL, McCracken AA. ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol* 1999; 10:507-513.
218. Bonifacino JS, Weissman AM. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Ann Rev Cell Dev Biol* 1998; 14:19-57.
219. Wiertz EJHJ, Tortorella D, Bogyo M, Yu J, Mothes W, Jones TR, Rapoport TA, Ploegh HL. Sec-61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 1996; 384:432-438.
220. Fiebigler E, Story C, Ploegh HL, Tortorella D. Visualization of the ER-to-cytosol dislocation reaction of a type I membrane protein. *EMBO J* 2002; 21:1041-1053.
221. Shastri N, Schwab S, Serwold T. Producing nature's gene-ships: the generation of peptides for display by MHC class I molecules. *Ann Rev Immunol* 2002; 20:463-493.
222. Rawlings ND, O'Brien EA, Barrett AJ. MEROPS: the protease database. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:343-346.
223. Serwold T, Gonzalez F, Kim J, Jacob R, Shastri N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 2002; 419:480-483.
224. Serwold T, Graw S, Shastri N. ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nature Immunol* 2001; 2:644-651.

225. Kloetzel PM. Antigen processing by the proteasome. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2001; 2:179-187.
226. Cascio P, Hilton C, Kisselev AF, Rock KL, Goldberg AL. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigen peptide. *EMBO J* 2001; 20:2357-2366.
227. Toes RE, Nussbaum AK, Degermann S, Schirle M, Emmerich NP, Kraft M, Laplace C, Zwinderman A, Dick TP, Muller J, Schonfisch B, Schmid C, Fehling HJ, Stevanovic S, Rammensee HG, Schild H. Discrete cleavage motifs of constitutive and immunoproteasomes revealed by quantitative analysis of cleavage products. *J Exp Med* 2001; 194:1-12.
228. Falk K, Rotzschke O, Rammensee HG. *Nature* 1990; 348:248-251.
229. Reits EA, Griekspoor AC, Neefjes J. How does TAP pump peptides? Insights from DNA repair and traffic ATPases. *Immunol Today* 2000; 21:598-600.
230. Van Kaer L, Ashton-Rickardt PG, Ploegh HL, Tonegawa S. TAP1 mutant mice are deficient in antigen presentation, surface class I molecules and CD4⁺8⁺ T cells. *Cell* 1992; 71:1205-1214.
231. de la Salle H, Hanau D, Fricker D, Urlacher A, Kelly A, Salamero J, Powis SH, Donato L, Bausinger H, Laforet M. Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency. *Science* 1994; 265:237-241.
232. Cresswell P. Intracellular surveillance controlling the assembly of MHC class I peptide complexes. *Traffic* 2000; 1:301-305.
233. Van Kaer L. Accessory proteins that control the assembly of MHC molecules with peptides. *Immunol Res* 2001; 23:205-214.
234. Sadasivan BK, Cariappa A, Waneck GL, Cresswell P. Assembly, peptide loading, and transport of MHC class I molecules in a calnexin-negative cell line. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1995; 60:267-275.
235. Nöbner E, Parham P. Species-specific differences in chaperone interaction of human and mouse major histocompatibility complex class I molecules. *J Exp Med* 1995; 181:327-337.
236. Gao B, Adhikari R, Howarth M, Nakamura K, Gold MC, Hill AB, Knee R, Michalak M, Elliott T. Assembly and antigen-presenting function of MHC class I molecules in cells lacking the ER chaperone calreticulin. *Immunity* 2002; 16:99-109.
237. Grandea AG 3rd, Van Kaer L. Tapasin: an ER chaperone that controls MHC class I assembly with peptide. *Trends Immunol* 2001; 22:194-199.
238. Ortmann B, Androlewicz MJ, Cresswell P. MHC class I/β2-microglobulin complexes associate with TAP transporters before peptide binding. *Nature* 1994; 368:864-867.

239. Suh WK, Cohen-Doyle MF, Fruh K, Wang K, Peterson PA, Williams DB. Interaction of MHC class I molecules with the transporter associated with antigen processing. *Science* 1994; 264:1322-1326.
240. Sadasivan B, Lehner PJ, Ortmann B, Spies T, Cresswell P. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 1996; 5:103-114.
241. Frickel EM, Riek R, Jelesarov I, Helenius A, Wuthrich K, Ellgaard L. TRO-SY-NMR reveals interaction between ERp57 and the tip of the calreticulin P-domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:1954-1959.
242. Dick TP, Bangia N, Peaper DR, Cresswell P. Disulfide bond isomerization and assembly of MHC class I-peptide complexes. *Immunity* 2002; 16:87-98.
243. Grandea AG 3rd, Golovina TN, Hamilton SE, Sriram V, Spies T, Brutkiewicz RR, Harty JT, Eisenlohr LC, Van Kaer L. Impaired assembly yet normal trafficking of MHC class I molecules in tapasin mutant mice. *Immunity* 2000; 13:213-222.
244. Diedrich G, Bangia N, Pan M, Cresswell P. A role for calnexin in the assembly of the MHC class I loading complex in the endoplasmic reticulum. *J Immunol* 2001; 166:1703-1709.
245. Garbi N, Tan P, Diehl AD, Chambers BJ, Ljunggren HG, Momburg F, Hammerling GJ. Impaired immune responses and altered peptide repertoire in tapasin-deficient mice. *Nat Immunol* 2000; 1:234-238.
246. Androlewicz MJ. The role of tapasin in MHC class I antigen assembly. *Immunol Res* 1999; 20:79-88.
247. Ward SG. The complexities of CD28 and CTLA-4 signaling: PI3K and beyond. *Arch Immunol Ther Exp* 1999; 47:69-75.
248. Boise LH, Minn AJ, Noel PJ, June CH, Accavitti MA, Lindstein T, Thompson CB. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity* 1995; 3:87-98.
249. Harding FA, Allison JP. CD28-B7 interactions allow the induction of CD8+ cytotoxic T lymphocytes in the absence of exogenous help. *J Exp Med* 1993; 177:1791-1796.
250. Malek TR, Yu A, Scibelli P, Lichtenheld MG, Codias EK. Broad programming by IL-2 receptor signaling for extended growth to multiple cytokines and functional maturation of antigen-activated T cells. *J Immunol* 2001; 166:1675-1683.
251. Hombach A, Sent D, Schneider C, Heuser C, Koch D, Pohl C, Seliger B, Abken H. T cell activation by recombinant receptors: CD28 costimulation is required for interleukin-2 secretion and receptor-mediated T-cell proliferation but does not affect receptor-mediated target cell lysis. *Cancer Res* 2001; 61:1976-1982.

252. Van Parijs L, Abbas AK. Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. *Science* 1998; 280:243-248.
253. Atkinson EA, Bleackly RC. Mechanisms of lysis by cytotoxic T cells. *Crit Rev Immunol* 1995; 15:359-384.
254. Kagi D, Vignaux F, Ledermann B, Burki K, Depraetere V, Nagata S, Hengartner H, Golstein P. Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity. *Science* 1994; 265:528-530.
255. Sharma K, Wang RX, Zhang JY, Yin DL, Luo XY, Solomon JC, Jiang RF, Markos K, Davidson W, Scott DW, Shi YF. Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand. *Pharmacol Ther* 2000; 88:333-347.
256. Ishiwatari-Hayasaka H, Kawashima H, Osawa T, Nagata S, Miyasaka M. Induction of cell death by chimeric L-selectin Fas receptors. *Int Immunol* 1997; 9:627-635.
257. O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 1996; 184:1075-1082.
258. Strand S, Hofmann WJ, Hug H, Muller M, Otto G, Strand D, Mariani SM, Stremmel W, Krammer PH, Galle PR. Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 1996; 2:1361-1366.
259. Ras E, van der Burg SH, Zegveld ST, Brandt RM, Kuppen PJ, Offringa R, Warnarr SQ, van de Velde CJ, Melief CJ. Identification of potential HLA-A*0201 restricted CTL epitopes derived from the epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) and the carcinoembryonic antigen (CEA). *Hum Immunol* 1997; 53:81-89.
260. Tsang KY, Zaremba S, Nieroda CA, Zhu MZ, Hamilton JM, Schlom J. Generation of human cytotoxic T cells specific for human carcinoembryonic antigen epitopes from patients immunized with recombinant vaccinia CEA vaccine. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:982-990.
261. Schirle M, Keilholz W, Weber B, Gouttefangeas C, Dumrese T, Becker HD, Stevanovic S, Rammensee HG. Identification of tumor-associated MHC class I ligands by a novel T cell independent approach. *Eur J Immunol* 2000; 30:2216-2225.
262. Kim C, Matsumura M, Saijo K, Ohno T. In vitro induction of HLA-A2402-restricted and carcinoembryonic-antigen-specific cytotoxic T lymphocytes on fixed autologous peripheral blood cells. *Cancer Immunol Immunother* 1998; 47:90-96.
263. Nukaya I, Yasumoto M, Iwasaki T, Ideno M, Sette A, Celis E, Takesako K, Kato I. Identification of HLA-A24 epitope peptides of carcinoembryonic antigen which induce tumor reactive cytotoxic T lymphocyte. *Int J Cancer* 1999; 80:92-97.

264. Kawashima I, Isai V, Southwood S, Takesako K, Sette A, Celis E. Identification of HLA A3-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes from carcinoembryonic antigen and HER-2/neu by primary in vitro immunization with peptide-pulsed dendritic cells. *Cancer Res* 1999; 59:431-435.
265. Trojan A, Witzens M, Schultze JL, Vonderheide RH, Harig S, Krackhardt AM, Stahel RA, Gribben JG. Generation of cytotoxic T lymphocytes against native and altered peptides of human leukocyte antigen-A*0201 restricted epitopes from the human epithelial cell adhesion molecule. *Cancer Res* 2001; 61:4761-4765.
266. Brossart P, Stuhler G, Flad T, Stevanovic S, Rammensee HG, Kanz L, Brugger W. Her-2/neu-derived peptides are tumor-associated antigens expressed by human renal cell and colon carcinoma lines and are recognized by in vitro induced specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 1998; 58:732-736.
267. Peoples GE, Goedegebuure PS, Smith R, Linehan DC, Yoshino I, Eberlein TJ. Breast and ovarian cancer-specific cytotoxic T lymphocytes recognize the same HER-2/neu-derived peptide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:432-436.
268. Tanaka H, Tsunoda T, Nukaya I, Sette A, Matsuda K, Umamo Y, Yamaue H, Takesako K, Tanimura H. Mapping the HLA-A24-restricted T-cell epitope from a tumor-associated antigen HER2/neu possible immunotherapy for colorectal carcinomas. *Br J Cancer* 2001; 84:94-99.
269. Fisk B, Blevins TL, Wharton JT, Ioannides CG. Identification of an immunodominant peptide of HER-2/neu protooncogene recognized by ovarian tumor-specific cytotoxic T lymphocyte lines. *J Exp Med* 1995; 181:2109-2117.
270. Zaks TZ, Rosenberg SA. Immunization with a peptide epitope (p369-377) from HER-2/neu leads to peptide-specific cytotoxic T lymphocytes that fail to recognize HER-2/neu⁺ tumors. *Cancer Res* 1998; 58:4902-4908.
271. Theobald M, Biggs J, Dittmer D, Levine AJ, Sherman LA. Targeting p53 as a general tumor antigen. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:11993-11997.
272. Umamo Y, Tsunoda T, Tanaka H, Matsuda K, Yamaue H, Tanimura H. Generation of cytotoxic T cell responses to an HLA-A24 restricted epitope peptide derived from wild-type p53. *Br J Cancer* 2001; 84:1052-1057.
273. Minev B, Hipp J, Firat H, Schmidt JD, Langlade-Demoyen P, Zanetti M. Cytotoxic T cell immunity against telomerase reverse transcriptase in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97:4796-47801.
274. Vonderheide RH, Hahn WC, Schultze JL, Nadler LM. The telomerase catalytic subunit is a widely expressed tumor-associated antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 1999; 10:673-679.
275. Peoples GE, Anderson BW, Lee TV, Murray JL, Kudelka AP, Wharton JT, Ioannides CG. Vaccine implications of folate binding protein, a novel cytotoxic T

- lymphocyte recognized antigen system in epithelial cancers. *Clin Cancer Res* 1999; 5:4214-4223.
276. Kikuchi M, Nakao M, Inoue Y, Matsunaga K, Shichijo S, Yamana H, Itoh K. Identification of a SART-1-derived peptide capable of inducing HLA A24-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int J Cancer* 1999; 81:459-466.
277. Sasatomi T, Yamana H, Shichijo S, Tanaka S, Okamura T, Ogata Y, Itoh K, Shirouzu K. Expression of the SART1 tumor-rejection antigens in colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2000; 43:1754-1758.
278. Shichijo S, Nakao M, Imai Y, Takasu H, Kawamoto M, Niya F, Yang D, Toh Y, Yamana H, Itoh K. A gene encoding antigenic peptides of human squamous cell carcinoma recognized by cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998; 187:277-288.
279. Ito M, Shichijo S, Miyagi Y, Kobayashi T, Tsuda N, Yamada A, Saito N, Itoh K. Identification of SART3-derived peptides capable of inducing HLA-A2-restricted and tumor specific CTLs in cancer patients with different HLA-A2 subtypes. *Int J Cancer* 2000; 88:633-639.
280. Fossum B, Olsen AC, Thorsby E, Gaudenack G. CD8+ T cells from a patient with colon carcinoma, specific for a mutant p21-Ras-derived peptide (Gly 13? Asp), are cytotoxic towards a carcinoma cell line harbouring the same mutation. *Cancer Immunol Immunother* 1995; 40:165-172.
281. Apostolopoulos V, Karanikas V, Haurum JS, McKenzie IF. Induction of HLA-A2-restricted CTLs to the mucin 1 human breast cancer antigen. *J Immunol* 1997; 159:5211-5218.
282. Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G, Behnke L, Reichardt VL, Stevanovic S, Muhm A, Rammensee HG, Kanz L, Brugger W. Identification of HLA A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* 1999; 93:4309-4317.
283. Domenech N, Henderson RA, Finn OJ. Identification of an HLA A11-restricted epitope from the tandem repeat domain of the tumor antigen mucin. *J Immunol* 1995; 155:4766-4474.
284. Bohm CM, Hanski ML, Stefanovic S, Rammensee HG, Stein H, Taylor-Papadimitrou J, Riecken EO, Hanski C. Identification of HLA-A2-restricted epitopes of the tumor-associated antigen MUC2 recognized by human cytotoxic T cells. *Int J Cancer* 1998; 75:688-693.
285. Nagorsen D, Keilholz U, Rivoltini L, Schmittel A, Letsch A, Asemissen AM, Berger G, Buhr HJ, Thiel E, Scheibenbogen C. Natural T-cell response against MHC class I epitopes of epithelial cell adhesion molecule, her-2/neu, and carcinoembryonic antigen in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 2000; 60:4850-4.

286. Harris JE, Ryan L, Hoover HC Jr, Stuart RK, Oken MM, Benson AB 3rd, Mansour E, Haller DG, Manola J, Hanna MG Jr. Adjuvant active specific immunotherapy for stage II and III colon cancer with an autologous tumor cell vaccine: Eastern Cooperative Oncology Group Study E5283. *J Clin Oncol* 2000; 18:148-157.
287. Hoover HC, Brandhorst JS, Peters LC, Surdyke MG, Takeshita Y, Madariaga J, Muenz LR, Hanna MG. Adjuvant active specific immunotherapy for human colorectal cancer: 6.5-year median follow up of a phase III prospectively randomized trial. *J Clin Oncol* 1993; 11:390-399.
288. Vermorken JB, Claessen AM, van Tinteren H, Gall HE, Ezinga R, Meijer S, Scheper RJ, Meijer CJ, Bloemena E, Ransom JH, Hanna MG Jr, Pinedo HM. Active specific immunotherapy for stage II and stage III human colon cancer: a randomised trial. *Lancet* 1999; 353:345-350.
289. Gjertsen MK, Gaudernack G. Mutated Ras peptides as vaccines in immunotherapy of cancer. *Vox Sang* 1998; 74:489-495.
290. Bender A, Sapp M, Schuler G, Steinman RM, Bhardwaj N. Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood. *J Immunol Methods* 1996; 196:121-135.
291. Morse MA, Lyerly HK. Immunotherapy of cancer using dendritic cells. *Cytokines Cell Mol Ther* 1998; 4:35-44.
292. Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G. Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J Immunol Methods* 1996; 196:137-151.
293. Chen W, Rains N, Young D, Stubbs RS. Dendritic cell-based cancer immunotherapy: potential for treatment of colorectal cancer? *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15:698-705.
294. Nair SK, Hull S, Coleman D, Gilboa E, Lyerly HK, Morse MA. Induction of carcinoembryonic antigen (CEA)-specific cytotoxic T-lymphocyte responses in vitro using autologous dendritic cells loaded with CEA peptide or CEA RNA in patients with metastatic malignancies expressing CEA. *Int J Cancer* 1999; 82:121-124.
295. Zhu MZ, Marshall J, Cole D, Schlom J, Tsang KY. Specific cytolytic T-cell responses to human CEA from patients immunized with recombinant avipox-CEA vaccine. *Clin Cancer Res* 2000; 6:24-33.
296. von Mehren M, Arlen P, Tsang KY, Rogatko A, Meropol N, Cooper HS, Davey M, McLaughlin S, Schlom J, Weiner LM. Pilot study of a dual gene recombinant avipox vaccine containing both carcinoembryonic antigen (CEA) and B7.1 transgenes in patients with recurrent CEA-expressing adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2000; 6:2219-2228.

297. Keller H, Wimmenauer S, Rahner S, Reimer P, von Kleist S, Farthmann EH. Morphological and functional characteristics of tumor-infiltrating lymphocytes from human colorectal cancers after stimulation with rIL-2. *Eur Surg Res* 1995; 27:258-268.
298. Hiroishi K, Tuting T, Lotze MT. IFN-alpha-expressing tumor cells enhance generation and promote survival of tumor-specific CTLs. *J Immunol* 2000; 164:567-572.
299. Schmidt-Wolf IG, Finke S, Trojaneck B, Denkena A, Lefterova P, Schwella N, Heuft HG, Prange G, Korte M, Takeya M, Dorbic T, Neubauer A, Witting B, Huhm D. Phase I clinical study applying autologous immunological effector cells transformed with the interleukin-2 gene in patients with metastatic renal cancer, colorectal cancer and lymphoma. *Br J Cancer* 1999; 81:1009-1016.
300. Mahvi DM, Madsen JA, Witt PL, Sondel PM. Interferon alpha enhances expression of TAG 72 and carcinoembryonic antigen in patients with primary colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother* 1995; 40:311-314.
301. Dansky-Ullmann C, Salgaller M, Adams S, Schlom J, Greiner JW. Synergistic effects of IL-6 and IFN-gamma on carcinoembryonic antigen (CEA) and HLA expression by human colorectal carcinoma cells: role for endogenous IFN-beta. *Cytokine* 1995; 7:118-129.
302. Tsang KY, Kashimiri SV, Qi CF, Nieroda C, Calvo B, De Filippi R, Greiner JW, Primus FJ, Schlom J. Transfer of the IL-6 gene into a human colorectal carcinoma cell line and consequent enhancement of tumors antigen expression. *Immunol Lett* 1993; 36:179-185.
303. Hombach A, Tillmann T, Jensen M, Heuser C, Sircar R, Diehl V, Kruis W, Pohl C. Specific activation of resting T cells against CA 19-9⁺ tumor cells by an anti-CD3/CAP19-9 bispecific antibody in combination with a costimulatory anti-CD28 antibody. *J Immunother* 1997; 20:325-333.

2

Objetivos

Los mecanismos responsables de la expresión alterada de moléculas HLA de clase I en líneas celulares humanas se conoce con relativa precisión. Sin embargo, el panorama es bien diferente en tumores primarios, en donde la frecuencia de tales alteraciones así como el mecanismo implicado se han esclarecido de forma parcial. En nuestro caso, nos planteamos los siguientes objetivos referentes al estudio de la expresión de HLA-I en tumores colorrectales:

1. Conocer los mecanismos implicados en la pérdida total de moléculas HLA-I (fenotipo I). Investigando para ello la expresión a partir de mRNA de tejido microdisectado de: cadena pesada, β 2-microglobulina (β 2m), TAP1, TAP2, LMP2, y LMP7; estudiar la existencia de inestabilidad de microsatélites (MSI) dentro de este grupo de tumores y su asociación con los defectos estructurales en β 2m.
2. Dada la elevada frecuencia de pérdida selectiva de alelos HLA-B44 encontrada en tumores de colon empleando técnicas inmunohistológicas, determinar la existencia de alteraciones que expliquen tales pérdidas.

