



Universidad de Granada

Programa Oficial de Posgrado en Inmunología

**CÁNCER COLORRECTAL E INESTABILIDAD
GENÓMICA: ASOCIACIÓN CON LA PÉRDIDA
DE HLA Y CON EL PATRÓN DE
INFILTRACIÓN INFLAMATORIA TUMORAL**

MÓNICA BERNAL SÁNCHEZ

GRANADA, 2013

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Mónica Bernal Sánchez
D.L.: GR 191-2014
ISBN: 978-84-9028-711-8

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular III e Inmunología.



Universidad de Granada

Programa Oficial de Posgrado en Inmunología (P42.56.1)

Norma Reguladora RD 56/2005

**CÁNCER COLORRECTAL E INESTABILIDAD
GENÓMICA: ASOCIACIÓN CON LA PÉRDIDA DE
HLA Y CON EL PATRÓN DE INFILTRACIÓN
INFLAMATORIA TUMORAL**

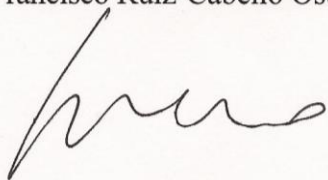
MÓNICA BERNAL SÁNCHEZ

GRANADA, 2013

La doctoranda Mónica Bernal Sánchez y los directores de la tesis Francisco Ruíz-Cabello Osuna, Federico Garrido Torres-Puchol y Ángel Concha López, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, a 25 de Abril de 2013


Fdo.: Director de la Tesis
Francisco Ruíz-Cabello Osuna



Fdo.: Director de la Tesis
Federico Garrido Torres-Puchol



Fdo.: Director de la Tesis
Ángel Concha López



Fdo.: Doctoranda
Mónica Bernal Sánchez



El trabajo de esta tesis doctoral ha sido dado a conocer mediante la exposición de varias comunicaciones en congresos nacionales e internacionales, y la publicación de dos artículos científicos y una revisión en la revista *Cancer Immunology and Immunotherapy*.

1. Publicaciones en *Cancer Immunology and Immunotherapy*:

- Bernal M, Concha A, Sáenz-López P, Rodríguez AI, Cabrera T, Garrido F, Ruiz-Cabello F. **Leukocyte infiltrate in gastrointestinal adenocarcinomas is strongly associated with tumor microsatellite instability but not with tumor immunogenicity.** *Cancer Immunol Immunother.* 2011 Jun; 60(6):869-82. doi: 10.1007/s00262-011-0999-1. Epub 2011 Mar 13. PubMed PMID: 21400022.
- Bernal M, García-Alcalde F, Concha A, Cano C, Blanco A, Garrido F, Ruiz-Cabello F. **Genome-wide differential genetic profiling characterizes colorectal cancers with genetic instability and specific routes to HLA class I loss and immune escape.** *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Jun; 61(6):803-16. doi: 10.1007/s00262-011-1147-7. Epub 2011 Nov 10. PubMed PMID: 22072317.
- Bernal M, Ruiz-Cabello F, Concha A, Paschen A, Garrido F. **Implication of the β 2-microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes.** *Cancer Immunol Immunother.* 2012 Sep; 61(9):1359-71. doi: 10.1007/s00262-012-1321-6. Epub 2012 Jul 26. Review. PubMed PMID: 22833104.

2. Congresos Internacionales:

2.1. 24th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (European Federation for Immunogenetics [EFI]), 2010:

- Different pattern of tumor infiltration leukocytes in colorectal microsatellite instability positive and negative tumors. *Tissue Antigens.* 2010; 75:462-643
- Microsatellite instability colorectal carcinomas display distinct gene expression profiles compatible with more immunogenic tumors. *Tissue Antigens.* 2010; 75:462-643

2.2. 25th European Immunogenetics and Histocompatibility Conference (European Federation for Immunogenetics [EFI]), 2011:

- Three different mechanisms underlying major histocompatibility complex class I down-regulation in colorectal carcinomas. *Tissue Antigens.* 2011; 77: 370-513
- Total loss of human leukocyte antigen class I expression in colon carcinomas is not associated with a particular pattern of proinflammatory gene expression and lymphocyte infiltration. *Tissue Antigens.* . 2011; 77: 370-513.
- Galectin-3 and programmed cell death-1 ligand expression in colorectal microsatellite instability positive and negative tumors. *Tissue Antigens.* 2011; 77: 370-513

3. Congresos Nacionales:

3.1. XXXV Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI), 2010:

- Carcinomas de colon con inestabilidad genómica presentan perfiles de expresión génica compatibles con tumores más inmunogénicos.

- El fenotipo de inestabilidad de microsatelites (MSI) determina el patrón de infiltración leucocitaria en el cáncer de colon.

3.2. XXXVI Congreso de la Sociedad Española de Inmunología (SEI), 2011:

- Análisis de las mutaciones del gen *B2m* en tumores humanos.
- Análisis de la categoría biológica de los genes diferencialmente expresados en tumores de colon con inestabilidad de microsatelites frente a tumores con estabilidad.

Otras Publicaciones y Comunicaciones a Congresos

1. Publicaciones Originales y Capítulo de Libro:

- Poly (ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) longer alleles spanning the promoter region may confer protection to bilateral Meniere's disease. Jose A. López-Escámez, Antonia Moreno, Mónica Bernal, Herminio Pérez-Garrigues, Sofía Santos-Pérez, Andrés Soto-Varela, Ismael Arán, Omar Fernández-Sanfrancisco, Alicia López-Nevot & Miguel Angel López-Nevot. *Acta Oto-Laryngologica*. 2009; 1-4
- Bernal M, Garrido P, Jiménez P, Carretero R, Almagro M, López P, Navarro P, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Changes in activatory and inhibitory natural killer (NK) receptors may induce progression to multiple myeloma: implications for tumor evasion of T and NK cells. *Hum Immunol*. 2009 Oct; 70(10):854-7. Epub 2009 Jul 4. PubMed PMID: 19580833.
- Changes in MHC class I expresión, MICA/B and CD95 during the progresion of MGUS to multiple myeloma: evidence of a NK-mediated cell immunoedition. Bernal M, Garrido P, Jiménez P, Carretero R, Almagro M, López P, Navarro P, Garrido F, Ruiz-Cabello F. En: *European Congress of Immunology*. Editado por R. Schmidt. Berlin 2009. ISBN: 978-88-7587-522-0

2. Comunicaciones a Congresos Nacionales e Internacionales:

- European Hematology Association (EHA), Berlín 2009: Changes in activatory and inhibitory NK receptors associated to the progression of monoclonal gammopathy of undetermined significance to multiple myeloma: implications for tumor evasion of T and NK cells.
- European Congress of Immunology (CEI), Berlín 2009: Changes in MHC class I expression, MICA/B and CD95 during the progression of MGUS to multiple myeloma: evidence of a NK-mediated cell immunoedition.
- Cancer Immunotherapy & Immunomonitoring (CITIM), Kiev 2009: Sucessive changes in HLA-class I, MICA and CD95 expression occurs during the course of progression of multiple myeloma: implications for immune evasion.
- Progress in Vaccination Agaisnt Cancer (PIVAC), Bulgaria 2009: Continuous changes in MHC class I expression of MGUS to multiple myeloma: evidence of a NK-mediated cell immunoedition.
- Congreso de la Asociación Española de Hematología y Hemoterapia (AEHH) y de la Sociedad de Trombosis y Hemostasia (SETH), Barcelona 2009: Cambios en los receptores activadores e inhibidores NK están asociados con la progresión a mieloma múltiple: implicaciones en los mecanismos de evasión de las células T y NK.

A mis padres
A mis hermanas
A mis abuelos
A Jorge y a Teresa....

.....∞

Agradecimientos

La realización de esta tesis doctoral ha supuesto algunos años de gran esfuerzo y sacrificio, pero, sin lugar a dudas, no habría sido posible sin el trabajo, colaboración y apoyo de un grupo de personas que merecen mi más profundo agradecimiento.

En primer lugar, quiero dar las gracias al Dr. Federico Garrido por haberme dado la oportunidad de formar parte del equipo de investigación que dirige, y por la labor que ha realizado como co-director de mi tesis doctoral durante estos años. He aprendido mucho de su trabajo y experiencia.

En especial, quiero dar las gracias a mi director de tesis, el Dr. Francisco Ruíz-Cabello, por haberme ofrecido la posibilidad de desarrollar este proyecto. También, por la confianza que ha depositado en mí desde el principio, por su paciencia, su gran trabajo e infatigable dedicación, y por el apoyo que siempre me ha brindado, incluso en momentos en los que me he sentido muy desanimada. Trabajar a su lado ha supuesto una gran experiencia que, estoy segura, marcará mi futuro como profesional.

Igualmente, quiero mostrar mi gratitud a mi co-director de tesis, el Dr. Ángel Concha, por el trabajo fundamental que ha desempeñado durante este proyecto. Por su asesoramiento y por la ayuda que nos ha proporcionado siempre que hemos acudido a él.

Quiero también dar las gracias a Fernando García, Carlos Cano y Armando Blanco, de la Escuela de Ingeniería Informática de la Universidad de Granada, por su participación en este trabajo.

Quiero agradecer a Ana Isabel Rodríguez, no sólo su imprescindible labor, sino también el haber sido conmigo una maravillosa persona, que siempre ha estado dispuesta a ayudarme y a escucharme. A Pablo Sáenz-López, mi “compañero de batalla”, por su generosidad, paciencia y gran compañerismo. Por su saber escuchar, sus consejos, y la ayuda y el apoyo que me ha prestado en todo momento. Siempre recordaré su música de fondo durante las largas tardes de inmunohistoquímica.

Quiero dar las gracias a la Dra. Teresa Cabrera, por su ayuda en este trabajo siempre que lo he necesitado, y por interesarse por mí, escuchándome y dándome buenos consejos. A la Dra. Natalia Aptsiauri por la inestimable colaboración que nos ha prestado durante estos años.

A mis compañeros Ana del Campo, Ana García Ruano, Rafael Carretero, Javier Carretero, Cristina Garrido e Irene Romero, que no han dudado en ayudarme siempre que he acudido a ellos.

Quiero dar las gracias a un grupo de personas maravillosas que me han hecho sentir parte de una gran familia: A los Dres. Antonio Garrido, Pilar Jiménez, Matías Pérez, Julia Cantón e Isabel Maleno, a Francisco Luis Díaz Torrejón, Purificación García, Antonia Martín, Ángela Giralt, Mercedes Maldonado, Inmaculada Delgado, Alonso Fernández, Fernando Valero y Carlos Mingorance. En especial, al Dr. Miguel Ángel López-Nevot, por su trabajo como tutor durante la residencia, por haberme enseñado inmunología, siempre estimulando mi curiosidad, por la confianza

que siempre me ha demostrado, y por los ánimos que me ha infundido en todo momento para continuar y terminar mi tesis doctoral. A tres personas que, para mí, han sido esenciales: Antonia Moreno, Eva M^a García y Alba Martínez. A vosotras, gracias por vuestra ayuda, apoyo, comprensión y consejos. Gracias por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas, por los ánimos que me habéis dado, por contagiarme vuestra alegría en las ocasiones más difíciles, y simplemente, por ser fantásticas.

De forma general, quiero dar las gracias a todas las personas que he conocido y me han ayudado, de un modo u otro, durante estos años de residencia y doctorado. Gracias a todos.

Por último, quiero dar las gracias a mi familia, por ser uno de los pilares fundamentales de mi vida. A mis padres, Francisco y M^a Teresa, por TODO, a mis hermanas Cristina y Rocío, y a mi amiga Cheché, por tenerlas siempre a mi lado.

A Jorge, porque sin él habría sido imposible todo esto. Quiero darle las gracias por su paciencia, apoyo, comprensión, y crítica constructiva. Por cuidarme siempre.

A Teresa, mi pequeño tesoro, porque desde su llegada al mundo, mis días son más felices.

Esta investigación ha sido posible gracias al Instituto de Salud Carlos III, al Fondo de Investigaciones Sanitarias (PI 11/01386), y a la Consejería de Salud de La Junta de Andalucía (PI-0080-2010). También, mi agradecimiento a la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (P08-TIC-4299), a la Dirección General de Investigación y Gestión del Plan Nacional I + D + i (TIN2009-13489), al Proyecto de Investigación de Excelencia (CTS-3952, CVI-4740 y P06/-CTS-02200), y al Plan Andaluz de Investigación (PAI, Grupo CTS).

ÍNDICE GENERAL

I. ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO	17
II. RESÚMEN	19
III. INTRODUCCIÓN	21
1. Epidemiología del Cáncer Colorrectal y Formas de la Enfermedad	23
2. Genética Molecular del Cáncer Colorrectal.....	24
3. Clasificación Molecular en el Cáncer Colorrectal.....	26
4. La Inestabilidad Cromosómica (“ <i>Chromosomal Instability</i> ”, CIN).....	29
5. La inestabilidad de Microsatélites (“ <i>Microsatellite Instability</i> ”, MSI).....	30
5.1. MSI-H en CRCs del Síndrome de Lynch vs CRCs esporádicos	31
5.1.1. Síndrome de Lynch	32
5.1.2. CRCs esporádicos con MSI-H	34
5.2. El Sistema de Reparación de Bases Desapareadas (<i>Mismatch Repair System, MMR</i>).....	36
5.2.1. El Mecanismo de Corrección de Errores del Sistema MMR	39
5.3. Genes Dianas que median la Carcinogénesis en los Tumores MSI	39
5.4. Detección de la Inestabilidad de Microsatélites	42
5.5. Respuesta al Tratamiento del CRC con Fenotipo MSI-H	45
6. El Sistema Inmunitario en el Microambiente Tumoral: Respuesta Inflamatoria e Inmunomodificación	46
7. Estrategias de Escape Tumoral	49
7.1. Factores Derivados del Tumor (“ <i>Tumor-derived factors</i> ”, TDFs)	49
7.2. Defectos en la Presentación de Antígenos Tumorales: Alteraciones en las Moléculas HLA de Clase I	51
7.2.1. Mecanismos Moleculares implicados en la Generación de Fenotipos HLA Clase I Alterados	53
7.2.1.1. Pérdida Total de Antígenos HLA de Clase I.....	53
7.2.1.2. Baja Regulación de Moléculas HLA de Clase I.....	53
7.2.1.3. Otros Fenotipos Alterados HLA de Clase I	54
7.3. Inmunosupresión mediada por Células de la Inmunidad Innata y Adaptativa.....	54
7.3.3. Células T Reguladoras (Treg)	54
7.3.2. Células Supresoras de Origen Mieloide (“ <i>Myeloid-derived suppressor cells</i> ” MDSCs)	56
7.3.1. Macrófagos Asociados al Tumor (“ <i>Tumor-associated macrophages</i> ”, TAMs)	57
7.4. Otros Mecanismos de Escape Tumoral	58
7.4.1. Alteraciones en la Interacción Ligando-Receptor que Perjudican a los Linfocitos T	58
7.4.2. Resistencia a la Apoptosis	59
IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	61

V. MATERIAL, MÉTODOS Y RESULTADOS (Artículos y Revisión)	65
1. Bernal M, Concha A, Sáenz-López P, Rodríguez AI, Cabrera T, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Leukocyte infiltrate in gastrointestinal adenocarcinomas is strongly associated with tumor microsatellite instability but not with tumor immunogenicity. <i>Cancer Immunol Immunother.</i> 2011; 60(6): 869-82	67
2. Bernal M, García-Alcalde F, Concha A, Cano C, Blanco A, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Genome-wide differential genetic profiling characterizes colorectal cancers with genetic instability and specific routes to HLA class I loss and immune escape. <i>Cancer Immunol Immunother.</i> 2012; 61(6): 803-16.....	87
3. Bernal M, Ruiz-Cabello F, Concha A, Paschen A, Garrido F. Implication of the β2-microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes. <i>Cancer Immunol Immunother.</i> 2012; 61(9): 1359-71.....	107
VI. DISCUSIÓN	127
VII. CONCLUSIONES	157
VIII. BIBLIOGRAFÍA	161

I. RELACIÓN DE LAS PRINCIPALES ABREVIATURAS EMPLEADAS EN EL TEXTO

ADN	Ácido DesoxirriboNucleico
APC	<i>Antigen Processing Cell</i>
APM	<i>Antigen Processing Machinery</i>
β_2m	β_2 -microglobulina
CIN	<i>Chromosomal INstability</i>
CIMP	<i>CpG Island Methylator Phenotype</i>
CpG.....	Citosina Fosfato Guanina
CRC	<i>ColoRectal Cancer</i>
CTL.....	<i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>
FSP	<i>FrameShift Peptide</i>
FU	FluoroUracilo
HLA.....	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
HNPCC....	<i>Hereditary NonPolyposic Colorectal Cancer</i>
IHQ.....	InmunoHistoQuímica
LOH.....	<i>Loss Of Heterozygosity</i>
MDSC.....	<i>Myeloid-Derived Suppressor Cell</i>
MMR	<i>MisMatch Repair</i>
MSI.....	<i>MicroSatellite Instability</i>
MSI-H.....	<i>MicroSatellite Instability-High</i>
MSI-L	<i>MicroSatellite Instability-Low</i>
MSS	<i>MicroSatellite Stability</i>
TAM	<i>Tumor-Associated Macrophage</i>
TDF.....	<i>Tumor-Derived Factor</i>
TIL.....	<i>Tumor-Infiltrating Lymphocyte</i>

II. RESUMEN

Los carcinomas colorrectales (CRCs) que se desarrollan a partir de la vía carcinogénica de Inestabilidad de Microsatélites (MSI), constituyen un subgrupo tumoral con características moleculares muy bien definidas. Presentan alteraciones en genes del sistema de reparación de bases desapareadas (MMR) del ADN, que impiden la corrección de los errores espontáneos que se originan durante la replicación. Consecuentemente, se acumulan miles de deleciones/inserciones en secuencias de repetición (microsatélites), contenidas muchas de ellas, en regiones codificantes de genes relacionados con el cáncer, principalmente, genes supresores de tumores. El resultado es que se altera la pauta de lectura de las secuencias génicas que acumulan las mutaciones, conduciendo a la generación de proteínas no funcionales, y a la producción de numerosos péptidos aberrantes, que son presentados sobre la superficie de la célula tumoral, a través de moléculas HLA de clase I, a linfocitos T citotóxicos (CTLs). El reconocimiento de estos neopéptidos antigénicos por los CTLs, provoca la liberación de moléculas linfocitarias con actividad citolítica, que promueven la muerte de la célula neoplásica. De ahí, que los tumores con fenotipo MSI, han sido ampliamente descritos como tumores muy inmunogénicos.

La gran presión inmunológica observada en el microambiente de estos tumores MSI-positivo, favorecería la immuno-selección de variantes tumorales menos inmunogénicas, que lograrían escapar de la acción del sistema inmunitario. En CRCs con MSI-H, la principal estrategia de immuno-evasión detectada, es la pérdida de expresión de antígenos HLA de clase I, mediante la inactivación del gen que codifica la cadena β_2m . Las mutaciones que se acumulan en el gen *B2m* de tumores con MSI-H, son deleciones/inserciones en secuencias repetitivas codificantes, indicando que son, igualmente, consecuencia de una deficiencia del sistema MMR.

Nosotros analizamos el tipo de respuesta inmunitaria presente en el microambiente de carcinomas gastrointestinales (estudiando el patrón de infiltración tumoral mediante inmunohistoquímica (IHQ), y analizando el perfil de expresión génica usando “*microarrays*”), y su correlación con la vía de oncogénesis (MSI *versus* MSS), y con mecanismos implicados en el escape tumoral del sistema inmunológico (pérdida de HLA de clase I, “sobre-expresión” de galectina-3 y PD-L1).

El examen de la expresión de HLA de clase I, se hizo estudiando los resultados de IHQ con anticuerpos monoclonales dirigidos frente al complejo HLA-ABC/ β_2m (W6/32), la cadena β_2m libre (GRH-1), y la cadena pesada intra-citoplasmática HLA-BC (HC-10). Los CRCs que mostraban pérdida total de moléculas HLA de clase I, se analizaron para mutaciones en el gen *B2m*, y los genes *TAP1* y *TAP2* de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM), así como para LOH en los cromosomas 6 y 15. En el estudio inmunohistoquímico del tipo y densidad del infiltrado tumoral, se emplearon anticuerpos monoclonales dirigidos frente a marcadores leucocitarios (CD45), de linfocitos

T (CD3, CD4 y CD8), de células NK (CD56), y de las subpoblaciones de macrófagos M1 o “clásicos” (CD64) y M2 o “inmunosupresores” (CD163, CD206 y Hmox-1), principalmente. En el análisis del perfil de expresión génica en el microambiente de los tumores incluidos en el estudio, se utilizó la tecnología *GeneChip* de Affymetrix, empleando el “array” HT_HG-U133_Plus 24.

Como resultados, obtuvimos que los CRCs con alto grado de inestabilidad de microsatélites (MSI-H), se caracterizaban por una alta infiltración de linfocitos T CD8⁺, con localización intersticial e intra-tumoral, principalmente, y una destacable presencia de macrófagos. Los grupos tumorales estables (MSS) mostraban una baja (agrupación HLA-I-positivo [Controles]) ó escasa/nula (conjunto tumoral HLA-I-negativo) presencia de linfocitos CD8⁺, que con infrecuencia infiltraban el interior de la glándula tumoral. No se encontraron diferencias en la infiltración por macrófagos M1 y M2 entre los grupos tumorales.

Tras un análisis inicial de los resultados del “*microarray*”, observamos que los tumores del estudio tendían a agruparse de acuerdo a las condiciones experimentales: el grupo tumoral MSI-H-positivo mostraba un perfil de expresión génica claramente diferenciado, mientras que los otros dos grupos de carcinomas (MSS/HLA-I-negativo y MSS/HLA-I-positivo [Controles]) presentaban perfiles muy similares. En el estudio concreto de genes relacionados con la respuesta inmunológica, encontramos que, en comparación con el conjunto Control, los CRCs con MSI-H mostraban una “sobre-expresión” de secuencias génicas relacionadas con la respuesta inflamatoria (genes de quimioquinas; genes que codifican moléculas relacionadas con la extravasación leucocitaria y la actividad pro-inflamatoria, genes marcadores de macrófagos...), y con la activación, proliferación y actividad citotóxica linfocitaria.

Los datos obtenidos de la IHQ y del análisis de “*arrays*” de expresión, confirman que en el microambiente de tumores con MSI-H, se da una fuerte respuesta anti-tumoral que podría implicar el desarrollo de estrategias de inmuno-evasión diferentes a las observadas en tumores que son MSS. De hecho, en el grupo de carcinomas MSI-H-positivo, encontramos que el principal mecanismo de escape inmunológico es la pérdida de HLA de clase I debido a mutaciones (deleciones/inserciones) en secuencias de microsatélites del gen *B2m*. La alta frecuencia de mutación detectada en *B2m*, y la extensión, a la totalidad de la masa tumoral, de las alteraciones que conducen a una falta de cadena β_2m funcional, son algunas de las evidencias que apoyarían que el gen *B2m* puede ser un gen diana clave en la carcinogénesis MSI-H.

III. INTRODUCCIÓN

III. INTRODUCCIÓN

1. Epidemiología del Cáncer Colorrectal y Formas de la Enfermedad.

Los últimos datos aportados por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (Organización Mundial de la Salud), sitúa al cáncer colorrectal (“*colorectal cancer*”: CRC) a nivel mundial, como el tercer tipo de enfermedad neoplásica más frecuente en hombres (663.000 casos, 10% del total) después del cáncer de pulmón o próstata, y el segundo más común entre las mujeres (571.000 casos, 9.4% del total), tras el cáncer de mama. Es además, la cuarta causa más común de muerte por cáncer, con cerca de 600.000 defunciones (8% de todas las muertes) en todo el mundo. Sin embargo, las diferencias en su distribución geográfica son notables, pues se registran tasas de incidencias en regiones desarrolladas que alcanzan los 40 casos por 100.000 habitantes, frente a los 5 casos por cada 100.000 habitantes en países subdesarrollados o en vías de desarrollo (Bray et al., 2012; Ferlay et al., 2010; Hagggar & Boushey, 2009). Consecuentemente, el CRC se ha convertido en un importante problema de salud pública en países de cultura y estilo de vida occidental.

El hecho de que el número de casos de este cáncer aumente con la industrialización, hace pensar en la posibilidad de que ciertos factores ambientales jueguen un papel como factores de riesgo en el desarrollo de la enfermedad. La dieta, principalmente la rica en carnes y grasas, es el factor exógeno más importante implicado en la etiología del CRC (Boyle & Langman, 2000; Hagggar et al., 2009). Otros factores de riesgo asociados a la enfermedad son el tabaco, la ingesta de alcohol, el sedentarismo, el índice de masa corporal (BMI), la obesidad abdominal, el uso de anti-inflamatorios no esteroideos, el sexo masculino y la presencia de grandes pólipos serrados (Gonzalez & Riboli, 2010; Hiraoka et al., 2010; Hoffmeister et al., 2010; Huang L et al., 2010; Larsson & Wolk, 2006). Contrariamente, la ingesta de folatos y vitaminas, una dieta rica en fibra y la realización de colonoscopias con eliminación de pólipos adenomatosos, se han asociado a un menor riesgo de desarrollar CRC (Bretthauer, 2010; Dahm et al., 2010; Kim DH et al., 2010).

La mayoría de los casos de cáncer colorrectal son esporádicos y ~30% de los pacientes presentan un historial familiar. Sin embargo, solo un 5-6% de los CRCs con antecedentes familiares, se deben a mutaciones heredadas en genes fundamentales implicados en el desarrollo tumoral. Estas formas heredadas incluyen diversos síndromes (Síndrome de Lynch, Poliposis Adenomatosa Familiar [FAP], Poliposis Asociada a MUTYH [MAP], Síndrome de Peutz-Jeghers [PJS], Síndrome de Poliposis Juvenil [JPS], Síndrome de Poliposis Hiperplásica [HPP]) que han sido bien caracterizados desde el punto de vista clínico, patológico y genético (Jasperson et al., 2010; Migliore et al., 2011). El resto de las formas familiares (~25%), probablemente resulten de factores génicos asociados a un incremento en el riesgo de desarrollar CRC, como pueden ser loci de susceptibilidad de baja

penetrancia o polimorfismos específicos, afectados por la interacción genes-genes o genes-ambiente (Jaspersen et al., 2010).

2. Genética Molecular del Cáncer Colorrectal

En los últimos 20 años, la investigación sobre el CRC ha revelado que se trata de una enfermedad heterogénea, que engloba diversos síndromes o afecciones con diferentes alteraciones genéticas y epigenéticas (Jaspersen et al., 2010; Migliori et al., 2010). Según el modelo propuesto por Fearon y Vogelstein en 1990, el desarrollo del CRC, desde células epiteliales normales hasta el adenocarcinoma, sigue un proceso secuencial, donde cambios histológicos progresivos se correlacionan con la acumulación de alteraciones moleculares en vías de señalización que regulan el comportamiento del cáncer (Figura 1) (Fearon & Vogelstein, 1990; Vogelstein et al., 2013).

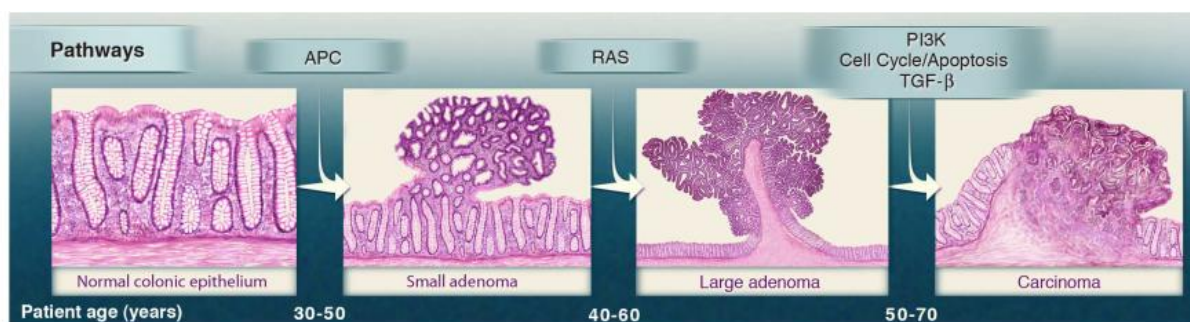


Figura 1. Alteraciones genéticas y progresión del cáncer colorrectal. Los principales genes implicados en la tumorigénesis se observan en la transición entre cada estadio tumoral.

Imagen adaptada de Vogelstein et al., Science, 2013; 339(6127): 1546-58

Los cambios genéticos responsables del inicio y progresión del cáncer conducen a la activación de oncogenes y a la inactivación de genes supresores de tumores, que codifican proteínas participantes en la regulación del crecimiento y diferenciación celular (Knudson, 1993; Weinberg, 1991). Las mutaciones en estos genes confieren una ventaja selectiva en el crecimiento y conducen a una expansión clonal de las células alteradas. La mutación en el gen supresor de tumores *APC* (*adenomatous polyposis coli*, 5q21) es la alteración más temprana que se ha identificado en la tumorigénesis del CRC esporádico (Fearon & Vogelstein, 1990). Se estima que >85% de los casos esporádicos de CRC tienen mutaciones somáticas en el gen *APC* (Kinzler & Vogelstein, 1998). El producto de este gen desempeña un papel importante en la regulación de la vía molecular *Wnt/β-catenina*, y su inactivación inicia la neoplasia colorrectal en forma de adenoma. Durante la progresión de la secuencia desde la lesión benigna (adenoma) hasta la malignidad (carcinoma) y la metástasis, se acumulan alteraciones adicionales en oncogenes como *KRAS* y *PIK3CA*, y en genes supresores de

tumores en los cromosomas 17p (*p53*) o 18q (*DCC*, *SMAD4*) (Figura 1). Aunque este modelo de progresión secuencial ha resultado muy útil, en realidad sólo un porcentaje pequeño de CRCs (aproximadamente un 10%) acumulan alteraciones en todos estos genes y se desarrollan siguiendo esta vía de carcinogénesis (Wood et al., 2007)

En los síndromes hereditarios se conocen las mutaciones específicas en la línea germinal que conducen al inicio y desarrollo del cáncer (por ejemplo, mutación en el gen *APC* en pacientes con Poliposis Adenomatosa Familiar [FAP], mutación en genes del sistema de reparación de bases desapareadas [“*Mismatch repair*”: MMR] del ADN en el síndrome de Lynch). Por el contrario, los casos esporádicos de CRC se desarrollan a través de la adquisición de mutaciones somáticas al azar en los genes que aparecen alterados en los cánceres hereditarios. Sin embargo, esta tasa de mutación aleatoria no puede explicar por sí sola el número de alteraciones genéticas encontradas en la mayoría de los cánceres humanos (Loeb et al., 2003). Por este motivo, algunos autores sugieren que la desestabilización del genoma puede ser un prerrequisito temprano en la carcinogénesis (Loeb, 2001), frente a otros investigadores que argumentan que las células continuamente generan un pequeño número de alteraciones genéticas, y que aquellas que proporcionan ventajas en la proliferación o supervivencia son seleccionadas durante la expansión clonal.

La desestabilización del genoma es consecuencia de mutaciones que afectan a genes fundamentales en el mantenimiento de la integridad genómica y cromosómica durante la replicación del ADN, la respuesta celular al daño genético y la división celular. La pérdida de estabilidad genómica, presente en la mayoría de los cánceres humanos, se considera un paso molecular clave en la formación del cáncer (Gollin, 2005; Grady, 2004; Lengauer et al., 1998). De hecho, esto se puede observar, por ejemplo, en pacientes con síndrome de Lynch o con Poliposis Asociada a *MUTYH* (*mut Y homologue*), (*MUTYH-associated polyposis*: MAP). Estos enfermos muestran un incremento en el riesgo de padecer cáncer de colon, debido a que presentan mutaciones en la línea germinal de genes que codifican proteínas de reparación del daño en el ADN mutado (“*Mismatch repair system*” [MMR] en el síndrome de Lynch y “*Base excision repair system*” [BER] en MAP) (Boland et al., 2008; Sampson et al., 2003; Sieber et al., 2003).

Existen dos vías principales de inestabilidad genética implicadas en la carcinogénesis colorrectal. Aproximadamente, el 15% de los CRCs esporádicos presentan inestabilidad de microsatélites (“*Microsatellite instability*”: MSI). Esta vía molecular se caracteriza por la acumulación de mutaciones (deleciones, inserciones pero también sustituciones de base) en secuencias cortas de repetición en tándem (microsatélites), como consecuencia de defectos en genes que intervienen en el sistema de reparación de bases desapareadas del ADN (MMR) (Ionov et al., 1993; Thibodeau et al., 1993). Sin embargo, la mayoría de los casos esporádicos de CRC (~85%) muestran inestabilidad cromosómica (“*Chromosomal instability*”: CIN), definida por pérdidas y ganancias de cromosomas

completos o de grandes partes de cromosomas durante la división celular. (Haydon & Jass, 2002; Jass et al., 2002; Kinzler & Vogelstein, 1996).

Además de las mutaciones génicas, el silenciamiento epigenético ha sido reconocido como una tercera vía en el modelo de Knudson, de inactivación de genes supresores de tumores en cáncer (Kondo & Issa, 2004; Mori et al., 2004). El mecanismo epigenético más estudiado, con un claro papel en el desarrollo tumoral, es la hipermetilación de islas CpG localizadas en las secuencias promotoras de estos genes supresores de tumores. De hecho, los cambios epigenéticos parecen estar estrechamente asociados a la transformación neoplásica del cáncer colorrectal (Söreide et al., 2005). Por ejemplo, la pérdida de expresión del gen supresor de tumores *phosphatase and tensin homologue (PTEN)*, localizado en 10q23, es debido a la hipermetilación de su promotor en los casos de CRC con inestabilidad de microsatélites (Goel et al., 2004). La hipermetilación de islas CpG conduce a la falta de expresión génica como consecuencia de cambios en la estructura de la cromatina, que impide el acceso de la maquinaria de transcripción. Si bien los tumores pueden clasificarse en función del grado de metilación, el fenotipo metilador de islas CpG (“*CpG island methylator phenotype*”: CIMP) hace referencia a aquellos tumores con múltiples procesos de metilación en un gran número de genes (Toyota et al., 1999^a). Este fenotipo CIMP determina una inestabilidad epigenética que, debido a la acumulación de numerosas alteraciones moleculares responsables del silenciamiento génico, sería funcionalmente equivalente a la inestabilidad genética (Issa, 2000).

3. Clasificación Molecular en el Cáncer Colorrectal.

La complejidad molecular observada en el cáncer colorrectal ha hecho imprescindible establecer una clasificación basada en características moleculares, con una gran importancia porque refleja los mecanismos subyacentes implicados en la carcinogénesis. La clasificación tumoral basada en criterios clínicos, patológicos y también, en una más extensa caracterización molecular, permite agrupar tumores individuales con características similares, intuyendo que probablemente, evolucionarán de manera similar (Ogino & Goel, 2008). Esto contribuye a un mejor entendimiento de la enfermedad, con una importante aplicación clínica en la detección, pronóstico y respuesta terapéutica al cáncer.

La clasificación molecular del CRC se basa, fundamentalmente, en tres procesos celulares globales, que equivalen a las vías principales implicadas en el desarrollo y progresión del cáncer: la inestabilidad de microsatélites (MSI), la inestabilidad cromosómica (CIN) y el fenotipo metilador de islas CpG (CIMP). Las clasificaciones más sencillas tienen en cuenta las dos vías de inestabilidad genética conocidas: MSI y CIN. Atendiendo a esto, el ~85% de CRCs esporádicos surgen a partir de la

vía “supresora” (“*suppressor pathway*”) caracterizada por presentar CIN, con frecuentes anomalías citogenéticas y pérdidas alélicas, que conducen a la inactivación secuencial de genes supresores de tumores (Cahill et al., 1998; Lengauer et al., 1997). En contraste, el ~15% restante de los CRCs esporádicos se desarrollan a partir de la vía “mutadora” (“*mutator pathway*”) con presencia de MSI, definida por alteraciones en la longitud de secuencias cortas de repetición en tándem, llamadas microsatélites (Ionov et al., 1993; Thibodeau et al., 1993). Esta vía “mutadora” es característica también, de los CRCs asociados al síndrome de Lynch, un desorden hereditario que predispone al desarrollo de diversos tipos de cáncer, principalmente colorrectal y de endometrio (Lynch & Smyrk, 1996). A diferencia de los tumores con CIN, los CRCs que se originan a partir de la vía MSI, son generalmente diploides (Figura 2), no exhiben alteraciones citogenéticas groseras, y no es frecuente observar en ellos mutaciones o pérdidas alélicas de los genes normalmente alterados en la vía “supresora” (*APC*, *KRAS*, *p53*), o pérdida de heterocigosidad (“*Loss of heterozygosity*”: LOH) en 5q, 17p y 18q. (Eshleman et al., 1998; Jass et al., 2002; Lothe et al., 1993; Olschwang et al., 1997; Thibodeau et al., 1993). En vez de eso, los tumores MSI acumulan mutaciones en secuencias de microsatélites, algunas de ellas presentes en genes involucrados en la carcinogénesis colorrectal (Parsons et al., 1995; Rampino et al., 1997; Souza et al., 1996).

Los CRCs originados a partir de estas dos vías de inestabilidad genética, MSI y CIN, presentan también características clínicas e histopatológicas distintas. La MSI se observa de forma más frecuente en mujeres y en CRCs con localización proximal. En los tumores MSI también se observa pobre diferenciación, abundante secreción de mucina y gran infiltración linfocitaria (Dolcetti et al., 1999; Phillips et al., 2004; Raut et al., 2004; Young et al., 2001) (Figura 2). Los CRCs con MSI tienen mejor pronóstico (Lothe et al., 1993; Thibodeau et al., 1993), y se han asociado con el desarrollo de tumores primarios de gran tamaño pero con estadíos más favorables (menor afectación de ganglios linfáticos y baja frecuencia de metástasis distales) (Buckowitz et al., 2005; Greenson et al., 2003; Gryfe et al., 2000). Además, los CRCs con MSI y CIN responden de forma diferente a la terapia: la quimioterapia con fluorouracilo (FU) beneficia a los pacientes con tumores CIN, pero no a los que presentan MSI (Ribic et al., 2003).

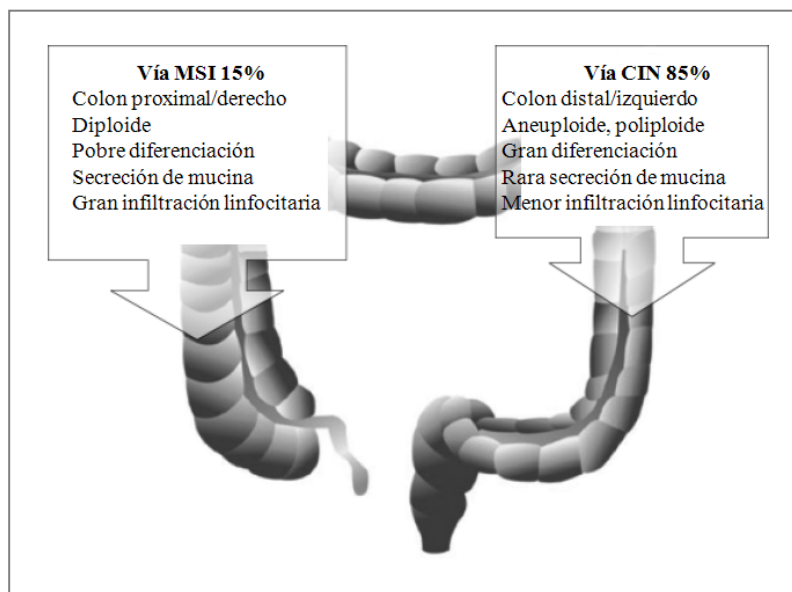


Figura 2. Características patológicas que diferencian a los CRCs con MSI de los CRCs con CIN. Imagen adaptada de Søreide et al., *British Journal of Surgery*, 2006; 93: 395-406

Sin embargo, aunque estas dos vías de inestabilidad genética se distinguen por sus características moleculares, y aparentemente parecen independientes, hay evidencias que señalan cierto grado de “*overlap*” (Goel, et al., 2003). Mediante estudios con “*arrays*” basados en procesos de hibridación genómica comparativa (“*Comparative genomic hybridization*”: CGH), se han identificado CRCs con fenotipo MSI que muestran cierto grado de anomalías citogenéticas (amplificaciones y deleciones de alelos o cromosomas) (Trautmann et al., 2006). Por otro lado, también se han detectado CRCs sin evidencia alguna de CIN o MSI (Tang et al., 2004). Los mecanismos moleculares que conducen el desarrollo de estos tumores MSI– CIN– son desconocidos, pero se piensa que una posibilidad podría ser el silenciamiento de genes de crecimiento y diferenciación celular por modificación epigenética (Goel et al., 2003). De hecho, existen evidencias que indican que el proceso de hipermetilación de promotores de genes supresores de tumores, juega un papel crítico en el desarrollo y progreso de muchos tumores colorrectales (Toyota et al., 1999^b). El fenotipo CIMP se ha detectado en casi la mitad de los CRCs esporádicos, y estos tumores podrían no progresar independientemente a través de las vías MSI o CIN (Samowitz et al., 2005; Toyota et al., 1999^a). Todos estos hallazgos sugieren que los procesos moleculares MSI y CIN no son mutuamente excluyentes, y que podrían existir múltiples mecanismos en algunos tumores que proporcionasen ventajas adicionales en el crecimiento y desarrollo.

4. La Inestabilidad Cromosómica (CIN, Chromosomal Instability)

La inestabilidad cromosómica (CIN) es la inestabilidad genómica más frecuente en el cáncer de colon y está presente en 80-85% de los CRCs (Grady & Carethers, 2008). Se define como un incremento en la tasa de pérdidas o ganancias de fracciones de cromosomas o de cromosomas completos durante la división celular (Rajagopalan & Lengauer, 2004). El resultado de CIN es un desbalance en el número de cromosomas (aneuploidía) y un incremento en la tasa de pérdida de heterocigosidad (“*Loss of heterocigosity*”: LOH). Las anomalías cromosómicas características de CIN contribuyen a la generación y progresión del cáncer a través de cambios en la dosis génica de miles de genes, conduciendo en concreto, a la pérdida de genes supresores de tumores (inactivación) y a la ganancia en el número de copias de oncogenes (activación) (Duesberg et al., 2006). De hecho, las alteraciones en genes supresores de tumores como *APC*, *p53*, *SMAD4* y *DDC*, y en oncogenes como *KRAS*, son muy características de la vía CIN (Markowitz & Bertagnolli, 2009). En general, se asume que esta vía molecular, también conocida como vía “supresora”, sigue el modelo de progresión lineal propuesto por Fearon y Vogelstein (Fearon & Vogelstein, 1990).

Sin embargo, a pesar de la alta frecuencia de CIN en el cáncer de colon, los mecanismos moleculares que originan esta forma de inestabilidad genética no son todavía bien entendidos. Lengauer et al fueron los primeros en mostrar que los CRCs estables (“*Microsatellite stable*”: MSS) exhibían un llamativo defecto en la segregación cromosómica, resultando en ganancias o pérdidas de 10^{-2} por cromosoma. Determinaron, mediante el uso de técnicas de fusión celular y transferencia cromosómica, que la aneuploidía es el resultado de una tasa anormalmente alta de CIN que persiste a lo largo de la vida de un tumor, y que CIN es un rasgo autosómico dominante que puede surgir de mutaciones que permiten la ganancia de funciones (Lengauer et al., 1998).

Dado el papel fundamental de CIN en la carcinogénesis colorrectal, se han puesto muchos esfuerzos en conocer los mecanismos responsables de esta forma de inestabilidad genética. Los primeros estudios realizados en levaduras, consiguieron identificar una larga lista de genes que desencadenaban CIN cuando estaban mutados. Son genes implicados en una gran variedad de procesos celulares, incluyendo función y estructura del cinetocoro, formación de centrosomas y microtúbulos, condensación cromosómica, cohesión de cromátidas hermanas y control del ciclo celular (Jallepalli & Lengauer, 2001). De forma similar, también se encontraron genes que causan CIN cuando están mutados en *Drosophila melanogaster* (Fung et al., 2002; Milaihov et al., 2002). En humanos, sin embargo, el número de genes afectados que se han identificado como causantes de CIN es bastante inferior, y parecen desempeñar funciones en los puntos de control (“*checkpoints*”) del ciclo celular. Estos genes incluyen a *hBUB1*, *MAD2*, *BRCA1*, *BRCA2* y *hCDC4* (Cahill et al., 1998; Wang Z et al., 2004). Igualmente, se ha descrito que el gen *APC* puede contribuir al fenotipo CIN en CRCs.

Concretamente, la proteína codificada por el gen *APC* se ha descrito a nivel de los cinetocoros, donde podría promocionar el alineamiento correcto de los cromosomas durante la mitosis (Green et al., 2005). Células deficientes en *APC* no pueden detectar anomalías cromosómicas durante la anafase (Draviam et al., 2006). Por tanto, la pérdida de *APC* podría interferir con la correcta regulación de la mitosis y contribuir al fenotipo CIN (Worthley et al., 2007). Las mutaciones en *p53* también se han descrito como causantes de algunas formas de inestabilidad genómica, pero no se ha observado correlación entre mutaciones en *p53* y el fenotipo CIN por Lengauer et al u otros investigadores (Eshleman et al., 1998; Lengauer et al., 1997).

Una cuestión todavía por resolver es si CIN surge temprano en la tumorigénesis e inicia la secuencia adenoma-carcinoma, o si se adquiere durante este proceso y facilita la formación del cáncer. Algunos trabajos sugieren que CIN aparece temprano en la carcinogénesis colorrectal y, subsecuentemente, conduce la progresión tumoral. Michor et al desarrollaron un modelo matemático de la dinámica de la tumorigénesis colorrectal, y encontraron que uno o dos genes CIN en el genoma son suficientes para asegurar que CIN surja pronto, precediendo incluso a las mutaciones en *APC* (Michor et al., 2004). Varias publicaciones han demostrado el papel activo de la inestabilidad genómica en el inicio del CRC al observar la presencia de CIN en adenomas tempranos (Nowak et al., 2002; Shih et al., 2001). Sin embargo, la idea de que CIN inicie y conduzca la transformación neoplásica no es aceptada universalmente. Algunos autores consideran que CIN se adquiere durante la tumorigénesis y facilita la progresión tumoral. En cualquier caso, la cuestión está todavía por aclarar (Pino & Chung, 2010^a).

5. La Inestabilidad de Microsatélites (MSI; MicroSatellite Instability)

La inestabilidad de microsatélites (MSI) está presente en el ~15% de los casos de cáncer de colon, aunque también se han descrito porcentajes similares en el cáncer gástrico y de endometrio, y frecuencias algo más bajas en otra minoría de tumores humanos (Woerner et al., 2003). Se define como un cambio en la longitud de secuencias nucleotídicas cortas de repetición llamadas microsatélites, (normalmente repeticiones de mono o dinucleótidos de citosina y adenina, como A_n o CA_n donde n es el número de repeticiones) en el ADN del tejido tumoral, en comparación con el ADN del tejido normal del mismo individuo (Boland et al., 1998). Los microsatélites, por su propia naturaleza y estructura, son secuencias inestables, propensas a sufrir cambios durante la replicación, que si no son reparados pueden conducir a la aparición de alteraciones como deleciones o inserciones.

La razón que explica esta inestabilidad de microsatélites se descubrió cuando se observó que su presencia se asociaba a una pérdida de función de genes del sistema de reparación de bases desapareadas (“*Mismatch Repair*”: MMR), correlación que fue inicialmente estudiada en bacterias y

levaduras (Boland et al., 1998; Boland et al., 2008). Cuando en 1993, se comprobó, además, que la MSI estaba presente en >95% de los tumores de colon que padecían enfermos con síndrome de Lynch, un síndrome familiar que predispone al desarrollo de diversos tipos de cáncer, se confirmó rápidamente que la inactivación de genes pertenecientes al sistema MMR era la causa de los casos de CRC con inestabilidad de microsatélites (Aaltonen et al., 1993; Marra & Boland, 1995). Si el mecanismo del sistema MMR falla, no pueden corregirse los errores espontáneos que se producen durante la replicación del ADN (Jiricny, 1998; Marra & Schär, 1999). Estos errores no sólo consisten en la incorporación de nucleótidos no-complementarios al ADN, que ocurre con una frecuencia de un error por cada 100.000 nucleótidos (Klingler et al., 2002), sino que también abarcan las alteraciones que afectan a las secuencias repetitivas. En ellas, la polimerasa experimenta un deslizamiento (“*slippage*”), generando un “*loop*” o lazo corto de nucleótidos, que dependiendo de si se localiza en la hebra molde o en la hebra hija del ADN, dará lugar a una delección o a una inserción respectivamente (véase apartados siguientes) (Marra & Schär, 1999). Estas alteraciones se fijan como mutaciones y se acumulan en las células hijas durante la mitosis. El resultado es la adquisición de cientos de miles de mutaciones somáticas (delecciones, inserciones, pero también sustituciones de base) en secuencias de microsatélites (Aquilina et al., 1994; Ionov et al., 1993; Jass et al., 1995; Liu et al., 1996; Perucho, 1996; Thibodeau et al., 1993), algunas de las cuales se localizan en regiones codificantes de genes asociados al cáncer, principalmente genes supresores de tumores cuyas expresiones y/o funciones pueden verse afectadas. Cuando el grado de MSI está muy extendido en el genoma, alterando un amplísimo número de genes implicados en la carcinogénesis colorrectal, se define el grado de alta frecuencia de inestabilidad de microsatélites (*MSI-High*: MSI-H), que determina el fenotipo conocido como fenotipo “mutador” o “hipermutable”. Este incremento en la tasa de mutación espontánea parece ser el mecanismo responsable de la rápida progresión neoplásica en el síndrome de Lynch y en tumores esporádicos con MSI (Aaltonen et al., 1993; Tsao et al., 2000).

5.1. MSI-H en CRCs del Síndrome de Lynch vs CRCs esporádicos.

MSI-H está presente en, aproximadamente, el 15% de los CRCs esporádicos y en la casi totalidad (> 95%) de los casos de cáncer colorrectal de pacientes con síndrome de Lynch, también conocido como cáncer colorrectal no-polipósico hereditario (“*Hereditary non-polyposic CRC*”: HNPCC) (Boland, 2005). Los casos esporádicos y hereditarios de CRC con MSI-H presentan características patológicas y clínicas similares, que los diferencian claramente de los tumores estables (“*Microsatellite stable*”: MSS): pobre diferenciación, abundante secreción de mucina, una gran infiltración linfocítica intra-tumoral o en la periferia del tumor, localización en el colon proximal, preferentemente, y mejor pronóstico comparado con los tumores MSS (Jass, 2006). Sin embargo, características como la gran secreción de mucina, pobre diferenciación, heterogeneidad tumoral con

presencia de subclones, o existencia de pólipos serrados, son más evidentes en CRCs MSI-H esporádicos; mientras que aspectos como la infiltración linfocitaria, la presencia de adenomas tradicionales y una edad de comienzo temprano, son más notables en los CRCs del síndrome de Lynch (Jass, 2004; Young et al., 2001).

Aunque en ambos tipos de afecciones, la inestabilidad de microsatélites se origina por defectos en los principales genes del sistema MMR, los mecanismos que conducen a estas alteraciones en los CRCs esporádicos y hereditarios con fenotipo MSI-H son diferentes. Mientras en el síndrome de Lynch la inactivación génica del sistema MMR sucede como consecuencia de una mutación en la línea germinal, en los CRCs esporádicos, es el resultado de un proceso de silenciamiento epigenético (Figura 3).

5.1.1. Síndrome de Lynch

El síndrome de Lynch es un síndrome de cáncer familiar de herencia autosómica dominante. Los individuos con este desorden muestran una predisposición a padecer varios tipos de cáncer (intestino delgado, estómago, tracto urinario, ovarios...), pero especialmente de colon y endometrio (Lynch & de la Chapelle, 2003). Supone un 2-5% de todos los casos de CRC (Hampel et al, 2008), y los individuos afectados presentan un 50-80% de riesgo de desarrollar este tumor, frente al 5-6% de probabilidades que tiene la población general (Chung & Rustgi, 2003; Schoen, 2002).

Se origina como consecuencia de mutaciones en la línea germinal de uno de los cuatro genes principales que forman parte del sistema de reparación de bases desapareadas (MMR), como son *hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6* y *hPMS2* (Figura 3). Las mutaciones en *hMSH2* y *hMLH1* son las más frecuentes, suponiendo hasta el 90% de los casos de síndrome de Lynch; las alteraciones en *hMSH6* se encuentran en un 10% de los individuos afectados y las mutaciones en *hPMS2* se detectan en raras ocasiones (Rustgi, 2007). De acuerdo con el modelo de tumorigénesis de Knudson, el fenotipo MSI-H precisa la inactivación bialélica (“*doble hit*”) del gen MMR responsable para el desarrollo tumoral (Knudson 1971; Knudson 2001). De manera que, además del alelo mutante transmitido en la línea germinal, debe darse un segundo suceso somático en el colonocito, que afecte al alelo salvaje. En los tumores del síndrome de Lynch, se han descrito varios mecanismos implicados en la inactivación del alelo salvaje (“*wild type*”): pérdida de heterocigosidad (LOH), mutación somática y metilación del promotor. Según la mayoría de los estudios, el mecanismo más frecuente es la pérdida del alelo salvaje, detectada en 33-86% de los casos (Tuupanen et al., 2007). Las mutaciones somáticas en el segundo alelo, que normalmente están asociadas a tumores deficientes en *hMLH1* y *hMSH2*, tienen una baja frecuencia (Tuupanen et al., 2007). Por otro lado, estudios avanzados que permitían cuantificar la metilación mediante PCR cuantitativa, demostraron que la metilación del promotor del gen *hMLH1* no se producía, o si estaba presente era a muy bajo nivel en los CRCs del síndrome de Lynch (Bettstetter

et al., 2007). Aunque, de acuerdo con esos trabajos, no se pueda excluir totalmente la posibilidad de una metilación monoalélica en el síndrome de Lynch, lo cierto es que la cuantificación de la metilación del promotor *hMLH1* es una herramienta molecular muy útil para poder distinguir entre esta afección y los casos esporádicos de CRC (léase siguiente apartado).

El diagnóstico clínico del síndrome de Lynch exige realizar un análisis detallado del historial familiar. En 1991 y 1999, expertos que formaron parte del “*International Collaborative Group on HNPCC*” formularon los criterios de Amsterdam I y II (Tablas 1 y 2), respectivamente, para la identificación de individuos con riesgo de padecer síndrome de Lynch (Vasen et al., 1991; Vasen et al., 1999). Sin embargo, más del 50% de las familias con este síndrome no cumplían estos criterios (Lindor et al., 2005). En 1996, un workshop internacional sobre HNPCC realizado por el “*National Cancer Institute*” estableció la guía de Bethesda (Tabla 3), que posibilitaba la indentificación de un espectro más amplio de pacientes con alto riesgo de padecer esta afección (Rodríguez-Bigas et al., 1997).

Tabla 1. Criterios de Amsterdam I

1. Al menos, tres familiares con CRC.
2. Al menos, dos afectos deben ser familiares de primer grado.
3. Al menos, dos generaciones sucesivas tienen que estar afectadas.
4. Al menos un CRC se ha tenido que diagnosticar antes de los 50 años.
5. La poliposis adenomatosa familiar (FAP) tiene que excluirse.

Tabla 2. Criterios de Amsterdam II

1. Al menos, tres familiares con cáncer asociado a HNPCC
2. Al menos, dos afectos deben ser familiares de primer grado.
3. Al menos, dos generaciones sucesivas tienen que estar afectadas.
4. Al menos un HNPCC se ha tenido que diagnosticar antes de los 50 años.
5. La poliposis adenomatosa familiar (FAP) tiene que excluirse.
6. Los tumores tienen que ser verificados por examen anatómo-patológico.

Tabla 3. Criterios de Bethesda

1. CRC diagnosticado antes de los 50 años.
2. Independientemente de la edad del individuo, presencia de CRC u otros tipos de tumores asociados al síndrome, simultáneos o diagnosticados en distintos momentos.
3. CRC con MSI-H diagnosticado histológicamente antes de los 50 años.
4. CRC o tumor asociado al síndrome diagnosticado antes de los 50 años en, al menos, un familiar de primer grado.
5. CRC o tumor asociado al síndrome diagnosticado en dos o más familiares, independientemente de la edad.

La evaluación del historial familiar permite la detección inicial de individuos posiblemente afectados, que pasan a ser estudiados en profundidad mediante el análisis genético de las mutaciones o bien, mucho más útil y menos costoso, mediante el estudio de la inestabilidad de microsatélites y el empleo de la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) en tumores colorrectales. Los defectos en genes MMR conducen normalmente a la pérdida de expresión de una proteína detectable en el núcleo de las células tumorales, proporcionando la posibilidad de emplear técnicas de inmunohistoquímica para detectar mutaciones en genes MMR. Las mutaciones en los genes *hMSH2* y *hMLH1* suponen más del 70% de todas las mutaciones del sistema MMR en el síndrome de Lynch. Por esta razón, todos los esfuerzos de la técnica IHQ se han centrado en la utilización de anticuerpos frente a las proteínas *hMSH2* y *hMLH1* para conseguir detectar el síndrome (Salahshor et al., 2001; Wahlberg et al., 2002). La sensibilidad de la técnica IHQ, utilizando anticuerpos frente a *hMSH2* y *hMLH1*, en la predicción de mutaciones en los correspondientes genes es del 85% (Shia, 2008). Sin embargo, la técnica IHQ ha evolucionado hasta la ampliación a un panel de cuatro anticuerpos (*hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* y *hPMS2*), que logra incrementar la sensibilidad a un 94% en la predicción de la mutación génica (Pino & Chung, 2010^b). Además, varios trabajos han recogido la estrecha asociación entre tumores con fenotipo MSI-H y la ausencia de expresión de las proteínas *hMSH2* o *hMLH1*, de manera que la IHQ utilizando anticuerpos monoclonales frente a las proteínas mencionadas, resulta muy útil en la detección de tumores del grupo MSI-H (Dietmaier et al., 1997; Thibodeau et al., 1998).

5.1.2. CRCs Esporádicos con MSI-H

Las deficiencias en el sistema MMR están presentes en, aproximadamente, el 15% de todos los CRCs esporádicos. En contraste con lo que ocurre en el síndrome de Lynch, la causa de la MSI-H en estos tumores esporádicos es la metilación bialélica de secuencias ricas en residuos de citosina y guanina (islas CpG) de la región promotora del gen *hMHL1* (Herman et al., 1998; Herman & Baylin, 2003; Miyakura et al., 2004; Veigl et al., 1998; Wheeler et al., 2000) (Figura 3). Rara vez estos tumores MSI-H presentan LOH o mutaciones somáticas (Tuupanen et al., 2007). La modificación epigenética mediante metilación, promueve el silenciamiento del gen y en consecuencia, la falta de expresión de la proteína. Parece ser que la metilación aberrante del ADN surge muy temprano, inicialmente en la mucosa normal del colon, y puede ser parte de un defecto relacionado con la edad, como se ha observado en el cáncer colorrectal esporádico (Söreider et al., 2005). La metilación aberrante también contribuye, en estadíos más tardíos, a la formación y progresión del cáncer colorrectal a través del fenotipo metilador de islas CpG (CIMP). El fenotipo CIMP parece estar presente en casi la mitad de los CRCs esporádicos, y determina un tipo tumoral con características patológicas, clínicas y moleculares muy diferentes (Lin et al., 2004; Lind et al., 2004; Toyota et al., 1999^a). Existe un considerable “*overlap*” entre CIMP y MSI-H en los CRCs esporádicos (Imai &

Yamamoto, 2008), sin embargo no es totalmente exacto (Aquilina et al., 1994; Parsons et al., 1993; Perucho et al., 1996), pues aunque se ha postulado que CIMP es la causa que explica el silenciamiento del gen *hMLH1* en los carcinomas colorrectales esporádicos con MSI-H (Kane et al., 1997; Kuismanen et al., 2000) (Figura 3), hay cánceres con una extensa metilación que no presentan el fenotipo mutador (Söreider et al., 2005))

Otra marcada diferencia de los CRCs esporádicos con MSI-H frente a los CRCs asociados al síndrome de Lynch, está relacionada con el gen *BRAF*, que codifica una Ser/Thr kinasa de las vías RAS/RAF/MAP-kinasas. Las mutaciones en *BRAF* juegan un papel importante en varios tipos de tumores humanos (Dhomen & Marais, 2007). Entre los CRCs esporádicos, las mutaciones en *BRAF* son detectadas con mayor frecuencia en aquellos con MSI-H (Domingo et al., 2004^a; Oliveira et al., 2003; Rajagopalan et al., 2002). De hecho, la mutación oncogénica V600E (mutación “*hot spot*”) en el gen *BRAF* está presente con mayor frecuencia en CRCs esporádicos con MSI-H, pero no en los CRCs relacionados con el síndrome de Lynch (Domingo et al., 2004^a; Domingo, et al., 2005) (Figura 3). Por tanto, la mutación V600E en *BRAF* puede resultar de utilidad para el “*screening*” de las familias con este síndrome hereditario (Domingo et al., 2004^b). Las mutaciones que afectan a *BRAF* y a *KRAS*, otro miembro de la vía de señalización RAS/RAF/MAP-kinasas, son mutuamente excluyentes (Fransén et al., 2004; Fujiwara et al., 1998; Koinuma et al., 2004; Rajagopalan et al., 2002; Oliveira et al., 2003; Wynter et al., 2004). De hecho, los CRCs esporádicos con MSI-H rara vez presentan mutaciones en *KRAS*. Estos datos sugieren que los tumores de colon progresan teniendo alterados distintos genes de la vía RAS/RAF/MAP-kinasa, dependiendo del proceso genético/epigenético que conduce a la deficiencia MMR (mutación *versus* metilación del promotor *hMLH1*) (Oliveira et al., 2004).

En definitiva, los CRCs esporádicos con fenotipo MSI-H se caracterizan por presentar una extensa metilación del ADN y mutación en el gen *BRAF* (Figura 3). Estas alteraciones genéticas no se observan en los CRCs asociados al síndrome de Lynch (McGivern et al., 2004; Wang L et al., 2003), e igualmente son raras en adenomas esporádicos (Chan et al., 2003; Kambara et al., 2004; Konishi et al., 2004). De hecho, la metilación extensa del ADN es un hallazgo frecuente en pólipos serrados que se desarrollan a nivel del colon proximal (Wynter et al., 2006; Yang S et al., 2004), los cuales también presentan con frecuencia la mutación en el oncogén *BRAF* (Kambara et al., 2004). De esta forma, está bastante extendida la idea de que los CRCs esporádicos con MSI-H se originan a partir de pólipos serrados (Goldstein et al., 2003; Torlakovic et al., 2003). La evidencia más convincente de este hecho es la observación directa de la transición pólipo serrado-displasia-carcinoma, apoyada por una correlación inmunohistoquímica y molecular (Iino et al., 1999; Jass et al., 2000; Mäkinen et al., 2001; Oh K et al., 2005). Así, mientras que los pólipos serrados, teniendo en cuenta el espectro de alteraciones genéticas observadas en los mismos, son el origen principal de los CRCs MSI-H esporádicos, la secuencia convencional adenoma-carcinoma iniciada por alteraciones en *APC* y

subsecuentemente conducida por mutaciones en *KRAS*, está asociada con mayor probabilidad, a la evolución temprana del CRC en el síndrome de Lynch.

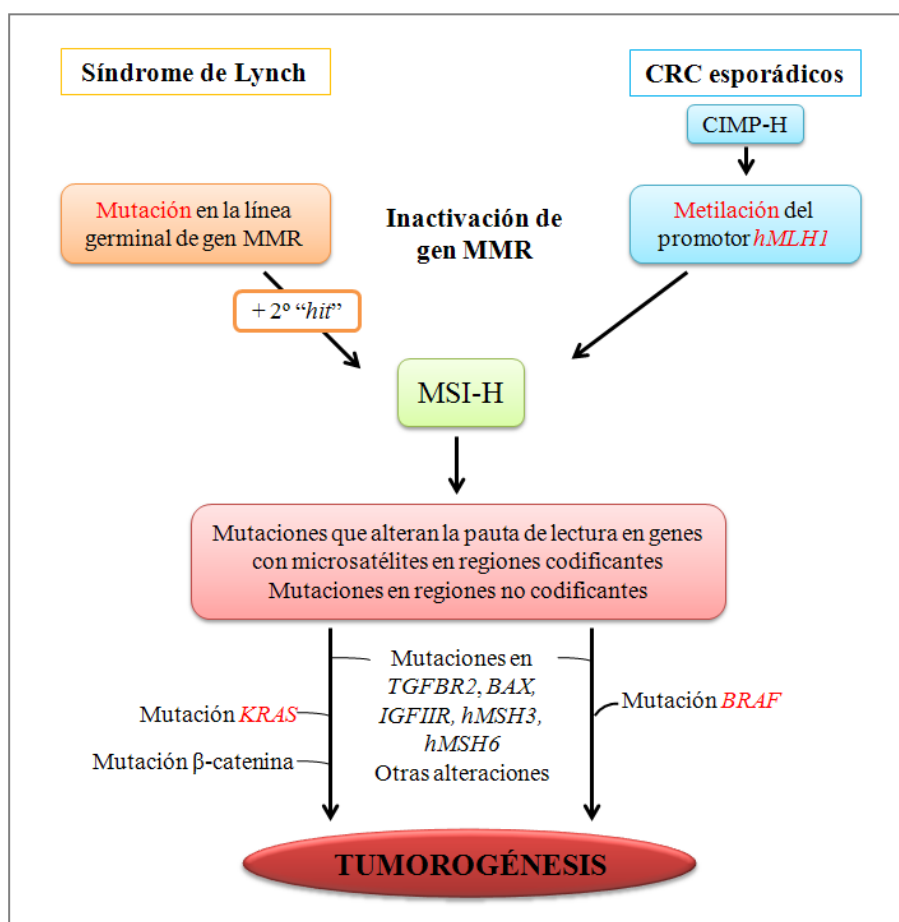


Figura 3. Vías moleculares en CRCs esporádicos con MSI.

Imagen adaptada de Imai & Yamamoto, Carcinogenesis, 2008; 29: 673-80

5.2. El Sistema de Reparación de Bases Desapareadas (*MisMatch Repair System, MMR*)

El sistema MMR está constituido por un grupo de polipéptidos altamente conservados, responsables del mantenimiento de la fidelidad del ADN mediante la detección y reparación de errores que se acumulan durante el proceso de replicación (Fishel, 1998; Marra & Boland, 1996). Los primeros estudios que demostraron la existencia de una corrección de errores en el ADN genómico fueron en bacterias y levaduras. Gracias a estos trabajos y a numerosas investigaciones posteriores, se llegó a un conocimiento extenso de los mecanismos moleculares implicados en el proceso de reparación de daño en ADN (Holliday, 1964; Lahue et al., 1989; Witkin & Sicurella 1964). Más tarde se confirmó que en organismos multicelulares, un fallo en el sistema MMR podía generar células con potencial

tumorigénico. Los últimos hallazgos culminaron con el descubrimiento de una asociación entre deficiencias en genes del sistema MMR y el síndrome de Lynch (Marra & Boland, 1995).

El sistema MMR repara los errores residuales que, aparentemente, escapan de la función normal de edición de la ADN polimerasa. En principio, pueden surgir dos tipos de errores en el emparejamiento de bases del ADN. El primero consiste en una falta de complementariedad de bases yuxtapuestas, lo que se conoce como bases desapareadas (“*base-base mispairing or mismatching*”) (Figura 4). Estas bases desapareadas pueden ser formas de purina-purina (G-G, A-A, G-A); pirimidina-pirimidina (C-C, T-T, T-C) o purina-pirimidina (G-T, T-G, A-C). Todas estas formas desapareadas, excepto C-C, pueden corregirse por acción del sistema MMR. El segundo tipo de error en el emparejamiento surge como consecuencia de un alineamiento incorrecto de las dos hebras sencillas complementarias que componen el ADN. Como resultado se generan bucles (“*loops*”) de cadena sencilla de una o más bases desapareadas en el dúplex de ADN (Figura 4). Estos bucles, conocidos como bucles de inserción-delección, también pueden repararse por acción de las proteínas del sistema MMR.

Durante la replicación del ADN, las bases desapareadas surgen como consecuencia de la incorporación incorrecta de una base no complementaria en la hebra de ADN recién sintetizada, mientras que los bucles de inserción-delección se originan por un deslizamiento (“*slippage*”) de la ADN polimerasa en secuencias de repetición (microsatélites) (Figura 4). Si estos errores escapan a la función de corrección de pruebas de la ADN polimerasa, terminan siendo subsanados por el sistema MMR. Pero si el sistema de corrección falla, las bases desapareadas pueden originar transiciones o transversiones de nucleótidos que alteran la secuencia génica, mientras que los bucles de inserción-delección producen mutaciones que alteran la pauta de lectura (“*frameshift mutations*”). De esta manera, dependiendo de si el bucle se localiza en la hebra molde o en la hebra hija, la mutación que se origina será una delección o una inserción, respectivamente (Figura 4). En cualquier caso, si no se produce la reparación del error antes de la siguiente ronda replicativa, la hebra parental original se copiará correctamente, pero la hebra que ha sido sintetizada de forma incorrecta contiene una mutación que se fijará por tanto, en el 50% de la descendencia (Marra & Boland, 1996; Marra & Schär, 1999).

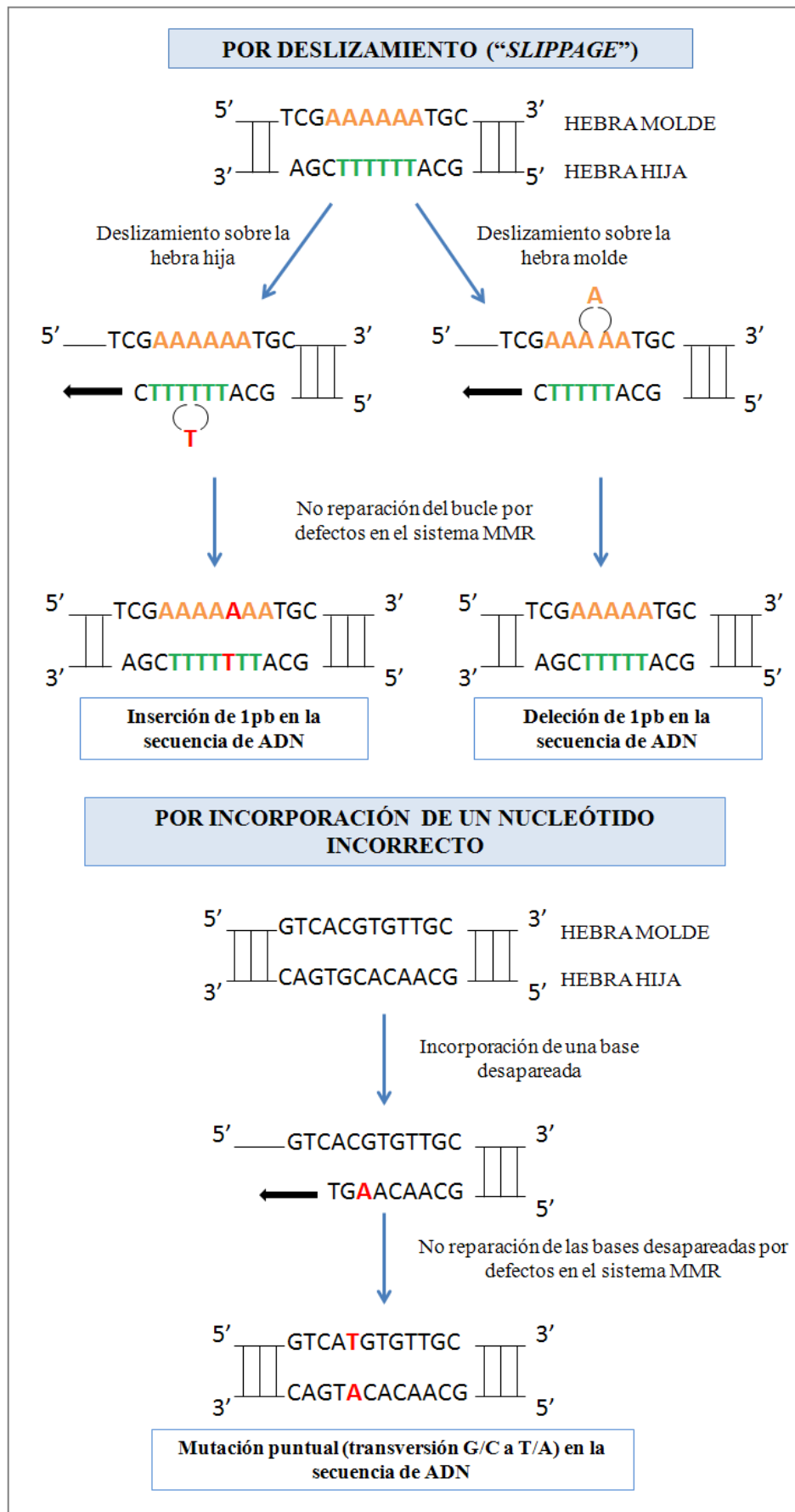


Figura 4. Tipos de errores originados durante la replicación del ADN y principales mutaciones asociadas como consecuencia de un sistema MMR alterado.

5.2.1. El Mecanismo de Corrección de Errores del Sistema MMR

Las proteínas que componen al sistema MMR, muy conservadas evolutivamente, pertenecen a la familia de proteínas homólogas de MutS (“*MutS homologue*”: MSH) y a la familia de proteínas homólogas de MutL (“*MutL homologue*”: MLH). El nombre de las proteínas humanas deriva de los de bacterias y levaduras (MutS y MutL), y se denominan *hMutL* y *hMutS*. En general, se han identificado cinco genes humanos homólogos de MutS (*hMSH2*, *hMSH3*, *hMSH4*, *hMSH5*, *hMSH6*) y cuatro homólogos de MutL (*hMLH1*, *hMLH3*, *hPMS1* y *hPMS2*). En el síndrome de Lynch, como vimos con anterioridad, los genes afectados pueden ser *hMSH2*, *hMSH6* (“*human Mut S homologues*”), *hMLH1* (“*human Mut L homologue*”) o *hPMS2* (“*human postmitotic segregation*”, un homólogo de Mut L) (Akiyama et al., 1997; Bronner et al., 1994; Fishel et al., 1993; Leach et al., 1993; Papadopoulos et al., 1994). En general, las proteínas del sistema MMR reconocen la deformación física que permanece en el ADN debido a los errores acumulados, se unen al nucleótido con la base desapareada en la hebra hija del dúplex de ADN o al “*loop*” de secuencia de microsatélites replicada de forma inexacta, y marcan el área del ADN para escisión, resíntesis y ligación (Fishel et al., 1994).

5.3. Genes Dianas que median la Carcinogénesis en los Tumores MSI.

Sabemos, entonces, que la inestabilidad de microsatélites (MSI) en el cáncer humano (principalmente colorrectal, pero también gástrico o de endometrio), ya sea en casos esporádicos o heredados, tiene su origen en la inactivación de genes pertenecientes al sistema de reparación de bases desapareadas (MMR). El resultado es, como ya hemos visto con anterioridad, un cambio en la longitud de secuencias de microsatélites. Estas secuencias repetitivas cortas se localizan normalmente en regiones no codificantes del genoma, pero también están presentes dentro de regiones codificantes de un selecto número de genes implicados en el inicio y progresión tumoral. Una alteración en la longitud de la secuencia de microsatélites, dentro de estos genes reguladores del crecimiento, provoca una mutación en la pauta de lectura que normalmente se traduce en una proteína inactiva. El fenotipo MSI, conduce, pues, a la acumulación de numerosas alteraciones en genes supresores claves, cuya inactivación se asocia a la patogénesis del tumor.

En principio, cualquier gen que contiene secuencias de repetición podría ser considerado un gen diana, propenso a acumular mutaciones de pauta de lectura como consecuencia de los defectos en genes MMR. Sin embargo, se cree que la mayoría de estas mutaciones en regiones codificantes no contribuyen al desarrollo tumoral. Hasta fechas recientes, la literatura ha recogido aproximadamente, 30 genes diana que aparecen alterados frecuentemente en tumores MSI-H, con implicación en la

carcinogénesis, y que son seleccionados durante la progresión tumoral (Duval & Hamelin, 2002) (Tabla 4).

En 1995 se identificó el primer gen diana en el cáncer colorrectal MSI-H, el gen *TGFBR2* (Markowitz et al., 1995). La mutación consiste en la delección de 1 a 2 pb en la secuencia de poli(A)₁₀ localizada al principio de la región codificante del gen. Esta mutación, que está presente en ~85% de los tumores colorrectales con MSI, inactiva al receptor TGFBR2 (Parsons et al., 1995; Wang et al., 1995), promoviendo el escape de las células tumorales a la acción supresora del crecimiento del ligando TGFβ. Después se detectaron otros cuatro genes con repeticiones de mononucleótidos en sus secuencias codificantes que aparecían alterados, con diferentes frecuencias, en tumores MSI-H. Estos genes, *BAX*, *MSH3*, *MSH6* y *IGFIIR*, mostraban el mismo tipo de alteración en sus secuencias de repetición de (G)₈, (A)₈, (C)₈, y (G)₈, respectivamente (Souza et al., 1996; Malkhosyan et al., 1996; Rampino et al., 1997). La mutación que afecta al gen *BAX* se ha encontrado en el 50% de los cánceres colorrectales con MSI. *BAX* forma un heterodímero con *BCL2* dentro de la célula, desencadenando el proceso de muerte celular programada. La mutación en el gen *BAX* impide que se de este proceso, contribuyendo a la inmortalización celular. (Rampino et al., 1997, Yamamoto et al., 1997). Las mutaciones en los genes *TGFBR2* y *BAX* se detectan con alta frecuencia en los estadios tempranos de la tumorigénesis colorrectal MSI, e incrementan con el grado de displasia y la transición a carcinoma (Woerner et al., 2005). El 15% de los tumores con MSI presentan mutaciones de pauta de lectura en el gen *IGFIIR*, que actúa como un regulador del ciclo celular (Souza et al., 1996). Los genes *MSH3* y *MSH6* pertenecen al sistema MMR y, curiosamente, contienen repeticiones de siete o más nucleótidos en sus secuencias codificantes (Chang et al., 2001). Una vez que la actividad MMR en el ADN está alterada, el resto de genes del sistema MMR son propensos a acumular mutaciones en sus secuencias repetitivas, conduciendo a un proceso por el que, progresivamente, el sistema MMR entero puede ser inactivado (Perucho, 1996). La pérdida de la actividad MMR acelera enormemente la tasa de acumulación de mutaciones en genes responsables de la restricción del crecimiento celular. Esto refuerza la hipótesis del fenotipo mutador, responsable de la rápida progresión neoplásica en el síndrome de Lynch y en CRCs con MSI esporádicos (Aaltonen et al., 1993; Tsao et al., 2000).

Con posterioridad, se han ido detectando un número de genes con mutaciones análogas a las descritas anteriormente y con un papel en la carcinogénesis humana (Tabla 4). La mayoría de estos genes han sido identificados en CRCs con MSI, y de hecho sus frecuencias de mutación son, en general, superiores en estos tumores con inestabilidad de microsatélites frente a los casos de cáncer gástrico y de endometrio con MSI (Duval & Hamelin, 2002). No sólo se observa una variabilidad en las frecuencias de mutación en estos genes, sino que además, las alteraciones genéticas pueden seleccionarse de manera recesiva o dominante en estos cánceres y tienen diferentes consecuencias funcionales. En la mayoría de los casos una mutación de alteración en la pauta de lectura conduce a la inactivación de la proteína, pero hay casos en los que se observa un efecto oncogénico. Se sabe

también que estas mutaciones, en el contexto de un alto grado de inestabilidad de microsatélites, pueden ser específicas de tejido, así como afectar a genes implicados en la misma vía de señalización, teniendo un efecto sinérgico (Duval & Hamelin, 2002).

En general, los genes dianas en tumores con MSI-H se dividen en categorías funcionales como genes supresores de tumores, genes que intervienen en la reparación del ADN o que están implicados en el proceso de apoptosis (Duval & Hamelin, 2002, Imai & Yamamoto, 2008). Pero también se han detectado mutaciones en el contexto MSI, que alteran la pauta de lectura en genes con un papel en la inmuno-vigilancia, especialmente en el gen que codifica la cadena β_2m , componente de las moléculas HLA de clase I (Kloor et al., 2005). Un aspecto llamativo referente al gen *B2m* como diana de la carcinogénesis MSI-H, es que las secuencias de microsatélites localizadas en sus exones contienen un número de repetición de mono ([N]5) o di-nucleótidos ([CT]4) inferior a las regiones repetitivas de otros genes diana (Tabla 4), y sin embargo, muestra una alta tasa de mutación (30-60%) (Cabrera et al., 2003; Kloor et al., 2005; Yamamoto et al., 2001).

Tabla 4. Lista de genes diana con mutaciones en secuencias de repetición en tumores con fenotipo MSI-H.

Gen Diana	Mononucleótido de repetición	Función génica
<i>ACTRII</i>	(A)8	Receptor de factor de crecimiento
<i>AIM2</i>	(A)10	Proteína inducible por interferón
<i>APAF1</i>	(A)8	Factor pro-apoptótico
<i>AXINA 2</i>	(A)6*2, (G)7, (C)6	Señalización Wnt
<i>BAX</i>	(G)8	Factor pro-apoptótico
<i>BCL10</i>	(A)8	Factor pro-apoptótico
<i>BLM</i>	(A)9	Respuesta al daño en ADN
<i>Caspasa-5</i>	(A)10	Factor pro-apoptótico
<i>CDX-2</i>	(G)7	Factor transcripcional Homeobox
<i>CHK1</i>	(A)9	Respuesta al daño en ADN
<i>FAS</i>	(T)7	Factor pro-apoptótico
<i>GRB14</i>	(A)9	Proteína de unión a factor de crecimiento
<i>HG4-1</i>	(A)8	Ciclo celular
<i>IGFIIR</i>	(G)8	Receptor de factor de crecimiento
<i>KIAA0977</i>	(T)9	Homólogo de ratón cordon bleu
<i>MBD4</i>	(A)10	Proteína de unión a ADN glicosilasa y metil CpG
<i>MLH3</i>	(A)9	MMR
<i>MSH3</i>	(A)8	MMR
<i>MSH6</i>	(C)8	MMR
<i>NADH-UOB</i>	(T)9	NADH ubiquinona oxidoreductasa
<i>OGT</i>	(T)10	GlcNAc transferasa
<i>PTEN</i>	(A)6*2	Ciclo celular
<i>RAD50</i>	(A)9	Respuesta a daño en ADN
<i>RHAMM</i>	(A)9	Motilidad celular
<i>RIZ</i>	(A)8, (A)9	Ciclo celular y proteína apoptótica
<i>SEC63</i>	(A)10, (A)9	Proteína de membrana de RE
<i>SLC23AI</i>	(C)9	Transportador nucleobase
<i>TCF4</i>	(A)9	Factor de transcripción (vía Wnt)
<i>TGFBR2</i>	(A)10	Inhibidor del crecimiento celular
<i>WISP3</i>	(A)9	Factor de transcripción (vía Wnt)

* indica la existencia de dos repeticiones del nucleótido señalado. Tabla adaptada de Duval & Hamelin, *Annales Génétique*, 2002; 45:71-75

5.4. Detección de la Inestabilidad de Microsatélites.

Aproximadamente, el 15% de todos los CRCs presentan MSI. En la clínica, la importancia de la detección del fenotipo MSI radica en tres hechos fundamentales: primero, contribuye a la identificación de pacientes con síndrome de Lynch; segundo, los tumores con MSI tienen mejor pronóstico que los tumores estables. La supervivencia es significativamente mejor en pacientes jóvenes con MSI, y esta mejora de la supervivencia se encuentra en todos los estadios de la enfermedad (Gryfe et al., 2000). Y tercero, los CRCs con MSI no tienen la misma respuesta a la administración de quimioterapia que los tumores MSS.

La estrategia más extendida para la detección del fenotipo MSI es la amplificación, mediante PCR, de marcadores de microsatélites, partiendo del ADN extraído del tejido tumoral, así como también del tejido normal (Figura 5). Los fragmentos amplificados se separan por electroforesis y se compara si existe diferencia entre el tamaño del fragmento derivado del tumor y el que se obtiene del ADN normal o control. Si se observa una variación entre el tamaño de ambos fragmentos, se confirma la presencia de inestabilidad para el marcador empleado (Figura 5). Inicialmente, en el estudio de MSI se podrían utilizar muchos y muy variables loci de microsatélites específicos. Sin embargo, con el objetivo de proporcionar uniformidad en esta área y facilitar, así, la comparación entre estudios, el “workshop” del *National Cancer Institute*, celebrado en 1997, recomendó un panel de referencia de cinco marcadores de microsatélites (marcadores de Bethesda) compuestos por dos repeticiones de mononucleótidos (*BAT26* y *BAT25*) y tres repeticiones de dinucleótidos (*D5S346*, *D2S123*, *D17S250*) (Boland et al., 1998) (Tabla 5). Empleando este panel de trabajo, los tumores que presentan inestabilidad en dos o más marcadores se definen con el término alta frecuencia de inestabilidad (MSI-H), mientras que los que muestran inestabilidad en un marcador se clasifican como MSI-Low, o baja frecuencia de inestabilidad (MSI-L) (Tabla 6). Aquellos tumores que no presentan inestabilidad en ninguno de los marcadores del panel se incluyen en el grupo de los tumores estables (MSS) (Tabla 6). Si se utilizan más de cinco marcadores, empleando loci de microsatélites alternativos (Tabla 7), se procede al uso de porcentajes. Así, el grupo MSI-H se define cuando existe inestabilidad en $\geq 30-40\%$ de los marcadores utilizados, mientras que los tumores se clasifican como MSI-L cuando exhiben MSI en $< 30-40\%$ de los marcadores (Tabla 6).

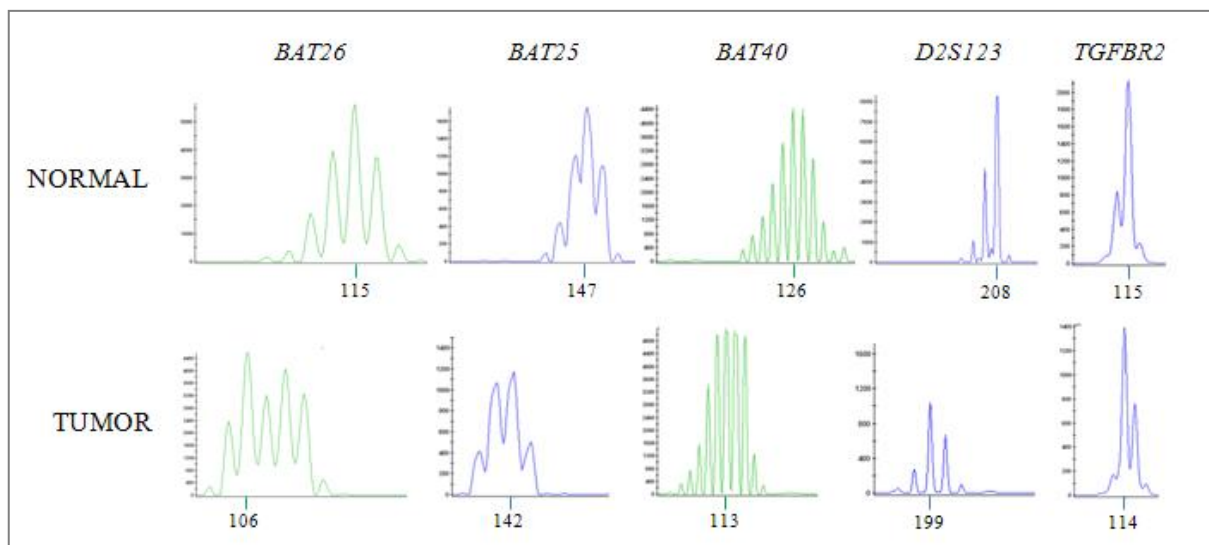


Figura 5. Análisis de MSI en un carcinoma colorrectal de nuestro estudio empleando marcadores de microsatélites consensuados por el “workshop” del National Cancer Institute. El estudio se realizó utilizando ADN extraído del tejido tumoral, y comparando los resultados con los obtenidos a partir del ADN normal de sangre periférica. Este tumor mostraba una alteración en la longitud de la secuencia (delección) en los cinco marcadores analizados con respecto al tejido normal, de ahí que fue catalogado como CRC con alto grado de inestabilidad de microsatélites (MSI-H).

Tabla 5. Panel de referencia de marcadores usados en la detección de MSI en el cáncer colorrectal

Marcador	Gen	Repetición de MS	Localización cromosómica	Localización de la repetición MS
D2S123	Ligado a <i>MSH2</i>	CA (n)	2p16	
D5S346	Ligado a <i>APC</i>	CA (n)	5q22-23	
D17S250	Ligado a <i>p53</i>	CA (n)	17q12	
BAT-25	<i>ckit</i>	A (25)	4q12	Intrón 16
BAT-26	<i>MSH2</i>	A (26)	2p21	Intrón 5

MS: microsatélite

Tabla adaptada de Boland et al., *Gastroenterology*, 2010; 138(6): 2073-87

Tabla 6. Criterios internacionales para la evaluación de MSI en el CRC

	5 loci analizados	> 5 loci analizados	Interpretación
Nº marcadores que presentan inestabilidad	≥ 2	≥ 30-40%	MSI-H
	1	<30-40%	MSI-L
	0	0	MSS o MSI-L

Tabla adaptada de Boland et al., *Cancer Res*, 1998; 58:5248-57.

Tabla 7. Loci alternativos al panel de referencia de cinco marcadores para la evaluación de MSI en el CRC.

Loci alternativos			
BAT40	D18S55	D3S1029	D5S107
BAT34C4	D18S58	D10S197	D8S87
TGF β RII	D18S61	D13S175	D18S69
ACTC (635/636)	D18S64	D17S588	D13S153
			D17S787
			D7S159
			D20S100

Tabla adaptada de Boland et al., *Cancer Res*, 1998; 58:5248-57.

En general, se recomienda la evaluación de marcadores alternativos, adicionales al panel de referencia, para distinguir entre tumores MSI-L y tumores MSS (Boland et al., 1998) (Tabla 7). Aunque, inicialmente, se definen tres fenotipos tumorales en función de la presencia y el grado de MSI (MSI-H, MSI-L y MSS), existe mucha controversia acerca de si los tumores MSI-L constituyen un grupo claramente definido. Hay autores que defienden que los tumores MSI-L no se distinguen de los tumores MSS, y que por lo tanto deben combinarse en un solo grupo. Argumentan que el panel de referencia de cinco microsatélites (Tabla 5) contiene un número insuficiente de marcadores para concluir con certeza que un tumor, aparentemente MSS, no pudiese demostrar MSI si se empleara un panel extendido de microsatélites. Es decir, si se utilizara un número suficiente de marcadores, sería posible que todos los CRCs exhibieran MSI-L (Boland et al., 1998). Además, si bien existen diferencias entre los tumores MSI-H y los MSI-L/MSS, no parece haberlas entre el grupo MSI-L y MSS en lo que respecta a parámetros clínicos y patológicos, como la localización tumoral, estadio, sexo, ploidía, y resultado en la clínica (Cawkwell et al., 1995; Dietmaier et al., 1997; Krishna et al., 1997; Lolhe et al., 1993; Risio et al., 1996; Rüschoff et al., 1997; Samowitz et al., 1995; Thibodeau et al., 1994).