3

Mecanismos moleculares implicados en la pérdida total de moléculas HLA de clase I (fenotipo I) en tumores de colon

INTRODUCCIÓN

Las células tumorales seleccionan mecanismos específicos que les permiten escapar al reconocimiento inmune a pesar de la presencia de LT tumorales específicos. Tales mecanismos incluyen la secreción de factores inmunosupresores, expresión de Fas-L (CD95-L), transducción de señales deficiente a linfocitos T, falta de expresión de moléculas coestimuladoras y de adhesión, y pérdida de expresión de moléculas HLA-I (1, 2, 3). Esto último puede estar causado bien por alteraciones estructurales o por una desregulación de los antígenos HLA-I y/o expresión deficiente de componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM) (4,5). Tanto las alteraciones en la expresión de MHC-I como la pérdida de función de la maquinaria de procesamiento antigénico se han identificado en células tumorales humanas y murinas (6); estando asociadas además con la progresión tumoral en melanoma, cáncer de colon, y cáncer de mama (7, 8, 9). Gracias al estudio molecular del complejo de procesamiento antigénico, se ha podido conocer la forma en la que los tumores escapan al reconocimiento inmune. Estudios realizados con líneas tumorales, mutantes deficientes en componentes de APM y en lesiones tumorales primarias, han demostrado que la pérdida o alteración de las subunidades componentes del proteasoma y de los genes TAP parecen contribuir a la expresión alterada de moléculas MHC-I en superficie (10, 11, 12). En un panel de tumores humanos de diferente histología (carcinoma de pulmón de células pequeñas, cáncer de cérvix, próstata, melanoma, colon, mama, carcinoma hepatocelular, renal, y linfoma de Burkitt) (13, 14), la pérdida o expresión disminuida de la función de genes TAP y/o LMP se asoció a una disminución del procesamiento y presentación antigénica a los LT-CD8+, resultando en bajos niveles o pérdida de MHC-I y resistencia a la lisis mediada por los mismos (7). Al mismo tiempo, se observó que las alteraciones en la

ruta de procesamiento antigénico podían ser revertidas mediante la administración de IFN γ (15, 16).

Además de las alteraciones del complejo APM y desregulación de moléculas MHC-I, la pérdida de expresión de β 2-microglobulina (β 2m) debida a mutaciones y/o pérdida de heterocigotidad (LOH) (17, 18), o desregulación (9) pueden producir igualmente fenotipo I.

Los mecanismos responsables de la pérdida de moléculas HLA-I han sido estudiados mayoritariamente en líneas tumorales (14). Sin embargo en tumores primarios tanto el mecanismo como la frecuencia del mismo se conocen parcialmente. Para conocer qué ocurre en lesiones primarias de tumores de colon, se ha comenzado a investigar cuáles son los mecanismos responsables de la pérdida total de moléculas HLA-I.

Alrededor del 10-15% de los tumores de colon exhiben fenotipo I (19). Dentro de este grupo se conoce relativamente bien la asociación que existe entre la pérdida HLA-I y la presencia de mutaciones en β 2m. Concretamente, estas mutaciones han sido encontradas tanto en líneas como en tumores primarios que presentaban el fenotipo mutador. El fenotipo mutador (MMP), también conocido como inestabilidad de microsatélites (MSI), aparece en la mayoría de tumores hereditarios colorrectales no-polipósicos (HNPCC) y entre el 10-15% de tumores esporádicos de colon (20, 21). En los tumores MSI, la inactivación génica y epigenética de los genes reparadores de desemparejamientos de bases en el DNA (MMR) conduce a la aparición de mutaciones en diferentes genes y al desarrollo tumoral. Entre los genes mutados en esta vía se encuentra la β 2m, siendo la frecuencia observada en tumores de colon MMP del 40%.

En estos casos, se encontró que el descenso de expresión en $\beta 2m$ se correspondía con una mutación en uno de los alelos, y que la pérdida de expresión ocurría cuando la línea era homocigota para una mutación (con una LOH en el otro alelo) o heterocigota para ambas mutaciones (22, 8).

Si la asociación entre fenotipo I y presencia de mutaciones en $\beta 2m$ es evidente en el grupo de tumores MMP, poco se conoce acerca del grupo HLA-I/MSI. Por esta razón se han investigado los mecanismos responsables en ambos grupos de tumores empleando para ello la técnica de microdissección de tejidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de pacientes y muestras tumorales por inmunohistología

Un total de 95 pacientes diagnosticados de cáncer colorrectal fueron seleccionados para el estudio de pérdida de expresión de moléculas HLA. Las muestras de tejido tumoral fueron suministradas por el Departamento de Cirugía del Hospital Universitario Virgen de las Nieves.

Los anticuerpos monoclonales (Abms) utilizados fueron: GRH1, que reconoce la $\beta 2m$ libre y asociada a la cadena pesada; W6/32, frente al complejo HLA-A, B, C/ $\beta 2m$; y HC-10 que reacciona con la cadena pesada libre HLA-A, B, C. Las muestras de tejido con más del 75% de células teñidas se consideran positivas para la reacción inmunohistológica.

Análisis de inestabilidad de microsatélites (MSI)

El DNA obtenido de muestras tumorales y mucosas autólogas fue analizado para determinar la existencia de MSI. En este estudio se emplearon cuatro secuencias de repeticiones de mononucleótidos: BAT-26 y BAT-40, siendo ambas secuencias de mononucleótidos de poliadenina; BAT-RII que es una repetición de 10 pb de poliadenina dentro de la región codificante del gen TGF β RII (receptor tipo II del factor de crecimiento transformante β); y una región de ocho guaninas consecutivas en el tercer exon del gen BAX. Los tumores que resultaron positivos para la presencia de MSI, fueron posteriormente confirmados empleando DNA de muestras microdisectadas. Los primers utilizados para la amplificación de los marcadores de microsatélites fueron los siguientes:

BAT26-Fw 5'TGACTACTTTTGACTTCAGCC;

BAT26-Bw 5'AACCATTCAACATTTTAAACCC;

BAT40-Fw 5'ATTAACTTCCTACACCACAAC;

BAT40-Bw 5'GTAGAGCAAGACCACCTTG;

BAX-Fw 5'ATCCAGGATCGAGCAGGGCG;

BAX-Bw 5'ACTCGCTCAGCTTCTTGGTG;

BATRII-Fw 5'AAGCTCCCCTACCATGACT;

BATRII-Bw 5'TGCACTCATCAGAGCTACAG.

Microdisección, aislamiento de DNA y análisis de LOH de b2m

Para la microdisección de tejido tumoral se emplearon secciones congeladas de 4-8 μ m teñidas con una solución de azul de toluidina al 0.05% wt/vol. Mediante el empleo del kit de extracción de Quiagen (Qiamap Tissue kit, Leusden, The Netherlands), se obtuvo

DNA a partir de muestras microdisectadas tanto de los nidos tumorales como del estroma.

En el estudio de LOH de $\beta 2m$, se emplearon los microsatélites D15S209 (15pter-5qter Tel $\beta 2m$) y D15S126 (15q21 cerca de $\beta 2m$), con las siguientes secuencias:

D15S126 Fw 5'GTGAGCCAAGATGGCACTAC;

D15S126 Bw 5'GCCAGCAATAATGGGAAGTT;

D15S209 Fw 5'AAACATAGTGCTCTGGAGGC;

D15S209 Bw 5' GGGCTAACAAACAGTGTCTGC.

Ambas parejas de primers fueron teñidas con el fluorocromo 6-FAM. Las condiciones de la PCR y electroforesis se describen en Ramal y col. (23, 24).

RT-PCR y análisis de expresión de HLA, $\beta 2m$, TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7 a partir de muestras microdisectadas

La recuperación y análisis del RNA de secciones de tejido congeladas puede realizarse empleando ligeras variaciones de los métodos habituales. Obtenemos RNA total a partir de muestras microdisectadas usando el kit de extracción Micro RNA de Stratagene (La Jolla, CA), con extracción de isocianato de guanidina y fenol-cloroformo. El RNA total se precipita después de la extracción orgánica con un volumen igual de isopropanol en presencia de glycogen (20 mg/ μ l). El pellet de RNA se lava posteriormente con una solución al 75% de etanol y 25% de agua tratada con DEPC (diethylpyrocarbonate) y se resuspende en 20 μ l de agua libre de nucleasas. Para la síntesis del cDNA se emplearon 10 μ l de RNA total, con la reverso-transcriptasa Sensiscript de Quiagen, 40 U/ μ l de RNasin (Promega, Madison, WI), y random primers (Promega). La reacción se incubó 60 minutos a 42°C, y posteriormente a 95°C durante

5 minutos para la inactivación de la enzima. Como control de expresión se utilizó la β -actina. En el análisis de RT-PCR se emplearon los siguientes primers:

β -actina Fw 5'GGCATCGTGATGGACTCCG; β -actina Bw 5'GCTGGAAGGTGGACAGCGA;
 β 2-m Fw 5' GGGCATTCTGAAGCTGACA; β 2-m Bw 5' TGCGGCATCTTCAAACCTCC;
 HLA Fw 5' CCTGGAGAACGGGAAGGAGA; HLA Bw 5' CATCTCAGGGTGAGGGGCT;
 TAP-1 Fw 5' TCTCCTCTCTTGGGGAGATG; TAP-1 Bw 5' GAGACATGATGTTACCTGTCTG ;
 TAP-2 Fw 5' CTCCTCGTTGCCGGCTTCT; TAP-2 Bw 5' TCAGCTCCCCTGTCTTAGTC;
 LMP-2 Fw 5' TTGTGATGGGTTCTGATTCCCG; LMP-2 Bw 5' CAGAGCAATAGCGTCTGTGG;
 LMP-7 Fw 5'TCGCCTTCAAGTTCAGCATGG; LMP-7 Bw 5'CCAACCATCTTCCTTCATGTGG.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 40 ciclos de 95°C/1 min, 60°C/1.5 min y 72°C/2 min con una extensión final de 10 minutos en el último ciclo.

Secuenciación de DNA y cDNA de β 2m

Para la secuenciación se empleó el kit Big Dye Terminador, en el secuenciador capilar ABI-PRISM 310. El cDNA de β 2m fue secuenciado con los primers empleados anteriormente en el análisis de RT-PCR. En la amplificación y secuenciación del DNA genómico de β 2m se usaron las siguientes parejas de primers:

Exon1 B2M-100Fw 5'GTGAGGTCCTGCGGGCCTT;
 Exon1 B2-1Bw 5'CAGAGCGGGAGGGTAGGAGA;
 Exon2 31555-Fw 5'ACCCTGGCAATATTAATGTGTC;
 Exon2 31557-Bw 5'TACACAACCTTTCAGCAGCTTAC.

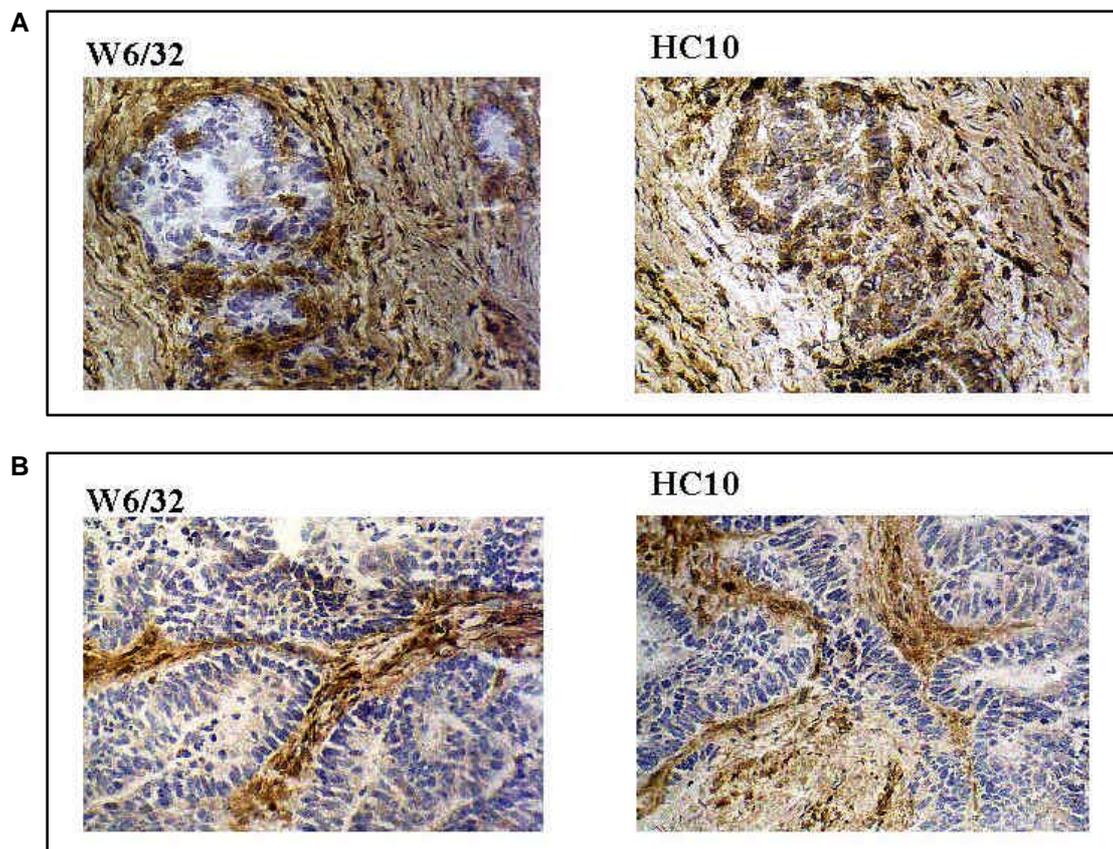
RESULTADOS

Análisis de expresión de antígenos HLA-I en tumores colorrectales

A partir del estudio inmunohistológico con anticuerpos monoclonales que reconocen un epitopo estructural del complejo cadena pesada/ β 2m y β 2m, se encontraron 14 de un

total de 95 casos estudiados con ausencia de expresión de antígenos HLA-A, B, C. Un tumor se consideró como negativo cuando al menos el 75% de las células tumorales no se teñían con los anticuerpos monoclonales W6/32 y GRH1. Con el empleo del anticuerpo monoclonal HC-10 pudo detectarse la presencia de cadena pesada libre citoplasmática en 5 de 14 casos. El patrón de tinción en secciones congeladas se muestra en la **Figura 1**. En la **Tabla 1** se detallan los tumores HLA negativos encontrados.

Figura 1



Tinción inmunohistológica de secciones criostáticas de tumores de colon. (A) Reacción negativa para el Abm W6/32 y positiva para HC-10 en el caso CO135. (B) Reacción negativa con los anticuerpos W6/32 y HC10 en el caso CO14. (A), (B) ($\times 400$).

Estudio de inestabilidad de microsátélites

Ya que en tumores de colon MSI⁺ se ha descrito hasta un 40 % de mutaciones en el gen de $\beta 2m$ (25) a diferencia de los tumores MSI⁻ donde las mutaciones espontáneas en $\beta 2m$ son infrecuentes o nulas (26), se comenzó por estudiar la presencia o ausencia de inestabilidad en este grupo de tumores. Partiendo de muestras de DNA de sangre periférica de los 95 casos, se analizaron las cuatro secuencias de repeticiones de mononucleótidos: BAT-26, BAT-40, BAT-RII y BAX.

6 de 95 casos estudiados presentaron inestabilidad, de los cuales cuatro casos: CO86, CO117, CO132 y CO135 tenían además tinción negativa para W6/32 siendo considerados como fenotipo I; los otros dos casos MSI⁺, CO119 y CO123 fueron clasificados como fenotipo III (pérdida de locus) y fenotipo IV (pérdida alelica) respectivamente. Los tumores CO86, CO117 y CO132 se clasificaron como HNPCC de acuerdo con los criterios de Amsterdam (27) y CO135 como esporádico. Los resultados del estudio de inestabilidad así como del patrón de inestabilidad de BAT 26 y TGF β RII en tumores HLA negativos se muestran en la **Tabla 2** y **Figura 2** respectivamente.

Mutaciones de $\beta 2m$ en tumores MSI⁺

Los cuatro tumores MSI⁺/W6/32⁻ se estudiaron para determinar la posible existencia de mutaciones en $\beta 2m$, encontrándose alteraciones en todos ellos. Los resultados de este estudio se detallan en la **Tabla 3**. Por RT-PCR a partir de muestras microdisectadas encontramos expresión de $\beta 2m$ en dos casos: CO86 y CO117, los casos CO132 y CO135 no presentaron expresión para $\beta 2m$ (ver resultados en **Tabla 1**). La secuenciación del DNA de $\beta 2m$ reveló que ambos tumores, CO132 y CO135 tenían la misma alteración: una deleción frameshift de CT en la región CTCTCTCT de la

secuencia líder (**Figura 3**). Para investigar la existencia de LOH en el segundo alelo, utilizamos los microsatélites D15S209 y D15S126 que flanquean el gen de $\beta 2m$ en la región 15q21-q22. Ambos marcadores fueron inestables tanto en CO132 como en CO135 (**Tabla 4**). Esto suponía la incapacidad de determinar la presencia o ausencia de LOH en el segundo alelo, pero dado que ambos casos no presentaron expresión de $\beta 2m$ lo más probable era pensar que el segundo alelo se hubiese perdido. El tumor CO86 presentó dos mutaciones diferentes en ambos alelos de $\beta 2m$. La primera de ellas se encontró en DNA, siendo una delección frameshift de CA en el codon 25. En el cDNA se halló una segunda alteración consistente en una delección de A en la región (A)₅ del exon 2 (**Figura 3**). Igualmente el caso CO117 presentó dos alteraciones, siendo heterocigoto. Una delección de C en el codon 91 del tracto (C)₅ encontrada en cDNA; y una delección de CCGTG al final del exon 2.

Los cuatro casos W6/32⁻ y MSI⁺, con inactivación de $\beta 2m$ presentaban además tinción positiva para el anticuerpo monoclonal HC10 que es capaz de detectar cadena pesada libre citoplasmática.

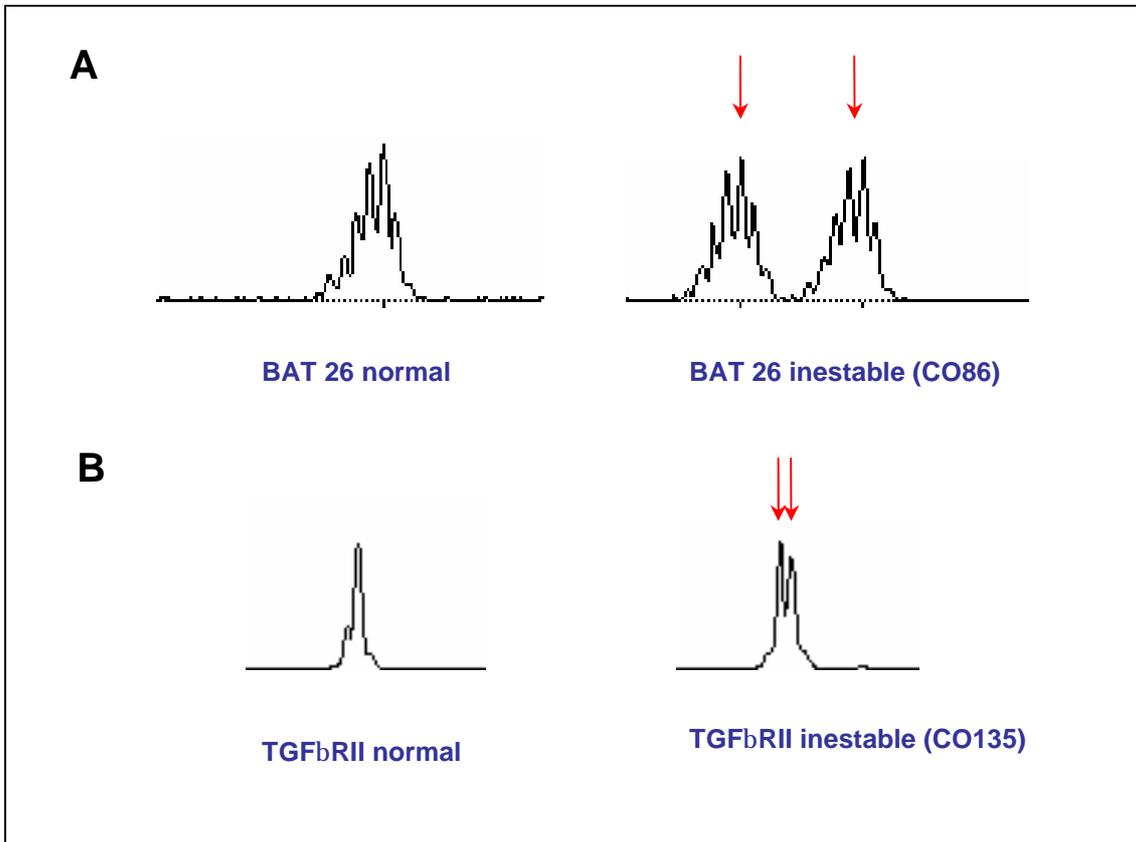
En el grupo de tumores MSI (10 de 14) no se encontraron alteraciones estructurales para el gen de $\beta 2m$. Los resultados del análisis de LOH en este grupo de tumores no reveló la presencia de delecciones parciales en el cromosoma 15 (**Tabla 4**).