Sin embargo, se han encontrado evidencias que sugieren que los tumores MSI-L forman una única entidad. MSI-L se asocia con la pérdida de expresión de la proteína *O*(6) metilguanina-DNA metiltransferasa (MGMT), que actúa reparando los residuos de guanina que aparecen metilados de forma inapropiada en el ADN. Se ha sugerido que los mecanismos implicados en el desarrollo de MSI-L son la pérdida de MGMT, y la metilación parcial y pérdida de expresión del gen *MLH1* (Tuppurainen et al., 2005; Whitehall et al., 2001). Parece, además, que el fenotipo MSI-L se correlaciona positivamente con mutaciones en *KRAS* y fenotipo CIMP-L (CIMP-Low) (Ogino et al., 2007). Se ha comprobado, también, que los tumores MSI-L muestran inestabilidad en la región de repetición de trinucleótidos de *RAS-induced senescence 1 (RIS-1)* (Iglesias et al., 2006). Parece que el fenotipo MSI-L es un factor pronóstico independiente y adverso en estadio III de CRCs, sobre todo cuando está asociado a la mutación de *RIS-1* (Kohonen-Corish et al., 2005). Por último, Mori et al

validaron la existencia de tumores MSI-L como una categoría molecular distinta en función de perfiles de expresión génica (Mori et al., 2003).

Existen estrategias alternativas que permiten detectar tumores con defectos en la actividad del sistema MMR, muy útil en el diagnóstico de pacientes con síndrome de Lynch, como hemos visto con anterioridad. Prácticamente, todos los tumores MSI-H muestran una pérdida de expresión de las proteínas MLH1 y MSH2, de manera que la utilización de anticuerpos monoclonales frente a estas proteínas del sistema MMR puede resultar útil en la identificación de tumores con fenotipo MSI-H (Dietmaier et al., 1997; Thibodeau et al., 1998).

5.5. Respuesta al Tratamiento del CRC con Fenotipo MSI-H.

Se sabe desde hace tiempo que el sistema MMR está implicado en señalar una respuesta de muerte celular tras un daño suficientemente tóxico en el ADN, y que las células deficientes en este sistema MMR son relativamente tolerantes al daño en ADN (Branch et al., 1993; Kat et al., 1993). Consecuentemente, también se ha encontrado que esto sucede en células de CRC, y que la recuperación del sistema MMR restauraría la sensibilidad de varios componentes que dañan el ADN (Carethers et al., 1996; Hawn et al., 1995), incluyendo agentes quimioterapéuticos como el fluorouracilo (FU) (Aebi et al., 1996). Por lo tanto, en un principio se predijo que los pacientes con CRC que presentaban fenotipo MSI, serían relativamente resistentes a los beneficios de las terapias basadas en FU.

Sin embargo, hasta la fecha, los estudios clínicos realizados acerca del valor predictivo de la MSI en el uso de la quimioterapia con FU, para mejorar la supervivencia de pacientes con CRC, sólo han dado resultados contradictorios. El primer estudio afirmó que los tumores con MSI respondían mejor a la quimioterapia adyuvante que los tumores sin MSI (Elsaleh et al., 2000). Desde entonces, los trabajos subsiguientes han encontrado resultados totalmente opuestos, incluso Ribic et al. sugirieron un peor pronóstico de los pacientes con CRC que mostraban el fenotipo MSI tras el tratamiento con FU (Ribic et al., 2003). Basados en este hallazgo, varios autores propusieron que no era recomendable el uso de la quimioterapia adyuvante en pacientes con este tipo de CRC (Boland, 2007; Sinicrope & Sargent, 2009). Una posible explicación a la enorme discrepancia generada por los resultados de los distintos trabajos, es la heterogeneidad de CIN y CIMP presentes en los CRC con fenotipo MSI, que podrían influenciar y ser más importantes en la respuesta a drogas citotóxicas, que la propia deficiencia en el sistema MMR (Iacopetta et al., 2010). En función de esto, sería necesario realizar más trabajos que determinen si los subgrupos CIN y CIMP responden diferencialmente a la quimioterapia adyuvante. Por el contrario, también se ha propuesto que el mal resultado observado en la respuesta a los regímenes terapéuticos, es debido a sus efectos inmunosupresores, que perjudicarían la inmunidad

anti-tumoral observada en pacientes con MSI (Boland & Goel, 2010). De esta forma, la administración de drogas sin demasiada inmunotoxicidad sería beneficiosa para pacientes con CRC con fenotipo MSI.

6. El Sistema Inmunitario en el Microambiente Tumoral: Respuesta Inflamatoria e Inmuno-edición.

Se ha documentado bastante bien que los tumores humanos están, generalmente, infiltrados por células inflamatorias (Balkwill and Mantovani, 2001; Mihm et al., 1996; Whiteside, 1993). Aunque estos infiltrados de células del sistema inmunitario pueden variar en tamaño y composición de un tumor a otro, su presencia se considera un intento del hospedador por detectar células tumorales emergentes y destruirlas, interfiriendo con la progresión tumoral (Zitvogel et al., 2006). El concepto de que el sistema inmunitario ejerce cierto control sobre las células cancerosas ya fue concebido en 1909 por Paul Ehrlich (Ehrlich, 1909), y posteriormente fue formulado como la teoría de la inmuno-vigilancia del cáncer (“*immunosurveillance*”) por Burnet y Thomas al final de la década de los 50 (Burnet, 1957; Thomas, 1959). Ambos autores propusieron que el sistema inmunitario era capaz de reconocer y eliminar células cancerosas y pre-cancerosas que surgían en el hospedador, antes de que pudiesen desarrollarse hasta tumores detectables y causar daño. Sin embargo, la idea de la inmuno-vigilancia del cáncer no fue realmente aceptada hasta la década de los 90, cuando modelos experimentales animales, empleando ratones “*knock-out*” validaron la existencia de una inmuno-vigilancia tanto en tumores espontáneos, como en los inducidos químicamente (Dighe et al, 1994; Kaplan et al., 1998). En humanos es difícil examinar la existencia de una inmuno-vigilancia natural, pero existen datos clínicos y ensayos sofisticados que evidencian indirectamente la importancia del sistema inmunitario en la prevención del cáncer (Kim R et al., 2007). Por ejemplo, numerosos trabajos han relacionado la presencia de infiltrados linfocitarios en tumores humanos con un mejor pronóstico o supervivencia de los pacientes (Baxevanis et al., 1994; Kornstein et al., 1983; Naito et al., 1998; Pagès et al., 2005). Datos más recientes obtenidos del análisis de marcadores inmunológicos, a través del uso de “*microarrays*”, han sugerido que el tipo, densidad y localización de las células inmunológicas en el microambiente tumoral de CRCs tienen valor pronóstico (Galon et al., 2006; Galon et al., 2007; Pagès et al., 2005).

Las células inmunológicas presentes en el infiltrado tumoral incluyen a aquellas que median en la inmunidad adaptativa, como células T, células dendríticas (“*dendritic cells*”: DCs) y linfocitos B ocasionales, así como células de la inmunidad innata, tales como macrófagos, leucocitos polimorfonucleares y escasas células NK (Whiteside, 2007). Los linfocitos que infiltran el tumor (“*Tumor-Infiltrating Lymphocytes*”: TILs), son fundamentalmente células T (CD4⁺ ó linfocitos T “*helper*” y CD8⁺ o linfocitos T citotóxicos (“*Cytotoxic T Lymphocytes*”: CTLs), conformando con

frecuencia el principal componente del infiltrado inflamatorio (Whiteside, 2007). Los linfocitos T CD4⁺ que desencadenan una respuesta Th1, facilitan la destrucción tisular y el rechazo tumoral proporcionando ayuda a los linfocitos T CD8⁺, que desempeñan funciones citotóxicas, lisando a las células cancerosas. Se considera que ambas subpoblaciones linfocitarias son parte esencial de la respuesta inmunológica responsable de la inhibición del crecimiento y desarrollo tumoral. Por esta razón, muchas estrategias de inmunoterapia pretenden activar estas células para conseguir la destrucción de las células tumorales, y una memoria inmunológica a largo plazo que evite la recurrencia de la enfermedad primaria y el desarrollo de metástasis.

Sin embargo, a pesar de ello, existen publicaciones que muestran una falta de correlación significativa entre la intensidad del infiltrado linfocitario y una mejora del pronóstico, o han asociado la infiltración por células inmunológicas en el tumor con un peor pronóstico (Nakano et al., 2001; Sheu et al., 1999; Stewart & Tsai, 1993). Numerosas evidencias indican que la respuesta inflamatoria, desencadenada en el microambiente tumoral, en principio como una respuesta del hospedador frente al tumor con el objetivo de destruirlo, juega un papel crítico en el inicio, desarrollo, crecimiento y metástasis del cáncer. La inflamación crónica se convierte, pues, en un proceso clave que polariza la inmunidad hacia un fenotipo que promueve el desarrollo del tumor (Karin & Greten, 2005). Las células cancerosas consiguen beneficiarse de las células inmunológicas infiltrantes, modificando su comportamiento para crear un microambiente que favorezca la progresión tumoral. Conforme el tumor se desarrolla, la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de los leucocitos presentes en el infiltrado, induce a las células tumorales y estromales a producir una variedad de mediadores solubles que re-programan funciones como la proliferación y diferenciación celular, la remodelación de la matriz extracelular, la angiogénesis y la migración/reclutamiento de células para beneficiar el crecimiento y supervivencia del cáncer (Whiteside, 2008).

Entonces, las células inflamatorias presentes en el infiltrado tumoral, bien pueden promover el desarrollo del cáncer o bien pueden interferir activamente en su progresión. Hoy en día está bastante claro que termina predominando la primera condición, no sólo porque el tumor consigue usurpar un proceso normal de inflamación para facilitar su propio crecimiento y progresión (Bui & Schreiber, 2007; Dunn et al., 2006; Stewart et al., 2007), sino porque también establece mecanismos para escapar de la acción del sistema inmunológico. Sabemos que el sistema inmunitario, a través de la interacción con el tumor y como consecuencia de la intensa inmuno-vigilancia, esculpe el fenotipo del cáncer (“*immunosculpting*”) y favorece la inmuno-selección de variantes tumorales menos inmunogénicas, que finalmente facilitan el sobrecrecimiento tumoral (Figura 6). Este complejo papel que desempeña el sistema inmunitario en el cáncer, por un lado protegiendo y por otro ayudando al crecimiento y progresión del tumor, ha llevado a introducir un nuevo término que refina la teoría de la inmuno-vigilancia: la inmuno-edición del cáncer (“*immunoediting*”) (Dunn et al., 2002) (Figura 6). El proceso de inmuno-edición conduce desde la inmuno-vigilancia hasta el inmuno-escape, pasando por tres fases:

eliminación, equilibrio y escape (Dunn et al., 2002; Dunn et al., 2004). Durante la fase de eliminación se produce la inmuno-vigilancia, donde células de la inmunidad innata, mediadores de la inflamación y células T efectoras CD4⁺ y CD8⁺, consiguen suprimir el crecimiento del tumor en las etapas más tempranas (Figura 6). En el proceso de equilibrio, el sistema inmunitario del huésped y las células tumorales que han sobrevivido a la fase de eliminación, entran en un equilibrio dinámico. La presión ejercida por la inmuno-vigilancia es suficiente para controlar la progresión tumoral, pero no elimina por completo a estas células malignas. Durante este periodo de equilibrio, aparecen células tumorales con alteraciones o cambios en su fenotipo. Finalmente, el proceso resulta en la selección de variantes tumorales que son capaces de resistir, evitar o suprimir la respuesta inmune anti-tumoral (Figura 6). Esta fase de equilibrio es la más larga, pudiendo prolongarse durante varios años (Teng et al., 2008). Durante la fase de escape, las variantes tumorales que han sobrevivido, comienzan a expandirse de forma incontrolada (Figura 6). El sistema inmunitario ya no es capaz de contener el tumor, que continúa creciendo progresivamente, lo que se traduce, desde el punto de vista clínico, en el desarrollo maligno de la enfermedad.

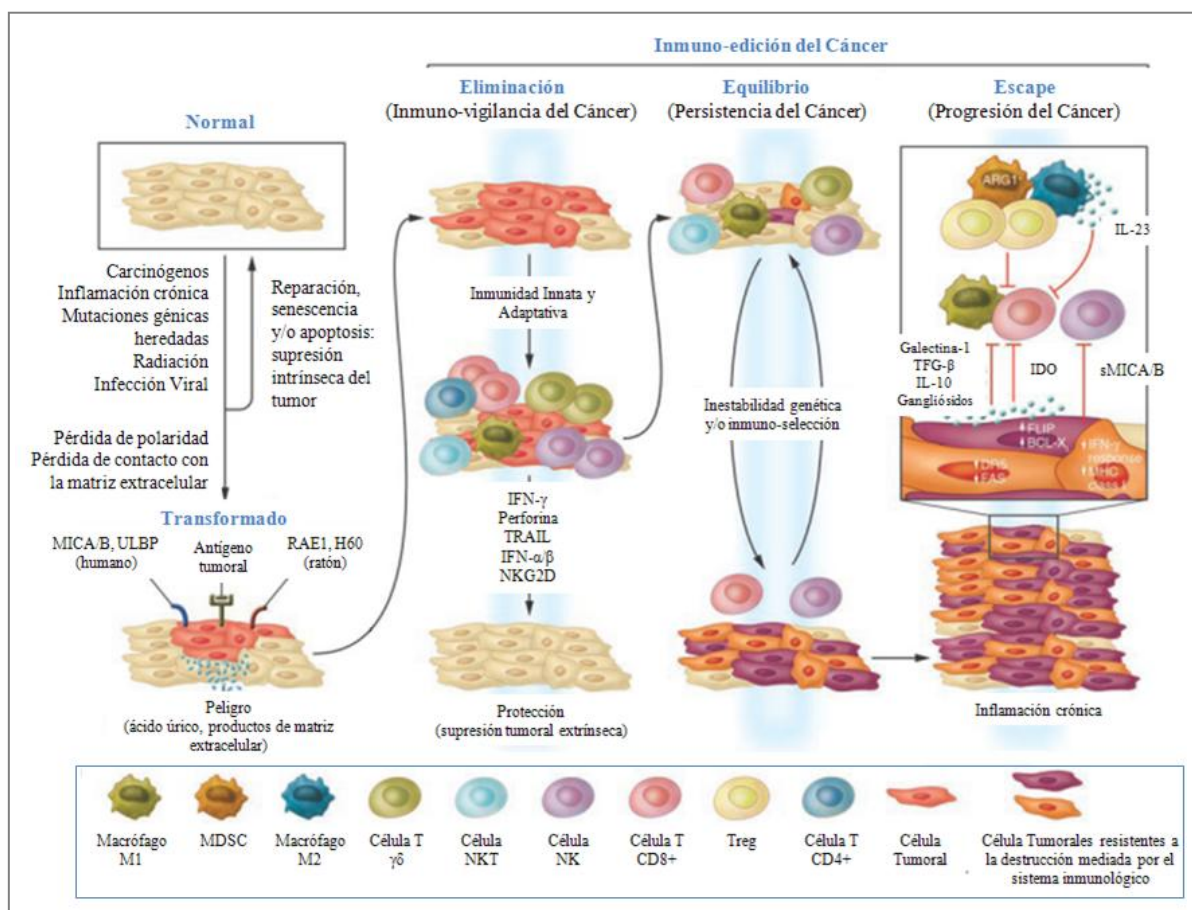


Figura 6. Fases de la inmuno-edición en el cáncer. Las células transformadas experimentan mecanismos de supresión tumoral extrínsecos que detectan y eliminan los tumores en desarrollo, antes de que sean clínicamente aparentes. Esto se conoce como la fase de eliminación de un proceso más complejo llamado inmuno-edición. La inmuno-edición del cáncer supone que el sistema inmunitario, por un lado, protege al

hospedador del desarrollo del tumor y, por otro, promueve el crecimiento tumoral. Este proceso de inmunomodulación está compuesto por tres fases: eliminación o inmuno-vigilancia del cáncer; equilibrio, una fase donde las células tumorales y la inmunidad entran en un equilibrio dinámico que controla la expansión del tumor; y escape, donde surgen variantes tumorales menos inmunogénicas, o que desarrollan posibles mecanismos inmunosupresores para atenuar la respuesta inmunológica, conduciendo al sobre-crecimiento del tumor. Estas fases han sido conocidas como las tres Es de la inmunomodulación. DR5, *death receptor 5*; IDO, indolamina 2,3-dioxigenasa; MICA/B, *MHC class I chain-related antigens A and B*; RAE1, *retinoic acid early transcript 1*; sMICA/B, MICA/B soluble; ULBP, *UL16-binding protein*. Figura adaptada de Swann & Smith, *J Clin Invest*, 2007; 117:1137-46.

7. Estrategias de Escape Tumoral

Numerosos trabajos se han centrado en analizar la compleja interacción entre el tumor y el sistema inmunitario, así como la heterogeneidad de mecanismos que favorecen el escape tumoral, contribuyendo al diseño de estrategias que mejoran la inmunoterapia en el cáncer. Los mecanismos de escape tumoral implican a numerosos elementos presentes en el microambiente del tumor: factores derivados del propio tumor (“*Tumor-Derived Factors*”: TDFs) con múltiples consecuencias funcionales; células de la inmunidad innata y adaptativa, que contribuyen a crear una red inmunosupresora o de tolerancia periférica a través de sus productos solubles o moléculas de membrana; y moléculas de superficie celular que median la interacción linfocito T-célula tumoral, y que experimentan una alteración en su expresión, destinada a conseguir la tolerancia frente a los antígenos tumorales o la supresión funcional de los linfocitos efectoros (Stewart & Abrams, 2008).

7.1. Factores Derivados del Tumor (“*Tumor-derived factors*”, TDFs)

Se han caracterizado numerosos factores derivados del tumor (TDFs) con propiedades anti-apoptóticas, inmunosupresoras o de promoción de la angiogénesis. Entre ellos, destacan el factor de crecimiento transformante β (“*Transforming growth factor- β* : TGF- β), el factor vascular endotelial (“*vascular endothelial factor*”: VEGF), la IL-10 o prostaglandinas (PGE₂) (Figura 7). Aunque tienen diferentes consecuencias multi-funcionales, pueden actuar directamente sobre los linfocitos (TGF- β , IL-10), o de forma indirecta (VEGF, PGE₂), a través de poblaciones de células presentadoras de antígenos del hospedador (“*Antigen Presenting Cells*”: APCs), como células dendríticas (“*Dendritic Cells*”: DCs) o monocitos/macrófagos, para hacerlas no-estimuladoras o tolerogénicas en la inducción de una respuesta inmunitaria adecuada por parte del hospedador (Stewart & Abrams, 2008). La producción de estos factores se caracteriza por la activación común del factor de transcripción STAT3, que además conduce a la inhibición de reacciones pro-inflamatorias (Wang T et al., 2004; Yu et al., 2007) (Figura 7). Una de las consecuencias de la liberación de estos factores dependientes de STAT-3, es que se altera la maduración y diferenciación de células dendríticas, obteniéndose una población de

células inmaduras (iDCs) incapaz de desarrollar su función en la inmunidad anti-tumoral (Zou, 2005). También se ha descrito que los TDFs pueden incrementar la expresión de activadores de la angiogénesis, como metaloproteinasas de matriz (MMP2 y MMP9) (Vakkila & Lotze, 2004), así como también genes anti-apoptóticos que codifican c-FLIP, Bcl-x_L y Mcl-1 (España et al., 2004; Jung et al., 2004) (Figura 7). La resistencia a la apoptosis junto al incremento de la angiogénesis, son procesos claves que favorecen la progresión y escape tumoral.

Entre estos TDFs, el TGF- β juega un papel destacado en el escape tumoral, afectando directa o indirectamente, elementos inmunológicos y estromales. Promueve la diferenciación de fibroblastos y macrófagos asociados al tumor ("*Tumor-Associated Macrophages*": TAMs) (Pollard, 2004), que a su vez secretan factores angiogénicos, como VEGF (Kim R et al., 2004). Suprime la diferenciación, proliferación y función efectora de las células T (Thomas & Massague, 2005); favorece la supervivencia, proliferación y resistencia a la apoptosis de las células tumorales (Reckamp et al., 2006); y estimula la producción de IL-4 e IL-10 por las células estromales, inclinando la inmunidad hacia una respuesta tipo Th2 inapropiada, que es incapaz de sostener una inmunidad celular efectiva (Stewart & Abrams, 2008) (Figura 7).

Además de estos factores comúnmente conocidos, en los últimos años ha adquirido especial relevancia una proteína miembro de la familia de las lectinas, la galectina-3 (gal-3), que parece desempeñar funciones reguladoras de la progresión tumoral. La gal-3 es una lectina que une carbohidratos (β -galactósidos), y que se expresa de manera ubicua en tejidos epiteliales y en células del sistema inmunitario (Dumic et al., 2006). Además, se ha detectado también su expresión en una gran variedad de tumores humanos (Califice et al., 2004). Aunque es una proteína citosólica, puede atravesar las membranas intracelulares y plasmática, translocándose hasta el núcleo o la mitocondria, o siendo secretada al exterior (Davidson et al., 2002; Davidson et al., 2006; Li et al., 2006). En tumores, la intensidad y localización de la expresión depende de la progresión tumoral, invasividad y potencial metastásico. En el cáncer de mama, la expresión de galectina-3 se ha detectado en la membrana perinuclear (Yu et al., 2002), mientras que en etapas avanzadas del cáncer colorrectal (Sanjuan et al., 1997) y también en el cáncer de próstata (Califice et al., 2004), se ha encontrado una expresión citoplasmática de la lectina. La gal-3 desempeña una plétora de funciones intracelulares y extracelulares, gracias a que su dominio de unión a carbohidratos le permite interactuar con múltiples ligandos. La actividad intracelular de esta lectina en las células tumorales, se ha relacionado con funciones anti-apoptóticas, o de incremento de la proliferación celular y crecimiento tumoral (Califice et al., 2004). También se ha implicado en distintas funciones extracelulares que favorecen la progresión del tumor, como adhesión celular, migración, angiogénesis, invasión (Nangia-Makker et al., 2008) o inducción de la apoptosis en células T efectoras (Peng et al., 2008).

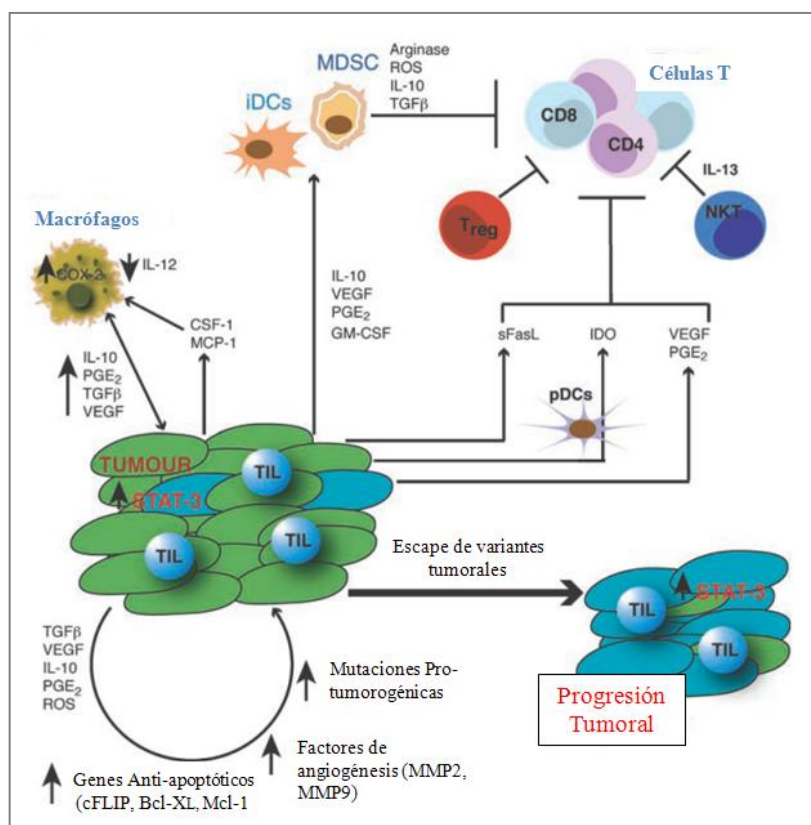


Figura 7. Mecanismos de escape tumoral dependientes de los efectos inducidos por factores derivados del tumor (TDFs) y de poblaciones de células del sistema inmunitario con funciones inmunosupresoras. Los TDFs pueden favorecer el escape tumoral, suprimir la inmunidad innata y adaptativa, y facilitar la progresión tumoral. Entre los TDFs más importantes destacan el factor de crecimiento vascular endotelial (“*vascular endothelial growth factor*”: VEGF), interleuquina-10 (IL-10), especies reactivas del oxígeno (ROS), indolamina-2,3-dioxigenasa (IDO), prostaglandinas (por ejemplo, PGE₂) y factor de crecimiento transformante-β (“*transforming growth factor*”: TGF-β). Además, poblaciones de células mieloides y linfoides, presentes en el infiltrado inflamatorio, son estimuladas para contribuir en la creación de una red inmunosupresora o tolerogénica que compromete la efectividad de la respuesta inmune innata y adaptativa. Estas poblaciones celulares incluyen a macrófagos asociados al tumor (“*tumour-associated macrophages*”: TAMs), células T reguladoras (Tregs), células “*Natural Killer*” T (NKTs), células dendríticas inmaduras (iDCs), células dendríticas plasmocitoides productoras de IDO (pDC) y células supresoras de origen mieloide (“*myeloid-derived suppressor cells*”: MDSCs). *Imagen adaptada de Stewart y Abrams, Oncogene, 2008; 27: 5894-5903*

7.2. Defectos en la Presentación de Antígenos Tumorales: Alteraciones en las Moléculas HLA de Clase I.

Las moléculas HLA (“*Human Leukocyte Antigen*”) de clase I juegan un papel crucial en la interacción entre las células tumorales y el sistema inmunitario. Unen péptidos antigénicos derivados de proteínas endógenas tumorales (“*Tumor-Associated Antigens*”: TAAs) y los presentan a linfocitos T CD8⁺ o citotóxicos (“*Cytotoxic T Lymphocytes*”: CTLs), para ser reconocidos por sus receptores de membrana (“*T Cell Receptors*”: TCRs) (Romero et al., 2002). El reconocimiento de estos péptidos por los CTLs desencadena una serie de eventos que pueden terminar en la lisis de la célula tumoral.

También están implicadas en la interacción de las células malignas con las células NK. En concreto, estos linfocitos “*Natural Killer*” lisan células tumorales que no expresan uno o más alelos HLA de clase I (Moretta et al., 2002).

Los antígenos HLA de clase I son glicoproteínas de superficie celular constituidas por una cadena pesada polimórfica de 45KDa, y una cadena ligera no polimórfica de 12 KDa, llamada β_2 -microglobulina (B_2m). Las cadenas pesadas están codificadas por genes del sistema principal de histocompatibilidad (“*Major Histocompatibility Complex*”: MHC), localizados en el cromosoma 6, mientras que el gen que codifica la cadena B_2m se sitúa en el cromosoma 15 (Bjorkman & Parham, 1990; Shawar et al., 1994). El ensamblaje correcto del complejo cadena pesada- B_2m -péptido y su transporte hasta la superficie celular, sigue un proceso dependiente de la maquinaria de procesamiento antigénico (“*Antigenic Processing Machinery*”: APM), que incluye las subunidades del proteosoma LMP2 y LMP7, los transportadores peptídicos TAP1 y TAP2, y un número de chaperonas residentes en el retículo endoplasmático como calnexina, calreticulina, ERp57 y tapasina (Cresswell et al., 1999). Cualquier defecto en el proceso de ensamblaje conducirá a una expresión anómala de antígenos de clase I.

Desde hace tiempo se conoce que la transformación maligna de las células se asocia a una alteración en la expresión y/o función de las moléculas HLA de clase I, y que estas anomalías proporcionan vías para escapar del reconocimiento por parte del sistema inmunológico. El estudio de la expresión HLA-I se ha realizado en una gran cantidad y variedad de tumores eliminados quirúrgicamente, mediante técnicas de inmunohistoquímica y el empleo de anticuerpos monoclonales específicos frente a determinantes HLA de clase I. Estos análisis han permitido identificar en las lesiones malignas varios fenotipos de la expresión alterada de HLA-I. Estos fenotipos incluyen: (I) Pérdida total de la expresión HLA clase I; (II) Pérdida selectiva de un haplotipo HLA; (III) Baja regulación selectiva de los productos génicos de los locus *HLA-A*, *-B* o *-C*; (IV) Pérdida selectiva de un alelo HLA de clase I; (V) Fenotipos complejos que representan una combinación de los fenotipos I-IV; o (VI) Incapacidad de incrementar la expresión de HLA de clase I debido a un bloqueo en la vía de señalización del IFN (Garrido et al., 1997; Garrido & Algarra, 2001). Los tumores más estudiados a lo largo de los años han sido carcinomas de mama, pulmón, colon, riñón, cérvix y próstata y melanomas cutáneos. Las frecuencias de pérdida total o baja regulación de antígenos HLA de clase I en lesiones primarias, van desde un 16% en melanomas a un 50% en el cáncer de próstata. En el cáncer de colon, los datos de pérdida total son de un 27%. Las pérdidas de locus o alélicas tienen frecuencias desde un 4% en el cáncer de pulmón, hasta un 35% en melanomas, mientras que en el carcinoma de colon son de un 16% (Ferrone & Marincola, 1995; Garrido et al., 1997; Marincola et al., 2000).

7.2.1. Mecanismos Moleculares implicados en la Generación de Fenotipos HLA Clase I Alterados.

Los mecanismos moleculares responsables de las anomalías en la expresión de moléculas HLA de clase I en las células tumorales, bien pueden afectar directamente a las cadenas pesadas o a la cadena B_2m , o bien a los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM).

7.2.1.1. Pérdida Total de Antígenos HLA de Clase I

El defecto molecular más frecuente causante de la pérdida total de moléculas HLA de clase I en las células cancerosas, es la presencia de alteraciones en el gen que codifica la B_2m y que resultan en la falta de expresión de una cadena funcional (Seliger et al., 2002). Con frecuencia, la inactivación bialélica del gen $B2m$ es el resultado de una mutación en una copia del gen, en combinación con la pérdida de la otra copia en un proceso de pérdida de heterocigosidad (“*Loss of Heterozygosity*”: LOH) (Benítez et al., 1998; Paschen et al., 2003). Se han identificado mutaciones en el gen $B2m$, que abarcan desde grandes deleciones, hasta inserciones o deleciones de nucleótidos simples, así como también sustituciones de nucleótidos con diferentes consecuencias funcionales. El resultado es que se afecta la expresión de la cadena β_2m , porque se inhibe la transcripción del gen, o en la mayoría de los casos, porque se impide la traducción del ARNm, o por la síntesis de una proteína no-funcional (Bernal et al., 2012). Las mutaciones en el gen $B2m$ que conducen a una pérdida total de moléculas HLA de clase I, se han descrito principalmente en el cáncer de colon y en líneas celulares de melanoma (Bicknell et al., 1994; Hicklin et al., 1997; Pérez et al., 1999). Sin embargo, hay que destacar una alta frecuencia de mutaciones de pauta de lectura en secuencias de mononucleótidos, fuertemente asociada al fenotipo MSI en el cáncer colorrectal (Bicknell et al., 1996; Cabrera et al., 2003; Kloor et al., 2005). Esto es debido a que la gran presión inmunológica ejercida por la alta infiltración de CTLs en el microambiente de tumores con MSI-H, favorece la selección de variantes tumorales con mutaciones somáticas en secuencias de microsatélites del gen $B2m$, como consecuencia de un sistema MMR defectuoso. La ausencia de una proteína β_2m funcional, impide el reconocimiento antigénico mediado por moléculas HLA de clase I y favorece el escape tumoral de la acción inmunológica.

7.2.1.2. Baja Regulación de Moléculas HLA de Clase I

La baja regulación total de moléculas HLA de clase I se debe fundamentalmente a una baja expresión o a una pérdida de los componentes de la APM (Seliger et al., 2000), aunque tampoco debe descartarse que sea consecuencia de un mecanismo epigenético que suprima la transcripción de genes que codifican la cadena pesada de HLA I (Coral et al., 1999; Nie et al., 2001). Entre los componentes de la APM, TAP1 es el que se ha investigado de forma más exhaustiva. La baja expresión o pérdida del gen $TAP1$ se ha descrito en carcinomas de mama, pulmón, colon, riñón, cervix y próstata y en melanomas cutáneos, con una frecuencia de mutación entre 10-84% (Seliger et al., 2000; Seliger et al., 2003). También se ha descrito una baja regulación de los genes $TAP2$ y $LMP7$, contribuyendo junto a

la LOH, a la pérdida de HLA de clase I en CRCs con estabilidad de microsatélites (Cabrera et al., 2003). Al igual que ocurre con el gen *B2m*, en CRCs con MSI-H también se han identificado mutaciones en secuencias de microsatélites situadas en regiones codificantes de genes de la APM. Se han encontrado mutaciones en *TAP1*, *TAP2*, *Tapasina*, *Calreticulina*, *Calnexina* y *ERp57*, aunque las frecuencias de mutación son del 10% o incluso menores para cada gen (Kloor et al., 2005; Kloor et al., 2007). Es probable que las mutaciones en *TAP1* y *TAP2*, en el contexto de MSI-H, interfieran en la presentación antigénica mediada por HLA de clase I, ya que las proteínas transportadoras TAP1 y TAP2 son esenciales para la presencia de un péptido cargado en el complejo HLA-I. Sin embargo, la importancia funcional de las mutaciones en microsatélites de los genes que codifican las chaperonas Tapasina, Calreticulina, Calnexina y ERp57, todavía no está del todo clara.

7.2.1.3. Otros Fenotipos Alterados HLA de Clase I

Las pérdidas selectivas de alelos HLA de clase I, pueden deberse a una pérdida del gen que codifica la cadena pesada o bien a mutaciones que inhiben la transcripción o traducción (Real et al., 2001; Seliger et al., 2002; Serrano et al., 2000; Torres et al., 1996). La pérdida de un haplotipo de HLA de clase I surge como consecuencia de defectos en la segregación cromosómica o debido a recombinaciones mitóticas, que causan la pérdida del brazo corto del cromosoma 6, donde residen los genes de cadena pesada de HLA de clase I (Browning et al., 1993; Marincola et al., 1994; Torres et al., 1996). Y finalmente, alteraciones en la regulación transcripcional y, concretamente en factores de transcripción de genes que codifican las cadenas pesadas de HLA de clase I, originan la baja regulación selectiva de los loci HLA-A y HLA-B (Griffioen et al., 2000; Imreh et al., 1995; Peltenburg & Schrier, 1994; Soong & Hui, 1992)

7.3. Inmunosupresión mediada por Células de la Inmunidad Innata y Adaptativa.

En el microambiente tumoral se localizan poblaciones de células efectoras de origen mieloide y linfoide que, inducidas por el efecto de los factores derivados del tumor, contribuyen a potenciar una red inmunosupresora que compromete la efectividad de la inmunidad innata o adaptativa, favoreciendo el escape tumoral. Estas poblaciones celulares inmunosupresoras incluyen a macrófagos, DCs inmadura, DCs secretoras de la enzima inhibidora IDO (indolamina dioxigenasa), células supresoras de origen mieloide (MDSCs), linfocitos T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (células T reguladoras), o células NKT (Figura 7).

7.3.1. Macrófagos asociados al tumor (*Tumor-associated macrophages*”, *TAMs*)

Los macrófagos son una parte esencial de la respuesta inmunológica innata, aunque desempeñan funciones importantes en todas las facetas de la inmunidad. Desde hace tiempo, se sabe

que los tumores sólidos están fuertemente infiltrados por macrófagos (Bingle et al., 2002; Mantovani et al., 2002), y se considera que tanto el reclutamiento como la activación de estos TAMs son fundamentales en la progresión tumoral. Existen estudios que han recogido una correlación positiva entre una alta densidad de TAMs y un mal pronóstico en tumores humanos, incluyendo mama, próstata y vejiga (Lewis & Pollard, 2006). Estas células derivan de monocitos circulantes que infiltran el tumor y se diferencian a macrófagos, dando lugar a una respuesta inflamatoria en el sitio tumoral (Balkwill & Mantovani, 2001; Mantovani et al., 1986). Constituyen una población muy heterogénea de células que, dependiendo de su fenotipo, pueden contribuir a la destrucción tumoral o facilitar el crecimiento del tumor y el desarrollo de metástasis. Se distinguen dos subpoblaciones de macrófagos funcionalmente diferentes, que son el resultado de un proceso de polarización dependiente de los factores que están presentes en el microambiente tumoral (citoquinas, disponibilidad de oxígeno...) y del estado de progresión del tumor (Gordon & Taylor, 2005; Mantovani et al., 2002).

Los Macrófagos tipo 1 (M1) infiltran en estadios tempranos del desarrollo tumoral y son activados “clásicamente” en respuesta a mediadores inflamatorios ($\text{IFN}\gamma$) o productos bacterianos como los polisacáridos (LPS) (Figura 8). Producen altos niveles de IL-12 e IL-23, y promueven, consecuentemente, la activación de una respuesta Th1. Se caracterizan también por una gran producción de intermediarios tóxicos (óxido nítrico: NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS). También actúan como células presentadoras de antígeno (“*Antigen presenting cell*”: APC) activando a los linfocitos T CD8^+ . Por lo tanto, los macrófagos M1 se consideran potentes células efectoras que matan microorganismos y células tumorales y producen grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias.

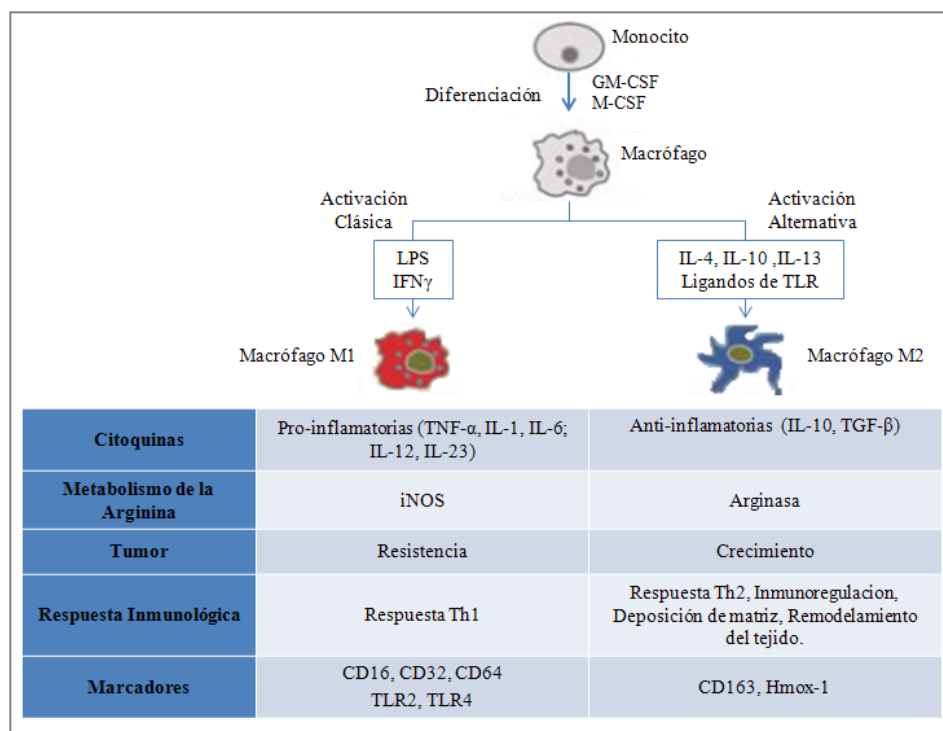


Figura 8. Representación esquemática de la activación de macrófagos M1 y M2 y sus principales características

En contraste, en estadios más avanzados del tumor o en regiones hipóxicas del microambiente tumoral, los macrófagos tienden a polarizar hacia un fenotipo M2. Estos macrófagos son activados por una vía “alternativa” en respuesta a varias señales (IL-4, IL-13, glucocorticoides o IL-10), y responden liberando factores que potencian el reclutamiento y la diferenciación Th2, promoviendo la angiogénesis y la reparación y remodelación tisular, así como la eliminación de residuos celulares a través de sus receptores “*scavenger*” (Sica et al., 2008^a). Tienen poca capacidad de presentación antigénica y pueden, en realidad, suprimir la activación y proliferación de células T, a través de la liberación de IL-10, TGFβ, prostaglandinas y metabolitos de la enzima arginasa (ARG) (Mantovani et al., 2002). Por tanto, las funciones de los macrófagos M2 contribuyen a la supresión de la actividad anti-tumoral (Figura 8).

7.3.2. Células supresoras de origen mieloide (“*Myeloid-derived suppressor cells*”, MDSCs)

Se ha comprobado que el crecimiento tumoral va acompañado, también, de la expansión de una población heterogénea de células de origen mieloide y estado inmaduro, con funciones inmunosupresoras, conocidas como “*Myeloid-derived suppressor cells*” (MDSCs) (Figura 7). Esta mezcla de células mieloides inmaduras presentan una morfología de granulocitos o monocitos, pero carecen de los marcadores expresados específicamente por monocitos, macrófagos o células dendríticas (Youn et al., 2008). Se han estudiado de forma más exhaustiva en modelos animales y, concretamente, en ratones co-expresan los marcadores de diferenciación CD11b y Gr-1 (Kusmartsev & Gabrilovich, 2006; Nagaraj & Gavrilovich, 2007). También se han identificado poblaciones mieloides inhibitoras en varios tipos de tumores humanos (Almand et al., 2001; Filipazzi et al., 2007; Ochoa et al., 2007; Schmielau & Finn, 2001; Zea et al., 2005), aunque no están tan bien caracterizadas como las encontradas en tumores murinos. En humanos, las MDSCs se definen comúnmente como células CD14-CD11b+, o como células que expresan el marcador mieloide CD33, pero que no presentan marcadores maduros de células mieloides y linfoides, ni la molécula HLA-DR (Almand et al., 2001; Ochoa et al., 2007).

La expansión y activación de las MDSCs están influenciadas por diferentes factores. La expansión y el reclutamiento de estas células desde la médula ósea, están orquestados por el propio tumor a través de la liberación de TDFs (GM-CSF, VEGF, IL-10, IL-6; CSF-1, PGE₂), que estimulan la mielopoyesis e inhiben la diferenciación de las células mieloides (Nagaraj & Gavrilovich, 2007; Ochoa et al., 2007; Rodriguez et al., 2005; Serafini et al., 2004; Sinha et al., 2007^a). En la activación de las MDSCs intervienen factores producidos por células T activadas y células estromales, como IFNγ, ligandos de “*Toll-like receptors*” (TLRs), IL-4, IL-13 o TGFβ (Gabrilovich & Nagaraj, 2009).

Estudios en modelos animales han implicado a las células CD11b+ Gr-1+ en la supresión de la inmunidad mediada por células T CD4⁺ y CD8⁺, a través de diversos mecanismos: a) la promoción de la angiogénesis tumoral a través de la producción de metaloproteína 9 (MMP9), que regula la

biodisponibilidad de VEGF (Yang L et al., 2004); b) la secreción de TGF β , que regula negativamente la inducción de CTLs (Terabe et al., 2003); c) la producción de enzimas inhibitoras, como la arginasa 1 (ARG1), la óxido nítrico sintasa (NOS) o la indolamina 2,3 dioxigenasa (IDO). Las enzimas ARG1 y NOS comparten el mismo sustrato, la L-arginina, que se metaboliza a urea y a óxido nítrico, respectivamente. La depleción de L-arginina por la ARG1 compromete la expresión correcta de una cadena CD3 ζ y la señalización mediada por el TCR de los linfocitos T. La actividad de NOS origina especies reactivas de oxígeno, incluyendo el NO, que afecta la señalización mediada por células T y su activación, así como eventualmente su supervivencia (Bronte & Zanovello, 2005; Nagaraj & Gavrilovich, 2007; Ochoa et al., 2007) (Figura 7). La actividad de IDO conduce al consumo L-triptófano y al desarrollo de funciones inmunosupresoras como la inhibición de la capacidad de las células T activadas de matar a las células tumorales, y la potenciación de la actividad supresora de las células Treg (Fallarino et al., 2006) (Figura 7). Además de suprimir la activación de las células T, también bloquea la maduración de las células dendríticas y polariza la inmunidad hacia una respuesta tipo Th2, a través de una gran producción de IL-10 y de la inhibición de citoquinas de tipo Th1, como la IL-12 (Serafini et al., 2006; Sinha et al., 2007^b) (Figura 7).

En tumores humanos todavía falta por entender completamente si las MDSCs influyen la progresión tumoral. Sin embargo, varios trabajos han confirmado que en pacientes que han recibido terapias que modulan a estas poblaciones mieloides inhibitoras, la función inmunológica ha mejorado (Fricke et al., 2007; Mirza et al., 2006).

7.3.3. Células T reguladoras (Treg)

No todos los linfocitos T tienen una actividad anti-tumoral; una población de células T CD4⁺, que expresan CD25 y el factor de transcripción Foxp3 (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), que son productoras de IL-10, y que se denominan células T reguladoras (Tregs), desempeñan un papel en la promoción del crecimiento y progresión tumoral, inhibiendo la respuesta inmunitaria frente al cáncer (Chen et al., 2003; Curiel et al., 2004; Wei et al., 2006) (Figura 7). Bajo condiciones fisiológicas normales, estas Tregs suprimen la activación de células efectoras que reconocen antígenos propios, limitando las reacciones de autoinmunidad y de inflamación (Bennett et al., 2001; Kim JM et al., 2007). Estas células reguladoras inhiben la actividad de células T efectoras (CD4⁺ y CD8⁺), y en el microambiente tumoral pueden suprimir la inmunidad celular frente a las células cancerosas, usando distintos mecanismos moleculares (Roncarolo et al., 2006; Bacchetta et al., 2007). Estudios en tumores murinos indican que las Tregs inhiben la respuesta inmunológica frente al tumor, mientras que la depleción de esta subpoblación celular promueve el rechazo de varias líneas celulares tumorales murinas incluyendo melanoma, fibrosarcoma, mieloma y leucemia (Onizuka et al., 1999). En humanos, se ha detectado un incremento en el número de células Tregs en la circulación periférica de pacientes con una gran variedad de cánceres (Ichihara et al., 2003; Liyanage et al., 2002; Ormandy et al., 2005). La

inmunosupresión mediada por células Tregs productoras de la citoquina supresora TGF- β , se ha documentado en el cáncer de ovarios, de pulmón o el cáncer colorrectal (Somasundaram et al., 2002; Woo et al., 2001). La inducción y diferenciación de las células Tregs está favorecida en el microambiente tumoral, por la IL-10 y el TGF- β producidos por el propio tumor (Zou, 2005), o por la acción directa de células dendríticas disfuncionales o inmaduras y MDSCs (Curiel et al., 2003; Gabrilovich & Nagaraj, 2009). La presencia de células T reguladoras en el microambiente tumoral está fuertemente ligada a una llamativa reducción de la supervivencia en pacientes con cáncer, constituyendo una clara evidencia de la asociación de células Tregs con la patogénesis en el cáncer humano (Curiel et al., 2004). Es por ello también, que las estrategias que consiguen la depleción de las células T reguladoras, mejoran el resultado de las terapias en pacientes con cáncer (Ercolini et al., 2005; Litzinger et al., 2007).

7.4. Otros Mecanismos de Escape Tumoral.

Las células tumorales también pueden escapar de la destrucción por parte del sistema inmunitario a través de otros mecanismos que son dependientes del contacto celular. Dentro de este escenario, se distinguen tres estrategias fundamentales: a) La expresión aberrante de ligandos-receptores de superficie celular, cuyas interacciones afectan a la supervivencia o a las funciones efectoras de los linfocitos; b) La adquisición de cambios genéticos o epigenéticos que incrementan la resistencia a la apoptosis mediada por receptores de muerte, en las células tumorales; c) La pérdida total o baja regulación de moléculas implicadas en el reconocimiento de antígenos tumorales, como las moléculas HLA de clase I o los componentes de la APM. Mediante este último mecanismo las células tumorales pierden la capacidad de presentar directamente péptidos antigénicos derivados del tumor a los CTLs, evitando la activación y destrucción mediada por el sistema inmunitario. Este mecanismo de escape tumoral se ha explicado con más detalle en el apartado anterior 7.2, por lo que ahora sólo procedemos a mencionarlo (Figura 9).

7.4.1. Alteraciones en la Interacción Ligando-Receptor que perjudican a los Linfocitos T.

La expresión aberrante de moléculas de superficie celular que son claves en las interacciones célula tumoral-célula efectora, es una táctica común entre las células neoplásicas para evitar la acción inmunológica (Whiteside, 2006).

Las células tumorales presentan una falta de expresión de moléculas co-estimuladoras que son necesarias para la adecuada activación de las células T. La pérdida de estas moléculas co-estimuladoras, que incluyen a miembros de la familia B7, resulta en un proceso de anergia, a pesar de que se produzca una presentación antigénica con restricción MHC (Stewart et al., 2007) (Figura 9). En modelos animales y en pacientes con cáncer, se ha observado un descenso en la expresión de la cadena

CD3 ζ del TCR en células T que infiltran el tumor, así como de tirosín kinasas como p56^{lck} y p59^{fyn}, que intervienen en el proceso de señalización para una activación óptima de la célula T (Koneru et al., 2005) (Figura 9). Este defecto inmunológico parece estar influenciado por la depleción del aminoácido arginina, debido a la actividad ARG1 de las células MDSCs (Serafini et al., 2004; Rodriguez et al., 2005; Kusmartsev & Gabrilovich, 2006; Nagaraj & Gabrilovich, 2007; Ochoa et al., 2007; Sinha et al., 2007^b). Por lo tanto estas alteraciones que afectan a la señalización mediada por el TCR y que son inducidas por el tumor, pueden perjudicar la inmunidad adaptativa.

La “sobre-expresión” de moléculas inhibitoras es otro de los mecanismos de escape tumoral a destacar. El receptor de muerte programada (“*programmed-death receptor 1*”) o PD-1, se expresa en una gran variedad de células del sistema inmunitario, como linfocitos T y B maduros, timocitos y células mieloides (Blank & Mackensen, 2007) (Figura 9). La interacción de este receptor con cualquiera de sus ligandos, PD-L1 (también conocido como B7-H1) o PD-L2, regula negativamente la proliferación y la producción de citoquinas por los linfocitos T (Freeman et al., 2000; Latchman et al., 2002) (Figura 9). Se sabe que PD-L1 se expresa fuertemente en una gran variedad de tumores (Iwai et al., 2002), y se correlaciona inversamente con el pronóstico del paciente (Ohigashi et al., 2005; Thompson et al., 2006).

Se ha demostrado también, al menos en algunos pacientes, que el número de células T circulantes, especialmente las células T CD8⁺, está disminuido (Kuss et al., 2004), debido a mecanismos de apoptosis inducidos por el tumor (Hoffmann et al., 2002). Parece que, bajo ciertas circunstancias *in vivo*, las células T activadas que expresan el receptor Fas, experimentan una muerte celular programada debido a la interacción con el ligando de Fas (Fas-L), expresado o liberado (es decir, soluble) por ciertos tipos de tumor. Por tanto, las células tumorales pueden escapar del ataque de las células T, induciendo la apoptosis de estas células efectoras, bien en el sitio de formación del tumor, o bien en células T circulantes, mediante la ruptura de Fas-L que pasa a estar contenido en microvesículas (Andreola et al., 2002).

7.4.2. Resistencia a la apoptosis

La resistencia a la apoptosis es ahora considerada una característica fundamental de la progresión tumoral (Hanahan & Weinberg, 2000). Esta pérdida de sensibilidad que muestran las células cancerosas a la muerte celular, se consigue mediante mecanismos que ofrecen resistencia tanto a la vía intrínseca (mitocondrial) como a la vía extrínseca (receptores de muerte) de la apoptosis. La inhibición de la vía intrínseca puede darse mediante la modulación de factores pro o anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 (Figura 9). La resistencia a la vía extrínseca de muerte programada puede ser consecuencia de la baja expresión o pérdida del receptor Fas (Figura 9), puede también deberse a la pérdida de expresión del receptores TRAIL (Figura 9), a defectos en miembros de la familia de

caspasas, o a la desregulación de la vía de señalización debido a la sobre-expresión de proteínas anti-apoptóticas, como la proteína inhibidora de FLICE (FLIP) (Stewart et al., 2007).

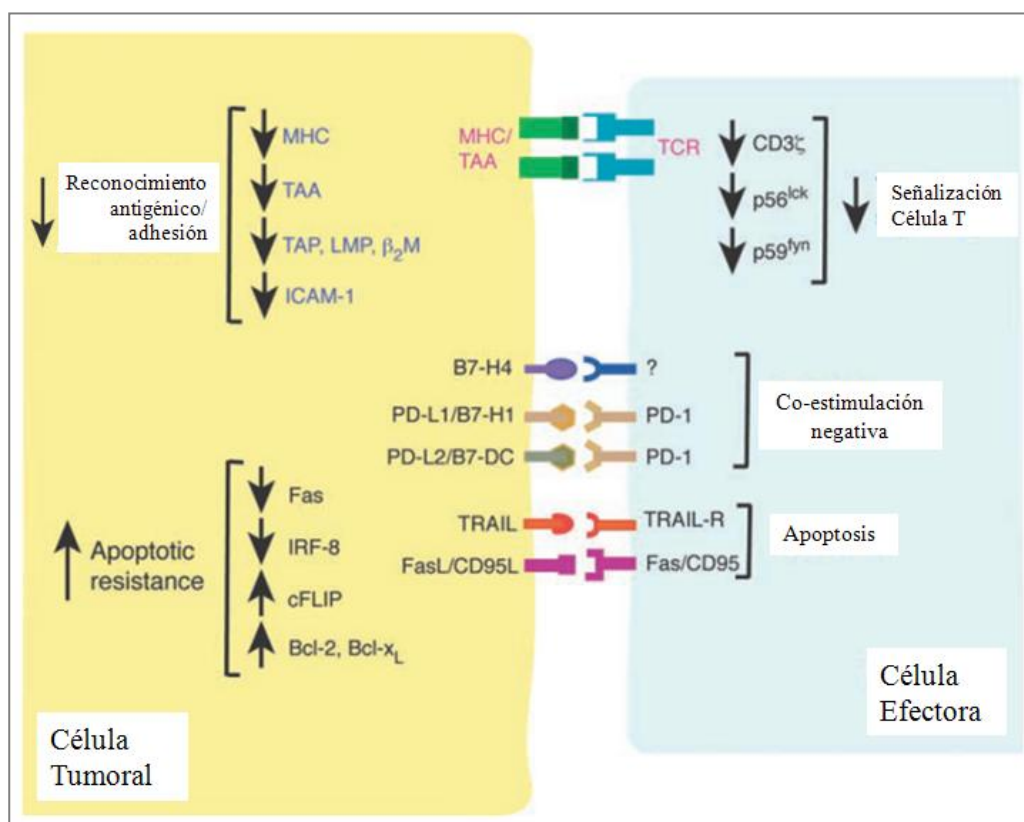


Figura 9. Mecanismos de escape tumoral dependientes del contacto celular. Las células tumorales tienen la capacidad de alterar la expresión de un número de moléculas de superficie necesarias para una interacción célula T-tumor efectiva y para la destrucción de las células cancerosas. Aquí, el escape tumoral puede ser el resultado de la pérdida o baja regulación de ligandos-receptores claves, cuyas interacciones son importantes en la adhesión celular, reconocimiento inmunológico y activación, y adquisición de resistencia a la apoptosis; o puede ser consecuencia de la expresión aberrante de ligandos de superficie celular que bien inmunoregulan la actividad de las células T (Por ejemplo, PD-L1/B7-H1 o B7-H4), o median en la muerte de las mismas (por ejemplo, TRAIL o FasL). PD-1: *programmed death receptor-1*; TRAIL: *TNF-related apoptosis-inducing ligand*.

Imagen adaptada de Stewart & Abrams, *Oncogene*, 2008; 27: 5894-5903

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

IV. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

Existen numerosos datos experimentales que demuestran una continua interacción de las células del sistema inmunológico que infiltran los tumores, para modificar las características inmunogénicas de la célula tumoral y facilitar así el escape inmunológico. La progresión del tumor involucraría, por tanto, un cambio en donde el sistema inmunitario modifica un patrón de rechazo inicial, hasta otro más complejo con características pro-tumorogénicas. Nuestra hipótesis establece que los distintos patrones de infiltración inflamatoria que se observan en los tumores, particularmente en carcinomas colorrectales, podrían encontrarse estrechamente asociados con los mecanismos intrínsecos de transformación neoplásica, es decir, con las distintas vías bioquímicas implicadas en la carcinogénesis colorrectal (inestabilidad de microsatélites (MSI), inestabilidad cromosómica, (CIN), epigenética). En este contexto, se ha demostrado a partir del análisis global del microambiente tumoral, que el tipo, densidad y localización de los linfocitos infiltrantes en el cáncer de colon, constituye un factor pronóstico independiente, determinante en la estimación de la supervivencia y en el riesgo de recaída del cáncer. En resumen, si como hemos apuntado, existe una conexión entre los mecanismos de inflamación y de oncogénesis, es muy probable que la fuerza con que la reacción inmunitaria se produzca, sea crítica para la comprensión de la evolución del cáncer y la generación de variantes celulares con características inmunogénicas distintas.

2. Objetivos

2.1. Objetivo General:

Estudiar características del microambiente tumoral y de inmunogenicidad en carcinomas de colon.

2.2. Objetivos Específicos:

Los tumores con fenotipo de inestabilidad de microsatélites (MSI) generan múltiples proteínas inmunogénicas que, potencialmente, son presentadas al sistema inmunitario. Las células tumorales pueden verse sometidas a una presión selectiva con aparición y selección de variantes débilmente inmunogénicas.

1. Estudio de los patrones de respuesta inflamatoria y de los perfiles de expresión génica en carcinomas colorrectales, en relación a las rutas de oncogénesis.

2. Estudio de mecanismos de evasión a la respuesta inmunitaria en carcinomas de colon con estabilidad (MSS) e inestabilidad de microsatélites (MSI).

**V. MATERIAL, MÉTODOS Y
RESULTADOS (Artículos y
Revisión)**

Leukocyte infiltrate in gastrointestinal adenocarcinomas is strongly associated with tumor microsatellite instability but not with tumor immunogenicity

Mónica Bernal¹ • Angel Concha² • Pablo Sáenz-López¹ • Ana Isabel Rodríguez¹ • Teresa Cabrera^{1,3} • Federico Garrido^{1,3} • Francisco Ruiz-Cabello^{1,3}

¹Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain; ²Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain. ³Departamento de Bioquímica, Biología Molecular III e Inmunología, Facultad de Medicina, Granada, Spain

Received: 4 November 2010 / Accepted: 18 February 2011 / Published online: 13 March 2011 © Springer-Verlag 2011

Abstract

Purpose To analyze the correlation of genomic instability with leukocyte infiltrate in gastrointestinal carcinomas (GIACs) and with tumor immunogenicity, e.g., HLA class I cell surface expression defects and galectin-3 and PDL-1 expression.

Experimental design Lymphocyte and macrophage infiltrations were immunohistochemically studied in HLA class I negative GIACs with sporadic high-level microsatellite instability (MSI-H) or microsatellite stability (MSS). Results Tumors with MSI-H were associated with the following: dense infiltration (CD45, $P < 0.001$); cytotoxic CD8-positive lymphocytes ($P < 0.001$); and a complete absence of HLA class I cell surface expression, due to inactivating $\beta 2$ -microglobulin ($\beta 2m$) mutation in 50% of cases. In contrast, HLA class I negative tumors with MSS were significantly associated with fewer CD8-positive lymphocytes. There was no association between microsatellite instability and other molecular features of the tumor cells, including expression of galectin-3. Finally, macrophage infiltrate in the tumors was not correlated with microsatellite instability or HLA class I cell surface expression (CD64, $P = 0.63$; CD163, $P = 0.51$).

Conclusions Microsatellite instability appears to be the most important factor determining the composition, density, and localization of leukocyte infiltrate, which is independent of other molecular features such expression of HLA class I cells, galectin-3, or programmed death ligand-1. Accordingly, the strong intratumoral CD8+ T infiltration of MSI-H tumors may be produced by elevated levels of specific inflammatory chemokines in the tumor microenvironment.

Keywords

Gastrointestinal adenocarcinomas (GIACs), Microsatellite instability (MSI), HLA class I, Tumor leukocyte infiltrate

Abbreviations

APM: Antigen processing machinery; CRC: Colorectal cancer; GIAC: Gastrointestinal adenocarcinoma; HLA: Human leukocyte antigen; LOH: Loss of heterozygosity; MHC: Major histocompatibility complex; MMR: Mismatch repair; MSI: Microsatellite instability; MSI-H: High microsatellite instability; MSS: microsatellite stability.

Introduction

Several lines of evidence from preclinical tumor models and human clinical trials indicate that immune effector cells play an important role in the recognition and destruction of cancer cells and in the control of neoplastic development [1–3]. Malignant tumors may generate a variety of tumor antigens that can be presented to and recognized by the host's immune system and may eventually lead to destruction of the respective tumor cells by cytotoxic T lymphocytes [4, 5]. However, immune responses and/or immunotherapy often fail to produce the rejection of progressing or established tumors. Immune escape mechanisms evolved by tumors exert a selective pressure on the tumor microenvironment that can lead to malignant progression. Indeed, immune responses may even favor the progression of malignancies [6, 7]. There is known to be a strong mutual influence and dynamic interaction between the cancer cell and its microenvironment [2, 3]. In colorectal cancer (CRC), there is growing evidence that the extent of the antitumoral immune response correlates with the type of genetic instability. CRC possesses two different carcinogenic pathways, chromosomal instability (CIN) or microsatellite instability (MSI) [8, 9]; CIN is associated with the suppressor pathway for aneuploid cancer and MSI with the mutator pathway for (pseudo) diploid cancer. These cancer pathways may be related to the somatic evolution of genetically unstable tumor cells, leading to the development of sophisticated immune escape variants in primary tumor lesions that are selected out by T lymphocyte responses. In CRCs, the MSI phenotype (MSI) has been correlated with the antitumoral immune response, which is characterized by the elevated lymphocytic infiltration [10, 11]. The high immunogenicity of this type of tumor has been explained in several studies, which suggested that insertions and deletions at coding microsatellites in target genes resulting from a defective DNA MMR system lead to the abundant generation of new immunogenic frameshift peptides (FSPs) for presentation to CTLs [12, 13]. The most frequent mechanism to escape intense immunosurveillance by CTLs is the loss of surface expression of HLA class I molecules, which inhibits the presentation of these new tumor-associated antigenic peptides to CTLs [14]. However, tumor cells can also employ other mechanisms to circumvent immune responses. Various tumor-derived factors contribute to the emergence of complex local and regional immunosuppressive networks, which include regulatory T cells (Tregs), expression of galectin-3, and programmed death ligand-1 (PDL-1) [15, 16], suppressive macrophages, tolerogenic DCs, and suppressive cytokines [17]. Macrophages are abundant in this tumor inflammatory infiltrate [18]. The high density of cytotoxic T lymphocytes in cancer infiltrate has been correlated with a good prognosis [19, 20], but the role of tumor-associated macrophages (TAMs) has not been fully elucidated [21]. The type, density, and localization of immune cells in CRC samples were found to be a better predictor of patient survival than the histopathological methods currently used to stage this disease, supporting the influence of the adaptive immune response on human tumor progression [19, 20].

The objective of this study was to analyze the correlation of tumor leukocyte infiltration with tumor immune escape phenotype (HLA class I downregulation and galectin-3 and PDL-1 upregulation in tumor cells) and with molecular features (microsatellite instability).

Materials and methods

Histopathology and selection of tumor samples

We analyzed 293 cryopreserved samples (Virgen de las Nieves University Hospital [VNUH] Tumor-Tissue Biobank) of tumor tissues from patients diagnosed with gastrointestinal adenocarcinoma (GIAC). These surgical specimens were previously studied and provided by the Department of Pathology, VNUH, Granada. The diagnosis followed the WHO pathological classification and TNM staging criteria [22]. Clinical and pathological reports were available, and approval was obtained from the ethical investigation review board of our hospital.

We selected 24 GIACs (21 colorectal carcinomas and 3 small intestine carcinomas) based on immunohistochemical study of HLA class I expression and analysis of the MSI phenotype. They were divided into three study groups as follows: 8 MSI-H tumors, including 7 HLA class I negative (MSI-H/HLA⁻) and 1 HLA class I positive (MSI-H/HLA⁺); 8 MSS tumors, all with total HLA class I loss (MSS/HLA⁻); and 8 MSS/HLA-I⁺ tumors (Control group), with no detectable alterations in HLA or $\beta 2-m$ genes (MSS/HLA⁺). The clinical characteristics of the 24 patients are listed in Table 1.

Table 1 Summary of main clinical and histological parameters of patient samples

	Samples	Age	Sex	TNM	Tumor location	Tumor stage	Tumor grade
MSI Tumors	CRC-1	81	Female	PT3N0M0	Colorectal	IIA	IV
	CRC-2	39	Male	PT3N1M1	Colorectal	IVA	II
	CRC-3	73	Female	pT4N1M0	Colorectal	IIIB	III
	CRC-4	45	Male	pT2N0M0	Colorectal	I	II
	CRC-5	79	Male	pT4N2M0	Colorectal	IIIC	II
	CRC-6	59	Female	pT3N0M0	Colorectal	IIA	II
	CRC-7	72	Female	pT3N2M0	Colorectal	IIIB	III
	CRC-8	82	Female	–	Colorectal	–	III
MSS/HLA ⁻ tumors	CRC-9	76	Male	pT4NxM1	Small Intestine	IV	II
	CRC-10	86	Male	PT3N0M0	Colorectal	IIA	III
	CRC-11	64	Female	pT3N1M0	Colorectal	IIIB	II
	CRC-12	71	Female	pT3N0M0	Colorectal	IIA	II
	CRC-13	72	Male	pT3N0M0	Colorectal	IIA	II
	CRC-14	70	Male	pT3N2M0	Colorectal	IIIB	III
	CRC-15	66	Male	pT3N0M0	Colorectal	IIA	II
	CRC-16	54	Male	pT4N1Mx	Colorectal	IIIB	II
MSS/HLA ⁺ (Controls)	CRC-17	56	Female	pT4N0M0	Small Intestine	IIB	II
	CRC-18	77	Male	pT3N0M0	Small Intestine	IIA	I
	CRC-19	61	–	pT3N0M0	Colorectal	IIA	II
	CRC-20	67	Male	PT3N0M0	Colorectal	IIA	II
	CRC-21	–	–	–	Colorectal	–	II
	CRC-22	62	Male	pT2N0M0	Colorectal	I	II
	CRC-23	70	Female	pT3N2M1	Colorectal	IVA	II
	CRC-24	83	Male	pT3N0M0	Colorectal	IIA	II

“–” (Data not available)

Immunohistological analysis

Cryopreserved samples: Sections of frozen 4–8- μ m-thick tissues were cut on a microtome-cryostat (Bright), allowed to dry at room temperature for 4–18 h, fixed in acetone at 4°C for 10 min, and stored at –40°C until staining.

Immunohistological techniques were performed with the Biotin-Streptavidin System (supersensitive Multilink HRP/ DAB kit, BioGenex, The Hague, The Netherlands). The following mouse monoclonal antibodies (mAbs) were used to analyze HLA class I expression: W6/32 against HLA-A, B, and C heavy chain/ β 2-m complex (kind gift from Dr Bodmer, Tissue Antigen Laboratory, Imperial Cancer Research Fund Laboratories, London, UK); GRH-1, which recognizes free and HLA class I heavy chain-associated β 2-m chain [23]; and HC-10 against free heavy chain of HLA-B y C molecules [24]. Total loss of HLA class I molecules was defined by negative staining with W6/32 and GRH-1 mAbs. We also reviewed previously obtained results of staining with monomorphic, locus- and allele-specific mAbs to select HLA class I positive tissue samples (Controls) without partial HLA losses.

Mouse mAbs used to stain tumor infiltrates on frozen tissues were: GRT2 (anti-CD45), produced in our laboratory [25]; OKT3 (anti-CD3 hybridoma, ATCC, Teddington, UK), OKT8 (anti-CD8 hybridoma, ATCC), and anti-CD4 (Clone RPA-T4, Becton–Dickinson Biosciences (BDB), San Jose, CA), anti-CD64 (Clone 10.1, BD Biosciences) and anti-CD206 (Macrophage mannose receptor; Clone 19.2, BD Biosciences), anti-heme-oxygenase 1 (HO-1, Clone 23/Heme Oxygenase 1, BD Bioscience), anti-CD163 (Macrophage scavenger receptor; Clone Ber-Mac3, MBL, Woburn, MA), anti-CD56 (Clone 123C3, Dako, Barcelona, Spain); anti-galectin-3 (Clone B2C10, BD Bioscience), and anti-CD274 (PDL-1, Clone 29E.2A3, BioLegend, San Diego, CA). The primary antibody was replaced with PBS for negative controls; no immunohistochemical staining was detected in control preparations.

Paraffin-Embedded Samples: Consecutive 4- μ m-thick sections were cut from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue and mounted in coated glass slides. After deparaffinization and rehydration, standard immunohistochemical assays were performed using an automated stainer (Auto-stainerLink 48, Dako). Conventional heat-induced antigen retrieval method (citrate buffer pH 6.0) was applied. Endogenous peroxidase activity was quenched with 3% aqueous hydrogen peroxide in methanol. A dextran-chain (biotin-free) detection system (EnvisionTM FLEX + Mouse (Linker), Dako) was used following manufacturer's recommendations. The following primary mAbs were used: anti-CD45 (2B11 + PD7/26 clone, Dako); anti-CD3 (UCHT 1 clone, Dako); anti-CD4 (4B12 clone, Dako); anti-CD8 (C8/144B clone, Dako); anti-CD20 (L26 clone, Dako); anti-CD56 (123C3 clone, Dako); anti-CD68 (PG-M1 clone, Dako); and anti-CD15 (Carb-3 clone, Dako).

Scoring system

Two observers analyzed tissue tumor infiltrates, using 10x objective and defining the infiltrate for each mAb staining as: stromal (inflammatory infiltrate surrounding tumor mass), interstitial (in fibrous septa around glands), or intratumoral (inflammatory cells in close contact with neoplastic epithelial cells). Stromal and interstitial infiltration was scored as: 0 (Absent), + (Low), ++ (Moderate), and +++ (High). Five different fields were examined under a 40x objective, and the number of infiltrating cells in the tumor were scored as: 0 (Absent); + (1–10 cells/field); ++ (10–20 cells/field); +++ (>20 cells/field).

Statistical analysis

For each of the 24 studied tumors, we calculated the overall infiltration score (0–9) for each marker (CD45, CD3, CD8, CD64, CD163, and CD206) separately, as the sum of the scores for stromal, interstitial, and intratumoral infiltration. After the normal distribution of the data were confirmed by means of the Kolmogorov–Smirnov test, one way ANOVA and Tukey post hoc tests were used to compare the means for each marker. $P \leq 0.05$ was considered significant. SPSS version 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) was used for the data analyses.

DNA isolation

Total DNA was obtained from tumor fragments microdissected (PALM Microlaser System, Olympus) from two frozen tissue sections (4–8- μ m-thick) using the REDEExtract-N-Amp Tissue PCR extraction kit. Normal DNA was obtained from PBLs, using the Quiagen DNA isolation kit (QIAamp Tissue Kit, Wetsbsurg, Leusden, the Netherlands).

MSI analysis

In all tumors, MSI status was determined according to the criteria of the National Cancer Institute workshop, using various panels of dinucleotide and mononucleotide repeat sequences. [26]. Samples were classified as high MSI (MSI-H) when MSI was detected for ≥ 30 –40% of the markers tested or as MSS when < 30 –40% of markers were unstable. We studied mononucleotide repeats in non-coding regions, *BAT-25*(poly-T), *BAT-26*(poly-A), and *BAT-40*(poly-A) and (poly-(A)₁₀) in *TGFB-RII* gene, which is related to cell proliferation and apoptosis. We also studied one dinucleotide (CA) repeated sequence, *D2S123*, and repeats in the HLA region (*D6S265*) and flanking the $\beta 2$ -*m* gene (*D15S209*). We also analyzed short tandem repeats associated with the HLA region (*D6S311*, *D6S273*, *C.1.2.C*, *C.1.2.5*, *D6S291*, *D6S105*, *D6S276*) and $\beta 2$ -*m* gene (*D15S1028*, *D15S126*, *D15S153*, *D15S146*) (data not shown). These microsatellite markers were amplified from DNA obtained from microdissected tissue and normal autologous PBLs. The 5' end of one primer of each primer set was tagged with a fluorescent label (Applied Biosystems). Microsatellite instability was determined using the ABI 3130x/Genetic Analyzer with 16 capillaries and GeneMapper v4.0 software (Applied Biosystems).

*Sequencing of $\beta 2$ -*m* gene*

Total DNA was used for sequencing exon 1 and exon 2 of $\beta 2$ -*m* gene. Primers used for amplification were exon 1: b2fw-90 5'GTCCCTCTCTCTAACCTGGC3' and B2-1Bw 5'-CAGAGCGGGAGGGTAGGAGA-3'; Exon2: B2-C (Fw) 5'-CGATATTCCTCAGGTACT-3' and B2-NC (Bw) 5'-CAACTTTCAGCAGCTTAC-3'.

PCR product was purified by using Microcon Centrifugal Filter Devices, Millipore (Billerica, MA). Sequencing was performed by using the Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Warrington, UK) and the same primers as in the amplification reaction. The sequencing reaction was performed in Centri-SepColumns (Applied Biosystems) following the manufacturer's recommendations. ABI 3130x/Genetic Analyzer and SequencingAnalysis v5.2 software (Applied Biosystem) were used for the analyses.

TAP1/2 gene mutations

The presence of possible mutations (usually mononucleotide deletions) in antigenic processing machinery (APM) TAP1 and TAP2 in microsatellite sequences was determined by PCR from total DNA using the following primers [27]: TAP1 Fw 5'-GTACTCCCGCTCAGTGCTTC-3', Bw 5'-AGAAGGCTTTCATTCTGGAGC-3'; TAP2 Fw 5'-TACTGTGGCTGCTTCAGGG-3', Bw 5'-AGGGAGACAGTCAGGGGG-3'.

The 5' end of one primer of each primer set was tagged with a fluorescent label. The analysis was performed using the ABI 3130x/Genetic Analyzer and GeneMapper v4.0 software (Applied Biosystems).

Results*HLA-ABC expression in GIACs*

We studied HLA class I expression in 293 GIACs using mAbs against HLA-ABC- β 2m complex (W6/32), β 2-m chain (GRH-1), and HLA-BC free heavy chain (HC-10), detecting 24 samples (8.2%) with total loss of tumor HLA class I expression; all cases were negative for mAbs recognizing the HLA-ABC- β 2m complex (W6/32) and β 2-m chain (GRH-1), but 13 (54%) showed intracellular presence of free heavy chains (HC-10 mAb positivity) (Fig. 1). These data suggest a selective downregulation of β 2-m gene, while negative HC-10 staining indicates a combined downregulation affecting the expression of HLA heavy chain and β 2-m genes. These results were confirmed by Q-PCR technique (data not shown). HLA class I study results were previously published [28], revealing different HLA class I altered phenotypes. For the present study, we selected 16 cases with non-detectable HLA class I expression by immunohistochemistry and 8 HLA class I positive GIAC samples, with no detectable HLA class I alterations (i.e., no locus, haplotype, or allele losses.)

HLA class I total loss due to β 2-m gene mutation correlates with the MSI-H phenotype

The MSI phenotype was analyzed in 142 of the GIAC samples, including 15 HLA class I negative tumors, of which 7 were classified as MSI-H (Table 2). Mutations of the β 2-m gene were analyzed in all 15 HLA class I negative tumors. Mutations were detected in four out of seven (57%) MSI-H/HLA-I negative CRCs and one out of eight (12.5%) MSS/HLA- GIACs (Table 3). All mutations detected in MSI-H tumors were frame shift mutations affecting coding microsatellites in the β 2-m gene. In contrast, the mutation found in the MSS HLA class I negative tumor was not in the repeated sequences. We observed biallelic mutations in two cases: CRC-2 presented two frameshift deletions in exon 2, CA deletion at codon 25, and deletion of A in the AAAAA sequence; and CRC-3 showed two frameshift deletions in exon 2, deletion of C in the CCCCC sequence and deletion of CCGTG at the end of exon 2 [29]. CRC-6 showed a frameshift insertion of TT in codon 15 of exon 1 in the remaining β 2-m alleles of these tumors, and CRC-5 a frameshift deletion of CT in the CTCTCTCT part of the leader sequence. Five short tandem repeats (STRs) flanking β 2-m gene were used to detect LOH in the second allele of CRC-5 and CRC-6 MSI-H tumors. All markers showed

MSI (data not shown), preventing detection of LOH. CRC-16 was the only MSS/HLA-tumor with $\beta 2$ -m gene mutation, i.e., a frameshift deletion of ACTACACT in codons 86, 87, 88 of exon 2. The other in the $\beta 2$ -m gene showed LOH (not shown). No HLA class I negative GIAC showed mutations in coding sequences in microsatellites of TAP1/TAP2 genes (Table 3). Other microsatellite targets have been defined in other APM members [30] but were not considered in this study, because the frequency of mutations in these genes and their functional relevance to HLA class I total loss or downregulation are less clear.

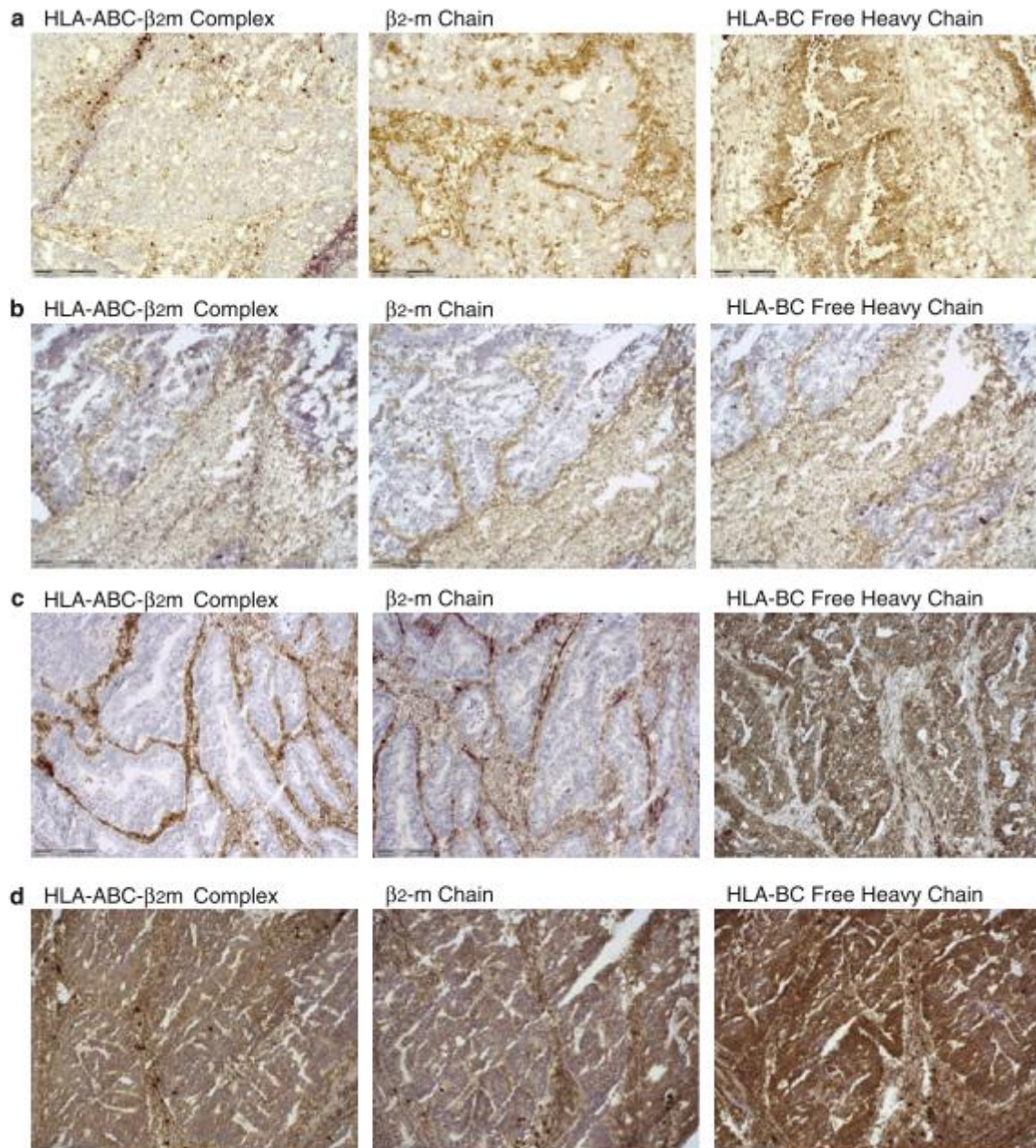


Fig. 1 Study of HLA class I expression in cryopreserved tissue sections using mAbs against HLA-ABC- $\beta 2$ m complex (W6/32), $\beta 2$ m (GRH-1), and HLA-BC free heavy chain (HC-10). **a** CRC-1: MSI/HLA-tumor with positive expression of HLA-BC free heavy chain (HC-10+) and negative intracellular $\beta 2$ -m chain (GRH-1-) **b** CRC-15: MSS/HLA- tumor showing a combined downregulation of heavy chain and $\beta 2$ -m expression (W6/32-, GRH-1-, HC-10-). **c** CRC-11: MSS/HLA- GIAC presenting negative $\beta 2$ -m expression with positive HLA-BC

free heavy chain expression. **d** CRC-24: MSS/HLA+ Control tumor with positive HLA class I expression (HC- β 2 m complex +; β 2-m chain +; HLA-BC free HC +)

Table 2 Microsatellite markers

	MSI markers					Cromosome 6 marker	Cromosome 15 marker
	BAT-25	BAT-26	D2S123	BAT-40	TGFBRII	D6S265	D15S209
CRC-1	+	+	+	+	+	+	+
CRC-2	+	+	+	+	-	+	-
CRC-3	+	+	+	+	+	-	+
CRC-4	+	+	+	+	+	+	+
CRC-5	+	+	+	+	+	+	+
CRC-6	+	+	+	-	-	+	+
CRC-7	+	+	+	+	+	+	+
CRC-8	+	+	+	+	+	+	+
CRC-9	-	-	-	-	-	LOH	ND
CRC-10	-	-	-	-	-	LOH	H
CRC-11	-	-	-	-	-	LOH	ND
CRC-12	-	-	-	-	-	ND	ND
CRC-13	-	-	-	-	-	ND	ND
CRC-14	-	-	-	-	-	LOH	LOH
CRC-15	-	-	-	-	-	LOH	LOH
CRC-16	-	-	-	-	-	-	-
CRC-17	-	-	-	ND	ND	-	-
CRC-18	-	-	-	ND	ND	-	-
CRC-19	-	-	-	ND	ND	-	-
CRC-20	-	-	-	ND	ND	-	-
CRC-21	-	-	-	ND	ND	-	-
CRC-22	-	-	-	ND	ND	-	-
CRC-23	-	-	-	ND	ND	-	-
CRC-24	-	-	-	ND	ND	-	-

“-” Normal, “+” MSI, *H* Homozygote, *LOH* Lost of Heterozygosity, *ND* not done

MSI status was determined according to the criteria of the National Cancer Institute workshop. Tissue samples were classified as MSI-H when tumors exhibited MSI in ≥ 30 –40% of the markers tested, and MSS when they exhibited MSI in ≤ 30 –40% markers

Table 3 Summary of immunohistochemical results for HLA-ABC, galectin-3, and PDL-1 expression and presence of mutations in $\beta 2$ -m and TAP1/2 genes

	Samples	Immunohistochemistry ^a					Mutations ^b	
		HLA-ABC- $\beta 2$ m complex	$\beta 2$ -m chain	HLA-BC free heavy chain	Galectin-3	PDL-1 (CD274)	$\beta 2$ -m	TAP1/2
MSI tumors	CRC-1	-	-	+	±	+++	-	-
	CRC-2	-	-	+	-	+	+	-
	CRC-3	-	-	+	+	-	+	-
	CRC-4	+	+	+	-	+	-	-
	CRC-5	-	-	+	-	+	+	-
	CRC-6	-	-	+	±	-	+	-
	CRC-7	-	-	+	-	±	-	-
	CRC-8	-	-	-	ND	ND	-	-
MSS/HLA- tumors	CRC-9	-	-	-	±	-	-	-
	CRC-10	-	-	-	+	+	-	-
	CRC-11	-	-	-	-	-	-	-
	CRC-12	-	-	-	±	-	-	-
	CRC-13	-	-	+	±	-	-	-
	CRC-14	-	-	+	-	-	-	-
	CRC-15	-	-	+	+	-	-	-
	CRC-16	-	-	+	-	-	+	-
MSS/HLA+ Tumors (controls)	CRC-17	+	+	+	±	-	-	-
	CRC-18	+	+	+	-	-	-	-
	CRC-19	+	+	+	-	±	-	-
	CRC-20	+	+	+	-	-	-	-
	CRC-21	+	+	+	-	-	-	-
	CRC-22	+	+	+	-	±	-	-
	CRC-23	+	+	+	+	±	-	-
	CRC-24	+	+	+	ND	ND	-	-

^a “-” 100% negative tumor cells, “+” 100% positive tumor cells, focal or scattered expression in tumor cells, ND not done

^b “+” (presence of mutation); “-” (absence of mutation). Four out of seven MSI-H/HLA class I negative tumors showed frameshift mutations in $\beta 2$ -m gene. Moreover, CRC-2 and CRC-3 presented biallelic mutations in this gene. No HLA class I negative tumors showed mutations in TAP1 and TAP2 microsatellite sequences

Tumor lymphocyte infiltrate correlates with MSI-H/MSS phenotype but not with HLA class I expression

Table 4 exhibits semi-quantitative scores for inflammatory infiltration in the three different tumor regions. MSI-H tumors showed high leukocyte infiltration (6/8 MSI-H tumors with score of +++), represented mainly by CD8+ T lymphocytes (+ to +++), with stromal, interstitial, and intratumoral distribution. Leukocyte infiltration was lower in MSS/HLA- samples (6/8 MSS/HLA- tumors with score of + to ++), with low or absent CD8+ cells (0 to +). CD8+ lymphocytes in MSS/HLA- tumors were predominantly stromal and interstitial, with only two cases showing scant CD8+ intratumoral lymphocytes (+). MSS/HLA+ tumors (controls) largely showed moderate/high leukocyte infiltration (++ to +++), with a low presence of CD8+ cells (+) in comparison with the HLA- GIACs. These T lymphocytes were mainly localized in the interstitium, with six cases showing intratumoral CD8+ cells (+) (Fig. 2). We obtained significant differences in the infiltration by CD8+ cells between MSI-H tumors and the others two GIACs groups (MSS/HLA-, $P < 0.001$; Controls, $P =$

0.001). No significant differences were found in the CD8 infiltration between MSS/HLA⁻ and Control tumors ($P \leq 0.05$) (Table 4).

The density of M1 macrophage infiltration was similar among the three GIAC groups (+ to +++), finding intratumoral CD64⁺ cells in 50% of MSI-H samples (+ to +++), and 22% of MSS/HLA⁺ tumors (+). M2 macrophages (CD163, CD206, Hmox-1) were detected in all 24 selected GIAC samples, with no differences in infiltration pattern among tumor groups. M2 macrophages were mainly distributed in stroma and interstitium, and the localization was intratumoral in less than 30% of MSI-H tumors (+). No significant differences in infiltration density were found between M1 and M2 macrophages in any GIAC group. ($P < 0.05$) (Table 4; Fig. 3).

The MSI-H phenotype was positively correlated with the intra-tumoral infiltration of CD8⁺ but not CD4⁺, CD20⁺, or CD56⁺ lymphocytes. The GIAC samples were only sparsely infiltrated by NK-CD56⁺ cells (not shown), and no correlation was observed between tumor infiltration by NK cells and MSI/MSS phenotype or HLA cell surface expression, as also found for scattered CD4⁺ and CD20⁺ lymphocytes.

Galectin-3 and PDL-1 in gastrointestinal tract carcinomas

The majority of tumors positive for PDL-1 and galectin-3 showed focal or scattered expression, predominantly in the cytoplasm (Fig. 4). Neither galectin-3 nor PDL-1 expression was correlated with any of the studied clinicopathological parameters. The frequency and pattern of galectin-3 expression did not differ among MSI-H HLA class I negative tumors, MSS HLA class I negative tumors, and the control group, whereas there was a tendency for a higher frequency of PDL-1 in the MSI-H group (Table 3).