El defecto de expresión de LMP7 en los tumores colorrectales MSI/HLA⁻ es una característica frecuente

Por RT-PCR se analizó la expresión de cadena pesada, TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7 en muestras microdisectadas en el grupo de tumores MSI. La **Tabla 1** recoge los

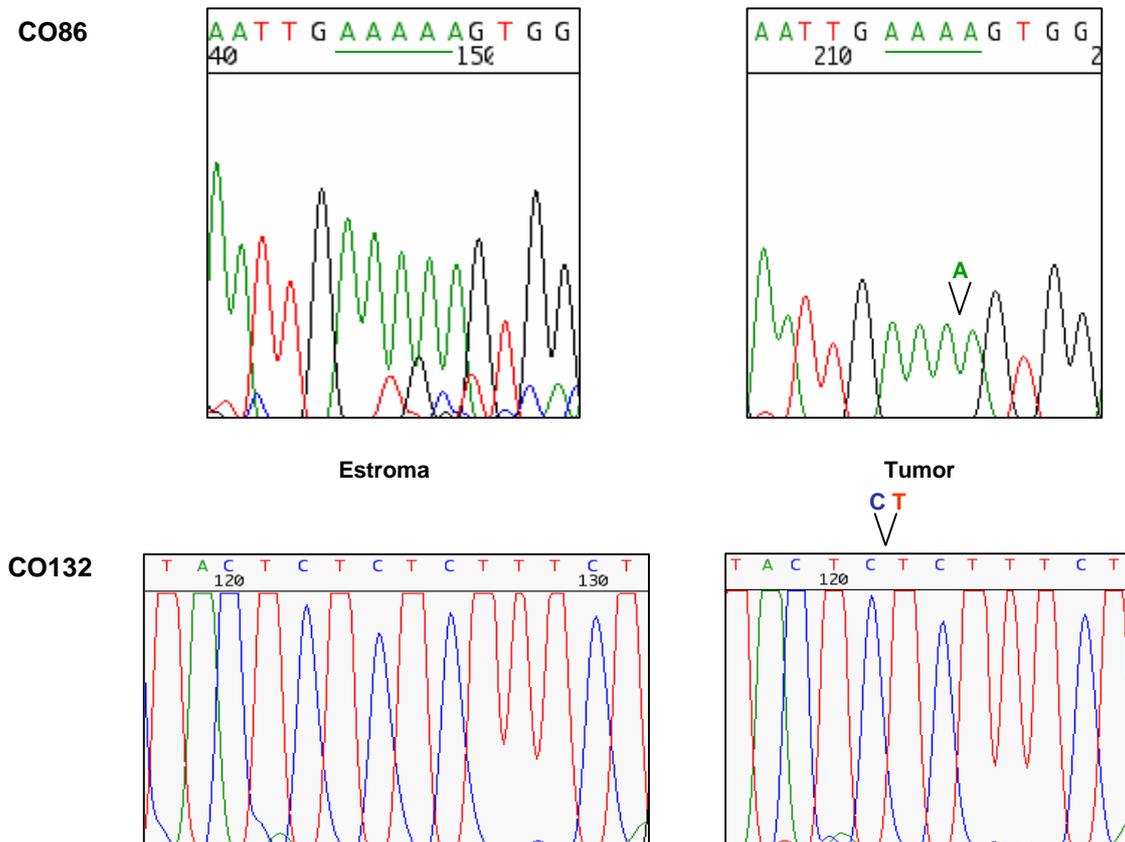
resultados obtenidos, apareciendo alteraciones en la expresión de componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico. TAP1 se detectó en el 100% de los tumores, y TAP2 en el 60%. Dado que los genes TAP se encuentran implicados en el transporte de péptidos en el retículo y que su desregulación es responsable de la pérdida de expresión de moléculas HLA (32), la falta de expresión en 4 de 10 tumores podía explicar el mecanismo implicado en estos tumores. Pero no resolvía el mecanismo responsable en el resto de los casos MSI/HLA⁻. En ellos, se estudió la transcripción de las proteínas componentes del inmunoproteasoma LMP2 y LMP7 (28). Para el estudio de expresión de LMP2 y LMP7 se analizó igualmente la expresión en las mucosas autólogas correspondientes a cada uno de los casos. Encontrando un defecto a nivel transcripcional del gen LMP7 en 9 de los 10 casos (**Figura 4**). Este hallazgo pone de manifiesto la importancia que tiene esta proteína en producir péptidos antigénicos que estabilizan la estructura del complejo cadena pesada/ β 2m y que permiten por tanto su expresión en superficie (29).

Únicamente el caso CO5 no concordaba con el grupo anterior. Ya que por un lado era HC-10 positivo, no tenía alteraciones de β 2m y presentaba transcripción de LMP7. Si la acumulación de cadena pesada en el citoplasma celular se relaciona con la pérdida de β 2m en tumores MSI⁺ (ver resultados anteriores), deben de existir por tanto otras alteraciones en esta caso concreto. Como por ejemplo en las chaperonas implicadas de la estabilización de la cadena pesada de clase I en el retículo antes de su unión con β 2m (30, 31).

Figura 2

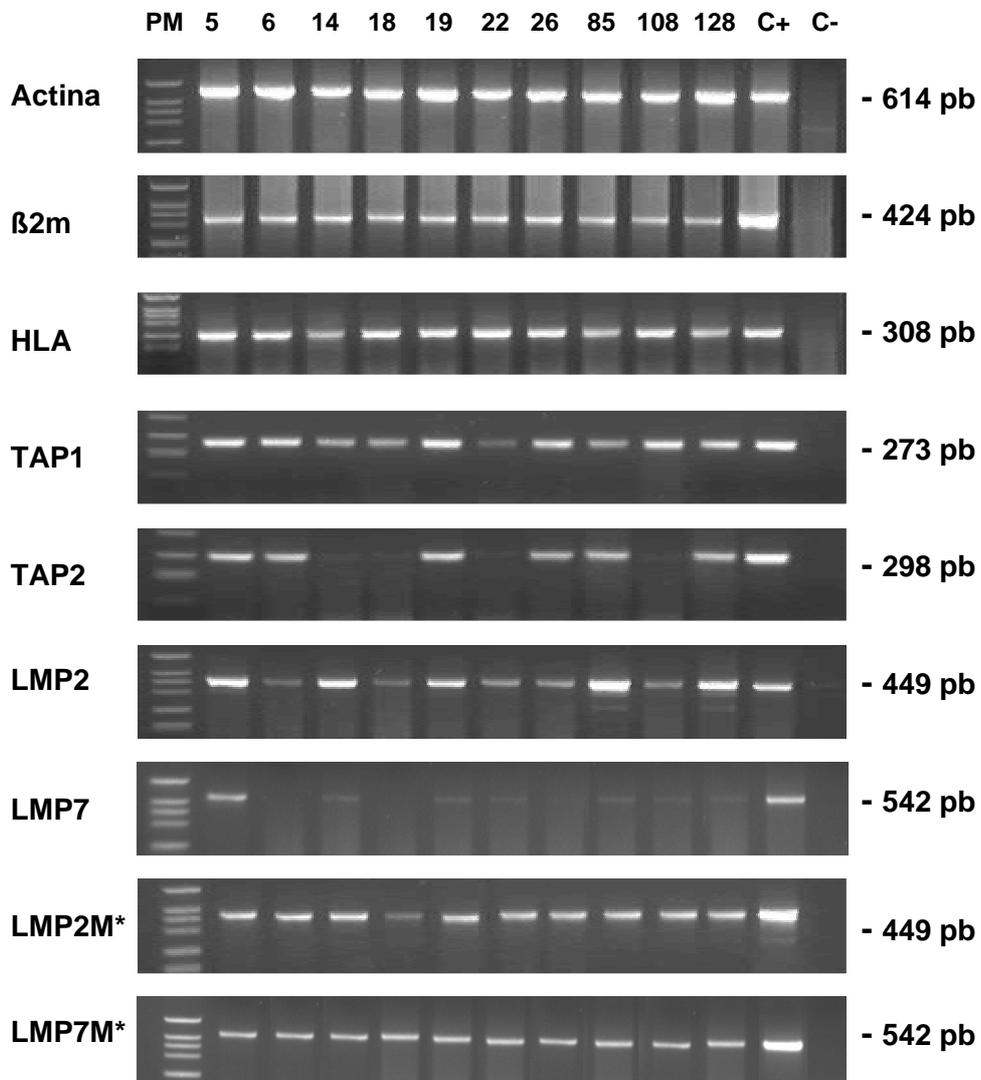
Patrón de inestabilidad de los microsatélites BAT 26 (A) y TGFβRII (B) en tumores de colon HLA de clase I negativos.

Figura 3



Electroferograma de los casos CO86 y CO132. En el tumor CO86 se muestra la deleción de una A encontrada en cDNA al comparar su secuencia con el estroma normal; el tumor CO132 presenta una deleción CT en la región de repetición (CT)₄.

Figura 4



RT-PCR de cadena pesada-HLA, β2m, TAP1, TAP2, LMP2, y LMP7 en tumores de colon W6/32⁻/MSI. C+ (control positivo), obtenido de un tumor de colon con tinción positiva para el Abm W6/32. LMP2M* y LMP7M* corresponden a la expresión de mRNA en mucosa normal autóloga.

Tabla 1. Inmunohistología y RT-PCR de HLA, β 2m, TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7 en tumores colorrectales microdisectados

Tumor	Proteína			RNA					
	HC/b2m	b2m	HC	HLA	b2m	TAP1	TAP2	LMP2	LMP7
CO5	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CO6	-	-	-	+	+	+	+	+	-
CO14	-	-	-	+	+	+	-	+	-
CO18	-	-	-	+	+	+	-	+	-
CO19	-	-	-	+	+	+	+	+	-
CO22	-	-	-	+	+	+	-	+	-
CO26	-	-	-	+	+	+	+	+	-
CO85	-	-	-	+	+	+	+	+	-
CO86	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CO108	-	-	-	+	+	+	-	+	-
CO117	-	-	+	+	+	+	+	+	+
CO128	-	-	-	+	+	+	+	+	-
CO132	-	-	+	+	-	+	+	+	+
CO135	-	-	+	+	-	+	+	+	+

Abreviaturas: HC, cadena pesada HLA de clase I.

Tabla 2. Análisis de inestabilidad en tumores HLA-negativos

Tumor	BAT 26	BAT 40	TGFbII	BAX	TNM	Grado histológico
CO86	+	+	-	-	T ₄ N ₂ M ₁	MD
CO117	+	ND	ND	+	ND	ND
CO132	+	+	+	+	T ₄ N ₃ M ₀	MD
CO135	+	+	+	-	T ₄ N ₂ M ₀	PD

Abreviaturas: Presencia (+) o ausencia (-) de MMP; MD, moderadamente diferenciado; PD, pobremente diferenciado; ND, no determinado.

Tabla 3. Mutaciones encontradas en β 2m

Tumor	Exon	Homocigoto/ heterocigoto	Mutación	Posición del codon stop
CO86	Exon 2	Heterocigoto	delección CA, codón 25	56
	Exon 2	Heterocigoto	delección A, codón 67	102
CO117	Exon 2	Heterocigoto	delección C, codón 91	102
	Exon 2	Heterocigoto	delección CCGTG, codones 101-102	114
CO132	Secuencia líder	ND	delección CT, codones 13-15	56
CO135	Secuencia líder	ND	delección CT, codones 13-15	56

ND, no determinado.

Tabla 4. Resultados del análisis de LOH empleando los microsatélites (STRs) que flanquean $\beta 2m$

Tumor	D15S126	D15S209
CO5	LOH	ROH
CO6	MSI	MSI
CO14	MSI	MSI
CO18	ROH	ROH
CO19	H	LOH
CO22	ROH	ROH
CO26	H	H
CO85	ROH	H
CO86	MSI	ROH
CO108	ROH	ROH
CO117	MSI	MSI
CO128	ROH	ROH
CO132	MSI	MSI
CO135	MSI	MSI

Abreviaturas: LOH, pérdida de heterocigosidad; ROH, retención de heterocigosidad; H: homocigoto; MSI: inestabilidad de microsatélites.

DISCUSIÓN

En este estudio, hemos mostrado cómo en tumores colorrectales que presentan pérdida total de moléculas HLA de clase I pueden existir dos mecanismos principales que explicarían el defecto de expresión en superficie. Mecanismos que operan en dos grupos de tumores W6/32 negativos y que se correlacionan dos rutas diferentes en la tumorigénesis de carcinoma de colon.

La ruta MMP (vía de reparación de desemparejamientos de bases de DNA) en cáncer de colon se caracteriza por la inestabilidad genómica, que conduce a la acumulación de deleciones e inserciones en secuencias de repeticiones simples. La fijación de estas alteraciones induce errores de replicación tales como mutaciones, estando asociadas a defectos de los genes encargados de la reparación de los desemparejamientos de bases (MMR) (32). Los tumores MMP representan una vía mutacional tumorigénica diferente (ruta mutadora), presentando estos tumores gastrointestinales bastantes diferencias tanto en el genotipo como en el fenotipo comparados con tumores MSI negativos (33). Las diferencias en el genotipo pueden ser explicadas por la alteración en el sistema MMR que conduce a la rápida acumulación de inserciones espontáneas y deleciones en regiones de mononucleótidos presentes en algunos genes tumorales tales como: TGF β R2, y BAX. Ambos genes están frecuentemente inactivados por mutaciones frameshift en tumores de colon MMP, pero raramente en tumores MMP⁻. Las mutaciones en BAX aparecen concretamente en el 51% de los tumores colorrectales primarios MMP⁺ (34), pero no en ningún otro tipo de tumores humanos. Las mutaciones que afectan a BAX se han encontrado en ambos alelos, siendo por tanto mutaciones bialelicas. La inactivación bialelica del gen BAX podría explicar por qué los tumores de colon de la ruta mutadora típicamente no presentan mutaciones en el gen

p53 (32), a diferencia de los tumores de la vía supresora (tumores con inestabilidad cromosómica o CIN).

Además de su papel central en la detención del crecimiento celular, p53 también interviene en la apoptosis en respuesta al daño producido en el DNA. La proteína p53 transactiva a BAX, un miembro de la familia bcl-2 que promueve la apoptosis. La inactivación de BAX ayudaría a explicar la correlación negativa existente entre los tumores MSI⁺ y p53. Una vez que ocurren las mutaciones en BAX, se liberaría la presión selectiva de las mutaciones oncogénicas sobre p53. Lo que sugiere que las mutaciones inactivadoras de BAX son seleccionadas durante la progresión de tumores de colon MMP⁺ y que el gen BAX interviene como gen supresor de tumores en una ruta para la carcinogénesis de colon independiente de p53. Igualmente, la inactivación bialelica de $\beta 2m$ puede estar bajo una fuerte presión selectiva durante la tumorigénesis de la ruta mutadora.

En los tumores de colon estudiados hasta la fecha a partir de secciones de parafina, se ha descrito hasta un 40% de mutaciones en $\beta 2m$ con una baja frecuencia de inactivación bialelica (35). En el presente estudio, 6 de 95 tumores se clasificaron como MSI⁺, presentando cuatro de ellos pérdida de expresión de moléculas HLA-I en superficie debido a la inactivación de $\beta 2m$. Está claro, que la inactivación bialelica de $\beta 2m$ es responsable de la pérdida de moléculas HLA y que debido a la alta frecuencia (4 de 6) observada en tumores MSI⁺ en este estudio, las mutaciones de $\beta 2m$ se seleccionan durante la tumorigénesis de la ruta mutadora evadiendo la respuesta del sistema inmune.

Aunque la $\beta 2m$ no está implicada directamente en el crecimiento celular debería ser considerada como diana para la inactivación en la ruta MMP y por tanto como un gen supresor de tumores (25). Este hecho es congruente con el pronóstico desfavorable de los tumores de colon MMP⁺ que presentan inactivación de $\beta 2m$ (35). A pesar de que los tumores MSI⁺ tienen un gran potencial para una presentación antigénica eficiente de péptidos junto con una mayor inmunogenicidad (36, 37), la presencia de inactivación de $\beta 2m$ estaría asociada a un peor pronóstico.

En la ruta supresora, los tumores W6/32⁻/MSI⁻ presentan un mecanismo diferente que implica al complejo APM. Alteraciones en la expresión y/o función de los componentes del complejo APM pueden producir un acusado descenso de la expresión en superficie de moléculas HLA de clase I. Defectos en APM se han identificado en diferentes tipos de lesiones tumorales conduciendo a una disminución en el procesamiento de los antígenos asociados a tumor (TAA) y en la presentación de péptidos derivados de TAA a los LT-CD8⁺, proveyendo a las células tumorales por tanto de un mecanismo de inmunoevasión.

En diferentes líneas celulares y tumores primarios estudiados, se han observado alteraciones en la expresión de TAP1, TAP2, LMP2 y LMP7. El estudio sobre tumores primarios se ha realizado hasta la fecha empleando tinción inmunohistológica sobre secciones de parafina. Alteración en la expresión de TAP1 se ha encontrado en todos los tipos de tumores analizados, con una frecuencia que varía entre el 14% encontrado en carcinoma de colon primario y el 49% en cáncer de cérvix (4, 14). En ambos tipos de tumores la frecuencia de desregulación de los componentes del complejo APM es mayor en las metástasis en comparación con los tumores primarios. La expresión de

TAP2 se ha analizado únicamente en carcinoma de mama y en melanoma (14). Defectos en la expresión de LMP2, TAP1 y TAP2, se han encontrado en líneas humanas de diferente histología, pero solamente aquellas líneas gastrointestinales con desregulación de LMP7 presentaron correlación con el nivel de expresión de moléculas HLA-I, pero no con la desregulación de TAP1, TAP2 y LMP2 (38, 39). Este resultado pone de manifiesto la relación directa que existe entre los niveles de expresión en superficie de moléculas HLA de clase I y la ausencia de expresión de LMP7. En este sentido, LMP7 es responsable de alterar la especificidad del complejo APM aumentando la producción de péptidos hidrofóbicos inmunogénicos. El defecto en la expresión de LMP7 encontrada en 9 de 10 casos de colon MSI⁻/HLA⁻, prueba el importante papel que la proteína LMP7 desempeña en la producción de péptidos antigénicos que estabilizan la estructura del complejo HLA/β2m permitiendo su expresión en superficie.

Además del defecto de LMP7, hemos encontrado alteración en la expresión de TAP2 en 4 de 10 tumores de la vía supresora. Tanto en líneas humanas como de ratón, se ha demostrado la existencia de una desregulación coordinada de los genes TAP1 y LMP2, ya que ambos se encuentran controlados por el mismo promotor bidireccional (10, 40). Aunque en líneas humanas y murinas se han encontrado alteraciones de TAP2 y LMP7, lo cual sería indicativo de un mecanismo de regulación común (6), en este trabajo se muestra una alteración simultánea en 4 de 10 casos. Puede ser que TAP2 y LMP7 tengan un mecanismo de regulación independiente y que por tanto en tumores colorrectales el defecto de expresión de LMP7 y TAP2 sea simultáneo más que coordinado.

El único caso de colon que estaría en discordancia con este último grupo de tumores de la vía supresora sería CO5, el cual presenta expresión de LMP7 y tinción positiva para el anticuerpo monoclonal HC10. Si los cuatro tumores de la vía mutadora CO132, CO135, CO117 y CO86 presentan inactivación bialelica de $\beta 2m$ y son simultáneamente HC10 positivos, por qué CO5 no presenta igualmente inactivación de $\beta 2m$.

La presencia de cadena pesada libre en el citoplasma en tumores sin $\beta 2m$ sugiere que en el retículo endoplasmático la pérdida de $\beta 2m$ es responsable de la desestabilización de la cadena pesada, lo que implicaría su translocación al citoplasma y explicaría la tinción con el anticuerpo HC10. Se conoce que el proteasoma media la degradación no sólo de proteínas citosólicas y nucleares, sino también de proteínas que residen en el retículo endoplasmático (41, 42). Este descubrimiento implica que las proteínas residentes en la membrana del retículo destinadas a la degradación son transportadas al citosol donde acceden a la maquinaria de degradación proteolítica. La translocación y posterior degradación por el proteasoma se ha observado en un gran número de proteínas del retículo en diferentes organismos (43). En nuestro caso, es de particular interés conocer si las moléculas MHC-I sufren igualmente un proceso similar existiendo una vía de degradación alternativa. Se conoce que las moléculas HLA-I que no se encuentran alteradas o que no presentan señales para su degradación como otros sustratos conocidos, pueden ser dianas para la degradación mediada por alguna de las proteínas virales US2 o US11 (44, 45). El citomegalovirus humano codifica dos glicoproteínas residentes en el retículo, US2 y US11, una de las cuales es suficiente para inducir la rápida dislocación de las moléculas HLA-I recién sintetizadas al citosol donde serán degradadas por el proteasoma (**Figura 5**). El mecanismo detallado del proceso de translocación no es muy bien conocido. Sin embargo, cuando se inhibe la

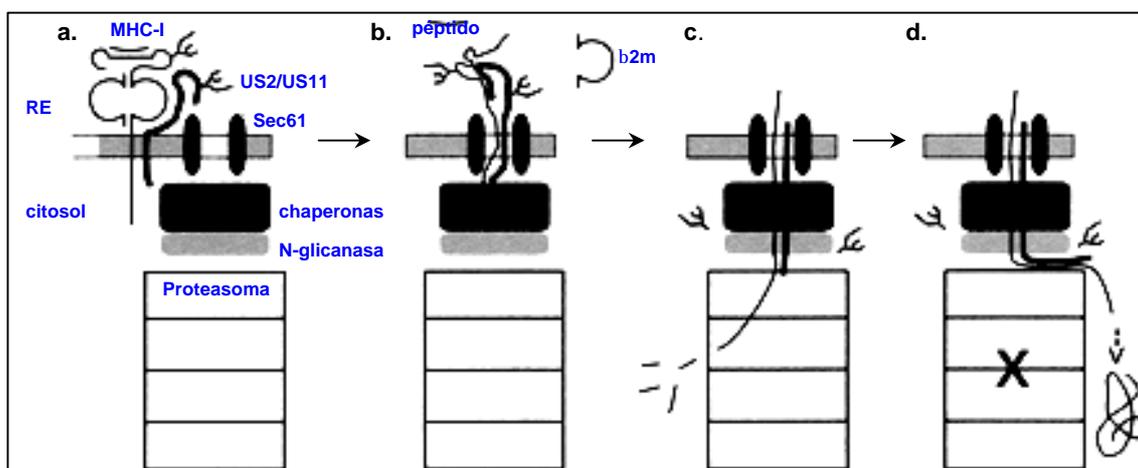
degradación del proteasoma se observan en el citoplasma intermediarios deglicosilados característicos, siendo los productos del ataque de la enzima N-glicanasa (proteína transmembrana del retículo) sobre la cadena pesada de clase I. Estos intermediarios se acumulan en el citoplasma celular. Este proceso de transporte no solamente se ve limitado a la acción mediada por las proteínas US2 y US11, sino que otras proteínas con defectos en el ensamblaje son igualmente degradadas en el proteasoma. Cómo las moléculas HLA-I sintetizadas en ausencia de $\beta 2m$, fracasando el ensamblaje correcto de las mismas y apareciendo intermediarios deglicosilados característicos en el citoplasma bajo la inhibición del proteasoma (46, 47). La maquinaria responsable de la translocación de proteínas mal plegadas o inestables desde la membrana del retículo al citoplasma es desconocida. Sin embargo, se ha sugerido como posible candidato el complejo denominado translocon o Sec61, basándose en los estudios de co-precipitación de intermediarios deglicosilados de moléculas MHC de clase I con el complejo Sec61 en células US2 o US11 (45, 48).