Table 4 Immunohistochemical results for leukocyte infiltrate in the 24 selected tumors

	CD45		CD3		CD8		CD64		CD206		CD163	
	Infiltration	<i>n</i>	Infiltration	<i>n</i>	Infiltration	<i>n</i>	Infiltration	<i>n</i>	Infiltration	<i>n</i>	Infiltration	<i>n</i>
MSI tumors	Stromal		Stromal		Stromal		Stromal		Stromal		Stromal	
	+	0	+	2	+	3	+	4	+	4	+	2
	++	2	++	2	++	4	++	3	++	3	++	3
	+++	6	+++	4	+++	1	+++	1			+++	1
	Interstitial		Interstitial		Interstitial		Interstitial		Interstitial		Interstitial	
	+	0	+	3	+	4	0	1	0	1	+	2
	++	2	++	2	++	4	+	3	+	4	++	3
	+++	6	+++	3			++	2	++	2	+++	1
							+++	2				
	Intratumorral		Intratumorral		Intratumorral		Intratumorral		Intratumorral		Intratumorral	
	+	3	+	3	+	2	0	4	0	5	0	4
	++	2	++	3	++	4	+	3	+	2	+	1
+++	3	+++	2	+++	2	+++	1			+++	1	
MSS/HLA– tumors	Stromal		Stromal		Stromal		Stromal		Stromal		Stromal	
	+	1	0	1	0	4	+	3	0	1	+	1
	++	5	+	3	+	4	++	4	+	2	++	5
	+++	2	++	3			+++	1	++	4	+++	2
			+++	1					+++	1		
	Interstitial		Interstitial		Interstitial		Interstitial		Interstitial		Interstitial	
	+	3	+	5	0	2	+	6	+	4	+	4
	++	4	++	2	+	6	++	1	++	3	++	3
	+++	1	+++	1			+++	1	+++	1	+++	1
	Intratumorral		Intratumorral		Intratumorral		Intratumorral		Intratumorral		Intratumorral	
	0	5	0	6	0	6	0	8	0	8	0	6
	+	3	+	2	+	2					+	2
MSS/HLA+ tumors (controls)	Stromal		Stromal		Stromal		Stromal		Stromal		Stromal	
	0	3	0	4	0	3	0	1	0	1	0	1
	++	3	+	4	+	5	+	2	+	2	++	5
	+++	2					++	3	++	3	+++	1
							+++	2	+++	1		
	Interstitial		Interstitial		Interstitial		Interstitial		Interstitial		Interstitial	
	+	1	+	7	+	8	+	4	+	5	+	1
	++	5	++	1			++	3	++	2	++	5
	+++	2					+++	1	+++	1	+++	1
	Intratumorral		Intratumorral		Intratumorral		Intratumorral		Intratumorral		Intratumorral	
	0	1	0	4	0	1	0	6	0	8	0	7
	+	4	+	4	+	6	+	2				
++	3			++	1							

We show the global tumor infiltrate by leukocytes (CD45), including T lymphocytes (CD3), cytotoxic T cells (CD8), and M1 (CD64) and M2 macrophages (CD206, CD163). *n* = number of patients with specific type of leukocyte infiltrate. The tumor infiltrate is classified by its localization as stromal (inflammatory infiltrate surrounding tumor), interstitial (in fibrous septum around tumor), or intratumoral (inflammatory cells are in close contact with neoplastic cells). The stromal/interstitial infiltration is classified as follows: 0 (absent); + (low); ++ (moderate), and +++ (high); and the intratumoral infiltration as 0 (absent); + (0–10 infiltrating cells per tumor field), ++ (10–20 infiltrating cells per tumor field), and +++ (>20 infiltrating cells per tumor field). Significant differences by CD45, CD3, and CD8 cells were found between MSI-H and Control groups (CD45, $P = 0.001$; CD3, $P = 0.001$; CD8, $P = 0.001$) and between MSI-H and MSS/HLA– tumor groups (CD45, $P < 0.001$; CD3, $P = 0.003$; CD8, $P < 0.001$). There was no significant difference in infiltration by CD45 ($P = 0.85$), CD3 ($P = 0.88$), or CD8 ($P = 0.18$) cells between MSS/HLA– and Control tumors. No significant differences in macrophage infiltration were found among any of the tumor groups (CD64, $P = 0.63$; CD163, $P = 0.51$; CD206, $P = 0.84$).

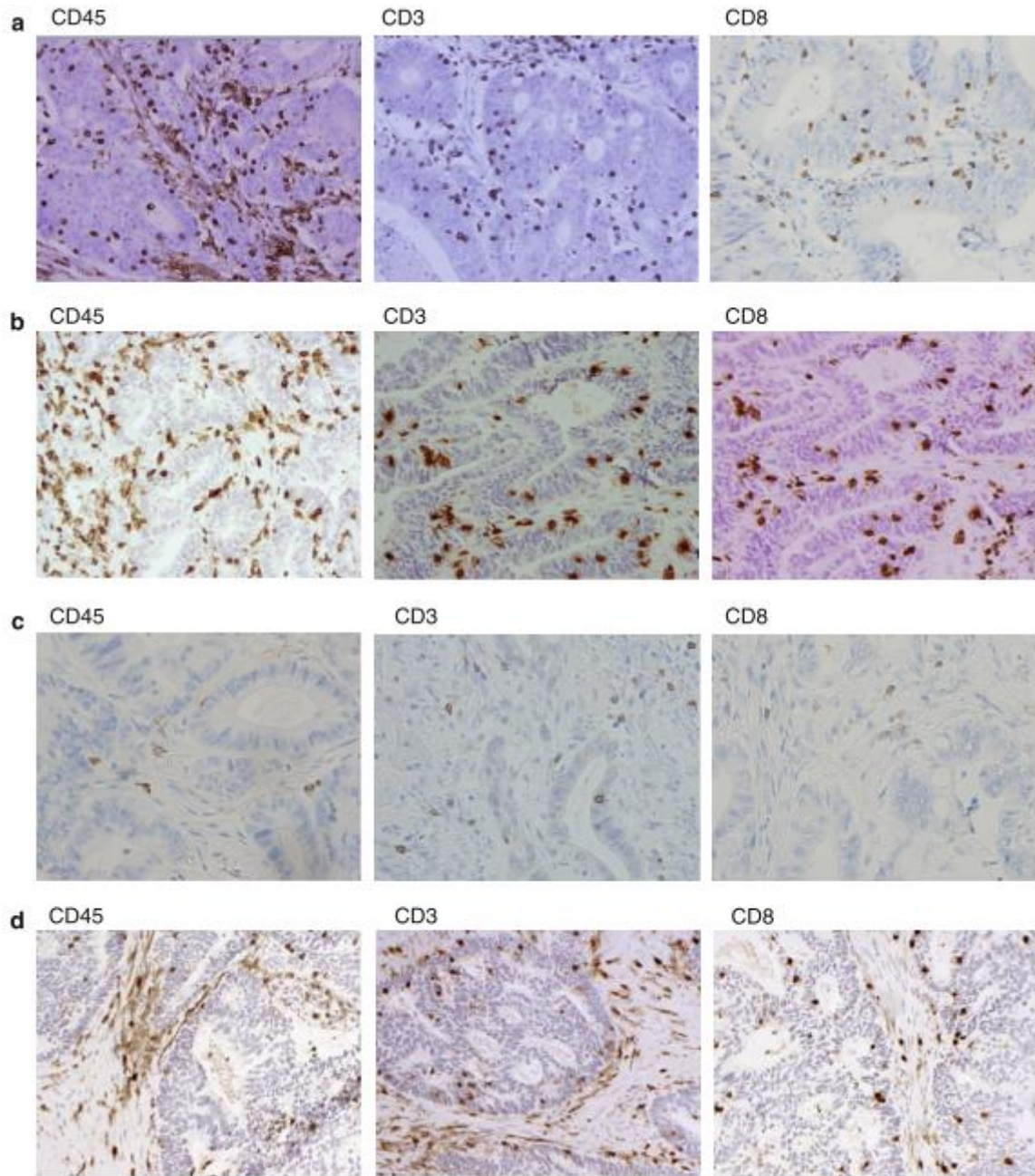


Fig. 2 Immunohistochemical staining of tumor infiltrate using mAbs against CD45, CD3, CD8 on paraffin (**a, c**), and cryopreserved (**b, d**) tissue sections. **a** CRC-6: MSI/HLA⁻ tumor with highest infiltration by CD45 cells and marked predominance of CD8⁺ lymphocytes within the tumor, also showing stromal and interstitial distribution. **a** CRC-6 presents total loss of tumor cell surface HLA-ABC expression and **b** CRC-4 is a HLA class I positive tumor; both **a** and **b** MSI-H CRCs show similar infiltration by CD8⁺ cells and leukocytes (CD45), suggesting that the presence of leukocytes in these MSI tumors is strongly associated with genetic instability rather than HLA phenotype. **c** CRC-14 is an MSS/HLA⁻ tumor showing the least presence of infiltrating cells with no CD8⁺ T Lymphocytes. **d** CRC-18 is an MSS/HLA⁺ tumor (control) characterized by intermediate infiltration by CD45⁺ cells with scant presence of CD8⁺ lymphocytes.

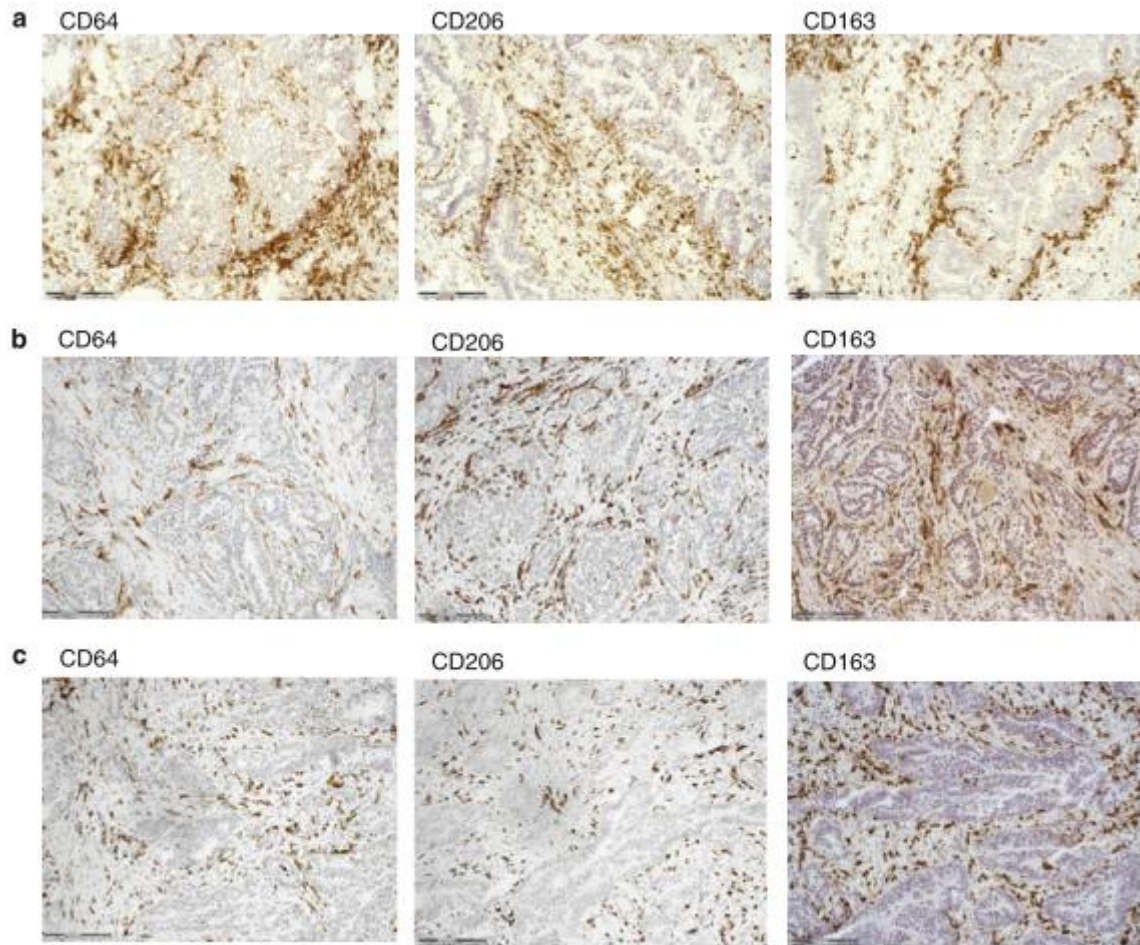


Fig. 3 Immunohistochemical staining of tumor infiltration using mAbs against M1 (CD64) and M2 (CD206, CD163) macrophage markers on cryopreserved tissue sections. **a** CRC-1, an MSI/HLA⁻ tumor; **b** CRC-15, an MSS/HLA⁻ tumor, and **c** CRC-17, an MSS/HLA⁺ tumor (control). No marked differences were observed in infiltration by M1/M2 macrophages among the three tumor types.

Discussion

Study of the relationship between lymphocyte infiltrate and tumor cells may shed light on tumor-host interactions. It has been proposed that lymphocyte infiltrate is an independent factor for survival in CRC patients [19, 20] suggesting that the adaptive immune response plays a role in preventing tumor recurrence. The purpose of this study was analyze the tumor leukocyte infiltration in relation to carcinogenesis pathways (genetic instability) and parameters associated to tumor immunogenicity and immune evasion (HLA class I, Galectin-3 and PDL-1 expression). Abnormalities of HLA class I expression have been found in various malignancies and may reflect the immune selective pressure imposed by the continuous antitumoral immune response of the host in order to select tumor cells with defects in antigen presentation [31–33]. Mutations or deletion of β 2-microglobulin genes [34–37], failure of expression of TAP genes or the components of the

immunoproteasoma LMP2 and LMP7 are also responsible for total or downregulation of HLA class I expression [29, 38]. Finally, promoter hypermethylation might be also an important mechanism that leads to HLA class I antigen downregulation and immune evasion in gastric cancer [39].

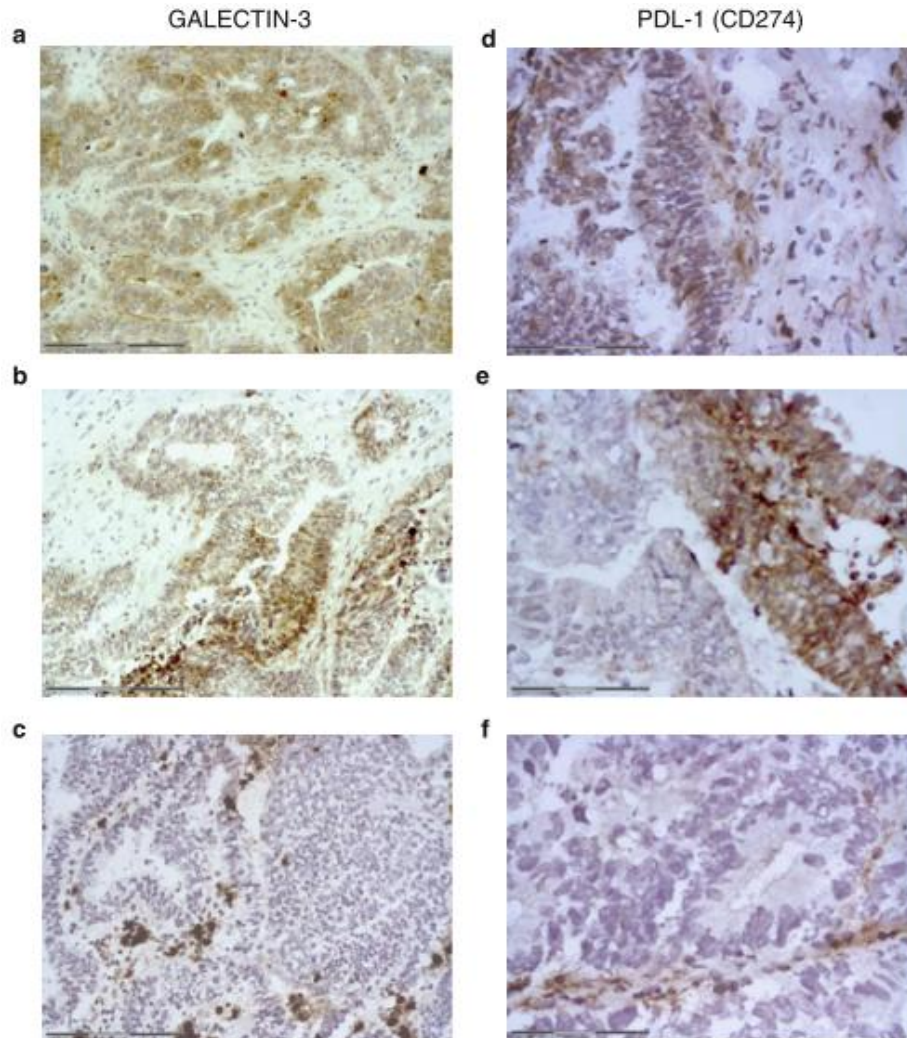


Fig. 4 Immunohistochemical staining to detect galectin-3 and PDL-1 expression by tumor cells in frozen tissue sections. **a** CRC-15, an MSS/HLA⁻ tumor with moderate galectin-3 expression in 100% of neoplastic cells. **b** CRC-9, an MSS/HLA⁻ tumor with areas of positive and negative galectin-3 expression. **c** CRC-19, an MSS/HLA⁺ tumor with no galectin-3 expression (10x objective). **d** CRC-1, an MSI/HLA⁻ tumor with strong PDL-1 expression in 100% of tumor cells. **e** CRC-23, an MSS/HLA⁺ tumor with focal pattern of PDL-1 expression in neoplastic cells. **f** CRC-14, an MSS/HLA⁻ tumor with no PDL-1 expression. (40x objective)

The main finding was an association between HLA class I defects due to $\beta 2-m$ mutation and the MSI-H phenotype in four out of seven cases. In the remaining three cases, the mechanism of HLA class I loss is unknown, since no mutations were detected in $\beta 2-m$ gene or the hot-spot mutation area of TAP genes. Interestingly, in two cases from the MSI-H group (CRC-2 and CRC-3), the complete loss of HLA class I expression was produced by biallelic inactivation of the $\beta 2-m$ gene via two truncating

mutations. The characterization of these biallelic mutations were previously described in a shorter cohort of tumor samples [29], in which the presence of two mutations in both copies of the gene were confirmed by cloning and subsequent gene sequencing [29]. Acquired biallelic mutations in $\beta 2-m$ are infrequent and correspond in the present study to tumors with immunoedited phenotype, providing strong evidence of cancer immune selection. Hence, although MSI-H tumors might possess higher immunogenicity as a consequence of the elevated amounts of aberrant frameshift peptides they generate [12, 40, 41], HLA class I loss may occur at an early stage of colorectal carcinogenesis in MSI-H tumors, supporting the early onset of immunoselective pressure [40, 42].

An ample CD45+ inflammatory infiltrate was observed in all MSI-H cases. CD8 + T lymphocytes were more frequently detected intratumorally in MSI-H tumors and in the stroma of MSS tumors. An important factor influencing abundant leukocyte infiltration in CRCs appears to be high-level instability but not the presence of K-RAS and BRAF mutation (not shown).

The abundance of intratumoral CD8+ T lymphocytes in tumors with total HLA class I loss is not yet understood. Interestingly, the T cell infiltrate in MSI-H tumors is characterized by the presence of activated and cytotoxic cells [43, 44]. Paradoxically, although antigenic structures may potentially be recognized by CD8+ T lymphocytes, these cells showed a lower intratumoral and stromal presence in HLA class I positive tumors with MSS versus MSI-H phenotype.

The high infiltration of CD8+ lymphocytes in MSI-H tumors may result from the release of specific chemokines that is independent of HLA class I expression. In this context, cytokines detected in MSI-H tumors were reported to favor recruitment of cytotoxic T cells and increase Th1 responses [42, 45] rather than contribute to tolerance induction. This observation is supporting by the present findings of no significant difference in CD8-lymphocyte infiltrate between HLA Class I positive MSI-H tumor (case CRC-4 in stage I, pT2N0M0) and more advanced tumors with HLA class I negative/MSI-H phenotype (Fig. 2) and of a significant reduction in the density and location of T-CD8+ lymphocytes in HLA class I negative MSS tumors (Fig. 2).

Although absence or downregulation of HLA class I renders cells susceptible to NK cells, we found only scant CD56+ cells in most of the tumors, with no differences as a function of HLA class I cell surface expression, in agreement with previously reports [46, 47].

Given the beneficial role proposed for tumor-associated macrophages in colon cancer [48], we analyzed the infiltration of M1 and M2 macrophages [49] in the three tumor groups studied. Previous studies have attributed M2 macrophages with important pro-tumor and immunosuppressive functions (regulation of angiogenesis, tissue remodeling, and Th2-cytokine production) [49, 50], whereas M1 macrophages exert pro-inflammatory activity by promoting Th1 responses. In the present study, however, there was no macrophage polarization, since the presence of M2 and M1 macrophages was similar in all three groups.

We also investigated the expression of Galectin-3 and PDL-1 in the tumor groups. Galectin-3 is expressed in a variety of tumors and immune cells and has been related to multiple extracellular functions [51–54]. This lectin also acts as an immune regulator inducing apoptosis of T cells and loss

of their antitumor effector functions [15]. PDL-1 also regulates peripheral tolerance, inducing anergy, unresponsiveness and functional exhaustion of T cells [16, 55]. The distribution of both molecules could be expected to differ among the three studied tumor groups, with a higher expression in HLA class I positive tumors than in immune-edited tumors (i.e., MSI-H HLA class I negative). We detected galectin-3 in some tumors in all groups, but it was not correlated with the presence of M1 macrophages in the microenvironment of MSI-H tumors. By contrast, there was a tendency for PDL-1 expression to be increased in tumors with high CD8 expression (MSI-H), although further studies are required to confirm this observation. Similar PDL-1 findings have been reported in hepatocellular carcinomas [56]. Although the mechanism regulating PDL-1 expression in tumor cells is unknown, several cytokines, including IFN- γ , have been implicated as potent inducers of PDL-1 expression on the surface of several tumor cells [57]. Moreover, various proteins of IFN- γ pathways are strongly upregulated in CRCs, with intense infiltration of T-CD8 cells [19, 20].

In the studied GIACs, microsatellite instability appears to critically influence the composition and density of leukocyte infiltration independently of HLA class I loss. The abundance of CD8+ cells detected in the studied MSI-H tumors might favor immunoselection of HLA-negative tumor cells. However, in both HLA-positive and –negative MSS tumors, the role of the dense lymphocyte infiltrate is still unclear and needs further investigation.

Acknowledgments The authors thank Eva García, Antonia Moreno, M^a Dolores Gálvez and Inmaculada García for technical assistance. They also thank the Tumor-Tissue Biobank of Virgen de las Nieves University Hospital for providing samples. The study was partially supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (08/0528), Red Genómica del Cáncer (RETICRD 06/020), Consejería de Salud Junta de Andalucía, Proyecto de Investigación de Excelencia (CTS-3952, CVI-4740 and P06/-CTS-02200) and Plan Andaluz de Investigación (PAI, Group CTS- in Spain, and from the European Searchable Tumour Cell Line Database (ESTDAB) project, contract No. QLRI-CT-2001-01325 (<http://www.ebi.ac.uk/estdab>), from the European Network for the identification and validation of antigens and biomarkers in cancer and their application in clinical tumor immunology (ENACT) project (European community LSHC-CT-2004-503306) and from the Cancer Immunotherapy Project (European community OJ 2004/c158, 18234).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interests.

References

1. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21:137–148
2. Smyth MJ, Dunn GP, Schreiber RD (2006) Cancer immunosurveillance and immunoediting: the roles of immunity in suppressing tumor development and shaping tumor immunogenicity. *Adv Immunol* 90:1–50
3. Bui JD, Schreiber RD (2007) Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol* 19:203–208.
4. Robbins PF, Kawakami Y (1996) Human tumor antigens recognized by T cells. *Curr Opin Immunol* 8:628–636
5. Boon T, Coulie PG, Van den Eynde BJ, Van der Bruggen P (2006) Human T cell responses against melanoma. *Annu Rev Immunol* 24:175–208
6. Philip M, Rowley DA, Schreiber H (2004) Inflammation as a tumor promoter in cancer induction. *Semin Cancer Biol* 14:433–439

7. de Visser KE, Eichten A, Coussens LM (2006) Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nat Rev Cancer* 6:24–37
8. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643–649
9. Perucho M (2003) Tumors with microsatellite instability: many mutations, targets and paradoxes. *Oncogene* 22:2223–2225
10. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, Vecchiato N, Macri E, Fornasarig M, Boiocchi M (1999) High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol* 154:1805–1813
11. Smyrk TC, Watson P, Kaul K, Lynch HT (2001) Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer* 91:2417–2422
12. Linnebacher M, Gebert J, Rudy W, Woerner S, Yuan YP, Bork P, von Knebel Doeberitz M (2001) Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int J Cancer* 93:6–11
13. Saeterdal I, Bjørheim J, Lislud K, Gjertsen MK, Bukholm IK, Olsen OC, Nesland JM, Eriksen JA, Møller M, Lindblom A, Gaudernack G (2001) Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13255–13260
14. Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S (2002) HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol* 12:3–13
15. Peng W, Wang HY, Miyahara Y, Peng G, Wan RF (2008) Tumor-Associated Galectin-3 modulates the function of tumor-reactive T cells. *Cancer Res* 68:7228–7236
16. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L et al (2000) Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med* 192:1027–1034
17. Zou W (2005) Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer* 5:263–274
18. Sica A, Allavena P, Mantovani A (2008) Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett* 267:204–215
19. Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molidor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Galon J (2005) Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med* 353:2654–2666
20. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH, Pagès F (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960–1964
21. Allavena P, Sica A, Garlanda C, Mantovani A (2008) The Yin-Yang of tumor-associated macrophages in neoplastic progression and immune surveillance. *Immunol Rev* 222:155–161
22. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind CH (2009) TNM classification of malignant tumours UICC, 7th edn. Wiley, Blackwell
23. López Nevot MA, Cabrera T, de la Higuera B, Ruiz-Cabello F, Garrido F (1986) Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a leucemias humanas. *Inmunología* 5:51–59
24. Stam NJ, Spits H, Ploegh HL (1986) Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus heavy chains permit biochemical characterization of certain HLA-C locus products. *J Immunol* 137:2299–2306
25. Huelin C, Gonzalez M, Pedrinaci S, de la Higuera B, Piris MA, San Miguel J, Ruiz-Cabello F, Garrido F (1988) Distribution of the CD45R antigen in the maturation of lymphoid and myeloid seri-es.- The CD45R negative phenotype is a constant finding in T CD4 positive lympho-proliferative disorders. *British J Haematol* 69:173–179
26. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN et al (1998) 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* 58:5248–5257
27. Kloor M, Becker C, Benner A, Woerner SM, Gebert J, Ferrone S, von Knebel Doeberitz M (2005) Immunoselective pressure and human leukocyte antigen class I antigen machinery defects in microsatellite unstable colorectal cancers. *Cancer Res* 65:6418–6424

28. Maleno I, Cabrera CM, Cabrera T, Paco L, López-Nevot MA, Collado A, Ferrón A, Garrido F (2004) Distribution of HLA class I altered phenotypes in colorectal carcinomas: high frequency of HLA haplotype loss associated with loss of heterozygosity in chromosome region 6p21. *Immunogenetics* 56:244–253
29. Cabrera CM, Jiménez P, Cabrera T, Esparza C, Ruiz-Cabello F, Garrido F (2003) Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens* 61:211–219
30. Dierssen JW, de Miranda NF, Ferrone S, van Puijenbroek M, Cornelisse CJ, Fleuren GJ, van Wezel T, Morreau H (2007) HNPCC versus sporadic microsatellite-unstable colon cancers follow different routes toward loss of HLA class I expression. *BMC Cancer* 7:33
31. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T et al (1997) Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 18:89–95
32. Marincola FM, Jaffee E, Hicklin D et al (2000) Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol* 74:181–273
33. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM (2006) Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol* 90:51–81
34. D'Urso CM, Wang ZG, Cao Y, Tataka R, Zeff RA, Ferrone S (1991) Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression. *J Clin Invest* 87:284–292
35. Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli JR, Rosenberg SA (1996) Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst* 88:100–108
36. Benítez R, Godelaine D, Lopez-Nevot MA, Brasseur F, Jiménez P, Marchand M, Oliva MR, van Baren N, Cabrera T, Andry G, Landry C, Ruiz-Cabello F et al (1998) 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* 52:520–529
37. Paschen A, Méndez RM, Jiménez P, Sucker A, Ruiz-Cabello F, Garrido F, Schadendorf D (2003) Complete loss of HLA class I Cancer Immunol Immunother (2011) 60:869–882 antigen expression on melanoma cells: a result of successive mutational events. *Int J Cancer* 103:759–767
38. Seliger B, Hohne A, Knuth A, Bernhard H, Ehring B, Tampe R, Huber C (1996) Reduced membrane major histocompatibility complex class I density and stability in a subset of human renal cell carcinomas with low TAP and LMP expression. *Clin Cancer Res* 2:1427–1433
39. Ye Q, Shen Y, Wang X, Yang J, Miao F, Shen C, Zhang J (2010) Hypermethylation of HLA class I gene is associated with HLA class I down-regulation in human gastric cancer. *Tissue Antigens* 75:30–39
40. Kloor M, Michel S, Buckowitz B, Rüschoff J, Bu'ttner R, Holinski-Feder E, Dippold W, Wagner R, Tariverdian M, Benner A, Schwitalle Y, Kuchenbuch B et al (2007) Beta2-microglobulin mutations in microsatellite unstable colorectal tumors. *Int J Cancer* 121:454–458
41. Schwitalle Y, Linnebacher M, Ripberger E, Gebert J, von Knebel Doeberitz M (2004) Immunogenic peptides generated by frame-shift mutations in DNA mismatch repair-deficient cancer cells. *Cancer Immunol* 4:14
42. Kloor M, Michel S, von Knebel Doeberitz M (2010) Immune evasion of microsatellite unstable colorectal cancers. *Int J Cancer* 127:1001–1010
43. Guidoboni M, Gafà R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Santini A, Del Tin L, Macrí E, Lanza G, Boiocchi M, Dolcetti R (2001) Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favourable prognosis. *Am J Pathol* 159:297–304
44. Phillips SM, Banerjea A, Feakins R, Li SR, Bustin SA, Dorudi S (2004) Tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer with microsatellite instability are activated and cytotoxic. *Br J Surg* 91:469–475
45. Banerjea A, Ahmed S, Hands RE, Huang F, Han X, Shaw PM, Feakins R, Bustin SA, Dorudi S (2004) Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. *Mol Cancer* 3:21
46. Sandel MH, Speetjens FM, Menon AG, Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Nagelkerke JF, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Kuppen PJ (2005) Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Mol Immunol* 42:541–546
47. Cozar JM, Canton J, Tallada M, Concha A, Cabrera T, Garrido F, Ruiz-Cabello Osuna F (2005) Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 54:858–866

48. Forssell J, Oberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A, Palmqvist R (2007) High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin Cancer Res* 13:1472–1479
49. Murdoch C, Muthana M, Coffelt SB, Lewis CE (2008) The role of myeloid cells in the promotion of tumor angiogenesis. *Nat Rev Cancer* 8:618–631
50. Qian BZ, Pollard JW (2010) Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* 141:39–51
51. Nangia-Makker P, Balan V, Raz A (2008) Regulation of tumor progression by extracellular galectin-3. *Cancer Microenviron* 1:43–51
52. Lahm H, Andre S, Hoefflich A et al (2001) Comprehensive galectin fingerprinting in a panel of 61 human tumor cell lines by RT-PCR and its implications for diagnostic and therapeutic procedures. *J Cancer Res Clin Oncol* 127:375–386
53. Lotan R, Matsushita Y, Ohannesian D et al (1991) Lactose binding lectin expression in human colorectal carcinomas. Relation to tumor progression. *Carbohydr Res* 213:47–57
54. Miyazaki J, Hokari R, Kato S et al (2002) Increased expression of galectin-3 in primary gastric cancer and the metastatic lymph nodes. *Oncol Rep* 9:1307–1312
55. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, Roche PC, Lu J, Zhu G, Tamada K, Lennon VA, Celis E et al (2002) Tumor-associated B7–H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med* 8:793–800
56. Shi F, Shi M, Zeng Z, Qi RZ, Liu ZW, Zhang JY, Yang YP, Tien P, Wang FS (2010) PD-1 and PDL-1 upregulation promotes CD8(?) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer*. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20473887
57. Muhlbauer M, Fleck M, Schutz C, Weiss T, Froh M, Blank C, Scholmerich J, Hellerbrand C (2006) PDL-1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and - gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol* 45:520–528

Genome-wide differential genetic profiling characterizes colorectal cancers with genetic instability and specific routes to HLA class I loss and immune escape

Mónica Bernal¹ • Fernando García-Alcalde^{2,3} • Angel Concha⁴ • Carlos Cano² • Armando Blanco² • Federico Garrido^{1,5} • Francisco Ruiz-Cabello^{1,5}

¹Department of Clinical Analysis and Immunology, Virgen de las Nieves University Hospital; ²Department of Computer Science and Artificial Intelligence, University of Granada; ³Department of Bioinformatics and Genomics, Príncipe Felipe Research Centre, Valencia; ⁴Department of Anatomical Pathology, Virgen de las Nieves University Hospital; ⁵Department of Biochemistry, Molecular Biology III and Immunology, School of Medicine, University of Granada.

Received: 20 May 2011 / Accepted: 26 October 2011 © Springer-Verlag 2011

Abstract

Aim We compared the expression of genes related to inflammatory and cytotoxic functions between MSI and MSS (HLA-class I-negative and HLA-class I-positive) colorectal cancers (CRCs), seeking evidence of differences in inflammatory mediators and cytotoxic T-cell responses. Twenty-two CRCs were divided into three study groups as a function of HLA class I expression and MSI phenotype: 8 MSI tumours, 6 MSS/HLA– tumours and 6 MSS/HLA+ tumours (controls).

Findings A first comparison between eight MSI and six MSS/HLA-positive (control) cancers, based on microarray analysis on an Affymetrix[®] HG-U133-Plus-PM plate, identified 1974 differentially expressed genes ($P < 0.05$). We grouped genes in Gene Ontology functional categories: apoptotic programme (72 genes, $P = 5.5 \cdot 10^{-3}$), leukocyte activation (43 genes, $P = 1.8 \cdot 10^{-5}$), T-cell activation (24 genes, $P = 6.3 \cdot 10^{-4}$), inflammatory response (40 genes, $2.3 \cdot 10^{-2}$) and cytokine production (10 genes, $P = 1.9 \cdot 10^{-2}$). Real-time PCR and immunohistochemical evaluation were used to validate the data, finding that increased mRNA levels of pro-inflammatory cytokines and cytotoxic mediators were associated with greater infiltration by CD8+T lymphocytes in the MSI group ($P < 0.001$). Finally, HLA-class I-negative tumours were not grouped together but rather in accordance with features of the gene expression profile of MSI or MSS tumours. As expected, genes associated with antigen processing machinery and MHC class I molecules (*TAP2*, *B2m*) were downregulated in MSS/HLA-class I-negative CRCs ($n = 6$) in comparison to controls.

Conclusions In conclusion, microarray and immunohistochemical data may be useful to comprehensively assess tumour–host interactions and differentiate MSI from MSS cancers. The two types of tumour, MSI/HLA-class I-negative and MSS/HLA-class I-negative, showed marked differences in the composition and intensity of infiltrating leucocytes, suggesting that their immune escape strategies involve distinct pathways.

Keywords

Colorectal cancers, Microsatellite instability, Human leukocyte antigen, Gene expression profile, Inflammatory response

Abbreviations

APM: Antigen processing machinery, CRC: Colorectal cancer, HLA: Human leukocyte antigen, MHC: Major histocompatibility complex, MMR: Mismatch repair; MSI: Microsatellite instability; MSS: Microsatellite stability

Introduction

Microsatellite instability (MSI) is one of the main carcinogenic pathways and has been observed in 15% of colorectal cancers (CRC). This type of genetic instability consists of the accumulation of numerous somatic mutations during DNA replication (insertions and deletions of single nucleotides and single base substitutions) in repetitive DNA sequences (microsatellites) because of alterations in the DNA mismatch repair (MMR) system [1–3]. The microsatellite instability (MSI) phenotype is the hallmark of Lynch syndrome-associated cancers characterized by MMR gene germline mutations (predominantly *hMLH1* or *hMSH2*), and it is also found in ~10–15% of sporadic CRCs, in which MMR gene promoter methylation is observed [3, 4]. Besides microsatellite instability, there is another carcinogenic pathway that promotes emergence of the remaining 85% of sporadic CRCs, i.e., chromosomal instability (CIN), characterized by numerical and structural chromosomal alterations, by the accumulation of mutations in oncogenes (e.g., K-ras) or tumour suppressor genes (p53) and, in most cases, by not being accompanied by CpG island methylator phenotype (CIMP) [4, 5].

Finally, cDNA microarray studies have demonstrated that microsatellite stable (MSS) and MSI colorectal cancers clearly differ in gene expression profiling, strongly supporting the different pathogeneses of these tumours [6, 7]. However, few studies have focused on the analysis of immune response genes, which may elucidate the distinct biological behaviours of the two cancer types [8].

Tumour development takes place despite activation of cytotoxic T lymphocytes (CTLs) in the response of the host immune system. In CRCs, it is possible to correlate the MSI phenotype with the strength of the anti-tumour immune response characterized by a high lymphocytic infiltration [9, 10]. In attempts to explain the high immunogenicity of this type of tumour, various studies have suggested that a defective DNA MMR system results in insertions and deletions at coding microsatellites in target genes that lead to the abundant generation of new immunogenic frameshift peptides (FSPs) that can be presented to CTLs [11, 12]. However, the biological meaning of the lymphocyte infiltrate in microsatellite instability tumours is controversial. Some authors propose that intra-epithelial lymphocytes (IELs) possess the characteristics of predominantly cytotoxic cells and release mediators of target cell death, whereas others argue that these infiltrates are secondary phenomena representing the proliferation of resident lamina propria lymphocytes with no immunological implications or biological role [8, 13]. Emergence of tumour escape variants due to immunoediting may explain the failure of CTLs to eliminate tumour cells [14]. In MSI cancers, a frequent mechanism to escape CTL immunosurveillance is the total loss of surface expression of HLA class I molecules and subsequent loss of tumour antigen presentation capacity [15]. Cells with HLA class I loss due to B2-microglobulin (*B2m*) gene mutations [16–19], especially in tumours with mutator phenotype (i.e. insertions and deletions leading to a change in the translational reading frame), would be immunoselected under immune pressure.

In a previous study, we observed that the characteristics and intensity of the infiltrate clearly differed as a function of the microsatellite instability phenotype but not the HLA expression on tumour cells [20]. In the present study, we used the same set of colorectal tumours to compare the expression of genes influencing inflammatory response and cytotoxic activity between MSI and MSS colorectal tumours in order to explain the above differences in leukocyte infiltration. We observed a differential

expression of genes involved in the anti-tumour immune response that may elucidate the molecular cancer escape mechanisms.

Materials and methods

Histopathology and selection of tumour samples

We selected 20 colorectal carcinomas (CRCs) based on the immunohistochemical study of HLA class I expression and analysis of the MSI phenotype. The rationale for dividing the groups of tumours is based on their immunogenicity for CD8+T cells, associated with HLA class I expression. Two groups consist of HLA-negative tumours (both MSI and MSS), while another group includes control tumours with genomic stability and no detectable alterations in HLA expression. Therefore, the three study groups were: 8 MSI tumours, including 7 HLA-class I-negative (MSI/HLA-negative) and 1 HLA-class I-positive (MSI/HLA-positive); 6 MSS tumours, all with total HLA class I loss (MSS/HLA-negative); and 6 MSS/HLA-positive tumours (control group), with no detectable alterations in HLA or *B2m* genes (MSS/HLA-positive). The clinical characteristics of the 20 patients are listed in Table 1.

We analysed cryopreserved samples (Virgen de las Nieves University Hospital [VNUH] Tumour-Tissue Biobank) that were previously studied and provided by the Department of Pathology, VNUH, Granada (Spain). The diagnosis followed the WHO pathological classification and TNM staging criteria [21]. Clinical and pathological reports were available, and approval was obtained from the ethical investigation review board of our hospital.

Immunohistological analysis of HLA class I expression

Frozen tissue sections of 4–8 µm thickness were cut on a microtome-cryostat (Bright), allowed to dry at room temperature for 4–18 h, fixed in acetone at 4°C for 10 min and stored at -40°C until staining. Immunohistological techniques were performed with the Biotin-Streptavidin System (supersensitive Multilink HRP/DAB kit, BioGenex, The Hague, The Netherlands). The following mouse monoclonal antibodies (mAbs) were used to analyse HLA class I expression: W6/32 against HLA-A, B and C heavy chain/B2m complex (kind gift from Dr Bodmer, Tissue Antigen Laboratory, Imperial Cancer Research Fund Laboratories, London, UK); GRH-1, which recognizes free and HLA class I heavy chain-associated B2m chain [22]; and HC-10 against free heavy chain of HLA-B and C molecules [23]. The primary antibody was replaced with PBS for negative controls, in which no immunohistochemical staining was detected.

Table 1 Summary of main clinical and histological parameters of patient samples

Samples	Age	Sex	TNM	Tumour location	Tumour stage	Tumour grade
MSI tumours						
CRC-1	81	Female	pT3N0M0	Colorectal	IIA	IV
CRC-2	39	Male	PT3N1M1	Colorectal	IVA	II
CRC-3	73	Female	pT4N1M0	Colorectal	IIIB	III
CRC-4	45	Male	pT2N0M0	Colorectal	I	II
CRC-5	79	Male	pT4N2M0	Colorectal	IIIC	II
CRC-6	59	Female	pT3N0M0	Colorectal	IIA	II
CRC-7	72	Female	pT3N2M0	Colorectal	IIIB	III
CRC-8	82	Female	–	Colorectal	–	III
MSS/HLA-negative tumours						
CRC-9	64	Female	pT3N1M0	Colorectal	IIIB	II
CRC-10	71	Female	pT3N0M0	Colorectal	IIA	II
CRC-11	72	Male	pT3N0M0	Colorectal	IIA	II
CRC-12	70	Male	pT3N2M0	Colorectal	IIIB	III
CRC-13	66	Male	pT3N0M0	Colorectal	IIA	II
CRC-14	54	Male	pT4N1Mx	Colorectal	IIIB	II
MSS/HLA-positive tumours (Conrols)						
CRC-15	61	–	pT3N0M0	Colorectal	IIA	II
CRC-16	67	Male	PT3N0M0	Colorectal	IIA	II
CRC-17	–	–	–	Colorectal	–	II
CRC-18	62	Male	pT2N0M0	Colorectal	I	II
CRC-19	70	Female	pT3N2M1	Colorectal	IVA	II
CRC-20	83	Male	pT3N0M0	Colorectal	IIA	II

“–” (Data not available)

DNA isolation

Total DNA was obtained from tumour fragments microdissected (PALM Microlaser System, Olympus) from two frozen tissue sections (4–8µm thick) using the REExtract-N-Amp Tissue PCR extraction kit. Normal DNA was obtained from PBLs using the Quiagen DNA isolation kit (QIAamp Tissue Kit, Wetsbsurg, Leusden, the Netherlands).

MSI analysis

MSI status was determined according to the criteria of the National Cancer Institute workshop, using various panels of dinucleotide and mononucleotide repeat sequences and classifying tissue samples with MSI in ≥ 30 –40% of tested markers as MSI and those with MSI in < 30 –40% of markers as MSS [3]. The MSI analysis conditions and markers used are reported elsewhere [20].

Microarray profiling

Total RNA was isolated from 10 serial cuts (30µm thick) from a liquid nitrogen-preserved tumour specimen that was also used in the tumour diagnosis by pathologists. The RNA isolation kit used was RNeasy Mini Kit (Quiagen). All samples were found to have good quality mRNA, with little

degradation and correct ratios of 28S:18S ribosomal peaks. The RNA Integrity Number (RIN), a measure of the integrity of total sample RNA, was calculated by using an algorithm that takes account of the entire electrophoretic trace. RIN values range from 1 (maximum degradation) to 10 (intact RNA). RIN values in our RNA samples ranged from 7 to 9.5. Biotinylated cRNA was synthesised from 200 ng of total RNA from each sample by using GeneChip 3'IVT Express kit (Affymetrix), following the manufacturer's recommendations. Oligonucleotide array hybridization and scanning were performed according to Affymetrix protocols. Gene expression profiles were determined by using Affymetrix HG-U133-Plus-PM Array Plate which contains 54,670 probe sets, including >33,000 well-characterized genes and UniGene clusters per sample.

Data pre-processing

Raw data were pre-processed by using the Robust Multi-Arrays Average (RMA) Bioconductor package RMA [24]. We removed control probes (102) and those with a background level hybridization signal and then filtered out the probes with no expression change across all samples, resulting in 9,695 probes that were used for further analysis.

Microarray analysis

Gene expression

As a first step in the analysis of pre-processed data, we identified the differentially expressed genes by means of the Partek Genomic Suite (Partek Inc. St Louis, MO, USA). Unsupervised hierarchical clustering of the samples was done by using Partek Genomic Suite software, with the euclidean distance as proximity measure and the average-linkage method as linkage criteria. We also applied principal components analysis (PCA), to simplify the analysis and visualization of the expression data sets. The data discussed in this publication have been deposited in NCBI's Gene Expression Omnibus [25] and are accessible through GEO Series accession number GSE27544 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE27544>).

Gene ontology

Gene Ontology (GO) information was used to assign biological meaning to selected genes, [26, 27] using csbl.go, a recently published tool, implemented as an R package [28, 29]. Furthermore, after analysing the set of genes and their GO annotations, we computed the most enriched GO terms. P-values were obtained by applying Fisher's exact test.

Pathways

The data sets of differentially expressed genes were uploaded into the Ingenuity Pathways Knowledge Base (IPKB) (IPA program) for the construction of networks and the analysis of biofunctions and biological pathways [30].

Microarray data validation

Real-time RT-PCR and immunohistochemical analysis were performed to validate the microarray data.

Real-time RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from 10 new sections (30µm thick) of each tumour specimen and from microdissected fragments using miRNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. cDNA synthesis was performed with the iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad), using 1µg RNA and following the manufacturer's instructions. RT-PCR products were analysed for gene expression of four target genes identified in microarray analysis: *B2m* (RNA isolated from tumour microdissected fragments), *MIP1α* (*CCL3*), *TGF1β* and *STAT1* (RNA isolated from 10 serial cuts of tumour specimen) by quantitative real-time RT-PCR. To control for variations in amounts of mRNA, we also tested glucose-6 phosphate dehydrogenase (*G6PDH*) as control gene. All reactions were performed in a LightCycler instrument using the LC-FastStart DNA Master SYBR Green I kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) with the exception of *G6PDH* and *B2m*, for which FastStart DNA Master Plus HybProbe Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) was used. HouseKeeping Gene Set kit (Roche Diagnostics) was used for *G6PDH* amplification. *B2m* primers used in the analysis were: Fw5'TCAGGAAATTTGACTTTCATTC3' ; Bw5'TTCTGGCCTGGAGGCTATC3' (TIB MOLBIOL, Berlin, Germany). Primers used for *MIP1α* (*CCL3*), *TGF1β* and *STAT1* gene amplification reactions were part of the LightCycler-Primer Set (GmbH, Heidelberg, Germany). The final expression levels of target genes were given relative to the expression levels of *G6PDH*.