La translocación al citoplasma de la cadena pesada implicaría la existencia de una ruta alternativa a la existente en el retículo para la degradación de la misma. Desconocemos porqué en la ruta supresora con un defecto en la expresión de LMP7 la cadena pesada no aparece en el citoplasma. Puede ser que la interacción con el conjunto de chaperonas que forman el complejo de carga, retenga el complejo HLA/ $\beta 2m$ en ausencia de péptidos en la membrana del retículo previniendo por tanto la translocación (49, 50).

El conocimiento de los mecanismos precisos que operan tanto en la ruta MMP como en la vía supresora es crucial para poder desarrollar en un futuro estrategias que mejoren la eficacia de la inmunoterapia. De esta forma, en los tumores de colon MMP⁺ con

ausencia de $\beta 2m$, la aproximación de una inmunoterapia basada en LT sería ineficaz, en cambio en la ruta supresora con alteración del gen LMP7 tal vez se podría desarrollar una inmunoterapia basada en el empleo de $IFN\gamma$.

Figura 5



Modelo de translocación de cadena pesada de clase I mediado por las proteínas virales US2 y US11. (a) La reacción de translocación se inicia a través de la unión de US2 o US11 a la cadena pesada mediante contactos intermoleculares dentro del lumen del retículo endoplasmático (RE). (b) Una vez en el complejo Sec61, la cadena pesada de clase I se desorganiza. La $\beta 2m$ y el péptido unido a MHC-I se disocian dentro del RE. Factores citosólicos unidos a la región citoplasmática de la cadena pesada de clase I ayudan a su extracción. (c) La enzima N-glicanasa escinde la cadena oligosacáridica cuando la cadena pesada emerge en el citosol. (d) En presencia de inhibidores del proteasoma, la cadena pesada se acumula en el citoplasma celular en forma de intermediarios deglicosilados.

REFERENCIAS

1. Pawelec G, Zeuthen J, Kiessling R. Escape from host-antitumor immunity. *Crit Rev Oncol* 1997; 8:111-141.
2. Radfar S, Martin H, Tilkin-Mariame AF. Tumor escape mechanism involving Fas and Fas-L molecules in human colorectal tumors. *Gastroenterol Clin Biol* 2000; 24:1191-1196.
3. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumors. *Immunol Today* 1997; 18:89-95.
4. Ritz U, Momburg F, Pilch H, Huber C, Maeurer MJ, Seliger B. Deficient expression of components of MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. *Int J Oncol* 2001; 19:1211-1220.
5. Delp K, Momburg F, Hilmes C, Huber C, Seliger B. Functional deficiencies of the MHC class I antigen pathway in human tumors of epithelial origin. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25:88-95.
6. Seliger B, Wollscheid U, Momburg F, Blankenstein T, Huber C. Coordinate downregulation of multiple MHC class I antigen processing genes in chemical-induced murine tumor cell lines of distinct origin. *Tissue Antigens* 2000; 56:327-336.
7. Rivoltini L, Barracchini DC, Viggiano V, Kawakami Y, Smith A, Mixon A, Restifo NP, Topalian SL, Simonis TB, Rosenberg SA. Quantitative correlation between HLA class I expression and recognition of melanoma cells by antigen specific cytotoxic T lymphocytes. *Cancer Res* 1995; 55:3149-3157.
8. Gayet J, Zhou XP, Duval A, Rolland S, Hoang JM, Cottu P, Hamelin R. Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines. *Oncogene* 2001; 20:5025-5032.
9. Palmisano GL, Pistillo MP, Capanni P, Pera C, Nicolo G, Salvi S, Perdelli L, Pasciucco G, Ferrara GB. Investigation of HLA class I downregulation in breast cancer by RT-PCR. *Human Immunol* 2001; 62:133-139.
10. Singal DP, Ye M, Ni J, Snider DP. Markedly decreased expression of TAP1 and LMP2 genes in HLA class I-deficient human tumor cell lines. *Immunol Lett* 1996; 50:149-154.
11. Corrias MV, Occhino M, Croce M, De Ambrosis A, Pistillo MP, Bocca P, Pistoia V, Ferrini S. Lack of HLA-class I antigens in human neuroblastoma cells: analysis of its relationship to TAP and tapasin expression. *Tissue Antigens* 2001; 57:110-117.

12. Johnsen A, France J, Sy MS, Harding CV. Down-regulation of the transporter for antigen presentation, proteasome subunits, and class I major histocompatibility complex in tumor cell lines. *Cancer Res* 1998; 58:3660-3667.
13. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. TAP off-tumors on. *Immunol Today* 1997; 18:292-299.
14. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 2000; 21:455-464.
15. Seliger B, Hammers S, Höhne A, Zeidler R, Knuth A, Gerharz CD, Huber C. IFN γ -mediated coordinated transcriptional regulation of human TAP1 and LMP2 genes in human renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997; 3:573-578.
16. Kallfelz M; Jung D, Hilmes C, Knuth A, Jaeger E, Huber C, Seliger B. Induction of immunogenicity of a human renal-cell carcinoma cell line by TAP1-gene transfer. *Int J Cancer* 1999; 81:125-133.
17. Perez B, Benitez R, Fernandez MA, Oliva MR, Soto JL, Serrano S, Lopez-Nevot MA, Garrido F. A new beta 2-microglobulin mutation found in a melanoma tumor cell line. *Tissue Antigens* 1999; 53:569-572.
18. Benitez R, Godelaine D, Lopez Nevot MA, Brasseur F, Jimenez P, Marchand M, Oliva MR, van Baren N, Cabrera T, Andry G, Landry C, Ruiz-Cabello F, Boon T, Garrido F. Mutations of the beta 2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 1998; 52:520-529.
19. Cabrera T, Collado A, Fernandez MA, Ferron A, Sancho J, Ruiz-Cabello F, Garrido F. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tissue Antigens* 1998; 52:114-123.
20. Calistri D, Presciuttini S, Buonsanti G, Radice P, Gazzoli I, Pensotti V, Sala P, Eboli M, Andreola S, Russo A, Pierotti M, Bertario L, Ranzani GN. Microsatellite instability in colorectal-cancer patients with suspected genetic predisposition. *Int J Cancer* 2000; 89:87-91.
21. Yamamoto H, Imai K, Perucho M. Gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype pathway. *J Gastroenterol* 2002; 37:153-163.
22. Bicknell DC, Rowan A, Bodmer WF. Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:4751-4756.
23. Ramal LM, Feenstra M, van der Zwan AW, Collado A, Lopez-Nevot MA, Tilanus M, Garrido F. Criteria to define HLA haplotype loss in human solid tumors. *Tissue Antigens* 2000; 55:443-448.

24. Ramal LM, Maleno I, Cabrera T, Collado A, Ferron A, Lopez-Nevot MA, Garrido F. Molecular strategies to define HLA haplotype loss in microdissected tumor cells. *Human Immunol* 2000; 61:1001-1012.
25. Perucho M. Correspondence re: C. R. Boland et al; A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:5248-5257. *Cancer Res* 1999; 59:249-253.
26. Bicknell DC, Kaklamanis L, Hampson R, Bodmer WF, Karran P. Selection for beta 2-microglobulin mutation in mismatch repair-defective colorectal carcinomas. *Curr Biol* 1996; 6:1695-1697.
27. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Bigas-Rodriguez MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A national cancer institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability. *Cancer Res* 1998; 58:5248-5257.
28. Murata S, Udono H, Tanahashi N, Hamada N, Watanabe K, Adachi K, Yamano T, Yui K, Kobayashi N, Kasahara M, Tanaka K, Chiba T. Immunoproteasome assembly and antigen presentation in mice lacking both PA28alpha and PA28beta. *EMBO J* 2001; 20:5898-907.
29. Fehling HJ, Swat W, Laplace C, Kühn R, Rajewsky K, Müller U, von Boehmer H. MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP7. *Science* 1994; 265:1234-1237.
30. Cresswell P, Bangia N, Dick T, Diedrich G. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol Rev* 1999; 172:21-28.
31. Mc Cracken AA; Brodsky JL. Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol* 1996; 132:291-298.
32. Yamamoto H, Sawai H, Weber TK, Rodriguez-Bigas MA, Perucho M. Somatic frameshift mutations in DNA mismatch repair and proapoptosis genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; 58:997-1003.
33. Yamamoto H, Perez-Piteira J, Yoshida T, Terada M, Itoh F, Imai K, Perucho M. Gastric cancers of the microsatellite mutator phenotype display characteristic genetic and clinical features. *Gastroenterology* 1999; 116:1348-1357.
34. Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, Perucho M. Somatic frameshift mutations in the Bax gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275:967-969.
35. Yamamoto H, Yamashita K, Perucho M. Somatic mutation of the beta2-microglobulin gene associates with unfavorable prognosis in gastrointestinal

- cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Gastroenterology* 2001; 120:1565-1567.
36. Bustin SA, Li SR, Phillips S, Dorudi S. Expression of HLA class II in colorectal cancer: evidence for enhanced immunogenicity of microsatellite-instability-positive tumors. *Tumor Biol* 2001; 22:294-298.
 37. Hemminki A, Mecklin JP, Järvinen H, Aaltonen LA, Joensuu H. Microsatellite instability is a favourable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology* 2000; 119:921-928.
 38. Kang JK, Yoon SJ, Kim NK, Heo DS. The expression of MHC class I, TAP1/TAP2, and LMP2/7 genes in human cancer cell lines. *Int J Oncol* 2000; 16:1159-1163.
 39. Yoon SJ, Kang JO, Park JS, Kim NK, Heo DS. Reduced expression of MHC class I antigen in human cancer cell lines with defective LMP-7. *Anticancer Res* 2000; 20:949-953.
 40. Dovhey SE, Ghosh NS, Wright KL. Loss of interferon-gamma inducibility of TAP1 and LMP2 in a renal cell carcinoma cell line. *Cancer Res* 2000; 60:5789-5796.
 41. Brodsky JL, McCracken AA. ER protein quality control and proteasome-mediated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol* 1999; 10:507-513.
 42. Bonifacino JS, Weissman AM. Ubiquitin and the control of protein fate in the secretory and endocytic pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; 14:19-57.
 43. Lord JM, Davey J, Frigerio L, Roberts LM. Endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11:159-164.
 44. Wiertz EJ, Jones TR, Sun L, Bogyo M, Geuze HJ, Ploegh HL. The human cytomegalovirus US11 gene product dislocates MHC class I heavy chains from the endoplasmic reticulum to the cytosol. *Cell* 1996; 84:769-779.
 45. Wiertz EJ, Tortorella D, Bogyo M, Yu J, Mothen W, Jones TR, Rapoport TA, Ploegh HL. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 1996; 384:432-438.
 46. Hughes EA, Hammond C, Cresswell P. Misfolded major histocompatibility complex class I heavy chains are translocated into the cytoplasm and degraded by the proteasome. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:1896-1901.
 47. Tortorella D, Story CM, Huppa JB, Wiertz EJ, Jones TR, Ploegh HL. Dislocation of type I membrane proteins from the ER to the cytosol is sensitive to changes in redox potential. *J Cell Biol* 1998; 142:365-376.

4

Alteración del patrón nuclear de los cuerpos de PML en tumores de colon con defecto de expresión en LMP7

INTRODUCCIÓN

El producto génico del gen supresor de tumores PML en la mayoría de pacientes con leucemia promielocítica aguda (LPA) aparece como un proteína de fusión con el producto del gen RAR α (receptor α del ácido retinoico), siendo consecuencia de la translocación t(15; 17) (1-3). La proteína PML en células normales es la responsable de formar los dominios nucleares conocidos como cuerpos de PML, que en células LPA se encuentran desorganizados. La proteína PML pertenece a una familia de proteínas caracterizadas por la presencia del motivo trimérico RBCC/TRIM compuesto por los siguientes dominios: dominio RING-finger; B1, B2-boxes; y dominio Coiled-coil (**Figura 1A**) (4). EL motivo RBCC es el responsable de la oligomerización de la proteína en una estructura con forma de red en cuyo interior se albergan gran número de proteínas diferentes. Entre las proteínas que se encuentran formando parte de los cuerpos de PML se encuentran: Sp100, SUMO-1, HAUSP, HSP-70, CBP, DAXX, BLM y una fracción de RB (5, 6). En la formación de los cuerpos de PML se requiere un primera etapa en la cual la proteína que se encuentra dispersa en el nucleoplasma se agrega como resultado de un proceso de desfosforilación, igualmente parece ser que la proteína CBP interviene en este proceso (**Figura 1B**) (7, 8). Para la etapa siguiente es imprescindible la participación de la proteína SUMO-1 (etapa de **sumolación**), se trata de una proteína similar a ubiquitina que modifica covalentemente a gran número de proteínas en el núcleo. SUMO-1 al igual que la proteína ubiquitina se une a residuos de Lys (lisina) de proteínas diana. Como resultado del proceso de sumolación se agregan gran número de proteínas a los cuerpos de PML, constituyendo entonces los cuerpos de PML maduros (**Figura 1B**). Esta última etapa es muy importante, ya que la ausencia de SUMO-1 impide que se formen los cuerpos de PML maduros (9).

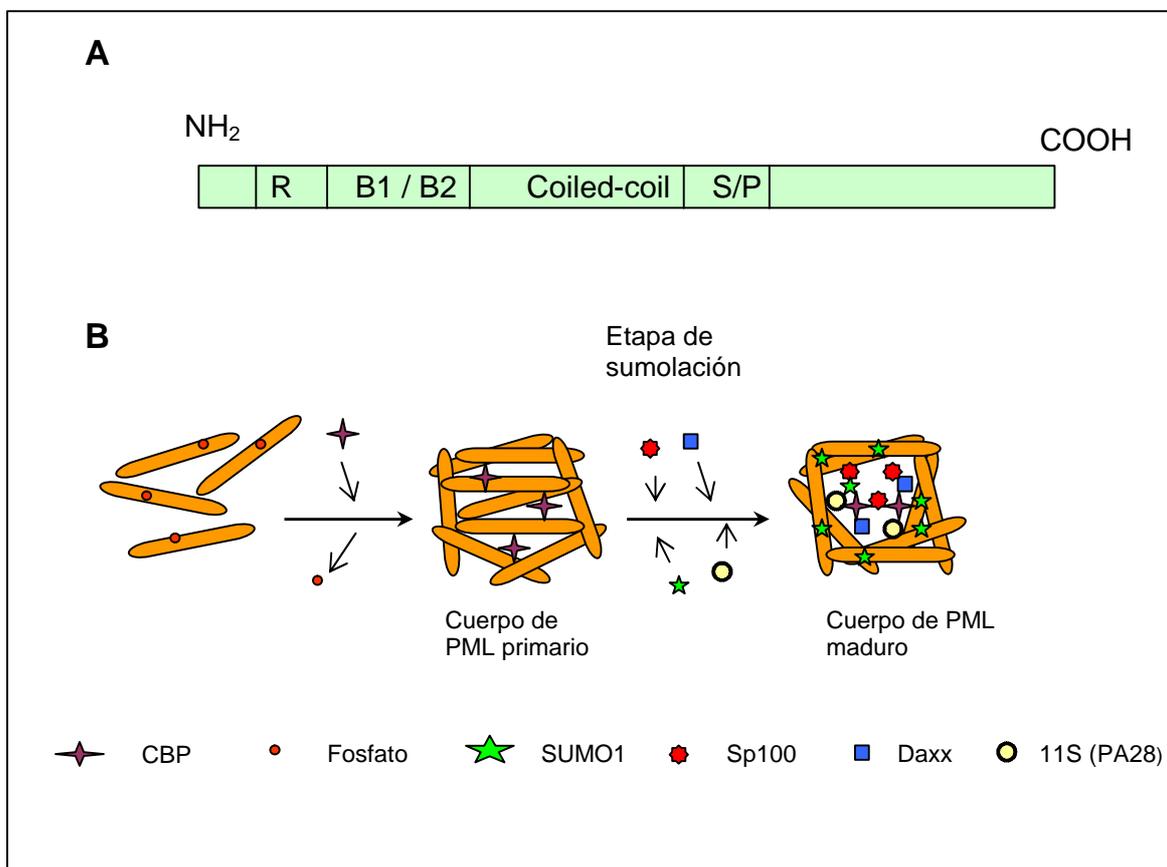
Los cuerpos de PML son estructuras complejas que no tienen una función definida, habiéndose implicado en diferentes procesos celulares como regulación transcripcional, supresión del crecimiento y apoptosis (4). Estudios recientes sugieren que los cuerpos de PML podrían estar relacionados además con la degradación proteasomal de proteínas etiquetadas con ubiquitina, proteínas virales mal plegadas (misfolded) y activadores transcripcionales (10, 11). Las proteínas celulares destinadas a ser degradadas por el proteasoma son modificadas por unión covalente a ubiquitina mediante un sistema compuesto por tres enzimas diferentes (12). Una de las proteínas encontradas de forma constitutiva en los cuerpos de PML es la hidrolasa dependiente de ubiquitina-HAUSP que elimina ubiquitina de sustratos que son posteriormente degradados por el proteasoma (13). La presencia de esta proteína en los cuerpos de PML es concordante con la idea de que los cuerpos de PML son lugares de ubiquitinización y desubiquitinización de proteínas. Igualmente varias proteínas virales son capaces de desorganizar estas estructuras nucleares, como la proteína IE1 de citomegalovirus alterando por tanto la degradación proteasomal (14). La identificación del factor regulador del proteasoma PA28 en esta localización apoya aún más la implicación de los cuerpos de PML como lugares de degradación proteica (15).

La presencia del inmunoproteasoma en los cuerpos de PML abre una nueva vía para la generación de péptidos antigénicos. De hecho los péptidos generados por el proteasoma nuclear difunden hacia el citoplasma sin necesidad de un transporte activo y pueden ser presentados igualmente por las moléculas HLA de clase I (16).

En los resultados expuestos en el apartado referente a tumores colorrectales con ausencia total de expresión de moléculas HLA de clase I, se mencionan 9 casos con

alteración en la expresión de LMP7. La proteína LMP7 es un componente del inmunoproteasoma encargado de modificar su especificidad generando péptidos que son preferencialmente presentados por moléculas HLA de clase I (Introducción). En este grupo de tumores se ha investigado el patrón inmunohistológico de los cuerpos de PML para determinar la posible existencia de asociación con la expresión de LMP7.

Figura 1



(A) Dominios de la proteína PML: R, dominio de dedos de zinc (ring-finger); B1/B2, dominios rico en cisteína; región de hélice- α ; S/P, dominio rico en serina/prolina. (B) Formación de los cuerpos de PML maduros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de tumores para estudio inmunohistológico de los cuerpos de PML

Los tumores de colon con defecto de expresión de LMP7 y tumores control fueron teñidos con el anticuerpo monoclonal PG-M3 (Dako A/S, Denmark) que reconoce la región N-terminal (17).

Índice de proliferación celular: expresión de Ki67

Se empleó el anticuerpo monoclonal MiB1 (Dakopatts, Glostrup, Denmark) sobre secciones de parafina en el estudio de expresión del antígeno Ki67. Secciones de parafina de 5 μ m fueron tratadas con xileno y rehidratadas con etanol. La actividad peroxidasa endógena se bloqueó mediante inmersión en metanol al 0.5% durante 15 min, seguido por dos lavados con tampón fosfato durante 5 min cada uno. Posteriormente las secciones se incuban con el anticuerpo primario durante una hora a temperatura ambiente. Para la detección de la reacción se empleó el complejo peroxidasa-streptavidina-biotina y el cromógeno diaminobenzidina (DAB). Los resultados se expresan como porcentaje de células neoplásicas con núcleos teñidos positivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El proteasoma es el principal complejo proteolítico responsable de la generación de péptidos a partir de proteínas intracelulares (18). Este complejo genera péptidos que se encuentran extendidos en su extremo N-terminal y que necesitan una reacción posterior de corte para adquirir la longitud óptima que les permita ser presentados por moléculas HLA de clase I (19). Reacción que es llevada a cabo por diferentes aminopeptidasas presentes en el citoplasma y en el retículo endoplasmático (20, 21). La expresión de

algunas de estas aminopeptidasas como la leucina-aminopeptidasa (LAP) (22) se encuentra regulada por $\text{IFN}\gamma$ (22), sugiriendo que la acción llevada a cabo por las mismas influye en el pool de péptidos presentados por las moléculas MHC de clase I.