Real-time PCR data were expressed as median ± standard deviation. Normal distribution of results was confirmed by Kolmogorov–Smirnov test. The Student's *t* test was used to analyse data in the validation experiment. Statistical significance was defined as $P \leq 0.05$. SPSS version 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) was used for data analyse.

Immunohistological study

Immunohistological techniques were applied as specified above. For the staining of tumour infiltrates, we took consecutive cuts (4–8µm thick) from the frozen tumour specimen used to obtain histological sections for RNA isolation. The following mouse mAbs were used to stain tumour infiltrates: GRT2 (anti-CD45), produced in our lab [31]; OKT3 (anti-CD3 hybridoma, ATCC, Teddington, UK), OKT8 (anti-CD8 hybridoma, ATCC), anti-CD4 (Clone RPA-T4, Becton–Dickinson Biosciences (BDB), San Jose, CA), anti-perforin (Clone δG9, BD Biosciences), anti-CD64 (Clone 10.1, BD Biosciences), anti-CD206 (macrophage mannose receptor; Clone 19.2, BD Biosciences), anti-CD163 (macrophage scavenger receptor; Clone Ber-Mac3, MBL, Woburn, MA) and anti-CD56 (Clone 123C3, Dako, Barcelona, Spain. A mouse monoclonal Ab (1D4.1) provided by Dr. Jaime Sancho (Department of Cellular Biology and Immunology, Instituto de Parasitología y Biomedicina, Granada, Spain) was used to stain the CD3 complex ζ-chain [32].

Two observers analysed tissue tumour infiltrates, defining the infiltrate for each mAb staining as: stromal (inflammatory infiltrate surrounding tumour mass), interstitial (in fibrous septa around glands), or intratumoral (inflammatory cells in close contact with neoplastic epithelial cells). Each stromal, interstitial and intratumoral infiltration was scored as: 0 (Absent), + (Low), ++ (Moderate)

and +++ (High). In the statistical analysis, for each studied tumour, we calculated the overall infiltration score (0–9) for each marker (CD45, CD3, CD8, CD64, CD163, CD206, CD247 [CD3 complex ζ -chain] and perforin) separately, as the sum of the scores for stromal, interstitial and intratumoral infiltration. After the normal distribution of the data was confirmed by means of the Kolmogorov–Smirnov test, one-way ANOVA and Tukey post hoc tests were used to compare the means for each marker. $P \leq 0.05$ was considered significant. SPSS version 15.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) was used for the data analyses.

Results

Gene expression profiles

Parquet Genomic Suite software was used for unsupervised hierarchical clustering analysis from the significantly differentially expressed sequences. As expected, the samples tended to cluster together in accordance with their experimental conditions. Figure **1a** depicts the hierarchical clustering for 2,057 sequences differentially expressed across all groups ($P < 0.05$), showing that the control group and MSS/HLA-negative samples are more closely related and have similar gene expression profiles, whereas MSI samples, except for the CRC-4 tumour, clearly differ from the rest, as confirmed by PCA of the significant sequences. Patient groups can be distinguished into a linearly separable gene expression data space (Fig. **1b**). The statistical analysis revealed 1,974 and 1,070 sequences corresponding to genes differentially expressed in MSI versus MSS/HLA-positive and in MSS/HLA-negative versus MSS/HLA-positive tumours, respectively. Comparison of MSI and MSS/HLA-positive groups revealed upregulation of 964 genes and downregulation of 1,010 genes in the former.

Gene function analysis

GO functions associated with the differentially expressed genes in the MSI versus control (MSS/HLA-positive) experiment were: apoptotic program (72 genes, $P = 5.5 \cdot 10^{-3}$), leucocyte activation (43 genes, $P = 1.8 \cdot 10^{-5}$), T-cell activation (24 genes, $P = 6.3 \cdot 10^{-4}$), chemotaxis (24 genes, $P = 9.8 \cdot 10^{-3}$), inflammatory response (40 genes, $P = 2.3 \cdot 10^{-2}$) or cytokine production (10 genes, $P = 1.9 \cdot 10^{-2}$). Among the last three groups, we mainly focused on the genes involved in the inflammatory response and cytotoxic activity.

Differentially expressed immune response genes in MSI tumours versus MSS/HLA-class I-positive (controls) tumours

Fifty-two genes associated with inflammatory and cytotoxic functions were differentially expressed ($P < 0.05$) in mMSI tumours versus controls (Tables **2** and **3**). Most of these genes were upregulated (fold change ranging from 1.4 to 6.79) in MSI tumours, (Fig. **2a**), and only genes involved

in anti-inflammatory pathways (*TGFBR2*, *GPX2*) and eosinophil chemotaxis (*CCL11*) were down-regulated.

Genes related to inflammation (cytokines and chemokines)

Among the upregulated differentially expressed genes (Table 2), we found genes encoding macrophage- and T lymphocyte-attractant chemokines and cytokine receptors (*CCL3*, *CCL18*, *CXCL16*, *IL15RA*), molecules related to cytokine-signalling pathways (*TNFAIP6*, *STAT1*, *STAT5A*, *NFIL3*, *SPP1*), proteins implicated in the extravasation of leucocytes from blood to tissues (*ICAM1*, *ITGB2*, *ITGAM*, *ROCK1*) and molecules that contribute to inflammation (*CLEC2B*, *S1PR3*, *PTAFR*, *ALOX5*).

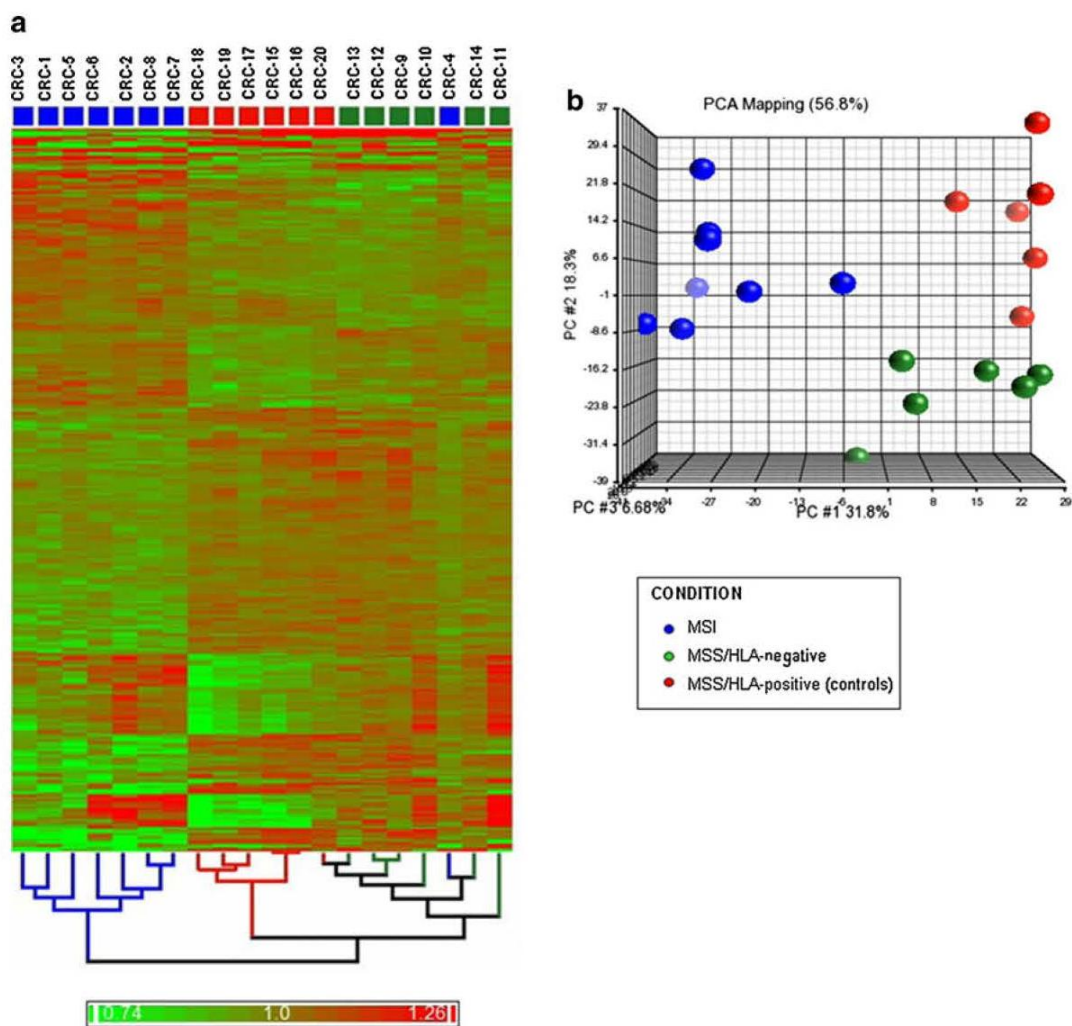


Fig. 1. Bidimensional-hierarchical clustering and PCA of MSI, MSS/HLA-negative and MSS/HLA-positive (control) cancers, using 2,057 significantly differentiated sequences ($P < 0.05$). **a** Two-way hierarchical clustering in which samples (columns) and array targets (rows) were ordered. Red, upregulated; green, downregulated. MSI tumours, except for the CRC-4 sample, were clearly differentiated from MSS CRCs (HLA negative and HLA positive), which shared similar expression profiles. **b** Discriminating genes were used to generate a three-dimensional (from 2,057 dimensional plot) plot of the data. The cumulative proportions of the variance captured by each principal component are (1) principal component axis, 31.8%; (2) principal component axis, 18.3%; and (3) principal component axis, 6.68%. PCA-based multidimensional scaling

visualization separated MSI, MSS/HLA-negative and MSS/HLA-positive (controls) samples into linearly separable 2,057-gene expression data spaces.

Macrophage-related genes

We also observed several upregulated macrophage marker genes (Table 2), including genes for Fc Receptors (*FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR1A*...), PAMP receptor (*CLEC7A*), scavenger receptor related to M2 macrophages (*CD163*), co-activator molecule (*CD86*), TLRs and proteins implicated in TLR signalling pathway (*CD14*, *TLR2*, *TLR8*, *LY96*, *TICAM2*) and molecules involved in macrophage activation (*JMJD6*) (Fig. 2b).

Lymphocyte activation and cytotoxicity-related genes

We found overexpressed gene sequences related to T lymphocytes (Table 3; Fig. 2c), including those encoding for: molecules that participate in signal transduction through the TCR (*CD53*, α chain of TCR, ζ chain of CD3 (*CD247*), *LCP2*, *FYN*, *NFATC2IP*); proteins involved in cell activation and proliferation (*TCIRG1*, *CD84*); cytolytic activity markers (*RNF19B*, *TNFSF9*, *GNLY*, *PRF1*); and a protein expressed in activated T cells that negatively regulates the TGF β pathway (*CD109*).

A further gene encoding a negative regulator of immune response, Arginase II (*ARG2*), was upregulated in MSI tumours versus controls (Table 2).

NKG2D-ligand-encoding genes (*MICA*, *MICB*, *ULBP2*) were also upregulated in MSI tumour cells versus controls, implying that MSI tumour cells expressing these stress molecules may be susceptible to the cytotoxic activity of T or NK cells through their NKG2D receptors (Table 3).

Immune response-related genes differentially expressed in MSS/HLA-class I-negative versus MSS/HLA-positive tumours (controls)

Genes differentially expressed between MSS/HLA-negative tumours and controls were related to: cell adhesion (64 genes, $P = 5.8 \cdot 10^{-7}$), immune response (45 genes, $P = 0.01$), phagocytosis (9 genes, $P = 2 \cdot 10^{-3}$), chemotaxis (17 genes, $P = 3.4 \cdot 10^{-3}$) and negative regulation of apoptosis (29 genes, $P = 6.6 \cdot 10^{-3}$). The MSS/HLA-negative group showed upregulation versus controls of genes encoding: monokines and other chemokines (*CCL3*, *CCL4*, *CCL8*, fold change >4), macrophage markers (*FCGR1A*, *FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR2C*, *CD14*, *TLR2*, *TLR8*, *CLEC7A*, *MRC1*, *CD163*) (fold change ranging from 2 to 5.26), other molecules related to TLR pathway (*LY96*, fold change = 2.86; *TICAM2*, fold change = 2.2), and antigen-presenting cell (*CD86*, fold change = 3.28; *IFI30*, fold change = 2.25) markers, transcription factors detected in nuclei of monocytes and granulocytes (*MNDA*, fold change = 3.12) or involved in monocyte/macrophage differentiation (*MAFB*, fold change = 2.07), neutrophil-related markers (*NCF2*, fold change = 2.84; *SPARC*, fold change = 1.91), adhesion-related molecules (*SKAP2*, fold change = 3; *ITGAM*, fold change = 4.53; *ICAM1*, fold change = 2.12; *ROCK1*, fold change = 1.35), complement-related molecules (*CIQB*, fold change = 2.83; *C3ARI*, fold change = 3.06), negative regulators of immune response (*VSIG4*, fold change = 5.2; *PPP3CB*, fold change = 1.3; *PLA2G7*, fold change = 3.13) and molecules involved in the TGF β

pathway (*TGFBI*, fold change = 1.83; *TGFB3*, fold change = 3.37) and the downregulation of genes related to antigen processing machinery and MHC class I molecules (*TAP2*, fold change = -1.56; *ERAP1*, fold change = -2.22; *B2m*, fold change = -2.44).

Table 2 List of inflammatory- and macrophage markers-related gene-specific probes differentially expressed ($P < 0.05$) between MSI and MSS/HLA-positive (control) colorectal cancers

Probe ID	Entrez gene	Fold change	P-value	Gene symbol	Gene name
Cytokine, chemokine and inflammation-related molecules					
205114_PM_s_at	414162	5.09	0	<i>CCL3</i>	Chemokine (C–C motif) ligand 3
210133_PM_at	6356	-6.15	0.01	<i>CCL11</i>	Chemokine (C–C motif) ligand 11
32128_PM_at	6362	6.79	0.01	<i>CCL18</i>	Chemokine (C–C motif) ligand 18
223454_PM_at	58191	1.92	0	<i>CXCL16</i>	Chemokine (C–X–C motif) ligand 16
207375_PM_s_at	3601	1.47	0.03	<i>IL15RA</i>	Interleukin 15 receptor, alpha
206026_PM_s_at	7130	4.79	0	<i>TNFAIP6</i>	Tumour necrosis factor, alpha-induced protein 6
209969_PM_s_at	6772	2.09	0.02	<i>STAT1</i>	Signal transducer and activator of transcription 1, 91 kDa
203010_PM_at	6776	1.76	0	<i>STAT5A</i>	Signal transducer and activator of transcription 5A
209875_PM_s_at	6696	21.15	0	<i>SPP1</i>	Secreted phosphoprotein 1
209949_PM_at	4688	3.24	0	<i>NCF2</i>	Neutrophil cytosolic factor 2
203574_PM_at	4783	1.46	0.04	<i>NFIL3</i>	Nuclear factor, interleukin 3 regulated
209732_PM_at	9976	2	0.02	<i>CLEC2B</i>	C-type lectin domain family 2, member B
202638_PM_s_at	3383	2.36	0	<i>ICAM1</i>	Intercellular adhesion molecule 1
202803_PM_s_at	3689	2.49	0.02	<i>ITGB2</i>	Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)
205786_PM_s_at	3684	4.02	0	<i>ITGAM</i>	Integrin, alpha M (complement component 3 receptor 3 subunit)
214578_PM_s_at	6093	1.39	0.03	<i>ROCK1</i>	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 1
228176_PM_at	1903	2.9	0	<i>S1PR3</i>	Sphingosine-1-phosphate receptor 3
211661_PM_x_at	5724	1.98	0.01	<i>PTAFR</i>	Platelet-activating factor receptor
204446_PM_s_at	240	1.82	0.03	<i>ALOX5</i>	Arachidonate 5-lipoxygenase
202831_PM_at	2877	-1.8	0.01	<i>GPX2</i>	Glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)
208944_PM_at	7048	-1.55	0.03	<i>TGFBR2</i>	Transforming growth factor, beta receptor II (70/80 kDa)
Macrophage markers					
203561_PM_at	2212	3.32	0	<i>FCGR2A</i>	Fc fragment of IgG, low affinity IIa, receptor (CD32)
210889_PM_s_at	2213	2.76	0.01	<i>FCGR2B</i>	Fc fragment of IgG, low affinity IIb, receptor (CD32)
210992_PM_x_at	9103	2.63	0.01	<i>FCGR2C</i>	Fc fragment of IgG, low affinity IIc, receptor for (CD32)
216950_PM_s_at	100132417/// 2209	3.79	0.01	<i>FCGR1A/// FCGR1C</i>	Fc fragment of IgG, high affinity Ia//Ic, receptor (CD64)
210895_PM_s_at	942	2.92	0.02	<i>CD86</i>	CD86 molecule
201743_PM_at	929	2.31	0.01	<i>CD14</i>	CD14 molecule
212722_PM_s_at	23210	1.38	0.04	<i>JMJD6</i>	Jumonji domain containing 6
221698_PM_s_at	64581	2.57	0.01	<i>CLEC7A</i>	C-type lectin domain family 7, member A
203645_PM_s_at	9332	4.56	0	<i>CD163</i>	CD163 molecule
203946_PM_s_at	384	3.14	0.02	<i>ARG2</i>	Arginase, type II
204924_PM_at	7097	2.71	0	<i>TLR2</i>	Toll-like receptor 2
229560_PM_at	51311	2.95	0.01	<i>TLR8</i>	Toll-like receptor 8
206584_PM_at	23643	2.48	0.02	<i>LY96</i>	Lymphocyte antigen 96
228234_PM_at	35376	3.12	0	<i>TICAM2</i>	Toll-like receptor adaptor molecule 2

Table 3 List of T lymphocyte and cytotoxicity markers-related gene-specific probes differentially expressed ($P < 0.05$) between MSI and MSS/HLA-positive (control) colorectal cancers

Probe ID	Entrez gene	Fold change	P-value	Gene symbol	Gene name
217143_PM_s_at	6955///6964	2.7	0.05	<i>TRA@//TRD@</i>	T-cell receptor alpha locus//T-cell receptor delta locus
210031_PM_at	919	2.6	0.05	<i>CD247</i>	CD247 molecule
205269_PM_at	3937	2.46	0.02	<i>LCP2</i>	Lymphocyte cytosolic protein 2 (SH2 domain containing leucocyte protein of 76 kDa)
216033_PM_s_at	2534	2.95	0	<i>FYN</i>	FYN oncogene related to SRC, FGR, YES
36564_PM_at	127544	1.55	0.03	<i>RNF19B</i>	Ring finger protein 19B
203416_PM_at	63	2.32	0.03	<i>CD53</i>	CD53 molecule
205988_PM_at	8832	2.49	0.01	<i>CD84</i>	CD84 molecule
204158_PM_s_at	10312	1.46	0.04	<i>TCIRG1</i>	T-cell, immune regulator 1, ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit A3
212809_PM_at	84901	1.56	0	<i>NFATC2IP</i>	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 2
206907_PM_at	8744	3.81	0.03	<i>TNFSF9</i>	Tumour necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
223501_PM_at	10673	2.56	0.01	<i>TNFSF13B</i>	Tumour necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
226545_PM_at	135228	5.61	0	<i>CD109</i>	CD109 molecule
37145_PM_at	10578	4.62	0.01	<i>GPLY</i>	Granulysin
214617_PM_at	5551	3.02	0.02	<i>PRF1</i>	Perforin 1 (pore forming protein)
238542_PM_at	80324	4.99	0.02	<i>ULBP2</i>	UL16-binding protein 2
205904_PM_at	4276	1.82	0.01	<i>MICA</i>	MHC class I polypeptide-related sequence A
206247_PM_at	4277	2.4	0.01	<i>MICB</i>	MHC class I polypeptide-related sequence B

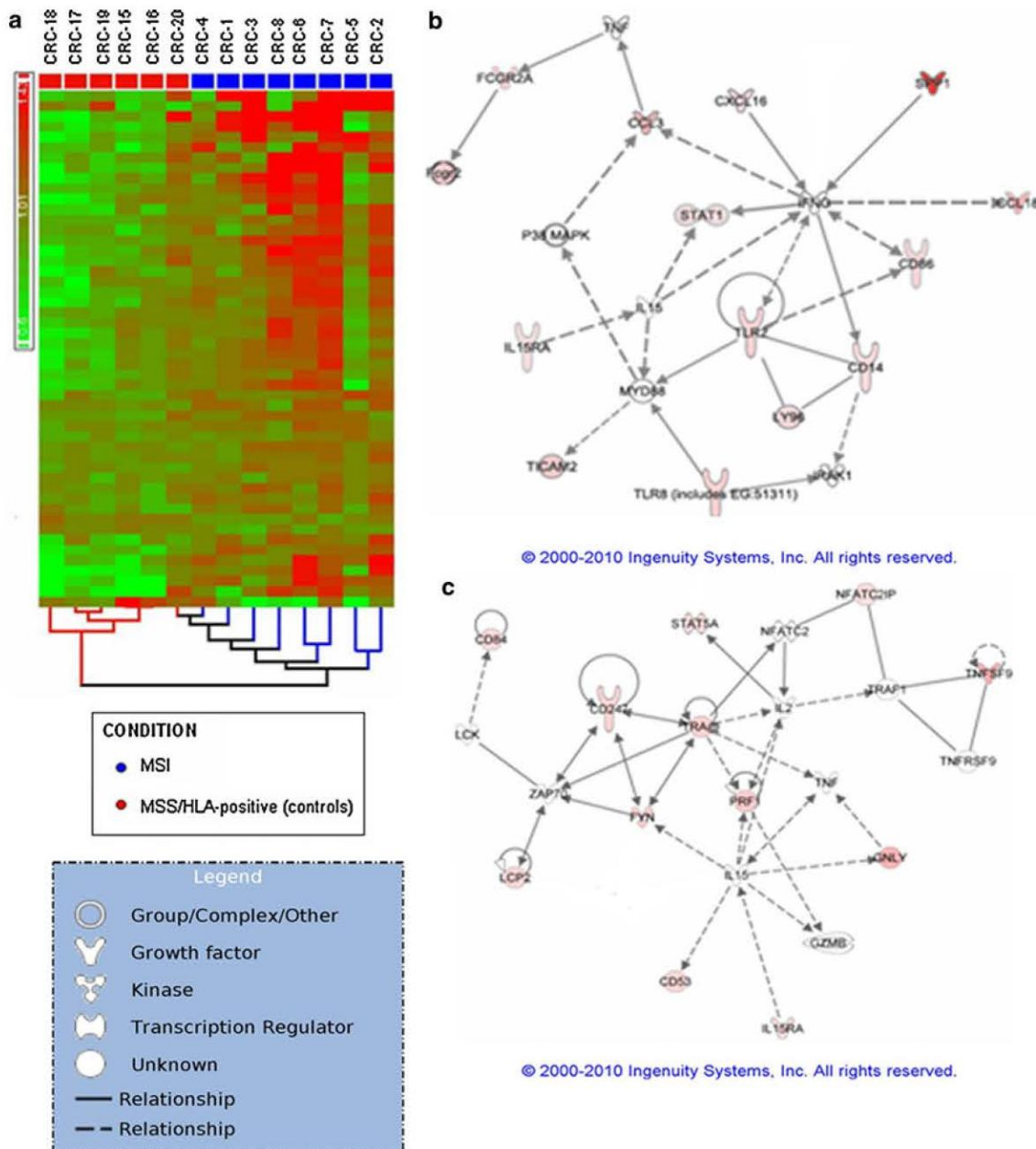


Fig. 2. **a** Bidimensional-hierarchical clustering of MSI and MSS/ HLA-positive (control) cancers, using 52 significantly differentiated sequences ($P < 0.05$). Red, upregulated; green, downregulated. Discriminator sequences, related to inflammatory and cytotoxic functions, were mainly upregulated in MSI tumours. **b**, **c** Ingenuity pathways analysis (IPA) of 26 differentially expressed genes in MSI CRCs versus MSS control groups that were qualified as networks. **b** This network centred on various macrophage markers, cytokines and chemokines. All differentially expressed genes were upregulated (red). Increased gene expression of *MIP-1 α* (*CCL3*) but not *STAT1* was confirmed by RT-PCR analysis (Table 4). **c** This network centred on T lymphocyte activation via TCR and cytotoxicity, with 12 molecules from the data set of differentially expressed genes that were upregulated

Microarray data validation

Real-time PCR analysis and immunohistochemistry were performed to validate microarray results. Four statistically significant genes were selected for these experiments: *STAT1* and *MIP1 α* (*CCL3*) gene sequences were upregulated in MSI tumours compared with MSS/HLA-positive (control) group, and *TGF1 β* and *B2m* genes were up- and downregulated, respectively, in MSS/HLA-negative tumour group versus controls.

Real-time PCR confirmed these findings ($P < 0.05$), with the exception of *STAT1* gene expression, which did not significantly differ between MSI tumours and controls (Table 4).

Table 4 Summarized results of quantitative real-time RT-PCR analysis in CRC samples

	Ratio ^a MSI tumours	Ratio ^a MSS/HLA- negative tumours	Ratio ^a MSS/HLA- positive tumours	<i>P</i> -value
<i>B2m</i>		1.99	108.6	0.05
<i>STAT1</i>	10.5		37.2	0.16
<i>MIP1α</i> (<i>CCL3</i>)	6.018		0.418	0.04
<i>TGFβ1</i>		$2.3 \cdot 10^{-2}$	$7 \cdot 10^{-4}$	0.02

Expression results of *B2m*, *MIP1 α* (*CCL3*) and *TGF β 1* genes by Real-Time RT-PCR confirmed the data obtained in microarray analysis ($P \leq 0.05$), excluding *STAT1* gene expression, for which no significant differences were observed

^a Mean values of target gene mRNA copy numbers normalized against *G6PDH* mRNA copy numbers

The microarray analysis results were also confirmed by immunohistochemistry, measuring the expression of two proteins encoded by discriminator genes identified in the MSI/control comparison: CD3 complex ζ -chain and perforin (Table 3). Expression of these proteins was higher in MSI tumours than in control CRCs (Fig. 3; Table 5). Expression of the selected proteins was closely related to the presence of cytotoxic CD8+T cells in the tissue. We observed a high infiltration by these cytotoxic CD8+T lymphocytes in MSI tumours (Fig. 3a; Table 5), which is also compatible with the upregulation of other genes expressed by these cells and identified in the MSI/control comparison (*GNLY*, α chain of TCR, *RNF19B*, *TNFSF9*, *LCP2*, *FYN*, *NFATC2IP*, *TCIRG1*, etc. [fold change > 1.46]) (Table 3). MSI tumours showed the highest leucocyte infiltration, represented mainly by CD8+T lymphocytes, whereas the leucocyte infiltration was lower in MSS/HLA-negative samples, with low or absent CD8+ cells (Fig. 3a, c) [20]. MSS/HLA-positive tumours (controls) largely showed moderate/high leucocyte infiltration, with a low presence of CD8+ cells in comparison to MSI tumours (Fig. 3b).

The density of M1 (CD64) macrophage infiltration was similar among the three CRC groups (Fig. 3j–l). M2 macrophages (CD163, CD206) were detected in all selected CRC samples, with no major differences in infiltration pattern among tumour groups (Fig. 3m–o; Table 5). No significant differences in infiltration density were found between M1 and M2 macrophages in any CRC group (Fig. 3j–o). The microarray data showed significant differences in the expression of genes related to M1 (*FCGR2A*, *FCGR2B*, *FCGR1A*, *CD86*, *CD14*, *TLR2*, *TLR8* (fold change > 2.31)) and M2 (*CD163*, *ARG2* (fold change > 3.14)) macrophages between MSI tumours and controls, but these differences were not reflected in the immunohistochemistry results (Table 5). This discrepancy may be due to the semi-quantitative nature of immunohistochemical analysis and the intense infiltration by macrophages, which accumulated mainly in interstitial and stromal tissue areas. Accordingly, further Real-Time PCR studies are warranted to confirm the microarray data.

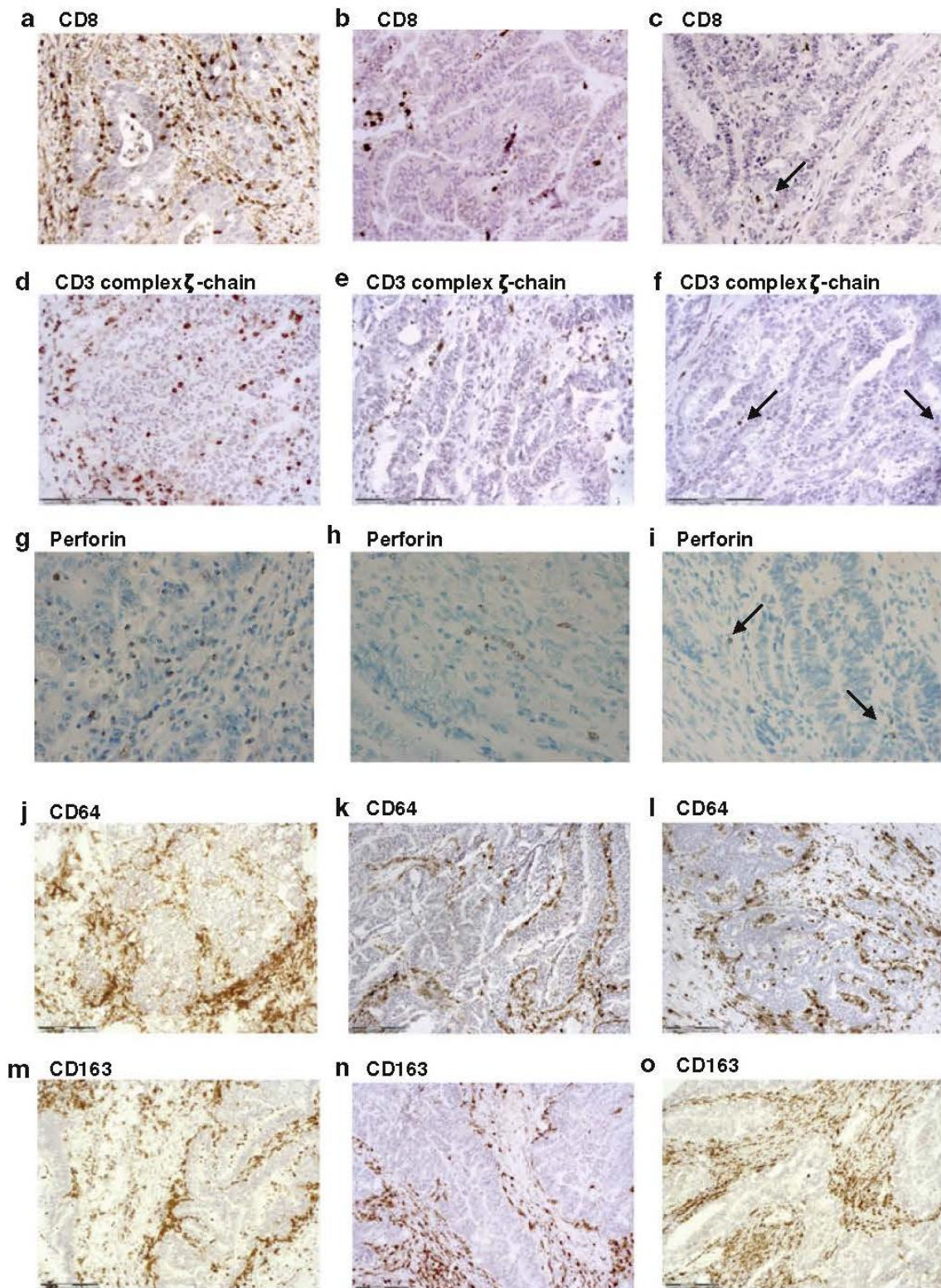


Fig. 3 Immunohistological results of microarray data validation in CRC tissue samples. **a** MSI tumour (CRC-6), **b** MSS/HLA-positive (control) tumour (CRC-19) and **c** MSS/HLA-negative tumour (CRC-14). A higher infiltration by CD8⁺ cells was observed in MSI tumour versus control CRC, whereas no CD8⁺ cells were observed in MSS/HLA-negative CRC. **d** Elevated expression of CD3 complex ζ -chain in MSI tumour (CRC-1) compared with **e** Control tumour (CRC-19) and **f** MSS/HLA-negative sample (CRC-14). Perforin staining in paraffin-embedded samples was higher in **g** MSI tumours (CRC-6) than in **h** Control tumours (CRC-16) and **i** MSS/HLA-negative CRCs (CRC-11). No differences were observed in infiltration by M1 (CD64) and M2 (CD163) macrophages in CRC samples. **j, m** MSI tumour (CRC-1); **k, n** MSS/HLA-positive sample (CRC-19); **l** MSS/HLA-negative CRCs (CRC-11) and **o** (CRC-12).

Table 5 Summarized results of immunohistochemical study of leucocyte infiltration in CRC samples

Markers	MSI tumours	MSS/HLA-negative tumours	MSS/HLA-positive tumours (controls)	<i>P</i> -value
CD45	++/+++ ^a	+/++	+/++	<0.001
CD3	++/+++ ^a	+	+	0.001
CD8	++ ^a	0/+	+	<0.001
CD247 (ζchain)	++ ^a	0/+	+	<0.001
Perforin	++ ^a	0/+	+	<0.001
CD64	++	+/++	++	0.63
CD163	+/++	+/++	++	0.51
CD206	++	+/++	+/++	0.84

The scoring system and statistical analysis used are reported in “Materials and methods”.

In the table, the score represents intensity of infiltration: +++ (high), ++ (moderate); + (low); 0 (absent). One-way ANOVA test was used to compare the mean of each marker between the three CRC groups: We observed significant differences in infiltration by total leucocytes (CD45) and T (CD3) lymphocytes, represented by CD8+ cells, between CRC groups. CD247 and perforin expression were higher in MSI tumours than in MSS CRCs. No significant differences were observed in infiltration by classical or M1 macrophages (CD64) and by immunosuppressive or M2 macrophages (CD163 and CD206) among tumour groups.

^aAfter using the Tukey post hoc test, significant differences were found between MSI and control groups (CD45, $P = 0.001$; CD3, $P = 0.001$; CD8, $P = 0.001$; CD247, $P = 0.001$ and perforin, $P = 0.001$) and between MSI and MSS/HLA-negative tumour groups (CD45, $P < 0.001$; CD3, $P = 0.003$; CD8, $P < 0.001$, CD247, $P < 0.001$ and perforin, $P = 0.001$). There was no significant differences in infiltration by CD45 ($P = 0.85$), CD3 ($P = 0.88$), or CD8 ($P = 0.18$) cells and in CD247 ($P = 0.8$) or perforin ($P = 0.1$) expression between MSS/HLA-negative and control tumours

Discussion

In this study, we compared the genome-wide gene expression microarray analysis profile between HLA-class I-negative tumours (MSI and MSS) and HLA-class I-positive tumours (controls). A main finding was that the two groups of HLA-class I-negative tumours (MSI and MSS) differed in the number of differentially expressed genes related to local anti-tumour immune reactivity, which was confirmed by hierarchical cluster analysis.

Only a small number of genes were differentially expressed ($P < 0.05$) between MSS-HLA-class I-positive and MSS/HLA-class I-negative tumours, including the upregulation of molecules involved in TGFβ pathway (*TGFB1*, *TGFB3*) and, as expected, the downregulation of genes related to antigen processing machinery and MHC class I molecules (*TAP2*, *ERAP1*, *B2m*) in the HLA-I-negative group versus controls.

Among the 9,695 genes analysed, the expression of 2,057 significantly differed among all of the groups. Samples were non-randomly enriched in various categories of biological processes,

including leucocyte activation, T-cell activation, inflammatory response or cytokine production, all of which showed a significantly higher expression in MSI versus MSS (control) cancers. Apoptosis was another GO category that discriminated between these cancers ($P = 5.5 \cdot 10^{-3}$), identifying 72 genes with pro- or anti-apoptotic functions that were over- or under-expressed in MSI cancers. This observation highlights the complex interaction between pro- and anti-apoptotic agents in MSI tumours, which requires further investigation.

A marked difference between MSI tumours and controls was also found for 52 genes involved in inflammatory responses against cancer (Tables 2 and 3), including the overexpression (in MSI) of genes related to immune response intensity and cytotoxic cell activity. The observed pattern of gene expression might be considered as a biomarker for MSI cancers.

Ingenuity pathway analysis (IPA) showed that the mechanisms underlying the generation of variants with defective HLA class I expression differed according to the MSI/MSS phenotype (Figs. 2b, c). For instance, 40 genes in the inflammatory and cytotoxic signalling pathway were upregulated ($P = 0.02$) in MSI versus MSS/HLA-positive tumours, suggesting the importance of this pathway in the MSI groups.

The immunohistochemical data showed higher infiltration by CD8+T lymphocytes with activated phenotype in MSI tumours versus controls (Fig. 3a, b). In agreement with these findings, the microarray data evidenced overexpression in MSI tumours of genes encoding lymphocyte markers related to: TCR-mediated signal transduction and lymphocyte activation, proliferation and cytotoxic activity. The high infiltration of CD8+ lymphocytes in MSI tumours may result from the release of specific chemokines. In this context, cytokines detected in MSI tumours were reported to favour recruitment of cytotoxic T cells and increase Th1 responses and upregulation of antigenic peptides potentially recognizable by CD8+T lymphocytes [8, 33]. In the present study, we identified a higher expression of genes encoding macrophage- and T lymphocyte-attractant chemokines and cytokines, molecules related to cytokine-signalling pathways and proteins implicated in the extravasation of leucocytes from blood to tissues. However, MSI cancers showed a markedly decreased expression of *TGFBR2* gene versus MSS controls (Table 2). MSI analysis revealed that 6 out of 8 MSI carcinomas showed instability in the microsatellite marker of the coding region in *TGFBR2* gene [20], confirming that this gene is frequently affected by the MSI pathway due to mutational inactivation [34]. However, we detected no appreciable differences in the intensity of infiltration and gene expression profiles between *TGFBR2* wild type tumours (CRC-2 and CRC-6) and the remaining MSI cancers with instability in this microsatellite marker.

In MSI carcinomas, the overexpression of M1 markers involved in inflammation and Th1 responses was more frequent than the overexpression of M2 markers related to inhibitory functions. However, despite this finding, no major differences were observed by immunohistochemistry between M1 (CD64) and M2 (CD163) polarized macrophage populations in MSI tumours (Fig. 3j–o). The above findings suggest that a combined analysis of microarray and immunohistochemical data might be useful to comprehensively assess tumour–host interactions. Thus, our data suggest that the immune microenvironment of MSI tumours favours immune-mediated tumour rejection, in line with previous suggestions of the protective role of immune infiltrates in colorectal tumours [35–38].

However, the outgrowth of MSI CRCs, despite the presence of a dense lymphocytic infiltration, is probably due to several mechanisms that interfere with the efficacy of the host immune response in vivo [39–41]. We found two possible mechanisms for tumour immune evasion in the MSI tumours studied: First, total loss of HLA class I molecules on tumour cell surface, mainly attributable to the accumulation of somatic mutations in the *B2m* gene and cell clonal expansion [20]; second, inhibition of T-cell responses by factors associated with the presence of M2 macrophages. For instance, we found increased gene expression levels of *ARG2* (fold change = 3.14) and *VSIG4* (*V-set and immunoglobulin domain containing 4*, fold change = 4.08) in MSI tumours compared with controls [42, 43].

We believe that molecular inactivation due to somatic mutation of the *B2m* gene may play a critical role in MSI tumour development, whereas this mutation was less frequent in the present MSS cancers. Interestingly, the presence of CTLs in MSI may be a necessary but not sufficient condition for tumour rejection. In fact, the high infiltration of CD8+ lymphocytes in MSI tumours persists after immunoediting (immune selection of B2m-deficient cells), probably recruited or locally expanded by the elevated expression of specific chemokines in the tumour microenvironment.

Finally, genes encoding NKG2D ligands (*MICA*, *MICB* and *ULBP2*) were found to be overexpressed in MSI tumours compared with controls, which, together with the total loss of HLA class I expression, could promote the cytotoxic activity of NK cells and CD8+ NKG2D+ T lymphocytes. Although the absence or downregulation of HLA class I renders cells susceptible to NK cells, we found only scant CD56+ cells in most of the tumours, with no differences as a function of HLA class I cell surface expression, in agreement with previous reports [44, 45].

In summary, immune-mediated tumour rejection may be favoured by the characteristics of MSI tumours, including the abundant generation of new immunogenic frameshift peptides presented to CTLs and the dense infiltration with CTLs. Nevertheless, changes in the intrinsic phenotype of cancer cells (e.g. total HLA class loss) and the participation of immune regulatory mechanisms can lead to tumour immune escape. Finally, our results also strongly suggest a divergence in the mechanisms that drive immune escape in HLA-I-negative MSI and MSS tumours.

Acknowledgments The authors thank Eva García, Antonia Moreno and Ana Isabel Rodríguez for technical assistance. They are also grateful to the Tumour-Tissue Biobank of Virgen de las Nieves University Hospital for providing study samples. This investigation was partially supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias (08/0528), Red Genómica del Cáncer (RETICRD 06/020), Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (PI-0080-2010), Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía (P08-TIC-4299), Dirección General de Investigación y Gestión del Plan Nacional I + D+i (TIN2009-13489), Proyecto de Investigación de Excelencia (CTS-3952, CVI-4740 and P06/-CTS-02200) and Plan Andaluz de Investigación (PAI, Group CTS) and from the European Searchable Tumour Cell Line Database (ESTDAB) project, contract No. QLRI-CT-2001-01325 (<http://www.ebi.ac.uk/estdab>), the European Network for the identification and validation of antigens and biomarkers in cancer and their application in clinical tumour immunology (ENACT) project (European community LSHC-CT-2004-503306) and the Cancer Immunotherapy project (European community OJ 2004/c158,18234).

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interests.