Los péptidos generados por el proteasoma se distribuyen en dos compartimentos celulares interconectados: el núcleo y el citoplasma celular. Existiendo un flujo continuo desde el núcleo al citoplasma que no requiere ATP, realizándose por difusión simple a través de complejo del poro nuclear (16). Los péptidos que abandonan el núcleo celular tienen posteriormente que interactuar con los transportadores TAP, pero en su camino encuentran a diferentes peptidasas citoplasmáticas (LAP, y tripeptidil peptidasa II) que no se encuentran en el núcleo. La actuación de las mismas limita la cantidad de péptidos que son presentados por las moléculas HLA de clase I, sobre todo cuando se encuentran sobre-expresadas como en el caso de la LAP (22).

La generación de péptidos tanto citoplasmáticos como nucleares es llevada a cabo por el complejo del proteasoma. En el nucleoplasma el proteasoma parece ser una estructura bastante dinámica según las necesidades de la célula (23). Una de las regiones donde puede encontrarse es en los denominados cuerpos de PML. Concretamente el complejo activador del proteasoma PA28 o 11S se encuentra formando parte de los cuerpos de PML maduros (**Figura 1B**) (15). E igualmente en determinadas ocasiones el complejo del proteasoma 20S se ha observado en los cuerpos de PML aportando evidencia de la posible actuación del inmunoproteasoma dentro de esta localización nuclear. Además, diferentes proteínas virales son capaces de alterar la función y estructura de los cuerpos de PML y por tanto la generación de péptidos antigénicos, pudiendo constituir una estrategia de inmunoevasión viral. Así por ejemplo la proteína ICP0 del virus herpes

simple tipo 1 (HSV-1) es capaz de unirse tanto a la proteína PML como a Sp100 induciendo la degradación de los cuerpos de PML (24, 25). La proteína viral temprana IE1 de citomegalovirus no degrada los cuerpos de PML pero disminuye la modificación covalente de PML por SUMO a través de su unión con PML (26, 27). No sólo proteínas virales mal plegadas pueden degradarse en el proteasoma asociado a los cuerpos de PML sino también reguladores transcripcionales, como la proteína-1 que interacciona con el receptor glucocorticoide (GRIP1) (28).

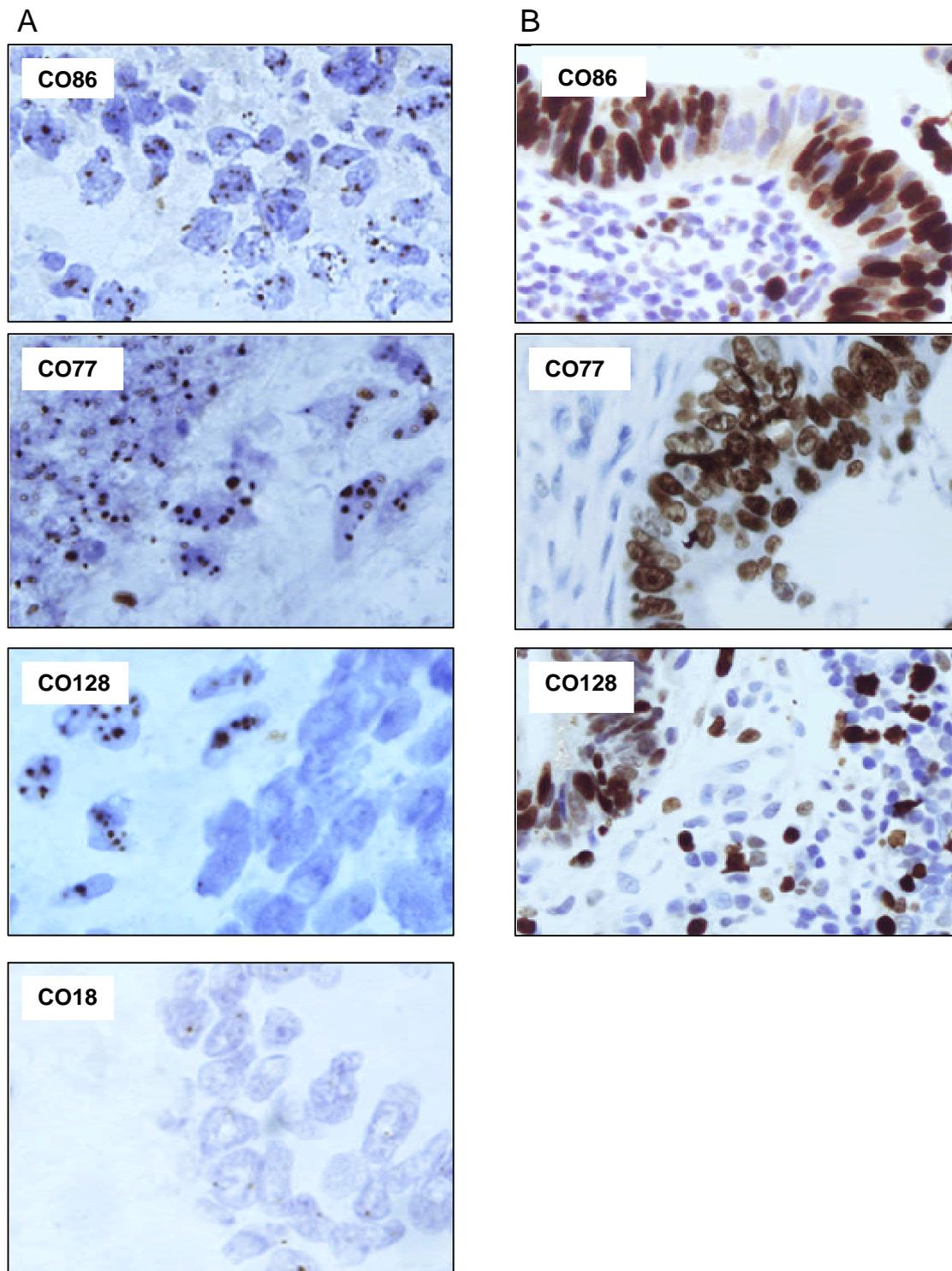
Dada la posible correlación existente entre degradación proteica-proteasoma dependiente dentro de los cuerpos de PML, investigamos el patrón de tinción inmunohistológico de aquellos tumores de colon que con ausencia de expresión de moléculas HLA de clase I tenían además un defecto en la expresión del gen LMP7. Los nueve casos de tumores que presentaban este fenotipo mostraron la misma característica: alteración del patrón moteado normal de los cuerpos de PML en comparación con el tejido circundante no neoplásico (**Figura 2**). El análisis de expresión del antígeno Ki67 mostró un índice alto de proliferación tumoral (**Tabla 1**).

La alteración de la estructura de los cuerpos de PML en tumores de colon que presentan alteración de expresión del gen LMP7, implicaría que LMP7 es parte indispensable del inmunoproteasoma presente en los cuerpos de PML. Y que el inmunoproteasoma participaría en la organización de la estructura de los cuerpos de PML maduros. En este grupo de tumores no sólo se alteraría el patrón de péptidos citoplasmáticos sino también los péptidos nucleares, en ausencia de los cuales las moléculas HLA de clase I en condiciones fisiológicas no se expresarían en la superficie celular.

Tabla 1. Patrones de PML en tumores de colon con pérdida total de HLA-I

Tumor	^aHLA-A, B y C/β2m	^bLMP7	%Ki67	^cPatrón de PML
CO5	-	-	67	W
CO6	-	-	80	D
CO14	-	-	70	D
CO18	-	-	85	D
CO19	-	-	65	D
CO22	-	-	85	D
CO26	-	-	85	D
CO85	-	-	72	D
CO86	-	+	60	W
CO117	-	+	65	W
CO128	-	-	55	D
CO132	-	+	45	W
CO135	-	+	50	W

^aHLA-A, B y C/β2m, expresión determinada por inmunohistología empleando el Abm W6/32; ^b(+) presencia o (-) ausencia de expresión de LMP7; ^cPatrón normal W(wild-type) o alterado D (disrupted).

Figura 2

A Inmunohistología de secciones de colon con el Abm PG-M3. Los tumores CO86 (con inactivación bialélica de $\beta 2m$) y CO77 (tumor HLA positivo) muestran un patrón normal de tinción de los cuerpos de PML, tanto las células tumorales como las estromales. En cambio las células tumorales de los casos CO128 y CO18 con defecto de expresión de LMP7 (Tabla 1) muestran alteración de los cuerpos de PML, siendo normal en las células estromales. **B** Tinción inmunohistológica empleando el Abm dirigido frente a ki67. A, B ($\times 400$).

REFERENCIAS

1. de The H, Lavau C, Marchio A, Chomienne C, Degos L, Dejean A. The PML-RAR alpha fusion mRNA generated by the t(15;17) translocation in acute promyelocytic leukemia encodes a functionally altered RAR. *Cell* 1991; 66:675-684.
2. Goddard AD, Borrow J, Freemont PS, Solomon E. Characterization of a zinc finger gene disrupted by the t(15;17) in acute promyelocytic leukaemia. *Science* 1991; 254:1371-1374.
3. Kakizuka A, Miller WH Jr, Umesono K, Warrell RP Jr, Frankel SR, Murty VV, Dmitrovsky E, Evans RM. Chromosomal translocation t(15;17) in human acute promyelocytic leukaemia fuses RAR alpha with a novel putative transcription factor, PML. *Cell* 1991; 66:663-674.
4. Hodges M, Tissot C, Howe K, Grimwade D, Freemont PS. Structure, organization and dynamics of promyelocytic leukaemia protein nuclear bodies. *Am J Hum Genet* 1998; 63:297-304.
5. Seeler JS, Dejean A. The PML nuclear bodies: actors or extras? *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9:362-367.
6. Zhong S, Hu P, Ye TZ, Stan R, Ellis NA, Pandolfi PP. A role for PML and the nuclear body in genomic stability. *Oncogene* 1999; 18:7941-7947.
7. Zhong S, Müller S, Ronchetti S, Freemont PS, Dejean A, Pandolfi PP. Role of SUMO-1-modified PML in nuclear body formation. *Blood* 2000; 95:2748-2753.
8. Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Puvion F, Koken M, Honore N, Doubeikovsky A, Duprez E, Pandolfi PP, Puvion E, Freemont P, de The H. Role of promyelocytic leukaemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As₂O₃-induced PML or PML/retinoic acid receptor α degradation. *J Exp Med* 2001; 193:1361-1371.
9. Muller S, Matunis MJ, Dejean A. Conjugation with the ubiquitin-related modifier SUMO-1 regulates the partitioning of PML within the nucleus. *EMBO J* 1998; 17:61-70.
10. Zhong S, Salomoni P, Ronchetti S, Guo A, Ruggero D, Pandolfi PP. Promyelocytic leukaemia protein (PML) and Daxx participate in a novel nuclear pathway for apoptosis. *J Exp Med* 2000; 191:631-640.
11. Anton LC, Schubert U, Bacik I, Princiotta MF, Wearsch PA, Gibbs J, Day PM, Realini C, Rechsteiner MC, Bennink JR, Yewdell JW. Intracellular localization of proteasomal degradation of a viral antigen. *J Cell Biol* 1999; 1:113-124.
12. Ciechanover A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 1998; 17:7151-7160.

13. Everett RD, Meredith M, Orr A, Cross A, Kathoria M, Parkinson J. A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein. *EMBO J* 1997; 16:566-577.
14. Lamond AI, Earnshaw WC. Structure and function in the nucleus. *Science* 1998; 280:547-553.
15. Fabunmi RP, Wigley C, Thomas PJ, DeMartino GN. Interferon γ regulates accumulation of the proteasome activator PA28 and immunoproteasome at nuclear PML bodies. *J Cell Sci* 2000; 114:29-36.
16. Reits E, Griekspoor A, Neijssen J, Groothuis T, Jalink K, van Veelen P, Janseen H, Calafat J, Drijfhout JW, Neefjes J. Peptide diffusion, protection and degradation in nuclear and cytoplasmic compartments before antigen presentation by MHC class I. *Immunity* 2003; 18:97-108.
17. Falini B, Flenghi L, Fagioli M, Lo Coco F, Cordone I, Diverio D, Pasqualucci L, Biondi A, Riganelli D, Orleth A, Liso A, Martelli MF, Pelicci PG, Pileri S. Immunocytochemical diagnosis of acute promyelocytic leukaemia (M3) with the monoclonal antibody PG-M3 (anti-PML). *Blood* 1997; 90:4046-4053.
18. Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 1994; 78:761-771.
19. Mo XY, Cascio P, Lemerise K, Goldberg AL, Rock K. Distinct proteolytic processes generate the C and N termini of MHC class I-binding peptides. *J Immunol* 1999; 163:5851-5859.
20. Paz P, Brouwenstijn N, Perry R, Shastri N. Discrete proteolytic intermediates in the MHC class I antigen processing pathway and MHC I-dependent peptide trimming in the ER. *Immunity* 1999; 11:241-251.
21. Serwold T, Gonzales F, Kim J, Jacob R, Shastri N. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 2002; 419:480-483.
22. Beninga J, Rock KL, Goldberg AL. Interferon-gamma can stimulate post-proteasomal trimming of the N terminus of an antigenic peptide by inducing leucine aminopeptidase. *J Biol Chem* 1998; 273:18734-18742.
23. Muratani M, Gerlich D, Janicki SM, Gebhard M, Eils R, Spector DL. Metabolic-energy-dependent movement of PML bodies within the mammalian cell nucleus. *Nat Cell Biol* 2002; 4:106-110.
24. Everett RD. A surprising role for the proteasome in the regulation of herpesvirus infection. *Trends Biochem Sci* 1999; 24:293-295.

25. Everett RD, Freemont P, Saitoh H, Dasso M, Orr A, Kathoria M, Parkinson J. The disruption of ND10 during herpes simplex virus infection correlates with the Vmw 110- and proteasome-dependent loss of several PML isoforms. *J Virol* 1998; 72:6581-6591.
26. Ahn JH, Brignole EJ, Hayward GS. Disruption of PML subnuclear domains by the acidic IE1 protein of human cytomegalovirus is mediated through interaction with PML and may modulate a RING finger-dependent cryptic transactivator function of PML. *Mol Cell Biol* 1998; 18:4899-4913.
27. Muller S, Dejean A. Viral immediate-early proteins abrogate the modification by SUMO-1 of PML and Sp100 proteins, correlating with nuclear body disruption. *J Virol* 1999; 73:5137-5143.
28. Baumann CT, Ma H, Wolford R, Reyes JC, Maruvada P, Lim C, Yen PM, Stallcup MR, Hager GL. The glucocorticoid receptor interacting protein 1 (GRIP1) localizes in discrete nuclear foci that associate with ND10 bodies and are enriched in components of the 26S proteasome. *Mol Endocrinol* 2001; 15:485-500.

5

Pérdida selectiva de HLA-B44 en tumores colorrectales

INTRODUCCIÓN

Uno de los mecanismos que opera durante la selección de variantes tumorales generando fenotipos de escape, es la alteración de expresión de moléculas HLA de clase I. Los diferentes fenotipos HLA alterados son el resultado de defectos estructurales o de expresión como: alteraciones de regulación-transcripción (1); desregulación de genes de la maquinaria de procesamiento antigénico (TAPs y LMPs) (2, 3); mutaciones y/o pérdida de expresión del gen de β 2-microglobulina (4); pérdida de haplotipos HLA secundaria a la pérdida de heterocigosidad (LOH) (5); y pérdida selectiva de alelos HLA de clase I.

La pérdida selectiva de alelos HLA-I es uno de los mecanismos observados en líneas celulares de diferente origen que contribuye en la producción de fenotipos HLA alterados. Los mecanismos moleculares descritos responsables de tales pérdidas implican no solo fenómenos de roturas cromosómicas y recombinación somática (6) sino también mutaciones puntuales (7, 8). En tumores primarios sin embargo el fenómeno parece ser poco frecuente, ya que hasta la fecha únicamente se han descrito dos casos de pérdidas alelicas por mutaciones frameshift en carcinoma cervical (9). Sin embargo el empleo de técnicas inmunohistológicas en secciones de tejido revela la presencia de un número relativamente alto de pérdidas de alelos HLA; así por ejemplo se describe hasta un 9% en tumores de laringe (10) y un porcentaje similar en tumores de colon (11). A pesar de lo cual, los mecanismos moleculares responsables de las mismas siguen sin conocerse.

Por técnicas inmunohistológicas se detecta que el alelo que presenta una mayor frecuencia de pérdida tanto en tumores de colon como en tumores de diferente

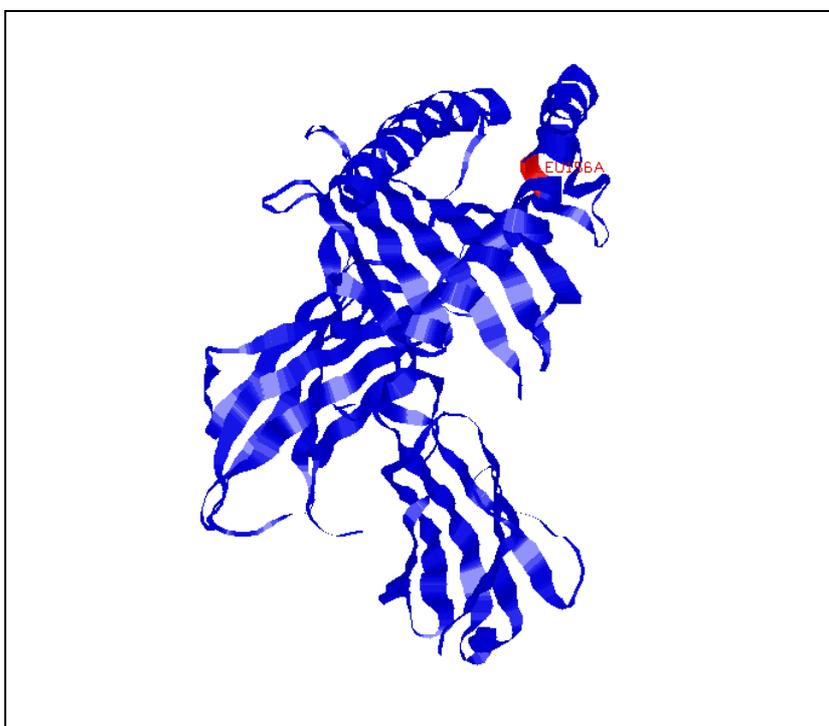
histología es HLA-B44 (11). Este hecho coincide con la elevada frecuencia de distribución que presenta el alelo HLA-B44 dentro de las poblaciones caucasoides, siendo la especificidad serológica más frecuente de alelos HLA de clase I (12). Actualmente se han descrito 34 alelos de HLA-B44, siendo HLA-B*4402 y HLA-B*4403 los predominantes. Estos dos subtipos difieren únicamente en el residuo 156: un Asp (aspártico) en HLA-B*4402 y una Leu (leucina) en HLA-B*4403 (13, 14). Este residuo se localiza en la región central de la hélice $\alpha 2$, extendiéndose hacia el sitio de unión con el péptido y los bordes de los bolsillos D y E (15, 16) (**Figura 1**). Esta única sustitución es capaz de inducir la formación de linfocitos T citotóxicos (CTLs) en trasplantes de médula ósea con donantes no emparentados que presentan la discordancia de alelos HLA-B*4402/HLA-B*4403, siendo responsable de la aparición de una reacción injerto contra huésped (GvHD) (17) o bien del rechazo (18). El alelo HLA-B*4402 es el más frecuente entre la población caucásica del norte de Europa (19), sin embargo la proporción HLA-B*4402/HLA-B*4403 está invertida en la población mediterránea (20, 21).

Estudios recientes denotan el importante papel que desempeña la proteína tapasina en el proceso de ensamblaje de las moléculas HLA de clase I en la membrana del retículo endoplasmático. En ratones mutantes deficientes en tapasina, tanto la expresión como la estabilidad de las moléculas HLA de clase I están fuertemente disminuidas (22). A pesar de conocer que la tapasina es un componente clave que facilita la presentación antigénica de las moléculas MHC de clase I, su función aún no está muy clara. Recientemente se ha descrito la diferente dependencia que parecen exhibir distintos alelos HLA-I por tapasina y por tanto su diferente expresión en superficie. Esta dependencia de tapasina viene determinada por la naturaleza del residuo localizado en la

posición 114 de la molécula HLA de clase I, siendo baja para residuos básicos o neutros. Específicamente, el alelo HLA-B*4402 presenta una elevada dependencia de tapasina y expresión en superficie debida precisamente al residuo ácido (ácido glutámico) presente en la posición 114 (23).