References

1. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363:558–561
2. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260:816–819
3. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S (1998) 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* 58:5248–5257
4. Imai K, Yamamoto H (2008) Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 29:673–680
5. Jass JR (2007) Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50:113–130
6. Bertucci F, Salas S, Eysteris S, Nasser V, Finetti P, Ginestier C, Charafe-Jauffret E, Loriod B, Bachelart L, Montfort J, Victorero G, Viret F et al (2004) Gene expression profiling of colon cancer by DNA microarrays and correlation with histoclinical parameters. *Oncogene* 23:1377–1391
7. Lanza G, Ferracin M, Gafà R, Veronese A, Spizzo R, Piciorri F, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Negrini M (2007) mRNA/microRNA gene expression profile in microsatellite unstable colorectal cancer. *Mol Cancer* 6:54
8. Banerjee A, Ahmed S, Hands RE, Huang F, Han X, Shaw PM, Feakins R, Bustin SA, Dorudi S (2004) Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. *Mol Cancer* 3:21
9. Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, Vecchiato N, Macrì E, Fornasarig M, Boiocchi M (1999) High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol* 154:1805–1813
10. Smyrk TC, Watson P, Kaul K, Lynch HT (2001) Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer* 91:2417–2422
11. Linnebacher M, Gebert J, Rudy W, Woerner S, Yuan YP, Bork P, von Knebel Doeberitz M (2001) Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor-specific antigens. *Int J Cancer* 93:6–11
12. Saeterdal I, Bjørheim J, Lislørud K, Gjertsen MK, Bukholm IK, Olsen OC, Nesland JM, Eriksen JA, Møller M, Lindblom A, Gaudernack G (2001) Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13255–13260
13. Michael-Robinson JM, Biemer-Huttmann A, Purdie DM, Walsh MD, Simms LA, Biden KG, Young JP, Leggett BA, Jass JR, Radford-Smith GL (2001) Tumour infiltrating lymphocytes and apoptosis are independent features in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status. *Gut* 48:360–366
14. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD (2004) The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity* 21:137–148.2
15. Seliger B, Cabrera T, Garrido F, Ferrone S (2002) HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol* 12:3–13
16. Kloor M, Michel S, Buckowitz B, Rüscho V J, Büttner R, Holinski-Feder E, Dippold W, Wagner R, Tariverdian M, Benner A, Schwitalle Y, Kuchenbuch B et al (2007) Beta2-microglobulin mutations in microsatellite unstable colorectal tumors. *Int J Cancer* 121:454–458
17. Bicknell DC, Kaklamanis L, Hampson R, Bodmer WF, Karran P (1996) Selection for beta 2-microglobulin mutation in mismatch repair-defective colorectal carcinomas. *Curr Biol* 6:1695–1697
18. Yamamoto H, Yamashita K, Perucho M (2001) Somatic mutation of the beta2-microglobulin gene associates with unfavorable prognosis in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Gastroenterology* 120:1565–1567
19. Cabrera CM, Jiménez P, Cabrera T, Esparza C, Ruiz-Cabello F, Garrido F (2003) Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: beta2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens* 61:211–219

20. Bernal M, Concha A, Sáenz-López P, Rodríguez AI, Cabrera T, Garrido F, Ruiz-Cabello F (2011) Leukocyte infiltrate in gastrointestinal adenocarcinomas is strongly associated with tumor microsatellite instability but not with tumor immunogenicity. *Cancer Immunol Immunother* 60:869–882
21. Sobin L, Gospodarowicz M, Wittekind CH (2009) TNM classification of malignant tumours UICC, 7th edn. Wiley-Blackwell, Oxford
22. López Nevot MA, Cabrera T, de la Higuera B, Ruiz-Cabello F, Garrido F (1986) Obtención y caracterización de anticuerpos monoclonales frente a leucemias humanas. *Inmunología* 5:51–59
23. Stam NJ, Spits H, Ploegh HL (1986) Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus heavy chains permit biochemical characterization of certain HLA-C locus products. *J Immunol* 137:2299–2306
24. Irizarry RA, Bolstad BM, Collin F, Cope LM, Hobbs B, Speed TP (2003) Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic Acids Res* 31:e15
25. Edgar R, Domrachev M, Lash AE (2002) Gene expression omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. *Nucleic Acids Res* 30:207–210
26. Robinson PN, Wollstein A, Bohme U, Beattie B (2004) Ontologizing gene-expression microarray data: characterizing clusters with gene ontology. *Bioinformatics* 20:979–981
27. Cheng J, Sun S, Tracy A, Hubbell E, Morris J, Valmeekam V, Kimbrough A, Cline MS, Liu G, Shigeta R, Kulp D, Siani-Rose MA (2004) NetAffx gene ontology mining tool: a visual approach for microarray data analysis. *Bioinformatics* 20:1462–1463
28. Ovaska K, Laakso M, Hautaniemi S (2008) Fast gene ontology based clustering for microarray experiments. *BioData Min* 1:1–11
29. Resnik P (1995) Using information content to evaluate semantic similarity in a taxonomy In: Smith Y (ed) Proceedings of the 14th international joint conference on artificial intelligence, Montreal, pp 448–453
30. Calvano SE, Xiao W, Richards DR, Felciano RM, Baker HV, Cho RJ, Chen RO, Brownstein BH, Cobb JP, Tschoeke SK, Miller-Graziano C, Moldawer LL et al (2005) A network-based analysis of systemic inflammation in humans. *Nature* 437:1032–1037
31. Huelin C, Gonzalez M, Pedrinaci S, de la Higuera B, Piris MA, San Miguel J, Ruiz-Cabello F, Garrido F (1988) Distribution of the CD45R antigen in the maturation of lymphoid and myeloid series. The CD45R negative phenotype is a constant finding in T CD4 positive lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol* 69:173–179
32. Sancho J, Franco R, Chatila T, Hall C, Terhorst C (1993) The T cell receptor associated CD3-epsilon protein is phosphorylated upon T cell activation in the two tyrosine residues of a conserved signal transduction motif. *Eur J Immunol* 23:1636–1642
33. Kloor M, Michel S, von Knebel Doeberitz M (2010) Immune evasion of microsatellite unstable colorectal cancers. *Int J Cancer* 127:1001–1010
34. Markowitz S, Wang J, Myer V L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B et al (1995) Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268:1336–1338
35. Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman WH, Galon J (2009) In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol* 27:5944–5951
36. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman WH (2010) Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene* 29:1093–1102
37. Buckowitz A, Knaebel HP, Benner A, Bläker H, Gebert J, Kienle P, von Knebel Doeberitz M, Kloor M (2005) Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *Br J Cancer* 92:1746–1753
38. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P et al (2006) Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* 313:1960–1964
39. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T et al (2006) Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 18:89–95
40. Drake CG, Ja V ee E, Pardoll DM (2006) Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol* 90:51–81

41. Michel S, Benner A, Tariverdian M, Wentzensen N, Hoeffler P, Pommerencke T, Grabe N, von Knebel Doeberitz M, Kloor M (2008) High density of FOXP3-positive T cells in W ltrating colorectal cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer* 99:1867–1873
42. Norian LA, Rodriguez PC, O'Mara LA, Zabaleta J, Ochoa AC, Cella M, Allen PM (2009) Tumor-infiltrating regulatory dendritic cells inhibit CD8+T cell function via L -arginine metabolism. *Cancer Res* 69:3086–3094
43. Vogt L, Schmitz N, Kurrer MO, Bauer M, Hinton HI, Behnke S, Gatto D, Sebbel P, Beerli RR, Sonderegger I, Kopf M, Saudan P et al (2006) VSIG4, a B7 family related protein, is a negative regulator of T cell activation. *J Clin Invest* 116:2817–2826
44. Sandel MH, Speetjens FM, Menon AG, Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Nagelkerke JF, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Kuppen PJ (2005) Natural killer cells in W ltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Mol Immunol* 42:541–546
45. Cozar JM, Canton J, Tallada M, Concha A, Cabrera T, Garrido F, Ruiz-Cabello Osuna F (2005) Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother* 54:858–866

Implication of the $\beta 2$ -microglobulin gene in the generation of tumor escape phenotypes

Monica Bernal¹ • Francisco Ruiz-Cabello^{1,2} • Angel Concha³ • Annette Paschen⁴
• Federico Garrido^{1,2}

¹Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain; ²Departamento de Bioquímica, Biología Molecular III e Inmunología, Facultad de Medicina, Granada, Spain; ³Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain; ⁴ Department of Dermatologie, University Hospital, Essen, Germany.

Received: 16 May 2012 / Accepted: 8 July 2012 © Springer-Verlag 2012

Abstract

Classical MHC molecules present processed peptides from endogenous protein antigens on the cell surface, which allows CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes (CTLs) to recognize and respond to the abnormal antigen repertoire of hazardous cells, including tumor cells. The light chain, $\beta 2$ -microglobulin ($\beta 2m$), is an essential constant component of all trimeric MHC class I molecules. There is convincing evidence that $\beta 2m$ deficiency generates immune escape phenotypes in different tumor entities, with an exceptionally high frequency in colorectal carcinoma (CRC) and melanoma. Damage of a single $\beta 2m$ gene by LOH on chromosome 15 may be sufficient to generate a tumor cell precommitted to escape. In addition, this genetic lesion is followed in some tumors by a mutation of the second gene (point mutation or insertion/deletion), which produces a tumor cell unable to express any HLA class I molecule. The pattern of mutations found in microsatellite unstable colorectal carcinoma (MSI-H CRC) and melanoma showed a striking similarity, namely the predominance of frameshift mutations in repetitive CT elements. This review emphasizes common but also distinct molecular mechanisms of $\beta 2m$ loss in both tumor types. It also summarizes recent studies that point to an acquired $\beta 2m$ deficiency in response to cancer immunotherapy, a barrier to successful vaccination or adoptive cellular therapy.

Keywords

HLA class I, $\beta 2$ microglobulin, Microsatellite instability, Human leukocyte antigen, Tumor immune escape, Loss of heterozygosity

Abbreviations

$\beta 2m$: $\beta 2$ -microglobulin; CRC: Colorectal cancer; HLA: Human leukocyte antigen; MHC: Major histocompatibility complex; LOH: Loss of heterozygosity; MMR: Mismatch repair; MSI-H: High microsatellite instability; MSS: Microsatellite stability

Introduction

The classical MHC class I molecule is a trimeric complex consisting of a variable heavy chain, encoded by human HLA-A, HLA-B, and HLA-C genes, the processed antigen peptide bound to the

heavy chain groove, and the constant $\beta 2m$ light chain. Specific recognition of this complex by the T-cell receptor triggers cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity, which is currently exploited in active (vaccination) and passive (adoptive cellular therapy [ACT], antibody therapy) cancer immunotherapies. Although ACT and antibody therapy achieved remarkable clinical responses in recent clinical trials, their efficacy is dependent on the MHC class I expression level of the tumor. Various studies have indicated that CD8-positive CTLs play a major role in destroying virus-infected cells and tumor cells [1]. CTL-mediated tumor rejection is not only observed in cancer but also in allograft rejection, graft-versus-host disease, and autoimmune diseases, in which identical molecular pathways lead to T-cell activation, suggesting the existence of an immunological constant of rejection [2].

Evidence is accumulating that loss of MHC class I expression is an obstacle to successful cancer immunotherapy [3, 4]. The implication of $\beta 2m$ gene in the generation of HLA class I-loss tumor variants is well established [5], and different types of mutation can knock down the capacity to synthesize the $\beta 2m$ protein required to produce a functionally active HLA class I molecule [6–8]. A number of these mutations have been detected in analyses of cell lines and tumor tissue, ranging from insertions and deletions of nucleotides in repetitive sequence motifs to single base substitutions in one $\beta 2m$ allele in combination with the loss of large segments of chromosome 15q21 encompassing the second $\beta 2m$ allele [9, 10]. These mutations were found to modify $\beta 2m$ expression, inhibiting transcription of the gene or, more frequently, by abrogating translation of the mRNA in some cases or by the synthesis of a nonfunctional protein.

Recent data obtained in our laboratory indicate that one $\beta 2m$ gene copy is inactivated by loss of heterozygosity (LOH) on chromosome 15 in various human tumors [11]. We also reported evidence in some tumors of LOH on chromosome 15q21, which contains the $\beta 2m$ gene, implying that these tumor cells, with an apparently normal HLA class I expression, can already harbor one hit in one $\beta 2m$ gene [11]. These tumor cells are therefore precommitted to an HLA class I total loss phenotype. These findings also suggest that the complete loss of HLA class I antigen expression by this particular molecular mechanism results from successive mutational events [8]. However, other molecular mechanisms can be used by some tumor cells to produce HLA class I total loss, for example, the coordinated downregulation of the transcription of HLA class I heavy chain, $\beta 2m$ and antigen presentation machinery genes in bladder carcinomas [12]. There are also human tumors with a high frequency of HLA class I total loss phenotype in which the $\beta 2m$ mutation is not involved, for example, 40 % of prostate cancers [13] and 52 % of breast cancers. (I. Maleno unpublished results), although the precise molecular mechanism is not known.

The present review describes the different $\beta 2m$ mutations reported in tumor tissues and cell lines and examines whether they follow a particular distribution pattern. We focus on data obtained from colorectal cancer (CRC) with mismatch repair deficiency that exhibit the high microsatellite instability phenotype (MSI-H) and melanoma, in which $\beta 2m$ alterations are a common mechanism for generating the HLA class I total loss phenotype. Our analysis reveals specific $\beta 2m$ gene mutation patterns in MSI-H CRCs and melanomas, suggesting a possible mechanistic origin of these mutations in the context of molecular cancer pathways.

Somatic $\beta 2$ -microglobulin mutations in human cancer

The $\beta 2m$ gene consists of 4 exons that encode a protein of 119 amino acids in length. Exons 1 and 2 contain a total of 4 repetitive nucleotide sequences: exon 1 harbors a [CT]₄ motif, encompassing codon 13–15, and exon 2 harbors two A₅ repeats, ranging from codon 67–68 and 94–95, and one C₅ sequence encompassing codon 91–92. Tables 1 and 2 summarize the different deletions, insertions, and single base substitutions that have been identified in the $\beta 2m$ gene of tumor cells and associated with a total loss of HLA class I expression.

Microdeletions/insertions in repetitive nucleotide motifs of the $\beta 2$ -microglobulin gene

As shown in Table 1, frameshift mutations at coding mononucleotide repeats have been most frequently detected in MSI-H CRC samples (Co), both in cell lines and colon cancer tissues. There is a high frequency of nucleotide deletions (del) affecting repeat regions of exon 1 and exon 2 (Fig. 1). The [CT]₄ region of exon 1 has been defined as a mutation hotspot in MSI-H CRC [7, 14]. Fourteen out of a series of 28 (including CRCs tumor specimens and tumor cell lines) were found to harbor deletions/insertions in this repetitive sequence [7] (Table 1). Mutations in the CT repeat of exon 1 have been associated with a mutator phenotype in CRC [7, 15], reflecting an increase in genetic instability during tumor development due to defects in the DNA mismatch repair (MMR) system [16, 17]. These defects are generally caused by a loss of mismatch repair (MMR) function in cancer cells, secondary to inactivation of MMR genes such as *MLH1* or *MSH2* [18, 19]. In sporadic CRCs, the *MLH1* gene could be silenced by promoter hypermethylation [20]. In this context, it has been reported that most Lynch syndrome cases have germline mutations in *MSH2* or *MLH1* genes [21], favoring the development of CRC and other tumors with microsatellite instability (MSI) [17, 22]. MSI-H phenotype was detected in 18 out of the 28 CRCs listed in Table 1.

Tumors with MSI are characterized by a form of genetic instability that manifests as frameshift mutations, deletions, or insertions in microsatellite DNA and as short repetitive sequences. DNA mononucleotide, dinucleotide, trinucleotide, and tetranucleotide repeats are intrinsically susceptible to slipped-strand mispairing during replication, producing a bulge composed of an unpaired repeat unit. If the bulge is formed on the template strand, the result is a deletion, whereas a bulge on the primer strand yields an insertion [18, 23]. The $\beta 2m$ mutation frequency in MSI-H adenomas is around 15 % and reaches about 30 % in MSI-H CRCs [24].

The mononucleotide repetitive regions (two A₅ and one C₅) in exon 2 of the $\beta 2m$ gene are also prone to accumulate mutations (Fig. 1). Interestingly, some of the tumors of an MSI phenotype were heterozygous and contained two different deletions, each in a copy of the $\beta 2m$ gene [25]. Both Co₁₆ and Co₂₃ tumors harbored a microdeletion in a mononucleotide repeat sequence of exon 2, while the other mutation was located in a nonrepetitive regions of exon 2 (Fig. 1).

Although MSI-H mainly occurs in CRCs, the $[CT]_4$ repeat is also a mutation hotspot in other types of tumor. Half of the deletions (5 out of 10) detected in melanoma (Me) cell lines were located in this repetitive region, as was also the case for two renal carcinoma cell lines (Re), one testicular diffuse large B lymphoma (LyT), and one cervical cancer cell line (Cer) (see Fig. 1) [7, 26–30]. Melanoma cell lines have been investigated for the presence of MSI [31–34], but only a small proportion of the primary melanomas reported in the literature present a MSI-H pattern, and widespread alterations in the genome have been found [35]. Our group analyzed 30 melanoma cell lines for the presence of an MSI phenotype, including five listed in Tables 1 and 2 (Me₂, Me₁₀, Me₁₂, Me₁₃, Me₁₆); we highlight the typical deletion in CT repeat observed in Me₂. However, none of the cases showed genomic instability according to the frequency of mutations at conventional mono- and di-nucleotide microsatellite loci [19], indicating that deletions/insertions at CT can occur in melanoma in the absence of the MSI phenotype. Unlike MSI-H CRCs, which contain insertions and deletions in repetitive regions of exon 1 and exon 2, melanomas only show deletions in repetitive regions of exon 1 of the $\beta 2m$ gene (see Fig. 2).

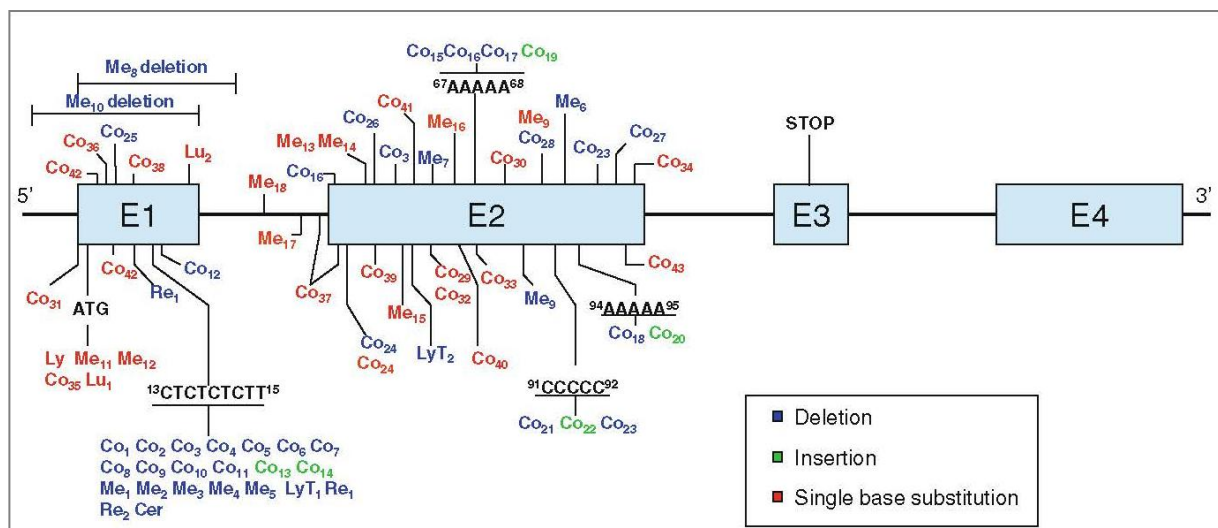


Fig. 1. $\beta 2m$ gene alterations in human tumors. Summary of the different $\beta 2m$ gene mutations found in tumor samples and cell lines of melanoma (Me, n = 18), colon cancer (Co, n = 43), Daudi lymphoma (Ly, one case), lung cancer (Lu, 2 cases), sarcomatoid renal carcinoma (Re, 2 cases), cervical cancer (Cer, one case), and testicular diffuse large B cell lymphoma (LyT, 2 cases). The type of mutation is indicated by color according to the legend.

Table 1 Summary of deletion and insertion mutations in *β2m* gene in human tumors

	Mutation ¹	Site ²	<i>β2m</i> expression ³	HLA expression ³	LOH ⁴	MSI ⁵	References
Co ₁ (LoVo)	del CT, Homozygous	13–15 codons, Ex1	–	–	+	+	[36]
Co ₂ (SW48)	del CTCT, Heterozygous	13–15 codons, Ex1	–	–	–	–	[36]
Co ₃	del A, Heterozygous	^a 47 codon, Ex2					
Co ₃	del CT	13–15 codons, Ex1	±	±	–	–	[36]
Co ₄ (HRA19)	del TCTT, Heterozygous	14–15 codons, Ex1	±	±	–	–	[36]
Co ₅ (C14)	del CT, Heterozygous	13–15 codons, Ex1	±	±		–	[14]
Co ₆ (C108)	del CT, Heterozygous	13–15 codons, Ex1	±	±		+	[14]
Co ₇ (13971/92)	del CT, Homozygous	13–15 codons, Ex1	–	–		+	[14]
Co ₈ (H630)	del CT, Hemi- or Homozygous	15 codon, Ex1	–	–	+		[69]
Co ₉ (CO-132)	del CT	13–14 codons, Ex1	–	–		+	[25]
Co ₁₀ (CO-135)	del CT	13–14 codons, Ex1	–	–		+	[25]
Co ₁₁	del TTCT	15–16 codons, Ex1	–	–		+	[48]
Co ₁₂	del CT	16 codon, Ex1	–	–		+	[48]
Co ₁₃	ins CC	13 codon, Ex1	–	–			[70]
Co ₁₄ (CRC-6)	ins TT	14–15 codons, Ex1	–	–		+	[71]
Co ₁₅ (StM185)	del A	67–68 codons Ex2				+	
Co ₁₆ (CO-86)	del CA, Heterozygous	25 codon, Ex2	–	–		+	[25]
Co ₁₇	del A, Heterozygous	67 codon, Ex2				+	
Co ₁₇	del A	68 codon, Ex2	–	–		+	[48]
Co ₁₈	del A	95 codon, Ex2	–	–		+	[24]
Co ₁₉	ins A	68 codon, Ex2	–	–		+	[48]
Co ₂₀	ins A	95–96 codons, Ex2	–	–		+	[24]
Co ₂₁	del C	92 codon, Ex2	–	–		+	[24]
Co ₂₂	ins C	92–93 codons, Ex2	–	–		+	[24]
Co ₂₃	del C, Heterozygous	91 codon, Ex2	–	–		+	[25]
Co ₂₃ (CO-117)	del CCGTG, Heterozygous	101–102 codons, Ex2					
Co ₂₄ (HCT)	del 11pb, Heterozygous	23–27 codons, Ex2	–	–	–		[72]
Co ₂₅ (StM78)	del TG	8–9 codons, Ex1				–	[14]
Co ₂₆	del C	34 codon, Ex2	–	–		+	[14]
Co ₂₇	del C	110 codon, Ex2	–	–			[70]
Co ₂₈ (CRC-16)	del ACTACT	86–88 codons, Ex2	–	–	–	–	[71]
Me ₁ (Me1386)	del CT, Hemi- or Homozygous	13–15 codons, Ex1	–	–	+		[26]
Me ₂ (GR-34)	del TTCT	15–16 codons, Ex1	–	–	+	–	[7]
Me ₃ (1106Mel)	del CT, Hemi- or Homozygous	13–15 codons, Ex1	–	–	+		[27]

Table 1 continued

	Mutation ¹	Site ²	$\beta 2m$ expression ³	HLA expression ³	LOH ⁴	MSI ⁵	References
Me ₄ (1180Mel)	del CT, Hemi- or Homozygous	13–15 codons, Ex1	–	–	+		[27]
Me ₅ (1259Mel)	del CT, Hemi- or Homozygous	13–15 codons, Ex1	–	–	+		[27]
Me ₆ (SK-MEL-33)	del G, Hemi- or Homozygous	96 codon, Ex2	–	–	+		[73]
Me ₇ (Mel249)	del AT, Hemizygous	62 codon, Ex2	–	–	+		[37]
Me ₈ (FO-1)	del 3 kb, Hemizygous	First exon and a segment of first intron	–	–	+		[9]
Me ₉ (Me9923)	del 14 bp, Homozygous	79–83 codons, Ex2	–	–	+		[26]
Me ₁₀ (UKRV-Mel-2b)	del 498 bp, Hemi- or Homozygous	–426 to +72 nt, including the whole exon 1	–	–	+	–	[8]
Re ₁ (fibroblastoid RCC52)	del G, Heterozygous del CT, Heterozygous	6 codon, Ex1 13–15 codons, Ex1	– –	– –	– –		[28]
Re ₂ (epitheloid RCC52)	del CT, Hemizygous	13–15 codons, Ex1	–	–	+		[28]
LyT ₁ (T19)	del CT, Hemizygous	14–15 codons, Ex1	–	–	+	–	[29]
LyT ₂ (T18)	del TG, Hemizygous	46–47 codons, Ex2	–	–	+	–	[29]
Cer	del TC or del CT	14–15 codons, Ex1		–			[30]

¹Frameshift mutations affecting repeat sequences of the $\beta 2m$ gene were described by Yamamoto et al. [58] in gastric, colorectal, and hereditary nonpolyposis colorectal cancers (HNPCC) (22, 26, and 19 frameshift mutations, respectively), but they have not been included in the table because of the lack of immunohistochemical studies to characterize the HLA Class I expression

²Site indicates codon number from ATG site, and exon in which it is located

³ $\beta 2m$ and HLA expression: \pm (weak); –(negative)

⁴LOH at chromosome 15q: + (presence of LOH); –(absence of LOH)

⁵MSI phenotype: + (presence of MSI); –(absence of MSI)

^aSite indicated by authors (Ref. [36]) did not correspond with our scheme of gene codons of $\beta 2m$ gene

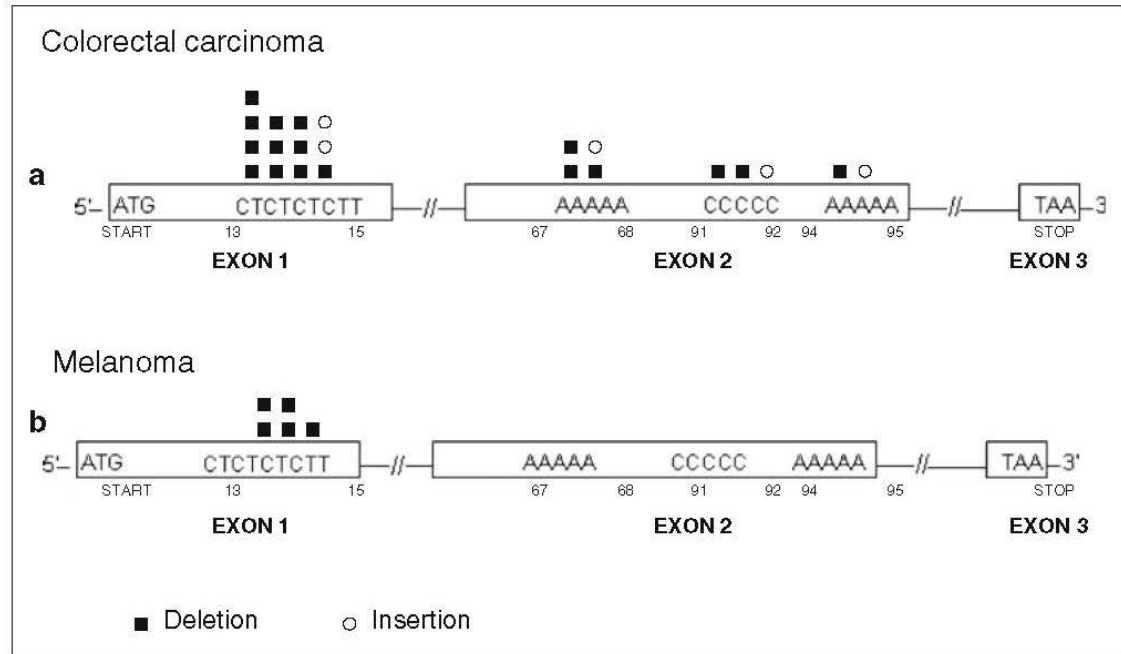


Fig. 2. Distribution of frameshift mutations in repeat sequences of the $\beta 2m$ gene in colon cancers (a) and melanoma (b). Schematic codon sequence of the $\beta 2m$ gene. Deletions and insertions both affect mono (A, C) and dinucleotide repeats (CT, CC, TT), but tetranucleotide sequences (CTCT, TCTT, TTCT) are only affected by deletions. In colon tumors (a), deletions and insertions were detected throughout the gene repeat sequences whereas in melanoma samples (b), deletions were only observed in the mutation hotspot of exon 1 (CT repeat sequence).

Single nucleotide substitutions in the $\beta 2$ -microglobulin gene

In addition to microdeletion/microinsertions in repetitive sequences, there have been reports of single nucleotide substitutions in the $\beta 2m$ gene that lead to nonsense or missense mutations or modify the splicing of the pre-mRNA (Fig. 3). These three types of point mutation can be generated by transversions (pyrimidine to purine exchange and vice versa) or transitions (purine to purine or pyrimidine to pyrimidine exchange). Transversions and transitions have both been observed in colon carcinoma and melanoma (Table 2).

Nonsense mutations that generate a premature stop codon (Table 2) are highly frequent in CRCs and melanoma. These mutations lead to the production of truncated $\beta 2m$ proteins that are generally undetectable by immunohistochemistry or ELISA (Fig. 3). One exception was sample C_O₄₃, in which the change from C to A at codon 108 at the end of exon 2 generated a stop codon but did not affect the HLA class I expression. This may be explained by expression of the second intact parental copy of the $\beta 2m$ gene, or it may be the case that deletion of the last 11 C-terminal amino acids does not severely impact $\beta 2m$ stability and function.

Missense mutations leading to amino acid exchanges have different effects on HLA class I cell surface expression (Table 2, Fig. 3). For instance, an alteration affecting the start codon (ATG) prevents translation of the mRNA into protein, as first described for a Burkitt lymphoma cell line (Daudi) [5]. Remarkably, the ATG start codon was affected by 5 out of 10 missense mutations found in exon 1 (Table 2). In contrast, other missense mutations can lead to the synthesis of abnormal $\beta 2m$ variants that are merely inefficiently processed, limiting the number of HLA class I cell surface molecules (e.g., low HLA class I expression in Co₂₉, Co₃₀, Co₃₁, Co₃₃, Co₄₂, and Co₄₃). The relevance of the type of amino acid exchange is demonstrated by two further examples: in Co₃₆, the C to T exchange in codon 6 (Ala to Val) did not modify the $\beta 2m$ and HLA class I expression; in melanoma cell line VMM5b (Me₁₅), however, the C to G transversion at codon 45 of exon 2 caused a Cys to Trp change, abolishing the formation of a disulfide bond between residues 45 and 100 of the $\beta 2m$ protein and leading to its degradation by the proteasome (Fig. 3). Point mutations that disrupt the sites involved in the splicing process of $\beta 2m$ pre-mRNA are another type of mutation observed in colon carcinoma and melanoma cells (Table 2, Fig. 3). These nucleotide exchanges were found to produce the destruction of conserved elements in donor (Me₁₈, Co₃₇) or acceptor (Me₁₇) splice sites at intron I and to the utilization of downstream located cryptic splice sites that result in the deletion or insertion of segments in the mRNA [26, 36, 37]. In the Me18105 cell line (Me₁₇), for example, the A to G transition in the dinucleotide AG splice acceptor site of intron I causes the use of a cryptic splice site in exon 2, which leads to the deletion of 11 bp in the $\beta 2m$ message, producing a frameshift mutation and introducing a premature stop codon in exon 2 (see Fig. 3) [26].

The molecular mechanisms that underlie the generation of single nucleotide substitutions are not known. However, the preference for G to C transversions (21/29) is compatible with deamination induced by activation-induced cytidine deaminase (AID) [38]. Aberrant AID expression has been detected in gastric cancer and human hepatocarcinoma [39, 40], while its expression under physiological conditions is mainly restricted to activated germinal center B cells, inducing somatic hypermutation and class-switch recombination of immunoglobulin genes [41]. The mutagenic action of AID consists of cytosine deamination in the consensus recognition sequence, which results in the formation of uracil for processing by the DNA repair system [38]. In this regard, we analyzed the consensus sequence for AID activity in 19 melanomas and CRCs tumors. Only two melanomas (Me₉ and Me₁₆) showed the corresponding consensus sequences close to the C or G changes, suggesting that expression of this enzyme does not play a major role in the generation of single missense and nonsense mutations in the $\beta 2m$ gene. However, we found heterogeneous expression of the AID enzyme in three CRCs but without the consensus sequence for AID.

Table 2 Summary of single base substitution mutations in *β2m* gene in human tumors

	Mutation ¹	Site ²	Amino acid substitution	<i>β2m</i> expression ³	HLA expression ³	LOH ⁴	MSI ⁵	References
Co ₂₉ (C84)	G → A, Heterozygous	54 codon, Ex2	Asp54Asn	±	±	–		[36]
Co ₃₀ (C84T)	G → A, Heterozygous	Nonrepetitive sequence, Ex2		±	±		+	[14]
Co ₃₁ (C43)	G → A, Heterozygous	Upstream of ATG		±	±		–	[69]
Co ₃₂	G → A	54 codon, Ex2	Asp54Asn				+	[24]
Co ₃₃	G → A	67 codon, Ex2	Glu67Lys	+	H			[70]
Co ₃₄	A → G	^a 68 nucleotide, Ex2		–	–			[70]
Co ₃₅	A → G	ATG	Met1Val	–	–			[70]
Co ₃₆	C → T	6 codon, Ex1	Ala6Val	+	+			[70]
Co ₂₄ (HCT)	C → A, Heterozygous	30 codon, Ex2	Tyr10Stop	–	–	–		[72]
Co ₃₇ (HCT15/ DLD1)	C → A, Heterozygous	30 codon, Ex2	Tyr10Stop	–	–		+	[36]
Co ₃₈ (3624/91)	C → G, Homozygous	11 codon, Ex1	Ala11Gly	–	–		–	[14]
Co ₃₉ (3822/93)	CT → GG, Homozygous	Nonrepetitive sequence, Ex2		–	–		+	[14]
Co ₄₀	G → T	63 codon, Ex2	Gly63Stop	–	–		+	[24]
Co ₄₁	T → A	50 codon, Ex2	Phe50Ile	+	–			[70]
Co ₄₂	T → A	5 codon, Ex1	Val5Glu	H	H			[70]
	T → G	2 codon, Ex1	Ser2Ala					
Co ₄₃	C → A	108 codon, Ex2	Ser108Stop	+	H			[70]
Co ₃₇ (HCT15/ DLD1)	G → T, Heterozygous	Last base of IVS1 ^b		–	–			[36]
Me ₁₁ (1074Mel)	G → A, Hemizygous	ATG	Met1Ile	–	–	+		[27]
Me ₁₂ (LB1622- Mel)	T → A, Hemizygous	ATG	Met1Lys	–	–	+	–	[6]
Me ₁₃ (BB74-Mel)	C → G, Hemizygous	31 codon, Ex2	Ser31Stop	–	–	+	–	[6]
Me ₉ (Me9923)	C → G, Homozygous	86 codon, Ex2	Tyr86Stop	–	–	+		[26]
Me ₁₄ (1174Mel)	C → G, Hemizygous	31 codon, Ex2	Ser31Stop	–	–	+		[27]
Me ₁₅ (VMM5b)	C → G, Hemizygous	45 codon, Ex2	Cys45Top	+	–	+		[74]
Me ₁₆ (DNR-DC- M010)	G → T, Hemizygous	67 codon, Ex2	Glu67Stop	–	–	+		[42]
Me ₁₇ (Me18105)	A → G, Homozygous	IVS1 ^b		–	–	+		[26]
Me ₁₈ (Mel499)	T → A	IVS1 ^b		–	–			[37]

Table 2 continued

	Mutation ¹	Site ²	Amino acid substitution	$\beta 2m$ expression ³	HLA expression ³	LOH ⁴	MSI ⁵	References
Lu ₁ (H2009)	A → G, Hemi- or Homozygous	ATG	Met1Val	–	–	+		[69]
Lu ₂ (C831L)	C → T	22 codon, Ex1	Gln22Stop	–	–	–		[75]
Ly (Daudi)	G → C, Homozygous	ATG	Met1Ile	–	–			[5]

¹Point mutations affecting $\beta 2m$ gene were described by Yamamoto et al. [58] in gastric, colorectal, and hereditary nonpolyposis colorectal cancers (HNPCC), but they have not been included in the table because of the lack of immunohistochemical studies to characterize the HLA Class I expression

² Site indicates codon number from ATG start codon (= 1), and exon in which it is located

³ $\beta 2m$ and HLA expression: + (positive); ± (weak); H (heterogeneous); - (negative)

⁴ LOH at chromosome 15: + (presence of LOH); - (absence of LOH)

⁵ MSI phenotype: + (presence of MSI); - (absence of MSI)

^a Sites indicated by authors (Ref. [70]) did not correspond with our scheme of gene codons of $\beta 2m$ gene

^b Single base substitutions in first intron affect splice sites resulting in microdeletions or insertions: Co_{4/5} (HCT-15/DLD-1 cell line) and Me₇ (Me18105 cell line): deletion of the first 11 pb of exon 2; Me₁₇ (Mel499): insertion of 27 and 407 pb in IVS1)

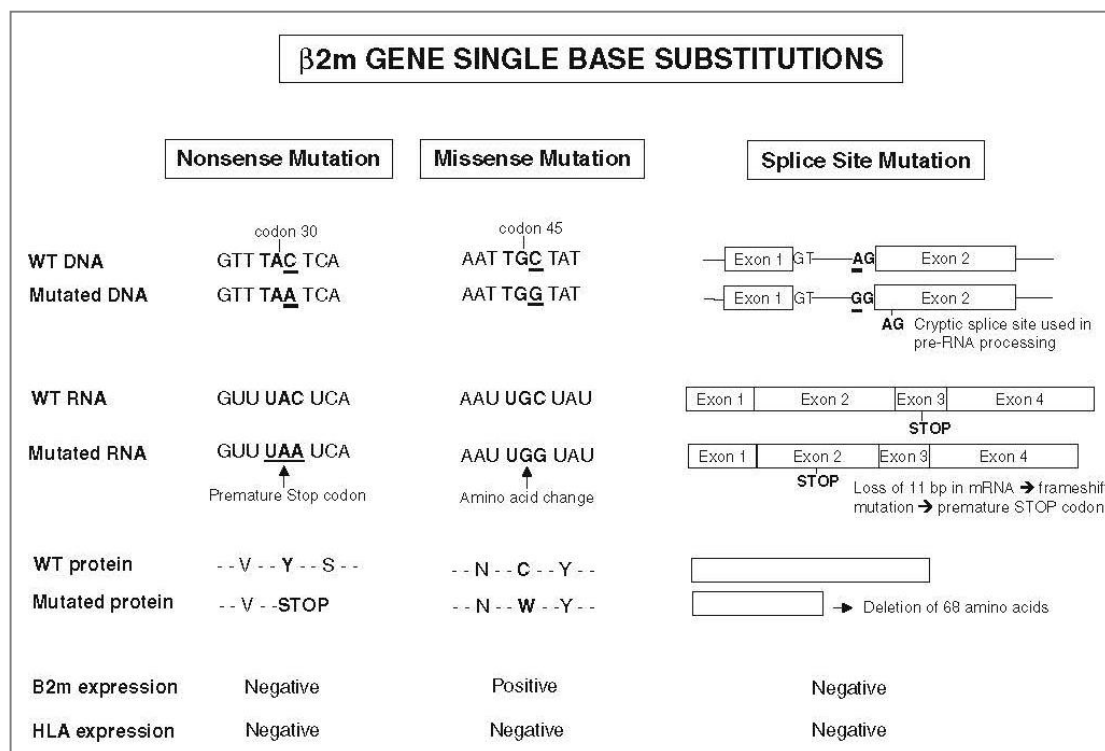


Fig. 3 Schematic representation of single base substitutions affecting $\beta 2m$ gene in human tumors. Nonsense mutation: a single nucleotide substitution in tumor DNA results in a premature stop codon. Missense mutation: a single nucleotide substitution alters the codon sequence and replace one amino acid by another in the gene product. Finally, a single nucleotide substitution in the splicing acceptor site (AG) activates a new “cryptic splice site” and introduces a premature stop codon

The concurrence of gene mutations and gene loss generates the $\beta 2$ -microglobulin-deficient cellular phenotype

With the exception of three colon carcinoma samples, the great majority of tumors listed in Tables 1 and 2 harbored only a single $\beta 2m$ gene mutation, suggesting loss of the second parental copy of the $\beta 2m$ gene. Loss of chromosomal DNA is detectable at the level of microsatellite markers, which are repetitive sequences of varying length spread over the whole genome. Primers located in the conserved flanking regions of microsatellite markers can be used for their PCR-based amplification, which gives rise to a specific product pattern for each individual. Amplification of microsatellite markers located in chromosome 15q21, to which the $\beta 2m$ gene maps, revealed an altered PCR product pattern for 17 out of 18 melanoma samples in comparison with autologous normal cells, pointing to LOH (Table 1, 2, Fig. 4). In melanoma, therefore, $\beta 2m$ deficiency is generally due to a mutation in one copy of the $\beta 2m$ gene together with complete loss of the second $\beta 2m$ copy [37].

One example is the cell line UKRV-Mel-2b (Me 10) (Table 1), obtained from the metastatic pleural effusion of a melanoma patient [8]. These cells showed a total lack of $\beta 2m$ expression due to a microdeletion of 498 bp in one $\beta 2m$ gene, including the entire exon 1, and a macrodeletion (LOH15q21) that included the entire second copy of the gene. In another melanoma cell line M010-DC-DNR (Me₁₄) obtained from a melanoma patient during metastatic progression (Table 2), $\beta 2m$ deficiency was caused by a mutation in codon 67 of exon 2 in combination with LOH on 15q21 [42].

The molecular mechanisms that lead to LOH on 15q21 appear to be heterogeneous. Comparative genomic hybridization studies on the genome of $\beta 2m$ -deficient cells revealed that the loss of one $\beta 2m$ copy occurred during intra- or inter-chromosomal rearrangements or resulted from the complete loss of one parental chromosome 15 [37]. It has not yet been elucidated whether $\beta 2m$ gene mutation or $\beta 2m$ copy loss is the initiating event [43]. We highlight that LOH on 15q21 can be found in melanoma tumor tissues that still express HLA class I complexes [44]. For instance, analysis of metastases from a melanoma patient revealed low HLA class I expression and LOH on 15q21 in progressing subcutaneous metastases but high HLA class I expression and no LOH on 15q21 in regressing metastases [45]. These data suggest that the loss of one $\beta 2m$ gene copy might be the initial step toward an irreversible HLA class I loss, which is completed by a $\beta 2m$ gene mutation [45].

Besides our findings in melanomas, we detected LOH on 15q21 in 44 % of primary bladder carcinomas, 53 % of breast carcinomas, and 35 % of MSS colon carcinomas [11]. However, this experimental technique is not suitable for CRCs with the MSI-H phenotype, because the microsatellite instability also affects the LOH marker [19]. One possibility to overcome this problem might be the use of heterozygous SNPs within or adjacent to the $\beta 2m$ gene or the application of fluorescent in situ hybridization with specific $\beta 2m$ -labeled probes [8].

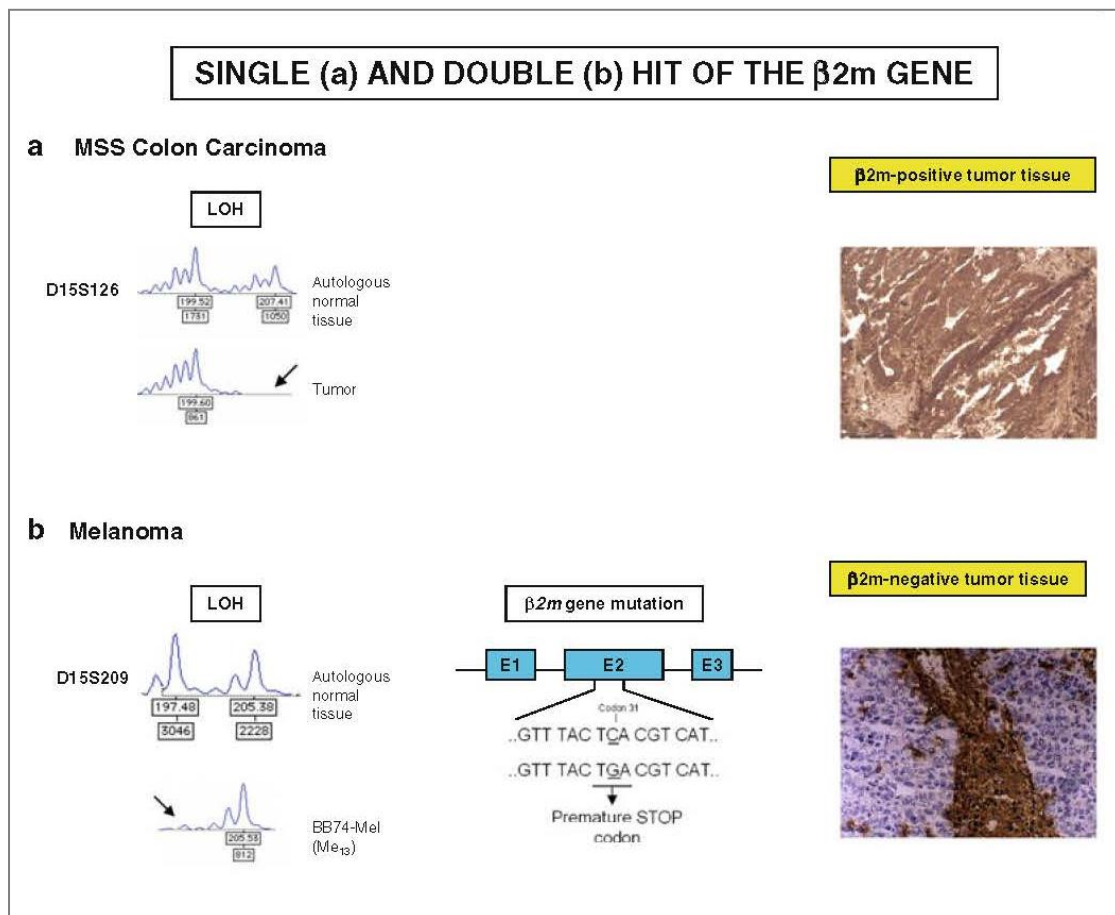


Fig. 4. Schematic representation of a single and a double hit in the $\beta 2m$ gene. In the first example, an MSS colon carcinoma harbors an LOH in the chromosome 15q21 region but retains HLA class I expression (a). In the second example, a melanoma has alterations affecting both $\beta 2m$ genes (an LOH and a point mutation generating a stop codon) leading to a total loss of HLA class I expression (b)

In vivo selection of $\beta 2$ -microglobulin-deficient tumors and impact on cancer immunotherapy

Evidences obtained in experimental mouse tumor models indicates that the MHC class I phenotype of a metastatic tumor clone can dramatically change depending on the immune status of the host. Thus, a metastatic colony that was MHC class I negative when the tumor metastasized in a T-cell immunocompetent mouse was MHC class I positive when the tumor metastasized in a T-cell immunodeficient animal [46, 47].

Various studies in humans have demonstrated that tumor cells acquire resistance to T-cell recognition by defective HLA class I expression [48–50]. We have proposed to distinguish between reversible (“soft”) and irreversible (“hard”) alterations. Reversible HLA class I alterations are caused by the transcriptional silencing of genes encoding HLA class I heavy chains and antigen processing machinery components. These phenotypes can be reversed by cytokines [50, 51] or by agents that modify histone acetylation or methylation, restoring the tumor’s susceptibility to CTLs [52–54]. In contrast, irreversible alterations usually result from the loss of one HLA haplotype

affecting chromosome 6p21, which generates tumor cells that express only one HLA-A, HLA-B, and HLA-C set of genes or from mutations in the $\beta 2m$ gene (hard lesions) [50]. Hence, the “soft” or “hard” nature of an alteration might determine the success or failure of immunotherapy. For instance, tumor escape variants with low HLA class I expression but soft lesions will recover HLA expression after immunotherapy through effect of cytokines released locally in the tumor microenvironment. In contrast, HLA class I-deficient tumor cells with hard lesions will not recover HLA, regardless of the type of immunotherapy.

We propose that T-cell-based therapy may fail due to the loss of HLA class I expression produced by irreversible mechanisms. In particular, the lack of immunotherapeutic efficacy in melanomas may in part be explained by the pre-existence of metastatic tumor lesions that harbor $\beta 2m$ gene mutations generated during tumor progression [6, 8]. In fact, additional selective pressure may be exerted during T-cell-based immunotherapy, favoring the outgrowth of HLA class I-deficient tumor cells with “hard lesions” [55].

Our group previously reported that the poor clinical response of two melanoma patients to vaccination with HLA-A1-restricted MAGE-derived peptides (BB74-Mel [Me₁₂]) and LB1622-Mel [Me₁₃]) correlated with the loss of HLA Class I surface expression in tumor tissues and cell lines due to the presence of LOH on chromosome 15q21 in combination with $\beta 2m$ gene mutations [6]. Likewise, another melanoma patient who did not respond to immunotherapy with IFN- α showed total loss of HLA class I surface expression caused by the concurrence of a $\beta 2m$ gene mutation and LOH on chromosome 15q21 (UKRV-Mel-2b [Me₁₀]) [41]. In this context, we recently reported a higher incidence of 15q21 chromosomal region loss in high-risk BCG-treated bladder carcinomas that relapsed than in those that did not, suggesting an association between hard $\beta 2m$ lesions and tumor escape [56].