Para la caracterización molecular de la pérdida de HLA-B44 encontrada en tumores de colon (11) se pueden contemplar por tanto dos alternativas: bien la presencia de defectos estructurales o una alteración post-transcripcional. Aunque teniendo en cuenta la baja frecuencia de alteraciones estructurales descritas en tumores primarios hasta la fecha, probablemente sea más lógico pensar en un mecanismo post-transcripcional.

Figura 1



Cadena pesada HLA de clase I, que muestra el residuo 156 de la hélice $\alpha 2$ en color rojo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estudio poblacional

Para la determinación de la frecuencia de HLA-B44 en nuestra población, se estudiaron 105 muestras de sangre de donantes voluntarios pertenecientes al registro de la Fundación Carreras (FC) de nuestro hospital. Para el tipaje serológico de HLA-B se empleó la técnica habitual de microcitotoxicidad dependiente de complemento. El tipaje genómico se realizó con la utilización de las técnicas de SSO (sequence-specific oligonucleotide) (Dynal RELI® HLA-B kit) y SBT (sequencing based typing) (Applied Biosystems kit).

Tipaje HLA-B de tumores

Los linfocitos de sangre periférica (PBLs) aislados de los pacientes de cáncer de colon se tiparon por técnicas serológicas y genómicas mediante las técnicas citadas anteriormente.

Estudio inmunohistológico de la expresión de HLA-B44

Se estudiaron un total de 95 muestras de cáncer colorrectal, que fueron suministradas por el Departamento de Cirugía del Hospital Universitario Virgen de las Nieves.

Para determinar la pérdida de expresión de HLA-B44 se utilizaron los anticuerpos monoclonales (Abms) 116-5-28, y 66HA (24). El Abm 116-5-28 reconoce el epitopo Bw4, uno de los epitopos públicos HLA-B; y el Abm 66HA reconoce al antígeno HLA-B12 del que B44 y B45 son splits. Las muestras de tejido se consideran como HLA-B44 negativas cuando al menos el 75% de las células tumorales no se tiñen con ambos anticuerpos monoclonales.

Obtención de DNA de muestras microdisectadas y análisis de LOH en 6p21.3

En el proceso de extracción de DNA a partir de muestras microdisectadas se utilizó el kit de extracción de Quiagen (Quiamp Tissue kit, leusden, The Netherlands).

Para el estudio de LOH se emplearon 8 microsátélites (STR) que mapean la región HLA del cromosoma 6: D6S311, D6S291, D6S273, C12C, C125, D6S265, D6S105, y D6S276. En la **Tabla 1** se describen las secuencias de los primers utilizados para la amplificación. Las condiciones de la PCR, electroforesis y análisis de los resultados se han descrito con anterioridad (25). Se considera que hay pérdida de heterozigosidad (LOH), cuando la señal de un alelo se reduce más de un 25% en el tumor cuando se compara con la muestra control del estroma. Para considerar que existe una pérdida de haplotipo HLA se requiere como mínimo una LOH en tres STR. Posteriormente la pérdida de haplotipo se confirma por SSO.

Extracción de RNA total y síntesis de cDNA a partir de muestras microdisectadas

Se obtiene RNA total a partir de muestras microdisectadas con el empleo del kit de extracción Micro RNA de Stratagene (La Jolla, CA). En la síntesis del cDNA se utilizan 10 µl de RNA total, con la reverso-transcriptasa Sensiscript de Quiagen; 40 U/µl de RNasin (Promega, Madison, WI), y oligo-dT primers (Promega). La reacción se incuba 60 minutos a 42°C, y posteriormente se inactiva la enzima calentando a 95°C durante 5 minutos.

Amplificación del gen completo HLA-B a partir de cDNA

En la amplificación del gen HLA-B a partir de cDNA (1388pb) se emplearon un conjunto de primers locus específicos que abarcan la secuencia del gen completo

(**Figura 2**). La secuencia y localización de los diferentes primers utilizados para ello se describen en la **Tabla 2**.

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: 40 ciclos a 95°C/1 min, 64°C/1 min y 72°C/2 min, con una extensión final de 10 min en el último ciclo.

Secuenciación del gen HLA-B

Para secuenciar el cDNA de HLA-B44 se emplearon los mismos primers utilizados en la estrategia de amplificación. Las condiciones de la reacción de secuenciación se aplicaron a un volumen final de 20 µl, siendo las siguientes: 5-6 µl del producto de PCR amplificado, 5 µl de Big-Dye con AmplyTaq®DNA polimerasa (Applied Biosystems), 3.2 µl del correspondiente primer de secuenciación (1 µM). La PCR de secuenciación se llevo a cabo con las siguientes condiciones: 20 ciclos a 96°C durante 15 s, 55°C/ 10s, 60°C/ 4 min. Las muestras se analizaron en el secuenciador ABI PRISM 377 (Applied Biosystems).

Expresión de tapasina en tumores microdisectados

Como controles de amplificación se utilizaron: β₂m, TAP1 y TAP2. Los primers utilizados en el análisis de expresión de tapasina, β₂m, TAP1 y TAP2 fueron los siguientes:

TAPAS Fw 5'CAAAGTGTCCCTGATGCCAGC; TAPAS Bw 5'GGTGAATTCGACAGGCATAGCG;

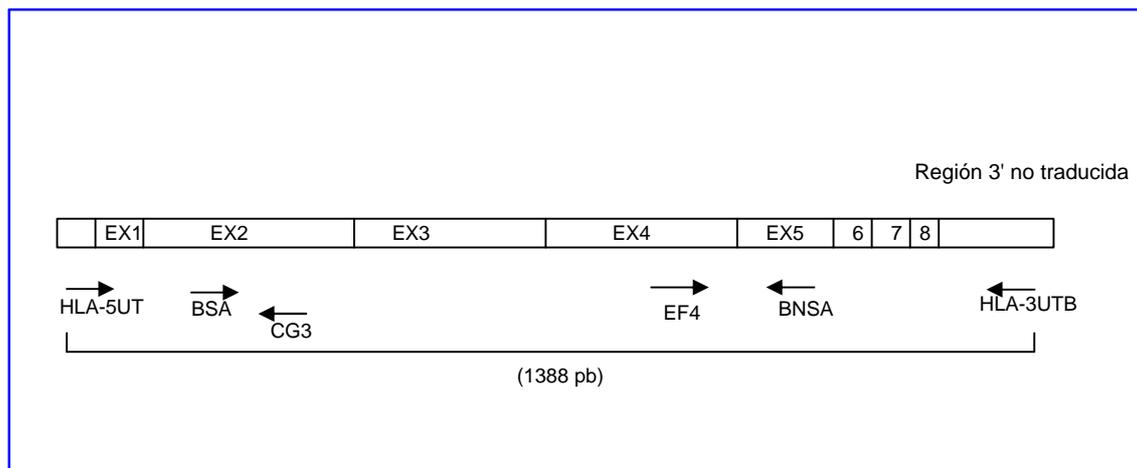
β₂m Fw 5' GGGCATTCTGAAGCTGACA; β₂m Bw 5' TGCGGCATCTTCAAACCTCC.

TAP1 Fw 5' TCTCCTCTCTGGGGAGATG; TAP1 Bw 5' GAGACATGATGTTACCTGTCTG ;

TAP2 Fw 5' CTCCTCGTTGCCGGCTTCT; TAP2 Bw 5' TCAGCTCCCCTGTCTTAGTC.

Las condiciones de la reacción de amplificación fueron: 1 min a 94°C, 30 s a 64°C y 1 min 72°C durante 40 ciclos, con 7 min de extensión final a 72°C.

Figura 2



Estrategia seguida para secuenciar el cDNA de HLA-B. Las flechas indican los primers utilizados y la dirección de secuenciación.

Tabla 1. Primers utilizados en la amplificación de STR en 6p21.3

STR	Secuencia 5'-3'	Secuencia 3'-5'
D6S311	ATGTCCTCATTGGTGTGTG	GATTCAGAGCCCAGGAAGAT
D6S291	CTCAGAGGATGCCATGTCTAAAATA	GGGGATGACGAATTATTCACAACT
D6S273	GCAACTTTTCTGTCAATCCA	ACCAAACCTCAAATTTTCGG
C12C	TAGAAAACGCAATCTCGGCC	CTGGATTAACCTGGAGACTC
C125	CAGTAGTAAGCCAGAAGCTATTAC	AAGTCAAGCATATCTGCCATTGG
D6S265	ACGTTCGTACCCATTAACCT	ATCGAGGTAAACAGCAGAAA
D6S105	GCCCTATAAAATCCTAATTAAC	GAAGGAGAATTGTAATTCCG
D6S276	TCAATCAAATCATATCCCCAGAAG	GGGTGCAACTTGTTCTCCT

Tabla 2. Secuencias de primers utilizados en la amplificación de HLA-B

Primers	Secuencia (5'-3')	Localización	Referencia
HLA-5UT	GGGCGTCGACGGACTCAGAATCTCCTCAGACGCCGAG	Región 5' no traducida	(26)
HLA-3UTB	CCGCAAGCTTCTGGGGAGGAAACACAGGTCAGCATGGGAAC	Región 3' no traducida	(26)
CG3	GCTCTGGTTGTAGTAGCCGC	Exon 2 (336-317)	(27)
EX4F	CTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGA	Exon 4 (809-830)	Este trabajo
BSA	GACAGCGACGCCGCGAGTCC	Exon 2 (180-200)	Este trabajo
BNSA	AGTAGCGACCACAGCTCCGA	Exon 5 (970-990)	Este trabajo

RESULTADOS

Tumores colorrectales que exhiben el fenotipo HLA-B44 negativo

El estudio de la pérdida selectiva de B44 se realizó por tinción inmunohistoquímica en secciones de tejido criopreservadas. Los diferentes subtipos de B44 pertenecen al grupo serológico B12, y por lo tanto pueden ser identificados como Bw4 positivos. Tanto los epítomos Bw4 como Bw6 se expresan de forma exclusiva por diferentes grupos de alelos HLA-B, siendo una dependencia conformacional (28).

13 de los 95 tumores analizados mostraron una tinción negativa para el epítomo Bw4 a diferencia de la mucosa normal. Para descartar que se tratara de una pérdida de haplotipo HLA (fenotipo II) en lugar de una pérdida selectiva de B44, se llevó a cabo el estudio de pérdida de heterocigosidad en este grupo de tumores. 4 de los 13 tumores analizados presentaron pérdida de haplotipo B44 (**Tabla 3**). Existiendo por tanto 9 tumores que pueden considerarse únicamente como pérdidas selectivas de B44, en los que nos hemos centrado para investigar el mecanismo de tal alteración.

Frecuencia de subtipos HLA-B44 perdidos

El tipaje de los 9 tumores de colon B44 negativos determinó tres subtipos diferentes: dos subtipos fueron HLA-B*4402 (22.2%), seis HLA-B*4403 (66.6%) y uno HLA-B*4405 (**Tabla 4**). Para determinar la posibilidad de que la pérdida de alguno de los subtipos fuera predominante se comparó con la frecuencia de los subtipos de B44 de nuestra población. Para este fin se analizaron 105 individuos no emparentados y 30 haplotipos B44 del registro FC de nuestro hospital. Los subtipos principales de esta población control fueron B*4402 y B*4403, representando el 37% y el 63% respectivamente. Estas frecuencias encontradas en nuestra población coinciden con las

frecuencias de HLA-B44 de la población española y mediterránea (21). Al comparar la frecuencia de subtipos perdidos de B44 con respecto a la población control no se encontraron diferencias (<0.5) (**Figura 3**).

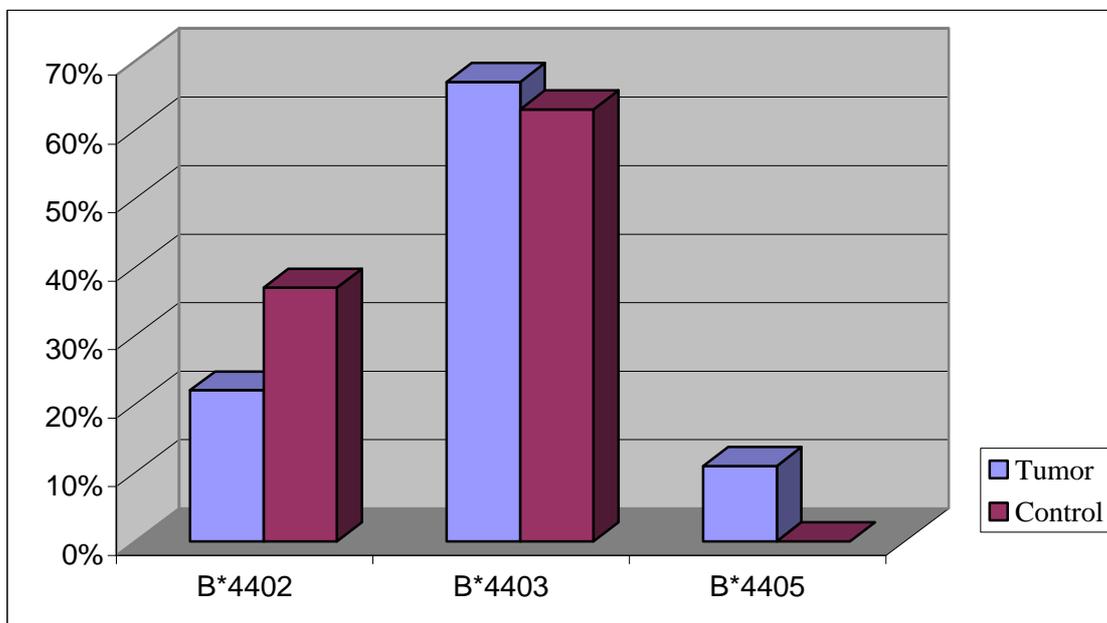
Tabla 3. Tumores con tinción inmunohistológica negativa de B44 que presentan pérdida de haplotipo HLA

Tumor	Tipaje HLA	STR								Haplotipo perdido (SSO)
		D6S311	D6S291	D6S273	C12C	C125	D6S265	D6S105	D6S276	
CO32	A29, -; B44, 62	N	L	H	L	L	H	H	L	ND
CO67	A2, 29; B44, 51	L	L	H	L	L	H	L	H	A29/B44
CO69	A24, -;B44, 35	L	L	L	L	L	H	H	L	A24/B44
CO101	A2, 29; B44, 7	L	L	L	L	L	L	H	L	A29/B44

Abreviaturas: N, normal; L, LOH; H, homocigoto; ND, no determinado.

Tabla 4. Tumores de colon con expresión negativa de HLA-B44

Tumor	Tinción con los Abms 116-5-28/66-HA	Tipaje HLA-B (SBT)
CO46	-	B*4402/51011
CO49	-	B*4403/1402
CO53	-	B*4403/0702
CO57	-	B*4403/4005
CO61	-	B*4403/3534
CO74	-	B*4403/4501
CO81	-	B*4402/40011
CO99	-	B*4403/4501
CO100	-	B*4405/4501

Figura 3

Frecuencia de los diferentes subtipos de HLA-B44 en los tumores de estudio y en la población control.

Alteraciones estructurales en el gen HLA-B

Para estudiar la presencia de mutaciones en HLA-B que expliquen la expresión negativa en superficie de los alelos HLA-B44, se empleó el cDNA obtenido a partir de las muestras microdisectadas. De esta forma detectaríamos la existencia de defectos transcripcionales por ausencia de mRNA de B44 y las posibles alteraciones estructurales al secuenciar el gen completo HLA-B.

La amplificación del cDNA de HLA-B se llevo a cabo con el empleo de un conjunto de primers que amplifican fragmentos de diferente tamaño (**Figura 2**) (**Tabla 2**). Todos los fragmentos amplificados fueron secuenciados y comparados con su correspondiente mucosa. El análisis de secuenciación no reveló ninguna alteración en los subtipos de HLA-B44, existiendo por tanto expresión de los alelos.

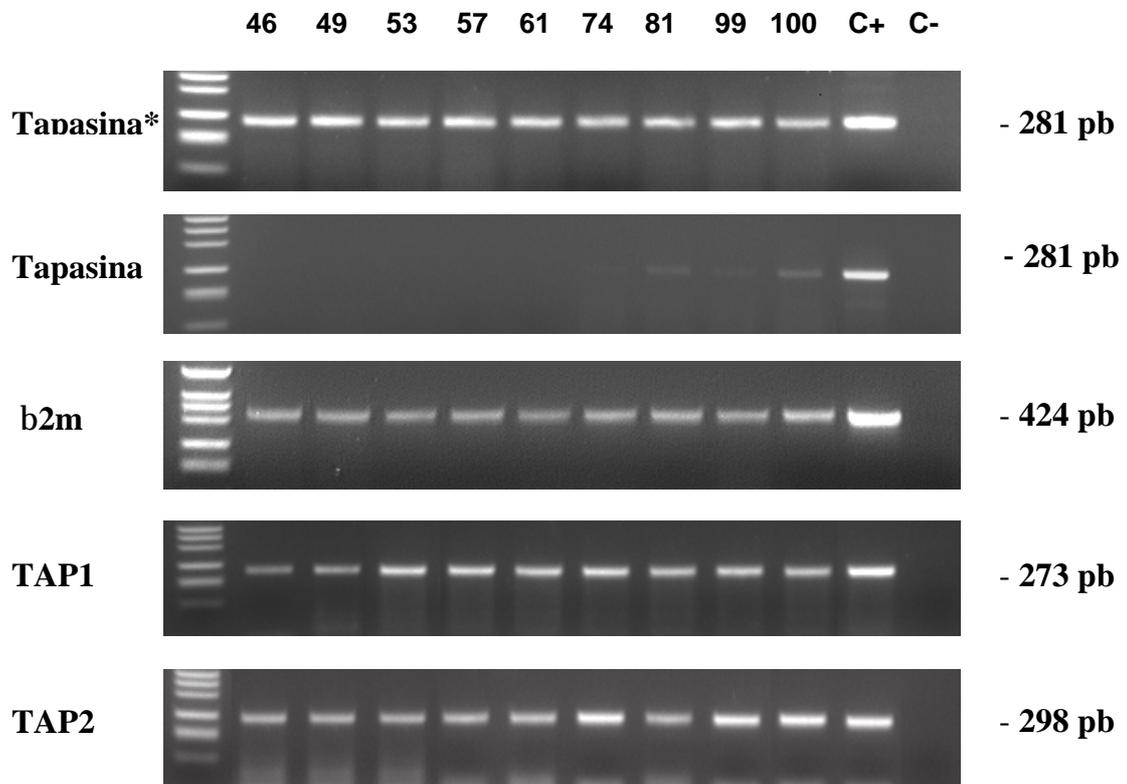
Defecto de expresión de tapasina como posible mecanismo post-transcripcional responsable de la expresión negativa de HLA-B44

La ausencia de mutaciones en HLA-B, nos puso en la necesidad de investigar como posible causa la existencia de una alteración post-transcripcional. En la cual la tapasina podría estar implicada, teniendo en cuenta la diferente dependencia de tapasina existente en diferentes alelos HLA de clase I, como HLA-B*4402 (29). Esta dependencia está relacionada con la naturaleza del residuo aminoacídico de la posición 114, siendo alta para los residuos ácidos (ácido aspártico y glutámico) (23).

Los residuos de aminoácidos en que difieren los tres subtipos de HLA-B44 perdidos se encuentran en la posición 156 (Asp en B*4402 y B*4405; Leu en B*4403) y en la posición 116 (Asp en B*4402 y B*4403; Tyr en B*4405). Sin embargo, todos ellos

presentan el residuo de ácido aspártico en la posición 114. Por esta razón nos planteamos la posibilidad de que los tres subtipos perdidos pudieran tener una alteración en la expresión de tapasina. Después de analizar la expresión de tapasina a nivel de mRNA en aquellos tumores de colon HLA-B44 negativos, encontramos un defecto de transcripción de la misma cuando se comparó con tumores control y con mucosas autólogas (**Figura 4**). Este hallazgo pondría de manifiesto que la ausencia de expresión en superficie de los alelos de B44 en los tumores de colon estudiados estaría producida por una alteración post-transcripcional como resultado de una expresión deficiente de tapasina.

Figura 4



RT-PCR de tapasina, β 2m, TAP1 y TAP2 en tumores de colon B44 negativos. C(+), control positivo de un caso de tumor colorrectal B44 positivo; C (-), control negativo. Tapasina*, expresión de tapasina en las correspondientes mucosas autólogas.

DISCUSIÓN

La alteración tanto de la función como de la expresión de varios de los componentes de la maquinaria de procesamiento y presentación antigénica, incluyendo los propios antígenos MHC-I, los transportadores de péptidos TAP y las subunidades del proteasoma LMP2 y LMP7 es un evento frecuente en tumores de diferente histología con alteración de la expresión de moléculas HLA de clase I (30-32). Muchos de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénica pueden ser inducidos por citoquinas, promoviendo por tanto la expresión en superficie de moléculas MHC-I y aumentando la susceptibilidad a la citotoxicidad mediada por los linfocitos T (CTLs) (30, 33). La pérdida selectiva de alelos HLA-I igualmente contribuye al defecto en el reconocimiento inmune del tumor. En el presente trabajo, se muestra cómo la ausencia de expresión de HLA-B44 en los tumores de colon está directamente relacionada con el defecto de expresión de tapasina, una chaperona componente del complejo de procesamiento y presentación antigénica. Este resultado implicaría por tanto que la desregulación de tapasina puede ser parte integral de los fenotipos inmunes de escape en las células tumorales de colon.

El ensamblaje de las moléculas HLA de clase I dentro del lumen del retículo endoplasmático (RE) es mediado por un conjunto de chaperonas (34). Una vez que la cadena nascente HLA-I se une al RE es estabilizada por la chaperona calnexina. Posteriormente la cadena de β 2m se asocia a la cadena pesada para formar los heterodímeros de clase I, en este momento la calnexina es intercambiada por la calreticulina. En este estado otras chaperonas se combinan para formar el complejo de carga de clase I, que consiste en el heterodímero de clase I, calreticulina, ERp57 y tapasina. La tapasina es una glicoproteína de 48 kDa que actúa de puente entre los

heterodímeros de clase I receptores de péptidos y las moléculas TAP (35, 36). Parece ser que esta interacción facilita la carga de péptidos antigénicos dentro de la gruta de unión de las moléculas HLA de clase I antes de su salida del RE y transporte hacia la superficie celular. Además de funcionar como puente de unión, la tapasina estabiliza el estado receptor de péptidos del complejo de clase I (37), influye en la expresión de TAP (37, 38), y aumenta la unión de péptidos al heterodímero TAP (39).

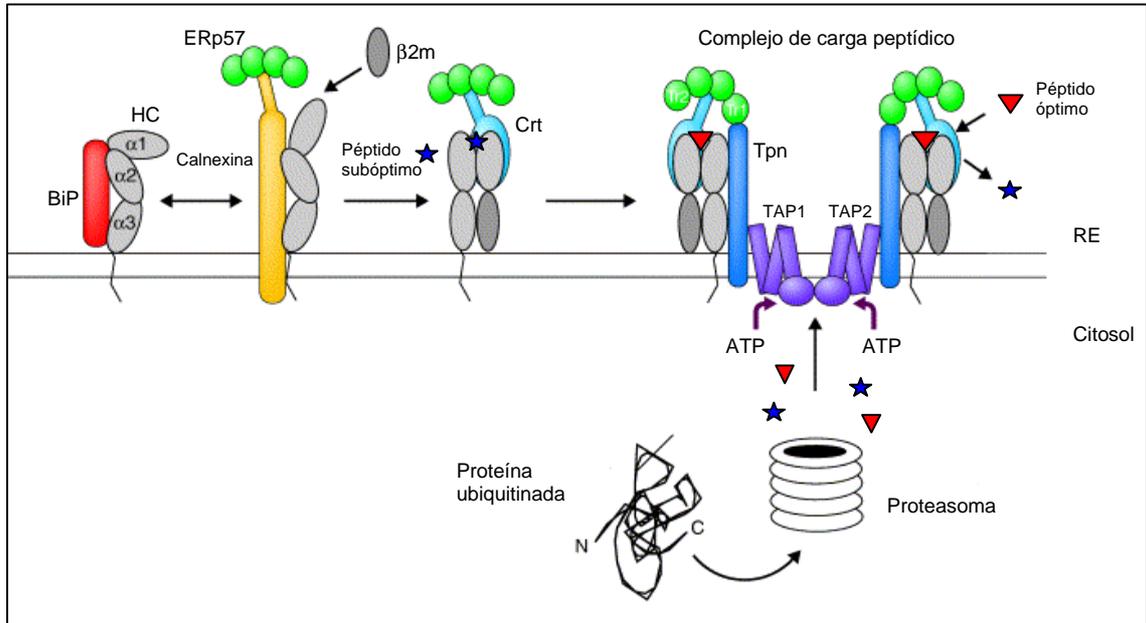
La tapasina es capaz de prevenir la liberación prematura de las moléculas de clase I del RE de mamíferos, lo que sugiere que puede también intervenir en la retención de moléculas HLA de clase I cargadas de forma subóptima (40). Según esto, se ha especulado con la posibilidad de que la tapasina intervenga en la selección y optimización de ligandos de las moléculas de clase I (**Figura 5**). Varias propiedades de la tapasina sugieren por tanto que presenta un papel editor de péptidos importante, entre las que se incluyen la capacidad de retener moléculas de clase I vacías o subóptimamente cargadas en el RE (40) y la observación de que las moléculas de clase I que se expresan en células deficientes en tapasina son termolábiles y se encuentran cargadas con ligandos subóptimos (41, 42). Además, estudios recientes demuestran que la tapasina interacciona con regiones de la cadena pesada de clase I que son sensibles a la presencia del péptido antigénico en la gruta de unión (43, 44), lo que sería un reflejo de la capacidad que tendría la tapasina para discriminar entre moléculas cargadas y moléculas vacías.

El supuesto papel editor de péptidos de la tapasina se apoya además en el hallazgo de la diferente dependencia de tapasina que muestran determinados alelos HLA de clase I tanto para su expresión en superficie como para la presentación antigénica a los LTCD8+. Así tendríamos, que el alelo B*2705 es independiente de tapasina, a diferencia

de B*4402 que tiene una elevada dependencia de tapasina (29). El alelo B*4402 se caracteriza por tener un residuo de ácido aspártico en la posición 114 que parece ser el responsable de su alta dependencia por tapasina, a diferencia de lo que ocurre con los residuos básicos en esta misma posición (23). Los tres subtipos de B44 que se pierden en los tumores de colon presentados en este trabajo, tienen el mismo residuo ácido en la posición 114, y todos ellos presentan además una alteración de la expresión de tapasina. La cadena lateral cargada negativamente del ácido aspártico o del glutámico en esta posición generaría impedimentos estéricos en la gruta de unión al péptido que podrían interferir con la unión fuerte de péptidos. Bajo la interacción con la tapasina, la gruta de unión pasaría a una forma abierta receptora de péptidos (23).

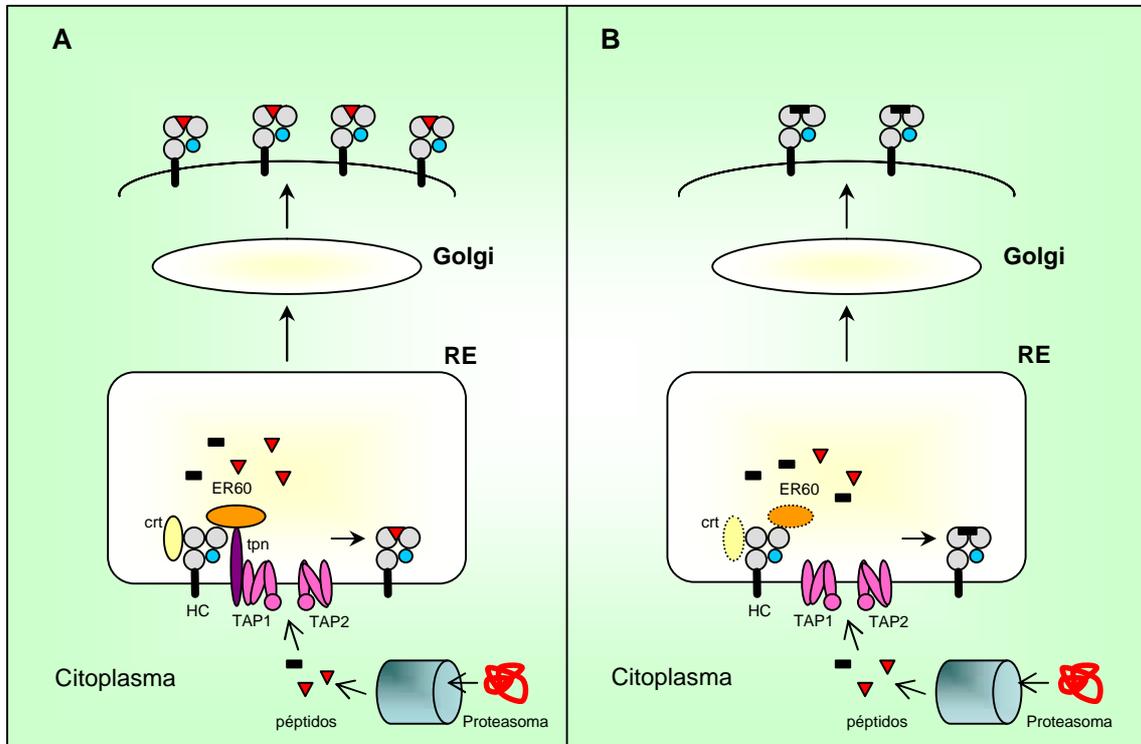
Los tres subtipos de B44 en virtud de su alta dependencia de tapasina, no se cargarían con péptidos óptimos siendo por tanto retenidos en la membrana del RE y no expresándose en la superficie celular. Sin embargo el patrón de tinción inmunohistológico en este grupo de tumores no mostró alteración para el resto de los alelos HLA de clase I. La desregulación de tapasina altera la expresión de moléculas MHC de clase I en superficie tanto en líneas como en tumores (45). Por tanto la detección inmunohistológica de expresión de los alelos de clase I a excepción de los tres subtipos de B44 (B*4402, B*4403 y B*4405) en este grupo de tumores, implicaría además que las moléculas de clase I gracias al papel editor de péptidos de la tapasina estarían cargadas con péptidos subóptimos (**Figura 6**).

Figura 5



Papel de la tapasina en la carga de péptidos dentro del complejo de carga peptídico. La cadena pesada de clase I recién sintetizada puede asociarse con la calnexina y/o con la proteína BiP. La asociación de β2m y unión de péptidos subóptimos produce un cambio conformacional dentro de la cadena pesada y el reemplazamiento de calnexina por calreticulina, dando lugar a la formación del complejo de carga peptídico. Dentro de este complejo, la tapasina se encarga de intercambiar péptidos subóptimos por péptidos óptimos. HC, cadena pesada de clase I; CRT, calreticulina; Tpn, tapasina.

Figura 6



Procesamiento y presentación antigénica en una célula de fenotipo salvaje (A) y en una célula con ausencia de tapasina (B). En ausencia de tapasina, se expresa en superficie un menor número de moléculas HLA de clase I, cargadas mayoritariamente con péptidos subóptimos (barras negras) a diferencia de las células sin alteración que se cargan con péptidos óptimos (triángulos rojos). Igualmente en células tapasina deficientes el complejo de carga peptídico no se forma correctamente lo que es reflejo de la ineficiente asociación de las moléculas de clase I con calreticulina y ER60 (indicado por línea punteada). HC, complejo de cadena pesada de clase I y $\beta 2m$; crt, calreticulina; ER60, oxidoreductasa tiol-dependiente; tpn, tapasina.

REFERENCIAS

1. Pawelec G, Zeuthen J, Kiessling R. Escape from host-antitumor immunity. *Crit Rev Oncol* 1997; 8:111-141.
2. Delp K, Momburg F, Hilmes C, Huber C, Seliger B. Functional deficiencies of the MHC class I antigen pathway in human tumors of epithelial origin. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25:88-95.
3. Ritz U, Momburg F, Pilch H, Huber C, Maeurer MJ, Seliger B. Deficient expression of components of MHC class I antigen processing machinery in human cervical carcinoma. *Int J Oncol* 2001; 19:1211-1220.
4. Benitez R, Godelaine D, López Nevot MA, Brasseur F, Jimenez P, Marchand M, Oliva MR, van Baren N, Cabrera T, Andry G, Landry C, Ruiz-Cabello F, Boon T, Garrido F. Mutations of the beta2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 1998; 52:520-529.
5. Jiménez P, Cantón J, Collado A, Cabrera T, Serrano A, Real LM, García A, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Chromosome loss is the most frequent mechanism contributing to HLA haplotype loss in human tumors. *Int J Cancer* 1999; 83:91-97.
6. Wang Z, Seliger B, Mike N, Momburg F, Knuth A, Ferrone S. Molecular analysis of the HLA-A2 antigen loss by melanoma SK-MEL-29.1.22 and SK-MEL-29.1.29. *Cancer Res* 1998; 58:2149-2157.
7. Seliger B, Ritz U, Abele R, Bock M, Tampe R, Sutter G, Drexler I, Huber C, Ferrone S. Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res* 2001; 61:8647-8650.
8. Jimenez P, Cabrera T, Mendez R, Esparza C, Cozar JM, Tallada M, Lopez-Nevot MA, Ruiz-Cabello F, Garrido F. A nucleotide insertion in exon 4 is responsible for the absence of expression of an HLA-A*0301 allele in a prostate carcinoma cell line. *Immunogenetics* 2001; 53:606-610.
9. Koopman LA, van der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. Human leukocyte antigen class I gene mutations in cervical cancer. *J Nat Cancer Inst* 1999; 91:1669-1677.
10. Maleno I, López-Nevot MA, Cabrera T, Salinero J, Garrido F. Multiple mechanisms generate HLA class I altered phenotypes in laryngeal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome 6p21 region. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51:389-396.
11. Cabrera T, Maleno I, Lopez-Nevot MA, Redondo M, Fernández MA, Garrido A, Garrido F. High frequency of HLA-B44 allelic losses in human solid tumors. *Hum Immunol* 2003 (in press).

12. Imanishi T, Akaza T, Kimura A, Tokunga K, Gojobori T. Allele and haplotype frequencies for HLA and complement loci in various ethnic groups. In: Tsuji K, Aizawa M, Sasazuko K, eds. HLA 1991. *New York: Oxford University Press* 1992:1065-1166.
13. Bodmer JG, Marsh SGE, Albert E, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Teraski PI. Nomenclature for factors for the HLA system. *Tissue Antigens* 1999; 53:407-446.
14. Fleischhauer K, Kernan NA, Dupont B, Yang SY. The two major subtypes of HLA-B44 differ for a single amino acid in codon 156. *Tissue Antigens* 1991; 31:133-137.
15. Bjorkman PJ, Saper MA, Samraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. The foreign antigen binding site and T cell recognition of class I histocompatibility antigens. *Nature* 1987; 329:512-518.
16. Saper MA, Bjorkman PJ, Wiley DC. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J Mol Biol* 1991; 219:277-319.
17. Keever CA, Leong N, Cunningham I, Copelan EA, Avalos BR, Klein J, Kapoor N, Adams PW, Orosz CG, Tutschka PJ. HLA-B44 directed cytotoxic T cell associated with acute graft-versus-host disease following unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994; 14:137-145.
18. Fleischhauer K, Kernan NA, O'Reilly RJ, Dupont B, Yang SY. Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44. *N Engl J Med* 1990; 323:1818-1822.
19. Petersdorf EW, Setoda T, Smith AG, Hansen JA. Analysis of HLA-B44 alleles encoded on extended HLA haplotypes by direct automated sequencing. *Tissue Antigens* 1994; 44:211-216.
20. Mattiuz PL, Di Paolo E, Fossombroni V, Menicucci A, Pradella F, Porfirio B, Rombola G. HLA-B44 subtypes and the chance of finding HLA compatible donor/recipient pairs for bone marrow transplantation: a haplotype study of 303 Italian families. *Tissue Antigens* 1997; 50:602-609.
21. Santos S, Vicario JL, Merino JL, Balas A. HLA-B44 subtyping in a Spanish population: further evidence of Caucasian population diversity. *Tissue Antigens* 1997; 49:124-128.
22. Grandea AG 3rd, Golovina TN, Hamilton SE, Siriram V, Spies T, Brutkiewicz RR, Harty JT, Eisenlohr LC, Van Kaer L. Impaired assembly yet normal trafficking of MHC class I molecules in tapasin mutant mice. *Immunity* 2000; 13:213-222.
23. Park B, Lee S, Kim E, Ahn K. A single polymorphic residue within the peptide-binding cleft of MHC class I molecules determines spectrum of tapasin dependence. *J Immunol* 2003; 170:961-968.

24. Cabrera T, Collado A, Fernández MA, Ferrón A, Sancho J, Ruiz-Cabello F, Garrido F. High frequency of altered HLA class I phenotypes in invasive colorectal carcinomas. *Tissue Antigens* 1998; 52:114-123.
25. Ramal LM, Feenstra M, van der Zwan AW, Collado A, Lopez-Nevot MA, Tilanus M, Garrido F. Criteria to define HLA haplotype loss in human solid tumors. *Tissue Antigens* 2000; 55:443-448.
26. Domena JD, Little AM, Madrigal AJ, Hildebrand WH, Johnston-Dow L, Du Toit E, Bias WB, Parham P. Structural Heterogeneity in HLA-B70, a high frequency antigen of black populations. *Tissue antigens* 1993; 42:509-517.
27. Curran MD, Williams F, Earle JAP, Rima BK, Van Dam MG, Bunce M, Middleton D. Long-range PCR amplification as an alternative strategy for characterizing novel HLA-B alleles. *E J Immunogenetics* 1996; 23:297-309.
28. Lutz CT, Smith KD, Greazel NS, Mace BE, Jensen DA, McCutcheon JA, Goeken NE. Bw4-reactive and Bw6-reactive antibodies recognize multiple distinct HLA structures that partially overlap in the alpha-1 helix. *J Immunol* 1994; 153:4099-4110.
29. Purcell AW, Gorman JJ, Garcia-Peydró M, Paradela A, Burrows SR, Talbo GH, Laham N, Peh CA, Reynolds EC, López de Castro JA, McCluskey J. Quantitative and qualitative influences of tapasin on the class I peptide repertoire. *J Immunol* 2001; 166:1016-1027.
30. Ruiz-Cabello F, Garrido F. HLA and cancer: from research to clinical impact. *Immunol Today* 1998; 19: 539-542.
31. Restifo NP, Esquivel F, Kawakami Y, Yewdell JW, Mule JJ, Rosenberg SA, Bennink JR. Identification of human cancers deficient in antigen processing. *J Exp Med* 1993; 177:265-272.
32. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-processing breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 2000; 21:455-464.
33. Seliger B, Hammers S, Hohne A, Zeidler R, Knuth A, Gerharz CD, Huber C. IFN γ -mediated coordinated transcriptional regulation of the human TAP-1 and LMP-2 genes in human renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 1997; 3:573-578.
34. Cresswell P, Bangia N, Dick T, Diedrich G. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol Rev* 1999; 172:21-28.
35. Sadasivan B, Lehener PJ, Ortmann B, Spies T, Cresswell P. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 1996; 5:103-114.
36. Solheim JC, Harris MR, Kindle CS, Hansen TH. Prominence of β 2-microglobulin, class I heavy chain conformation and tapasin in the interactions of class I heavy

- chain with calreticulin and the transporter associated with antigen processing. *J Immunol* 1997; 158:2236-2241.
37. Lehner PJ, Surman MJ, Cresswell P. Soluble tapasin restores MHC class I expression and function in the tapasin-negative cell line 220. *Immunity* 1998; 8:221-231.
 38. Bangia N, Lehner PJ, Hughes EA, Surman M, Cresswell P. The N-terminal region of tapasin is required to stabilize the MHC class I loading complex. *Eur J Immunol* 1999; 29:1858-1870.
 39. Li S, Paulsson KM, Chen S, Sjogren HO, Wang P. Tapasin is required for efficient peptide binding to transporter associated with antigen processing. *J Biol Chem* 2000; 275:1581-1586.
 40. Barnden MJ, Purcell AW, Gorman JJ, McCluskey J. Tapasin-mediated retention and optimization of peptide ligands during the assembly of class I molecules. *J Immunol* 2000; 165:322-330.
 41. Purcell AW, Kelly AJ, Peh CA, Dudek NL, McCluskey J. Endogenous and exogenous factors contributing to the surface expression of HLA B27 on mutant antigen presenting cells. *Hum Immunol* 2000; 61:120-130.
 42. Peh CA, Burrows SR, Barnden M, Khanna R, Cresswell P, Moss DJ, McCluskey J. HLA-B27-restricted antigen presentation in the absence of tapasin reveals polymorphism in mechanisms of HLA class I. *Immunity* 1998; 8:531-542.
 43. Yu YY, Myers NB, Hilbert CM, Harris MR, Balendiran GK, Hansen TH. Definition and transfer of a serological epitope for peptide-empty forms of MHC class I. *Int Immunol* 1999; 11:1897-1906.
 44. Yu YY, Turnquist HR, Myers NB, Balendiran GK, Hansen TH, Solheim JC. An extensive region of an MHC class I $\alpha 2$ domain loop influences interaction with the assembly complex. *J Immunol* 1999; 163:4427-4433.
 45. Seliger B, Schreiber K, Delp K, Meissner M, Hammers S, Reichert T, Pawlischko K, Tampe R, Huber CH. Downregulation of the constitutive tapasin expression in human tumors cells of distinct origin and its transcriptional upregulation by cytokines. *Tissue Antigens* 2000; 57:39-45.

6

Discusión general

INTRODUCCIÓN

Los mecanismos que operan en la generación de los fenotipos de alteración HLA son diversos, y pueden encontrarse a diferentes niveles de la ruta biosintética de las moléculas HLA de clase I (**Tabla 1**). Aunque mayoritariamente son alteraciones determinadas en líneas celulares, conocemos poco en cambio, referente tanto al mecanismo como a la frecuencia del mismo en los tumores primarios. Si la pérdida de expresión de moléculas HLA representa un mecanismo de inmunoevasión, el conocimiento de tales alteraciones supone un objetivo importante para poder abordar de forma coherente el empleo de la inmunoterapia en estos pacientes.

La base de la generación de variantes tumorales inmunorresistentes hay que buscarla en la inestabilidad genética inherente al proceso de transformación, siendo el propio sistema inmune un factor de selección. Se destruyen las variantes inmunógenas escapando las poco inmunogénicas. Igualmente para poder aplicar terapias que traten de romper la tolerancia inmune frente a los tumores, es imprescindible conocer las alteraciones HLA que subyacen en esos tumores. Siendo éste el objetivo que se pretende con esta tesis.

Pérdida total de expresión de moléculas HLA de clase I en tumores MIN⁺ y MIN⁻

La presencia o ausencia de inestabilidad de microsatélites en los tumores de colon presentados en este estudio que exhiben el fenotipo I delimita dos vías tumorogénicas, en las cuales se ven implicados diferentes genes diana responsables de la expresión alterada de moléculas HLA-I y por tanto del deficiente reconocimiento de las mismas por parte del sistema inmune (**Tabla 2**).

La alteración de los genes reparadores de los apareamientos erróneos de bases durante los procesos replicativos del DNA son los responsables de aumentar la tasa de mutación en regiones susceptibles del genoma. Como son las regiones de repeticiones de bases de genes como: TGF β RII, BAX, hMSH3, etc (Introducción), tanto en los tumores inestables HNPCC como en los esporádicos. Uno de los genes diana con repeticiones de bases en su secuencia que igualmente se ve afectado en los tumores MSI es el de β 2m, concretamente se ha descrito hasta un 40% aunque con una baja frecuencia de inactivación bialelica (18). En este trabajo Perucho (18) ya apunta que considerando esa tasa de alteración, el gen de β 2m debería ser considerado como gen supresor de tumores diana de la vía mutadora. En nuestro estudio, describimos que aquellos tumores con fenotipo I e inestabilidad de microsatélites presentan inactivación bialelica de β 2m. Considerando estos resultados, podemos decir que β 2m es un gen diana susceptible de inactivación en tumores de colon MSI siendo además responsable del defecto de expresión de moléculas HLA de clase I observado, y que por tanto va a condicionar de forma directa el reconocimiento de las células tumorales por parte del sistema inmune y de forma indirecta la progresión tumoral.

En el grupo de tumores con ausencia de inestabilidad de microsatélites y que pertenecen al grupo MSS o CIN, es el defecto transcripcional de genes que intervienen en la ruta biosintética de las moléculas HLA de clase I el que se encuentra implicado.

En todos los estudios realizados hasta el momento, referentes a la expresión tisular de los genes TAP1/TAP2 y LMP2/LMP7 realizados por técnicas inmunohistológicas, no se ha establecido la asociación existente con las alteraciones fenotípicas de moléculas HLA de clase I (19, 20). En nuestro trabajo, hemos abordado el estudio de los fenotipos HLA

alterados en el caso concreto del fenotipo I considerando para ello la expresión a nivel de mRNA de tejido microdisectado. Encontrando que existe una asociación directa entre la ausencia de expresión en superficie de moléculas HLA de clase I (determinada por técnicas inmunohistológicas) y la ausencia de expresión del gen LMP7 determinada a nivel de mRNA. Y que por tanto el defecto en el gen LMP7 presente en el inmunoproteasoma tanto del citoplasma como del núcleo celular (asociación existente entre el defecto transcripcional de LMP7 y la alteración del patrón nuclear de los cuerpos de PML) igualmente contribuye a la ausencia de péptidos antigénicos presentados por las moléculas HLA de clase I.

Pérdida selectiva de HLA-B44 en tumores de colon

Las técnicas inmunohistológicas presentan ciertas limitaciones, como lo demuestra la incapacidad de detectar la mayoría de las pérdidas de haplotipo HLA debidas a pérdida de heterocigosidad o LOH (10). En nuestro caso, cuatro de 13 casos clasificados como fenotipo IV por inmunohistología resultaron ser pérdidas de haplotipo B44 cuando se les realizó el estudio de microsatélites en 6p21. Por otra parte no es un hecho raro, ya que la pérdida de haplotipo HLA debida a LOH es un fenómeno frecuente en tumores de diferente histología (10-13), con un 42% encontrado en los tumores de colon estudiados en este trabajo (resultados que no han sido presentados en esta tesis).

El alelo HLA-B44 además de ser el más frecuente entre la población caucásica es el que se pierde de forma mayoritaria en los tumores de colon. En los que hemos podido detectar presencia de transcrito citoplasmático con ausencia de alteraciones estructurales. Revelándose la elevada dependencia de tapasina que presentan los subtipos de B44 perdidos (B*4402, B*4403, B*4405), clave para entender la pérdida selectiva. La cual se

caracteriza por un defecto post-transcripcional como resultado de la expresión alterada de la chaperona tapasina.

Las moléculas HLA de clase I como genes de susceptibilidad implicados en la progresión tumoral de colon

Si consideramos el número total de casos de colon que presentan algún tipo de alteración en las moléculas HLA de clase I (14 casos con fenotipo I, 9 casos con pérdida selectiva de B44, y los casos que presentan LOH en 6p21 que no han sido recogidos en este trabajo), resulta un porcentaje elevado. Bien sea por defecto de los genes que intervienen en la vía biosintética de moléculas HLA de clase I ($\beta 2m$ en tumores W6/32⁻/MSI-positivos; LMP7/TAP2 en tumores W6/32⁻/MSI-negativos; tapasina en tumores B44 negativos) o de las propias moléculas HLA de clase I por pérdida de heterocigosidad (resultados no presentados en este trabajo). Implicando al sistema HLA de clase I constituido por diferentes genes, como diana del proceso tumoral en colon tanto de los tumores MSI como en los CIN al obstaculizar el reconocimiento tumoral llevado a cabo por el sistema inmune.

Tabla 1. Alteración de la expresión de moléculas HLA-I y mecanismos responsables

Tipo de defecto	Mecanismo	Tumor (línea celular) estudiado	Referencia
1. Pérdida total de moléculas HLA-I	Mutaciones y/o LOH de β 2m	Líneas de melanoma, colon, mama, pulmón	1, 2, 3
		Tumores primarios de melanoma y colon	4, 2
	Alteración de la expresión de β 2m	Tumores primarios de mama	5
	Defectos en los genes TAP1/TAP2, LMP2/LMP7	Líneas celulares de diferente histología; carcinoma de pulmón de células pequeñas, cáncer de cérvix, próstata, melanoma, colon, mama, carcinoma hepatocelular, renal, y linfoma de Burkitt	6, 7
2. Defecto de expresión de locus HLA-B	Transcripcional	Líneas de melanoma, colon y tumores gástricos	8, 9
3. Pérdida de haplotipo HLA	Pérdida de heterocigosidad (LOH) en 6p21	Tumores primarios y líneas de diferente origen	10-13
4. Pérdida selectiva de alelos HLA-A o HLA-B	Roturas cromosómicas y recombinación somática	Líneas de melanoma	14
	Mutaciones en los genes HLA de clase I	Líneas celulares y tumores primarios de cérvix	15, 16, 17

Tabla 2. Alteraciones HLA-I en los tumores de colon presentados en este trabajo

1. Fenotipo I	MSI positivos - Inactivación bialélica de $\beta 2m$ (4casos)
	MSI negativos - Alteración del componente del proteasoma LMP7 inducible por $IFN\gamma$ (9casos); con alteración del patrón de péptidos citoplasmáticos y nucleares (alteración del patrón nuclear de los cuerpos de PML). - En un único caso no se ha podido determinar el mecanismo responsable (CO5).
2. Expresión negativa en superficie de B44	- Tumores con pérdida de haplotipo B44 (4 casos). -Tumores con defecto de expresión de la chaperona tapasina, componente del complejo de carga peptídico de clase I (9 casos).

Implicaciones en la inmunoterapia del cáncer de colon

El cáncer de colon es el segundo en cuanto a número de casos diagnosticados de cáncer en los países occidentales (**Figura 1**) (21). La mayoría de las muertes relacionadas con el mismo son causadas por las metástasis. El pronóstico de los pacientes con cáncer de colon está estrechamente relacionado con el estadio del tumor en el momento del diagnóstico (**Tabla 3**). Aquellos tumores que no presentan metástasis en los ganglios linfáticos en el momento del diagnóstico tienen una tasa de supervivencia a los 5 años de aproximadamente el 80%, a diferencia de los que tienen metástasis en los ganglios regionales con un 50% de supervivencia. Disminuyendo a menos del 5% para aquellos pacientes con metástasis en órganos distantes en el momento del diagnóstico.

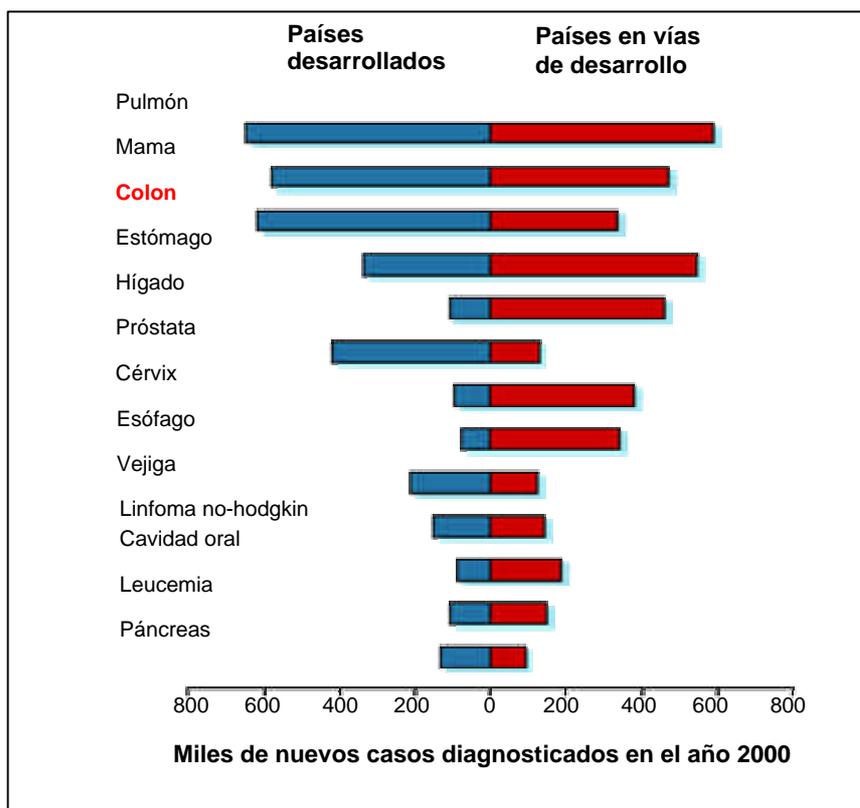
La quimioterapia-adyuvante es el tratamiento de elección para los tumores de colon que se encuentran en estadio III, y consiste en la administración mensual de bolos de 5-

fluorouracilo y leucovorina durante 5 días consecutivos de un mes, repitiéndose el proceso durante un periodo de 6 meses. En cambio la quimioterapia adyuvante para tumores en estadio II no se realiza, a excepción de determinados pacientes con riesgo alto. En aquellos pacientes con la enfermedad en estado muy avanzado y con tasas de supervivencia muy bajas se están intentando desarrollar nuevas estrategias en combinación con la quimioterapia. Estrategias basadas en el desarrollo de respuestas de linfocitos T citotóxicos (CTLs) frente a antígenos asociados a tumor (TAA) conocidos bien mediante técnicas de inmunoterapia activa o adoptiva (**Introducción**). En ambos casos la caracterización de los mecanismos implicados en el reconocimiento de las células tumorales y la lisis llevada a cabo por los CTLs así como de los procesos responsables de la inmunoevasión tumoral son esenciales para poder desarrollar cualquier estrategia de inmunoterapia.

A pesar que pueden detectarse CTLs precursores frente a TAA en pacientes con cáncer de colon en sangre periférica y en el infiltrado inflamatorio peri-tumoral, su frecuencia es extremadamente baja, y probablemente tengan un escaso o nulo efecto anti-tumoral. Esta incapacidad de desarrollar una respuesta inmune frente a determinados antígenos tumorales es un reflejo de la tolerancia existente frente al tumor y que constituye por tanto una forma de inmunoevasión. La existencia de tolerancia frente a antígenos asociados a tumor que en condiciones fisiológicas no se expresan en células normales se puso de manifiesto en estudios de ratones transgénicos que expresan la proteína humana MUC1 (22, 23). Son ratones incapaces de responder a MUC1, incluso cuando son inmunizados con células tumorales irradiadas portadoras de MUC1 (23). Sin embargo, cuando se inmunizan con células híbridas de células dendríticas y células tumorales-MUC1 se induce una potente respuesta inmune frente a MUC1 que resulta en el rechazo

de las metástasis establecidas (22). Se trata de estudios esperanzadores que muestran como la inmunoterapia basada en el uso de DCs para generar una respuesta de CTLs es capaz de contrarrestar la falta de respuesta inmunológica frente a antígenos tumorales, y por otro lado aumentar el número y la actividad de CTLs específicos en la esperanza de superar la tolerancia inmunológica pre-existente.

La importancia de conocer los mecanismos moleculares responsables de generar un patrón alterado de expresión de moléculas HLA de clase I y por supuesto una respuesta deficiente por parte del sistema inmune, radica en la aplicabilidad que estos estudios puedan tener en un futuro en el abordaje de diferentes estrategias de inmunoterapia en pacientes de cáncer de colon con la enfermedad en estados avanzados. Todos los planteamientos realizados hasta la fecha en este sentido (inmunoterapia activa o adoptiva) caen en el error de no considerar que muchos de los tumores de colon presentan defectos de expresión en moléculas HLA de clase I, lo cual es un obstáculo para que estos ensayos se lleven a cabo de forma satisfactoria en estos pacientes. Por esta razón, es imprescindible conocer en una primera aproximación la presencia de alteraciones en el sistema HLA de clase I antes de plantear la estrategia de inmunoterapia adecuada.

Figura 1

Incidencia global del cáncer en los países desarrollados y en vías de desarrollo (21).

Tabla 3. Estadios y pronóstico en el cáncer de colon

Estadio			Descripción patológica	Tasa de supervivencia a los 5 años (%)
Dukes	TNM	Numérico		
A	T1N0M0	I	Cáncer limitado a la mucosa y submucosa	>90
B ₁	T ₂ N ₀ M ₀	II	Cáncer extendido en la muscular	85
B ₂	T ₃ N ₀ M ₀	II	Cáncer extendido en la serosa	70-80
C	T _x N ₁ M ₀	III	Invasión de los ganglios linfáticos regionales	35-65
D	T _x N _x M ₁	IV	Metástasis distantes (hígado, pulmón, etc)	5

REFERENCIAS

1. Perez B, Benitez R, Fernandez MA, Oliva MR, Soto JL, Serrano S, Lopez-Nevot MA, Garrido F. A new beta 2-microglobulin mutation found in a melanoma tumor cell line. *Tissue Antigens* 1999; 53:569-572.
2. Bicknell DC, Rowan A, Bodmer WF. Beta 2-microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:4751-4756.
3. Chen HL, Gabrilovich D, Virmani A, Ratnani I, Girgis KR, Nadaf-Rahrov S, Fernandez-Vina M, Carbone DP. Structural and functional analysis of beta-2microglobulin abnormalities in human lung and breast cancer. *Int J Cancer* 1996; 76:756-763.
4. Benitez R, Godelaine D, Lopez Nevot MA, Brasseur F, Jimenez P, Marchand M, Oliva MR, van Baren N, Cabrera T, Andry G, Landry C, Ruiz-Cabello F, Boon T, Garrido F. Mutations of the beta 2-microglobulin gene result in a lack of HLA class I molecules on melanoma cells of two patients immunized with MAGE peptides. *Tissue Antigens* 1998; 52:520-529.
5. Palmisano GL, Pistillo MP, Capanni P, Pera C, Nicolo G, Salvi S, Perdelli L, Pasciucco G, Ferrara GB. Investigation of HLA class I downregulation in breast cancer by RT-PCR. *Human Immunol* 2001; 62:133-139.
6. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. TAP off-tumors on. *Immunol Today* 1997; 18:292-299.
7. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 2000; 21:455-464.
8. Soong TW, Hui KM. Locus-specific transcriptional control of HLA genes. *J Immunol* 1992; 149:2008-2020.
9. Abril E, Mendez RE, Garcia A, Serrano A, Cabrera T, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Characterization of a gastric cell line defective in MHC class I inducibility by both alpha- and gamma-interferon. *Tissue Antigens* 1996; 47:391-398.
10. Maleno I, Lopez-Nevot MA, Cabrera T, Salinero J, Garrido F. Multiple mechanisms generate HLA class I altered phenotypes in laryngeal carcinomas: high frequency of HLA haplotypes loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Cancer Immunol Immunother* 2002; 51:389-396.
11. Fenestra M, Verdaasdonk M, van der Zwan AM, de Weger R, Slootweg P, Tilanus M. Microsatellite analysis of microdissected tumor cells and 6p high density microsatellite analysis in head and neck squamous cell carcinomas with down-regulated human leukocyte antigen class I expression. *Lab Invest* 2000; 80:405-414.

12. Metzelaar-Blok JA, Jager MJ, Moghaddam PH, van der Slik AR, Giphart MJ. Frequent loss of heterozygosity on chromosome 6p in uveal melanoma. *Human Immunol* 1999; 60:962-969.
13. Virmani AK, Fong KM, Kodagoda D, McIntire D, Hung J, Tonk V, Minna JD, Gazdar AF. Allelotyping demonstrates common and distinct patterns of chromosomal loss in human lung cancer types. *Genes Chromosomes Cancer* 1998; 21:308-319.
14. Wang Z, Seliger B, Mike N, Momburg F, Knuth A, Ferrone S. Molecular analysis of the HLA-A2 antigen loss by melanoma SK-MEL-29.1.22 and SK-MEL-29.1.29. *Cancer Res* 1998; 58:2149-2157.
15. Seliger B, Ritz U, Abele R, Bock M, Tampe R, Sutter G, Drexler I, Huber C, Ferrone S. Immune escape of melanoma: first evidence of structural alterations in two distinct components of the MHC class I antigen processing pathway. *Cancer Res* 2001; 61:8647-8650.
16. Jimenez P, Cabrera T, Mendez R, Esparza C, Cozar JM, Tallada M, Lopez-Nevot MA, Ruiz-Cabello F, Garrido F. A nucleotide insertion in exon 4 is responsible for the absence of expression of an HLA-A*0301 allele in a prostate carcinoma cell line. *Immunogenetics* 2001; 53:606-610.
17. Koopman LA, van der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ. Human leukocyte antigen class I gene mutations in cervical cancer. *J Nat Cancer Inst* 1999; 91:1669-1677.
18. Yamamoto H, Yamashita K, Perucho M. Somatic mutation of the beta2-microglobulin gene associates with unfavorable prognosis in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Gastroenterology* 2001; 120:1565-1567.
19. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. TAP off-tumors on. *Immunol Today* 1997; 18:292-299.
20. Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today* 2000; 21:455-464.
21. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer* 2001; 37:S4-66.
22. Gong J, Chen D, Kashiwaba M, Li Y, Chen L, Takeuchi H, Qu H, Rowse GL, Grendler SJ, Kufe D. Reversal of tolerance to human MUC1 antigen in MUC1 transgenic mice immunized with fusions of dendritic and carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:6279-6283.
23. Rowse GJ, Tempero RM, Vanlith ML, Hollingsworth MA, Gendler SJ. Tolerance and immunity to MUC1 in a human MUC1 transgenic murine model. *Cancer Res* 1998; 58:315-321.

7

Conclusiones

1. En los tumores de colon con pérdida total de expresión de moléculas HLA de clase I, se encuentran dos mecanismos principales implicados:

a) La pérdida de la función génica de $\beta 2m$ como resultado de una inactivación bialelica (mutaciones y/o posible LOH) en los tumores de colon que presentan inestabilidad de microsatélites (MSI).

b) El defecto transcripcional de genes implicados en el procesamiento y presentación antigénica LMP7 y TAP2 en el grupo de tumores con ausencia de inestabilidad de microsatélites (MSS); estando además asociado el defecto de LMP7 a una alteración del patrón nuclear de los cuerpos de PML afectándose de este modo tanto el repertorio de péptidos antigénicos generados en el citoplasma como en el núcleo celular.

2. El alelo HLA-B44 es el que presenta una mayor frecuencia de pérdida en los tumores de colon, por mecanismos que implican bien la pérdida de haplotipo en un pequeño número (4 de 13 casos) y en la mayoría de los casos (9 de 13) por un defecto post-transcripcional que estaría relacionado con el defecto de expresión de la proteína tapasina, componente del complejo de carga peptídico de clase I.

8

Apéndice

Publicaciones relacionadas con esta tesis doctoral

Cabrera CM, Jiménez P, Cabrera T, Esparza C, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: β_2 -microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens* 2003; 61: 211-219.

Esparza C, Jiménez P, Méndez R, Clavero A, **Cabrera C**, Ruiz-Cabello F. El patrón de inestabilidad de microsatélites (MIN) revela un patrón específico de mutaciones durante la carcinogénesis de colon. *Rev Diagn Biol* 2002; 52: 145-149.

Jiménez P, Cabrera T, Méndez R, **Cabrera C**, Ruiz-Cabello F, Garrido F. The use of mAbs against HLA class I heavy chain and β_2m /heavy chain complex reveals β_2m gene inactivation in microdissected colorectal cancer tumor tissues. *HLA 2002, Immunobiology of the Human MHC* (in press).

Cabrera CM, Jiménez P, Concha A, Garrido F, Ruiz-Cabello F. PML bodies are disorganized in colorectal tumors with total loss of MHC class I expression and LMP7 downregulation. Submitted for publication.