There is further evidence of the functional significance of mutations in the $\beta 2m$ gene. First, the frequency of mutations at mononucleotide repeats in the coding region of the $\beta 2m$ gene is much higher than would be expected by chance. The predicted frequency of mutations at microsatellites with a length of 5 nucleotides in MSI-H CRC is lower than 1 % [24, 57], but the observed frequency of $\beta 2m$ mutations reaches 30 % in MSI-H CRCs [24]. Second, no mutations are found at significantly longer repeats in either coding or noncoding regions of other genes, suggesting that $\beta 2m$ mutations may be under positive selective pressure in MSI cancers [58]. Third, mutations that inactivate $\beta 2m$ appear to favor local tumor growth, given the demonstration by immunohistochemistry studies that metastatic lesions are homogeneously composed of $\beta 2m$ -negative tumor cells (see Fig. 4).

The data reviewed here suggest the need for strategies to overcome tumor escape mechanisms. This requires a clear definition of the precise molecular mechanisms responsible for HLA alterations. In particular, it is necessary to differentiate between reversible (soft) mechanisms, in which the administration of cytokines (e.g., IFN) can be useful, and irreversible (hard) mechanisms, in which HLA expression can only be restored by transfer of the appropriate wild-type functional gene.

The $\beta 2m$ gene is widely implicated in the generation of HLA class I-loss tumor phenotypes, underlining the importance of developing therapies to correct defects in this gene and thereby restore HLA class I expression [11]. Our group successfully restored HLA class I expression in $\beta 2m$ -negative tumor cells by transduction with a nonreplicating adenovirus vector encoding the wild-type human

β2m gene, obtaining recognition of the *β2m*-transduced tumor cells by cytotoxic T cells. In the same study, intratumoral injection of the *β2m* recombinant adenoviral vector into a human tumor xenograft of a nude/nude mouse resulted in the re-expression of HLA class I molecules [59].

It should also be taken into account that the level of MHC/HLA class I expression in tumors can affect T- and NK-cell effector mechanisms in an opposite manner according to whether the tumor is growing locally or is in metastatic dissemination. Thus, our group reported that GR9 mouse fibrosarcoma clones expressing elevated levels of H-2 class I molecules are highly immunogenic and induce a T-cell-mediated rejection when growing locally as a primary tumor mass, whereas the same H-2 positive clones produce a large amount of spontaneous metastases in different organs [60]. Conversely, H-2 negative clones of the same mouse fibrosarcoma revealed a low local immunogenicity and grew rapidly but with very few or no spontaneous metastases [61]. Likewise, it has been reported that the loss of HLA class I expression in human uveal melanoma is associated with better patient survival, suggesting that NK cells might play a major role in destroying MHC class I-deficient tumor cells when “blood-borne” to colonize distant tissues [62, 63]. In this context, it was recently reported that the potential metastatic spread of colon cancer cells to the liver is reduced when they carry an HLA class I negative phenotype produced by *β2m* mutations [64]. In a similar manner, a poor survival of colorectal cancer patients has been associated with tumors expressing intermediate HLA expression in comparison with those with total loss or positive expression, indicating that tumor tissues with ±HLA class I expression can escape from T- and NK-cell cytotoxicity [65]. We favor the proposition that the transfer of the *β2m* gene and the consequent re-expression and/or enhancement of HLA class I expression promotes T-cell-mediated tumor rejection in solid primary or metastatic lesions. NK cells play a major role when tumor cells are migrating as single cells to induce metastasis. Finally, it is important to note that *β2m* has also been related to other nonimmunological functions, including enhancement of epithelia/mesenchymal transition [66] and activity as a growth factor and signaling molecule in cancer cells [67, 68].

Conclusions and future directions

Over the past two decades, several studies identified mutations in the *β2m* gene to be causative for the HLA class I total loss phenotype of tumors. In general, one type of *β2m* mutation was reported to be present in a cell ranging from single base substitutions to microinsertions/microdeletions. Such mutations were predominantly detected in colorectal carcinoma and melanoma. However, recent data suggest that these *β2m* mutations coincide with extensive loss of genetic material in chromosome region 15q21, to which the *β2m* gene maps. LOH in 15q21 can be detected in tumor tissues with apparently “normal” HLA expression. Thus, we propose that in general, the LOH is the primary mutational event that is then followed to the *β2m* gene mutation as the second hit that produces the MHC class I negative phenotype. Indeed, HLA class I negative tumor tissue obtained from melanoma patients undergoing different types of immunotherapy has been characterized for these two successive mutational events affecting the *β2m* gene. These HLA class I negative melanoma cells with irreversible “hard” lesions are immunoselected after immunotherapy since are resistant to T-cell recognition and destruction. We have also obtained evidences that *β2m* LOH also occur with high

incidence in breast and bladder carcinoma suggesting an important role of this gene in the generation of tumor escape variants in different tumors. There are tumor entities that acquire total HLA class I loss by other molecular mechanisms. For instance, a coordinated downregulation of the transcription of genes encoding HLA class I heavy chains, $\beta 2m$ and components of the antigen presentation machinery has been found in bladder carcinomas [12] or tumors in which the precise molecular mechanism responsible HLA class I total loss is not known, for example, 40 % of prostate cancers [13] and 52 % of breast cancers. (I. Maleno unpublished data). So, it will be a challenge for the future to define all these mechanisms and to develop strategies to circumvent HLA class I downregulation in order to ensure maximal efficacy of T-cell-based immunotherapy. We favor the idea that the $\beta 2m$ gene can be a target for gene therapy by replacing the damaged gene by a wild-type one, inducing HLA class I expression in HLA-deficient tumor cells or even increasing HLA expression in cells with a weak expression due to LOH in one $\beta 2m$ gene to promote tumor rejection.

Acknowledgments The authors are grateful to Dr Natalia Aptsiauri for helpful discussions and suggestions, to Dr Isabel Maleno for helping in the preparation of the manuscript, and to Eva García and Ana Isabel Rodríguez for technical assistance. They also thank the Tumor-Tissue Biobank of Virgen de las Nieves University Hospital for providing samples. The study was partially supported by grants from the Fondo de Investigaciones Sanitarias, Instituto de Salud Carlos III, Red Genómica del Cáncer (RETICRD 06/020), Consejería de Salud de la Junta de Andalucía, Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa Junta de Andalucía, (P08-TIC-4299), Dirección General de Investigación y Gestión del Plan Nacional I + D + i (TIN2009-13489), Proyecto de Investigación de Excelencia (CTS-3952, CVI-4740 and P06/-CTS-02200), and Plan Andaluz de Investigación (PAI, Group CTS) in Spain; and from the European Searchable Tumour Cell Line Database (ESTDAB) project (contract No. QLRI-CT-2001-01325) at <http://www.ebi.ac.uk/estdab>, the European Network for the identification and validation of antigens and biomarkers in cancer and their application in clinical tumor immunology (ENACT) project (European community LSHC-CT-2004-503306), and the Cancer Immunotherapy project (European community OJ 2004/c158,18234) and the Helmholtz-Gemeinschaft Deutscher Forschungszentren (HGF) “Alliance on Immunotherapy of Cancer”.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interests.

References

1. Coulie PG, Karanikas V, Lurquin C, Colau D, Connerotte T, Hanagiri T, Van Pel A, Lucas S, Godelaine D, Lonchay C, Marchand M, Van Baren N, Boon T (2002) Cytolytic T-cell responses of cancer patients vaccinated with a MAGE antigen. *Immunol Rev* 188:33–42
2. Wang E, Worschech A, Marincola FM (2008) The immunologic constant of rejection. *Trends Immunol* 29:256–262
3. Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Perez-Villar JJ, Lopez-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL (1997) Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today* 18:89–95
4. del Campo Ana B, Carretero J, Aptsiauri N, Garrido F (2012) Targeting tumor HLA class I expression to increase tumor immunogenicity. *Tissue Antigens* 79:147–154
5. Rosa F, Berissi H, Weissenbach J, Maroteaux L, Fellous M, Revel M (1983) The $\beta 2m$ mRNA in human Daudi cells has a mutated initiation codon but is still inducible by interferon. *EMBO J* 2:239–243
6. Benitez R, Godelaine D, Lopez-Nevot MA, Brasseur F, Jiménez P, Marchand M, Oliva MR, van Baren N, Cabrera T, Andry G, Landry C, Ruiz-Cabello F, Boon T, Garrido F (1998) 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* 52:520–529
7. Pérez B, Benitez R, Fernández MA, Oliva MR, Soto JL, Serrano S, López Nevot MA, Garrido F (1999) A new beta 2 microglobulin mutation found in a melanoma tumor cell line. *Tissue Antigens* 53:569–572
 8. Paschen A, Méndez RM, Jimenez P, Sucker A, Ruiz-Cabello F, Song M, Garrido F, Schadendorf D (2003) Complete loss of HLA class I antigen expression on melanoma cells: a result of successive mutational events. *Int J Cancer* 103:759–767
 9. D'Urso CM, Wang ZG, Cao Y, Tataka R, Zeff RA, Ferrone S (1991) Lack of HLA class I antigen expression by cultured melanoma cells FO-1 due to a defect in B2m gene expression. *J Clin Invest* 87:284–292
 10. Browning M, Petronzelli F, Bicknell D, Krausa P, Rowan A, Tonks S, Murray N, Bodmer J, Bodmer W (1996) Mechanisms of loss of HLA class I expression on colorectal tumor cells. *Tissue Antigens* 47:364–371
 11. Maleno I, Aptsiauri N, Cabrera T, Gallego A, Paschen A, López- Nevot MA, Garrido F (2011) Frequent loss of heterozygosity in the b2-microglobulin region of chromosome 15 in primary human tumors. *Immunogenetics* 63:65–71
 12. Romero JM, Jiménez P, Cabrera T, Cozar JM, Pedrinaci S, Tallada M, Garrido F, Ruiz-Cabello F (2005) Coordinated downregulation of the antigen presentation machinery and HLA class I/b2m complex is responsible for HLA-ABC loss in bladder cancer. *Int J Cancer* 113:605–610
 13. Blades RA, Keating PJ, McWilliam LJ, George NJ, Stern PL (1995) Loss of HLA class I expression in prostate cancer: implications for immunotherapy. *Urology* 46:681–686
 14. Bicknell DC, Kaklamanis L, Hampson R, Bodmer WF, Karran P (1996) Selection for beta 2-microglobulin mutation in mismatch repair-defective colorectal carcinomas. *Curr Biol* 6:1695–1697
 15. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363:558–561
 16. Umar A, Kunkel TA (1996) DNA-replication fidelity, mismatch repair and genome instability in cancer cells. *Eur J Biochem* 238:297–307
 17. Imai K, Yamamoto H (2008) Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 29:673–680
 18. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Rüschoff J (1997) Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 57:4749–4756
 19. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S (1998) 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* 58:5248–5257
 20. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB (1998) Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6870–6875
 21. Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovicova J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Peltomäki P, Kolodner RD, Nilbert M, Lindblom A (2007) Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst* 99:291–299
 22. Speicher MR (1995) Microsatellite instability in human cancer. *Oncol Res* 7:267–275
 23. Bichara M, Pinet I, Schumacher S, Fuchs RP (2000) Mechanisms of dinucleotide repeat instability in *Escherichia coli*. *Genetics* 154:533–542
 24. Kloor M, Michel S, Buckowitz B, Rüschoff J, Büttner R, Holinski-Feder E, Dippold W, Wagner R, Tariverdian M, Benner A, Schwitalle Y, Kuchenbuch B, von Knebel Doeberitz M (2007) Beta2-microglobulin mutations in microsatellite unstable colorectal tumors. *Int J Cancer* 121:454–458
 25. Cabrera CM, Jiménez P, Cabrera T, Esparza C, Ruiz-Cabello F, Garrido F (2003) Total loss of MHC class I in colorectal tumors can be explained by two molecular pathways: b2m inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens* 6:211–219
 26. Hicklin DJ, Wang Z, Arienti F, Rivoltini L, Parmiani G, Ferrone S (1998) Beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J Clin Invest* 101:2720–2729
 27. Chang CC, Campoli M, Restifo NP, Wang X, Ferrone S (2005) Immune selection of hot-spot beta 2-microglobulin gene mutations, HLA-A2 allospecificity loss, and antigen-processing machinery component

- down-regulation in melanoma cells derived from recurrent metastases following immunotherapy. *J Immunol* 174:1462–1471
28. Hsieh CH, Hsu YJ, Chang CC, Liu HC, Chuang KL, Chuang CK, Pang ST, Hasumi K, Ferrone S, Liao SK (2009) Total HLA class I loss in a sarcomatoid renal carcinoma cell line caused by the coexistence of distinct mutations in the two encoding b2m genes. *Cancer Immunol Immunother* 58:395–408
 29. Jordanova ES, Riemersma SA, Filippo K, Schuurin E, Kluin PM (2003) Beta2-microglobulin aberrations in diffuse large B-cell lymphoma of the testis and the central nervous system. *Int J Cancer* 103:393–398
 30. Koopman LA, Corver WE, van der Slik AR, Giphart MJ, Fleuren GJ (2000) Multiple genetic alterations cause frequent and heterogeneous human histocompatibility leukocyte antigen class I loss in cervical cancer. *J Exp Med* 191:961–976
 31. Tomlinson IP, Beck NE, Bodmer WF (1996) Allele loss on chromosome 11q and microsatellite instability in malignant melanoma. *Eur J Cancer* 32:1797–1802
 32. Birindelli S, Tragni G, Bartoli C, Ranzani GN, Rilke F, Pierotti MA, Pilotti S (2000) Detection of microsatellite alterations in the spectrum of melanocytic nevi in patients with or without individual or family history of melanoma. *Int J Cancer* 86:255–261
 33. Hussein MR, Sun M, Tuthill RJ, Roggero E, Monti JA, Sudilovsky EC, Wood GS, Sudilovsky O (2001) Comprehensive analysis of 112 melanocytic skin lesions demonstrates microsatellite instability in melanomas and dysplastic nevi, but not in benign nevi. *J Cutan Pathol* 28:343–350
 34. Palmieri G, Ascierto PA, Cossu A, Colombino M, Casula M, Botti G, Lissia A, Tanda F, Castello G (2003) Assessment of genetic instability in melanocytic skin lesions through microsatellite analysis of benign naevi, dysplastic naevi, and primary melanomas and their metastases. *Melanoma Res* 13:167–170
 35. Hussein MR (2004) Genetic pathways to melanoma tumorigenesis. *J Clin Pathol* 57:797–801
 36. Bicknell DC, Rowant A, Bodmer WF (1994) b 2 –Microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:4751–4755
 37. Paschen A, Arens N, Sucker A, Greulich-Bode KM, Fonsatti E, Gloghini A, Striegel S, Schwinn N, Carbone A, Hildenbrand R, Cerwenka A, Maio M, Schadendorf D (2006) The coincidence of chromosome 15 aberrations and b2m gene mutations is causative for the total loss of human leukocyte antigen class I expression in melanoma. *Clin Cancer Res* 12:3297–3305
 38. Di Noia J, Neuberger M (2007) Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* 76:1–22
 39. Kim CJ, Song JH, Cho YG, Cao Z, Kim SY, Nam SW, Lee JY, Park WS (2007) Activation-induced cytidine deaminase expression in gastric cancer. *Tumour Biol* 28:333–339
 40. Marusawa H, Aberrant AID (2008) Expression and human cancer development. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1399–1402
 41. Shivarov V, Shinkura R, Doi T, Begum NA, Nagaoka H, Okazaki IM, Ito S, Nonaka T, Kinoshita K, Honjo T (2009) Molecular mechanism for generation of antibody memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:569–575
 42. Del Campo A, Mendez R, Carretero J, Maleno I, Zinchenko S, Ruiz-Cabello F, Kyte JA, Aamdal S, Gaudernak G, Aptsiauri N, Garrido F (2010) Analysis of HLA class I expression in metastatic lesions obtained from a melanoma patient before and after treatment with tumor-mRNA-transfected DCs: immunoselection of cells with beta 2-microglobulin gene alterations. *Tissue Antigens* 75:488
 43. Marusawa H, Aberrant AID (2008) Expression and human cancer development. *Int J Biochem Cell Biol* 40:1399–1402
 44. Carretero R, Romero JM, Ruiz-Cabello F, Maleno I, Rodriguez F, Camacho FM, Real LM, Garrido F, Cabrera T (2008) Analysis of HLA class I expression in progressing and regressing metastatic melanoma lesions after immunotherapy. *Immunogenetics* 60:439–447
 45. Carretero R, Wang E, Rodriguez AI, Reinboth J, Ascierto ML, Engle AM, Liu H, Camacho FM, Marincola FM, Garrido F, Cabrera T (2012) Regression of melanoma metastases after immunotherapy is associated with activation of antigen presentation and interferon-mediated rejection genes. *Int J Cancer* 131:387–395
 46. Garcia-Lora A, Martinez M, Algarra I, Gaforio JJ, Garrido F (2003) MHC class I-deficient metastatic tumor variants immunoselected by T lymphocytes originate from the coordinated downregulation of APM components. *Int J Cancer* 106:521–527

47. Garcia-Lora A, Algarra I, Gaforio JJ, Ruiz-Cabello F, Garrido F (2001) Immunoselection by T lymphocytes generates repeated MHC class I-deficient metastatic tumor variants. *Int J Cancer* 91:109–119
48. Kloor M, Becker C, Benner A, Woerner SM, Gebert J, Ferrone S, von Knebel Doeberitz M (2005) Immunoselective pressure and human leukocyte antigen class I antigen machinery defects in microsatellite unstable colorectal cancers. *Cancer Res* 65:6418–6424
49. Drake CG, Jaffee E, Pardoll DM (2006) Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol* 90:51–81
50. Garrido F, Cabrera T, Aptsiauri N (2010) “Hard” and “soft” lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. *Int J Cancer* 127:249–256
51. Seliger B, Ruiz-Cabello F, Garrido F (2008) IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv Cancer Res* 101:249–276
52. Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, Mendez R, Traversari C, Ruiz-Cabello F, Garrido F (2001) Reexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer* 94:243–251
53. Rodriguez T, Mendez R, del Campo A, Jimenez P, Aptsiauri N, Garrido F, Ruiz-Cabello F (2007) Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. *BMC Cancer* 7:34
54. Khan AN, Gregorie CJ (2008) Tomasi TB Histone deacetylase inhibitors induce TAP, LMP, Tapasin genes and MHC class I antigen presentation by melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 57:647–654
55. Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli JR, Rosenberg SA (1996) Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst* 88:100
56. Carretero R, Cabrera T, Gil H, Saenz-Lopez P, Maleno I, Aptsiauri N, Cozar JM, Garrido F (2011) Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of bladder cancer induces selection of human leukocyte antigen class I-deficient tumor cells. *Int J Cancer* 129:839–846
57. Woerner SM, Yuan YP, Benner A, Korff S, von Knebel Doeberitz M, Bork P (2010) SelTarbase, a database of human mononucleotide microsatellite mutations and their potential impact to tumorigenesis and immunology. *Nucleic Acids Res* 38 (Database issue):D682–D689
58. Yamamoto H, Sawai H, Peruchio M (1997) Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res* 57:4420–4426
59. del Campo AB, Aptsiauri N, Mendez R, Zinchenko S, Vales A, Paschen A, Ward S, Ruiz-Cabello F, Gonzalez-Aseguinolaza G, Garrido F (2009) Efficient recovery of HLA class I expression in human tumor cells after b2m gene transfer using adenoviral vector: implications for cancer immunotherapy. *Scand J Immunol* 70:125–135
60. Perez M, Algarra I, Ljunggren HG, Caballero A, Mialdea MJ, Gaforio JJ, Klein G, Karre K, Garrido F (1990) A weakly tumorigenic phenotype with high MHC class-I expression is associated with high metastatic potential after surgical removal of the primary murine fibrosarcoma. *Int J Cancer* 46:258–261
61. Garrido ML, Perez M, Delgado C, Rojano J, Algarra I, Garrido A, Garrido F (1986) Immunogenicity of H-2 positive and H-2 negative clones of a mouse tumour, GR9. *J Immunogenet* 13:159–167
62. Jager MJ, Hurks HM, Levitskaya J, Kiessling R (2002) HLA expression in uveal melanoma: there is no rule without some exception. *Human Immunol* 63:444–451
63. Ma D, Luyten GP, Luider TM, Niederkorn JY (1994) Relationship between natural killer cell susceptibility and metastasis of human uveal melanoma cells in a murine model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36:435–441
64. Tikidzhieva A, Benner A, Michel S, Formentini A, Link K-H, Dippold W, von Knebel Doeberitz M, Kornmann M, Kloor M (2012) Microsatellite instability and beta2-microglobulin mutations as prognostic markers in colon cancer: results of the FOGT-4 trial. *Br J Cancer* 106:1239–1245
65. Watson NF, Madjd Z, Splendlove I, Ellis IO, Scholefield JH, Durant LG (2006) Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with poor prognosis. *Int J Cancer* 118:6–10
66. Jossen S, Nomura T, Lin JT, Huang WC, Wu D, Zhou HE, Zayzafoon M, Weizmann MN, Gururajan M, Chung LW (2011) b2-Microglobulin induces epithelial to mesenchymal transition and confers cancer lethality and bone metastasis in human cancer cells. *Cancer Res* 71:2600–2610

67. Huang WC, Wu D, Xie Z, Zhou HE, Nomura T, Zayzafoon M, Pohl J, Hsieh CL, Weitzmann MN, Farach-Carson MC, Chung LW (2006) beta2-microglobulin is a signaling and growth-promoting factor for human prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res* 66:9108–9116
68. Huang WC, Zhou HE, Chung LW (2010) Androgen receptor survival signalling is blocked by anti- β 2-microglobulin monoclonal antibody via a mitogen-activated protein kinase/lipogenic pathway in human prostate cancer cells. *J Biol Chem* 285:7947–7956
69. Chen H, Gabrilovich D, Virmanii A, Ratnani I, Girgis K, Nadaf-Rahrovv S, Fernandez-Vin~a M, Carbone P (1996) Structural and functional analysis of β 2 microglobulin abnormalities in human lung and breast cancer. *Int J Cancer* 67:756–763
70. De Miranda NF, Nielsen M, Pereira D, van Puijenbroek M, Vasen HF, Hes FJ, van Wezel T, Morreau H (2009) MUTYH-associated polyposis carcinomas frequently lose HLA class I expression—a common event amongst DNA-repair-deficient colorectal cancers. *J Pathol* 219:69–76
71. Bernal M, Concha A, Sáenz-López P, Rodríguez AI, Cabrera T, Garrido F, Ruiz-Cabello F (2011) Leukocyte infiltrate in gastrointestinal adenocarcinomas is strongly associated with tumor microsatellite instability but not with tumor immunogenicity. *Cancer Immunol Immunother* 60:869–882
72. Gattoni-Celli S, Kirsch K, Timpane R, Isselbacher KJ (1992) Beta 2-microglobulin gene is mutated in a human colon cancer cell line (HCT) deficient in the expression of HLA class I antigens on the cell surface. *Cancer Res* 52:1201–1204
73. Wang Z, Cao Y, Albino AP, Zeff RA, Houghton A, Ferrone S (1993) Lack of HLA class I antigen expression by melanoma cells SK-MEL-33 caused by a reading frameshift in beta2-microglobulin messenger RNA. *J Clin Invest* 91:684–692
74. Chang CC, Ogino T, Mullins DW, Oliver JL, Yamshchikov GV, Bandoh N, Slingluff CL Jr, Ferrone S (2006) Defective human leukocyte antigen class I-associated antigen presentation caused by a novel β 2m loss-of-function in melanoma cells. *J Biol Chem* 281:18763–18773
75. Baba T, Hanagiri T, Ichiki Y, Kuroda K, Shigematsu Y, Mizukami M, Sugaya M, Takenoyama M, Sugio K, Yasumoto K (2007) Lack and restoration of sensitivity of lung cancer cells to cellular attack with special reference to expression of human leukocyte antigen class I and/or major histocompatibility complex class I chain related molecules A/B. *Cancer Sci* 98:1795–1802

VI. DISCUSIÓN

VI. DISCUSIÓN

1. Mecanismos Moleculares Implicados en la Pérdida de HLA de clase I: Relación con la Vía de Carcinogénesis en Carcinomas Gastrointestinales.

En el cáncer colorrectal (CRC) con alto grado de inestabilidad de microsatélites (MSI-H) se ha observado que la pérdida total de antígenos HLA de clase I ocurre con mayor frecuencia (~60%) que en los casos con MSS (~17%) (Bernal et al., 2011; Cabrera et al., 2003; Dierssen et al., 2007; Kloor et al., 2005). Estos datos reflejan la intensa inmuno-vigilancia en el microambiente de tumores con inestabilidad genómica, que favorece la selección de variantes tumorales con defectos en la presentación antigénica (Kloor et al., 2005). El principal mecanismo molecular implicado en la generación de este fenotipo HLA alterado en CRCs con MSI-H, es la existencia de mutaciones somáticas en secuencias de repetición del gen que codifica la cadena β_2m (Bicknell et al. 1996; Cabrera et al., 2003; Kloor et al., 2005).

Tras el estudio inmunohistoquímico (IHQ) de 293 tumores, nosotros identificamos 15 carcinomas gastrointestinales (1 carcinoma de intestino delgado y 14 CRCs) con pérdida total de antígenos HLA de clase I. De los 15 casos HLA-I detectados, 5 tumores mostraban una baja regulación combinada que afectaba tanto al gen que codifica la cadena β_2m como a los genes de cadena pesada HLA; mientras que en los otros 10 casos se observaba una baja regulación selectiva del gen *B2m* (Tabla 9). Estos resultados se confirmaron posteriormente mediante PCR cuantitativa (datos no mostrados).

En función de estos resultados, analizamos si los mecanismos moleculares involucrados en la falta total de antígenos HLA de clase I en los 15 tumores seleccionados, se asociaba a la vía molecular de tumorogénesis. En 7/15 CRCs HLA-I-negativos se pudo demostrar un alto grado de inestabilidad de microsatélites (MSI-H) (Tabla 9). Los 8 tumores HLA-I-negativos restantes fueron catalogados como estables (MSS) (Grupo MSS/HLA-I-negativo) (Tabla 9).

Un paso más en la caracterización molecular de los tumores seleccionados, fue la determinación de mutaciones en los oncogenes *BRAF* y *KRAS*. Encontramos que un único CRC con MSI-H (12,5%) (CRC-3, Tabla 9) presentaba la mutación “hotspot” V600F en *BRAF*, lo que se asocia a un origen epigenético del tumor (hipermetilación del promotor *hMLH1*) (Koinuma et al., 2004; Wang L et al., 2003). Las alteraciones en *KRAS* se hallaron en 5 tumores de estudio (20,8%), siendo la mutación más frecuente la que afecta al codón 12 del gen. Dos de los CRCs con mutaciones en *KRAS* pertenecían al grupo MSI-H (CRC-6 y CRC-7, Tabla 9). Sin embargo, no puede proponerse que estos tumores tengan un origen genético (mutaciones germinales en genes del sistema MMR) pues, aunque a frecuencias muy bajas, también se han descrito defectos en *KRAS* en CRCs con MSI-H de origen esporádico (Benhattar et al., 1993; Kern et al., 1989; Oliveira et al., 2004; Samowitz et al., 2001^a). Las frecuencias de mutación que hemos registrado en *BRAF* y *KRAS* son inferiores a las descritas en la

bibliografía (*BRAF*: ~71% en CRCs esporádicos; *KRAS*: ~ 30-40% en CRCs) (Oliveira et al., 2004; Wang L et al., 2003).

Nuestros resultados no logran confirmar ninguna asociación entre las mutaciones detectadas en los genes *BRAF* y *KRAS*, y las vías de carcinogénesis MSI-H y MSS (Tabla 9). Tampoco entre las alteraciones encontradas para estos dos genes y las mutaciones detectadas en el gen *B2m*, que se recogen a continuación (Tabla 8).

Por el contrario, observamos que 4/5 tumores con mutaciones en el gen *B2m* presentaban el fenotipo MSI-H, mientras que el caso restante fue definido como MSS (Tabla 8). La mutación detectada en este tumor MSS (CRC-16) no era característica de la vía MSI-H, y resultaba más compatible con las alteraciones presentes en tumores con estabilidad de microsatélites (Tabla 8). No se hallaron alteraciones en la secuencia del gen *B2m* en tres CRCs con MSI-H. El resto de casos HLA Clase I-negativos en los que no se detectaron mutaciones en *B2m*, pertenecieron al grupo MSS (Tabla 9). Esto sugeriría que la pérdida de expresión de la cadena β_2m en estos tumores, podría ser consecuencia de otros mecanismos no mutacionales o de grandes deleciones no detectadas por secuenciación.

Consecuentemente, nuestros resultados demuestran una estrecha asociación entre la inactivación por mutación del gen *B2m* y la vía carcinogénica de colon asociada al fenotipo de inestabilidad de microsatélites. Además, el gen *B2m* parece ser una diana importante en la tumorigénesis MSI-H, dado que otras secuencias de microsatélites analizadas, que están localizadas en los genes *TAP1* y *TAP2*, y que, por tanto, serían susceptibles de mutagénesis dando lugar al mismo fenotipo HLA clase I-negativo, no aparecían alteradas. De esta manera, quedaban sin explicar el resto de casos HLA-I-negativo del grupo MSI-H estudiado (Tabla 9).

Tabla 8. Mutaciones en el gen *B2m* detectadas en los CRCs de estudio.

Tumor	Mutación	Localización	Codón de parada	MSI
CRC-2	del CA	Codón 25, Exón 2	56	+
	del A	Codón 67, Exón 2	102	
CRC-3	del C	Codón 91, Exón 2	102	+
	del CCGTG	Codones 101-102, Exón 2	114	
CRC-5	del CT	Codones 13-14, Exón 1	56	+
CRC-6	ins TT	Codones 14-15, Exón 1	44	+
CRC-16	del ACTACACT	Codones 86-88, Exón 2	86	-

“del”: deleción; “ins”: inserción; “+”: presencia de MSI; “-”: Ausencia de MSI

Por otra parte, el análisis de pérdida de heterocigosidad (“*Loss of Heterozygosity*”: LOH) asociada a las regiones cromosómicas 6p21 y 15q21 en los tumores HLA-I-negativos, reveló que los carcinomas MSS mostraban LOH en casi la totalidad de los marcadores polimórficos utilizados (datos

no mostrados). Por lo tanto, en estos tumores MSS, los mecanismos citogenéticos que están estrechamente asociados a la vía CIN (“*Chromosomal instability*”) de oncogénesis, también pueden contribuir a generar defectos en la expresión de HLA-ABC. Resultó imposible valorar la presencia de LOH en los cromosomas 6 y 15 de CRCs con MSI-H, ya que mostraban inestabilidad en todas las secuencias de microsatélites estudiadas. En tumores MSI-H-positivo son infrecuentes los reordenamientos y las pérdidas cromosómicas, sin embargo, se ha detectado LOH en los loci HLA-A, -B y -C en casos de cáncer gástrico con MSI-H (Hirata et al., 2007), lo que indica que sería útil estudios adicionales con técnicas alternativas que facilitasen el análisis de LOH en tumores con inestabilidad genómica.

En resumen, nuestros resultados confirman que la mutación del gen *B2m* es un mecanismo molecular fundamental en la pérdida total de antígenos HLA de clase I en CRCs que emplean la ruta de inestabilidad de microsatélites (MSI-H), mientras que son alteraciones raras en tumores MSS. Las mutaciones descritas en los tumores estudiados se concentran, fundamentalmente, en secuencias de repetición de los exones 1 y 2 del gen *B2m* (Tabla 8), lo que es característico de los tumores con inestabilidad de microsatélites. La acumulación de mutaciones en *B2m*, que en nuestro estudio se correlaciona con tumores que presentan un fenotipo inmuno-editado (HLA clase I totalmente negativo), proporciona evidencias de una fuerte inmuno-selección en CRCs con MSI-H. En este sentido, es interesante destacar que en dos casos MSI-H-positivos (CRC-2 y CRC-3), la pérdida total de expresión de HLA de clase I se debía a la inactivación bialélica del gen *B2m* (Tabla 8).

Tabla 9. Expresión HLA-ABC y caracterización molecular de los 24 tumores gastrointestinales seleccionados.

	Estudio de la expresión HLA-I mediante IHQ ^b				Estudio del fenotipo MSI ^c					Estudio de mutaciones ^d			
	Tumor	Complejo HLA-ABC- β_2m	Cadena β_2m	Cadena pesada libre HLA-BC	BAT25	BAT26	D2S123	BAT40	TGFBR2	BRAF	KRAS	B2m	TAP1/ TAP2
Tumores MSS/HLA-negativo	CRC-1*	-	-	+	MSI	MSI	MSI	MSI	MSI	-	-	-	-
	CRC-2*	-	-	+	MSI	MSI	MSI	MSI	MSS	-	-	+	-
	CRC-3*	-	-	+	MSI	MSI	MSI	MSI	MSI	V600F	-	+	-
	CRC-4	+	+	+	MSI	MSI	MSI	MSI	MSI	-	-	-	-
	CRC-5*	-	-	+	MSI	MSI	MSI	MSI	MSI	-	-	+	-
	CRC-6*	-	-	+	MSI	MSI	MSI	MSS	MSS	-	G12D	+	-
	CRC-7*	-	-	+	MSI	MSI	MSI	MSI	MSI	-	G12A	-	-
	CRC-8†	-	-	-	MSI	MSI	MSI	MSI	MSI	-	-	-	-
Tumores MSS/HLA-positivo (Controles)	CRC-9†	-	-	-	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	-	G12D	-	-
	CRC-10†	-	-	-	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	-	-	-	-
	CRC-11†	-	-	-	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	-	-	-	-
	CRC-12†	-	-	-	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	-	-	-	-
	CRC-13*	-	-	+	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	-	-	-	-
	CRC-14*	-	-	+	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	-	-	-	-
	CRC-15*	-	-	+	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	-	-	-	-
	CRC-16*	-	-	+	MSS	MSS	MSS	MSS	MSS	-	-	+	-
Tumores MSS/HLA-positivo (Controles)	CRC-17	+	+	+	MSS	MSS	MSS			-	G13D		
	CRC-18	+	+	+	MSS	MSS	MSS			-	-		
	CRC-19	+	+	+	MSS	MSS	MSS			-	-		
	CRC-20	+	+	+	MSS	MSS	MSS			-	-		
	CRC-21	+	+	+	MSS	MSS	MSS			-	-		
	CRC-22	+	+	+	MSS	MSS	MSS			-	-		
	CRC-23	+	+	+	MSS	MSS	MSS			-	G12S		
	CRC-24	+	+	+	MSS	MSS	MSS			-	-		

* Tumores con una baja regulación selectiva del gen *B2m*; † Tumores con una baja regulación combinada de los genes HLA y *B2m*.

^a “MSI-H”: Alto grado de inestabilidad de microsatélites

^b “IHQ”: Inmunohistoquímica; “+”: expresión positiva en el 100% de las células tumorales; “-”: ausencia de expresión en el 100% de las células tumorales.

^c “MSI”: Inestabilidad de microsatélites; “MSS”: Estabilidad de microsatélites

^d “-”: ausencia de mutación; “+”: presencia de mutación. “V600F”: mutación “*hot spot*” en *BRAF*. En el análisis de las mutaciones en *KRAS* hemos señalado el tipo de alteración encontrada. Los espacios en blanco indican que no se ha realizado la determinación para ese caso.

2. En el Microambiente de CRCs con MSI-H se Mantiene una Pronunciada Infiltración por CTLs, a pesar de la Pérdida de Inmunogenicidad.

Los CRCs con MSI-H conforman un subgrupo tumoral con características moleculares y clínico-patológicas específicas (Gryfe et al., 2000; Ionov et al., 1993; Jass et al., 1998; Kim H et al., 1994; Thibodeau et al., 1993). Está ampliamente descrito que presentan, entre otras propiedades, un alto contenido de linfocitos que infiltran el tumor (TILs), en comparación con los tumores MSS e incluso MSI-L (Buckowitz et al., 2005; Dolcetti et al., 1999; Drescher et al., 2009; Menon et al., 2004^a; Morris et al., 2008; Prall et al., 2004; Smyrk et al., 2001; Waldner et al., 2006). Estos TILs se identificaron como células T CD8⁺ citotóxicas (CTLs) activadas, ya que expresaban altos niveles de los marcadores CD3 y CD8, así como también de granzima B y perforina (Dolcetti et al., 1999; Prall et al., 2004; Drescher et al., 2009). En los últimos años, estudios genómicos que comparaban los perfiles de expresión génica de CRCs con MSI-H y MSS mediante el uso de “*microarrays*”, han encontrado numerosos genes relevantes en la discriminación entre ambos grupos de tumores (Bernal et al., 2012; Giacomini et al., 2005; Kim H et al., 2004; Lanza et al., 2007). Entre ellos, se han descrito secuencias génicas relacionados con la respuesta inmunológica, que mostraban una alta regulación en el microambiente de CRCs con MSI-H en comparación con tumores que presentaban MSS (Banerjee et al., 2004). Estos resultados moleculares reforzaban el planteamiento de que en los CRCs MSI-H-positivo existe una reacción inmunológica activada contra el tumor, que se atribuye a la intensa inmunogenicidad derivada del propio defecto genético que caracteriza a la inestabilidad de microsatélites (Phillips et al., 2004). Como consecuencia de un sistema MMR (“*Mismatch Repair*”) defectuoso, que conduce a la acumulación de deleciones/inserciones en secuencias de microsatélites contenidas en las regiones codificantes de muchos genes, los tumores con MSI-H demuestran una alta frecuencia de mutaciones de pauta de lectura. Estas alteraciones promueven la aparición de codones de terminación prematuros durante la traducción, generando numerosas proteínas truncadas que proporcionan una fuente de nuevos péptidos aberrantes (“*frameshift neopeptides*”: FSPs). Muchos de estos nuevos péptidos derivados del tumor son presentados, vía moléculas HLA de clase I, a los CTLs, que los reconocen a través de sus receptores de membrana (TCRs), desencadenándose un proceso de activación linfocitaria, que culmina con la liberación del contenido de sus gránulos citotóxicos, con el objetivo de causar la muerte de las células neoplásicas (Titu et al., 2002) (Figura 10). Diversos ensayos funcionales *in vitro* e *in vivo* han conseguido demostrar la inmunogenicidad de ciertos FSPs asociados a la MSI (Linnebacher et al, 2001; Ripberger et al, 2003; Saeterdal et al, 2001; Schwitalle et al., 2008).

Sin embargo, hay publicaciones en las que se argumenta que la infiltración linfocitaria es independiente de la MSI, y que, consecuentemente, deben existir otros factores que también pueden ser importantes en la respuesta anti-tumoral de las células T (Chiba et al., 2004; Ogino et al., 2009). Es

más, varios grupos de investigación proponen que el estadio tumoral es el principal factor que determina la infiltración linfocitaria, de manera que en etapas tempranas se observa una mayor densidad de células citotóxicas, que va decreciendo gradualmente durante la progresión tumoral (Koch et al., 2006; Mlecnik et al., 2011; Pagès et al., 2005; Ropponen et al., 1997). Esto indicaría que la reacción inmunológica frente al cáncer podría ser más prominente en los estadios tempranos de la enfermedad, y alternativamente, ir disminuyendo conforme se produce la invasión del tumor (Koch et al., 2006), debido probablemente a la progresión del inmuno-escape.

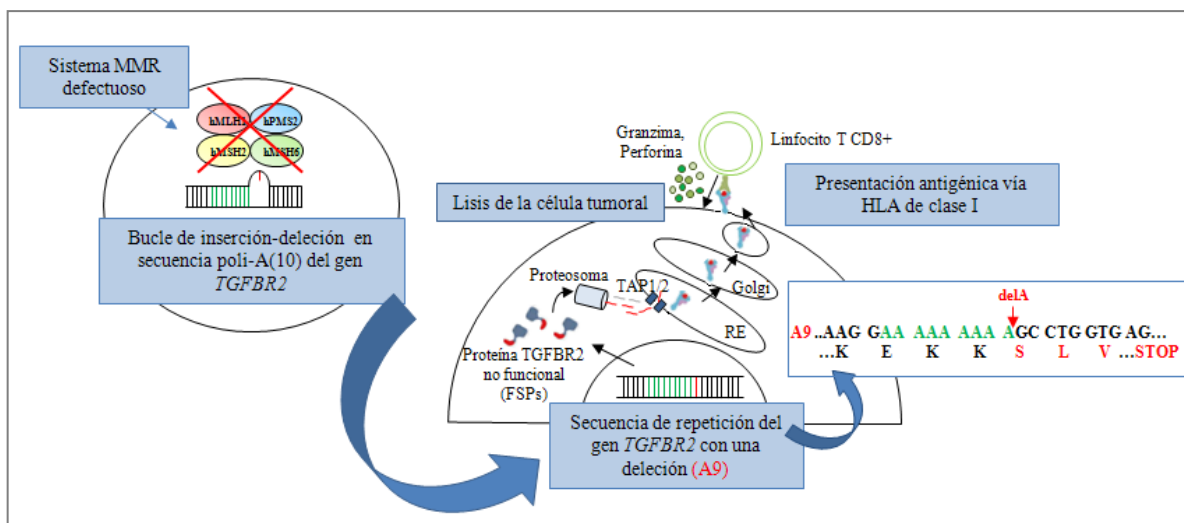


Figura 10. Representación esquemática de las consecuencias derivadas de la MSI-H utilizando como ejemplo el gen *TGFBR2*. La ADN polimerasa comete errores espontáneos durante la replicación que no pueden corregirse debido a defectos en el sistema MMR. En secuencias de repetición de nucleótidos, la polimerasa experimenta un deslizamiento (“*slippage*”) generando un bucle de inserción-delección que, si se produce en la hebra molde del ADN, conduce a la acumulación de delecciones en la secuencia del gen. En el ejemplo, la delección de un nucleótido en la secuencia codificante de poli-A(10) del gen *TGFBR2* (barra roja), ocasiona un desplazamiento de la pauta de lectura que conlleva la modificación de la secuencia de aminoácidos (color rojo) y la generación de un codón de “*stop*” prematuro, que impiden la formación de una proteína funcional. Consecuentemente, los FSPs derivados del tumor se procesan antígenoicamente y se presentan a través de moléculas HLA de clase I para su reconocimiento por los CTLs. *Imagen adaptada de Kloor, Int. J. Cancer. 2010; 12: 1001-10.*

En nuestro estudio hemos analizado la composición del infiltrado leucocitario y el tipo de respuesta inmunitaria presente en el microambiente tumoral de carcinomas gastrointestinales, pertenecientes a los tres grupos tumorales definidos en el primer apartado de la discusión. Así mismo, se analizó la correlación de los resultados de infiltración tumoral con la vía implicada en la carcinogénesis (MSI *versus* MSS o CIN), y con el fenotipo de expresión de HLA de clase I, cuya pérdida total, entre otras alteraciones, conlleva una reducción de la inmunogenicidad tumoral. El trabajo se abordó inicialmente desde un punto de vista celular, empleando la técnica de

inmunohistoquímica (IHQ) para caracterizar el tipo y cantidad de las células inmunológicas presentes en el infiltrado tumoral; y posteriormente, desde una perspectiva molecular, evaluando la expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria, y su relación con la infiltración leucocitaria descrita.

Tras el estudio inmunohistoquímico, encontramos que los CRCs con MSI-H mostraban un gran infiltrado de células CD45⁺, representado fuertemente por linfocitos T CD8⁺, que se distribuían siguiendo un patrón de infiltración intersticial, pero fundamentalmente, estromal e intra-tumoral (Figura 11). En cambio, la densidad de infiltración leucocitaria en los tumores MSS (Grupo HLA-I-negativo y Grupo HLA-I-positivo [Controles]) era menor que la descrita en los CRCs del grupo MSI-H. En los casos MSS/HLA-I-negativo se demostraba una muy baja presencia de células T CD8⁺, que rara vez tenían una localización intra-tumoral. En los casos MSS/HLA-I-positivo (Grupo Control), se detectó una infiltración por linfocitos T CD8⁺ intermedia entre los otros dos grupos de tumores, pero siempre con una baja representación intra-tumoral. Igualmente, observamos que los macrófagos constituían un subgrupo leucocitario con una presencia destacable en el infiltrado tumoral de los tres grupos de carcinomas estudiados. En todos los casos se detectó la presencia de macrófagos M1 (“clásicos”) y M2 (“inmunosupresores”), pero no se obtuvieron diferencias significativas en la infiltración por ambos tipos celulares entre los tres grupos de tumores analizados. Tampoco se observaron indicios de polarización, pues se describieron densidades de infiltración similares para ambos tipos de macrófagos dentro de cada agrupación tumoral. No obstante, es destacable que en los CRCs con MSI-H fuese más frecuente observar un patrón de infiltración intra-tumoral, sobre todo de macrófagos M1, pero también M2, en comparación con los tumores del grupo Control o con el grupo MSS/HLA-I-negativo. Por otro lado, no se observó una asociación entre la infiltración tumoral por células NK, linfocitos CD4⁺ o CD20⁺, y el fenotipo MSS/MSI o la expresión de HLA-I en la superficie de células tumorales. La presencia de linfocitos CD4⁺ y CD20⁺ fue baja en todos los tumores estudiados, e igualmente, la infiltración por células NK fue muy escasa, con una localización dispersa en los tres grupos de carcinomas. En conclusión, nuestros resultados evidenciaban que la MSI-H se correlacionaba positivamente con la infiltración tumoral por linfocitos T CD8⁺.

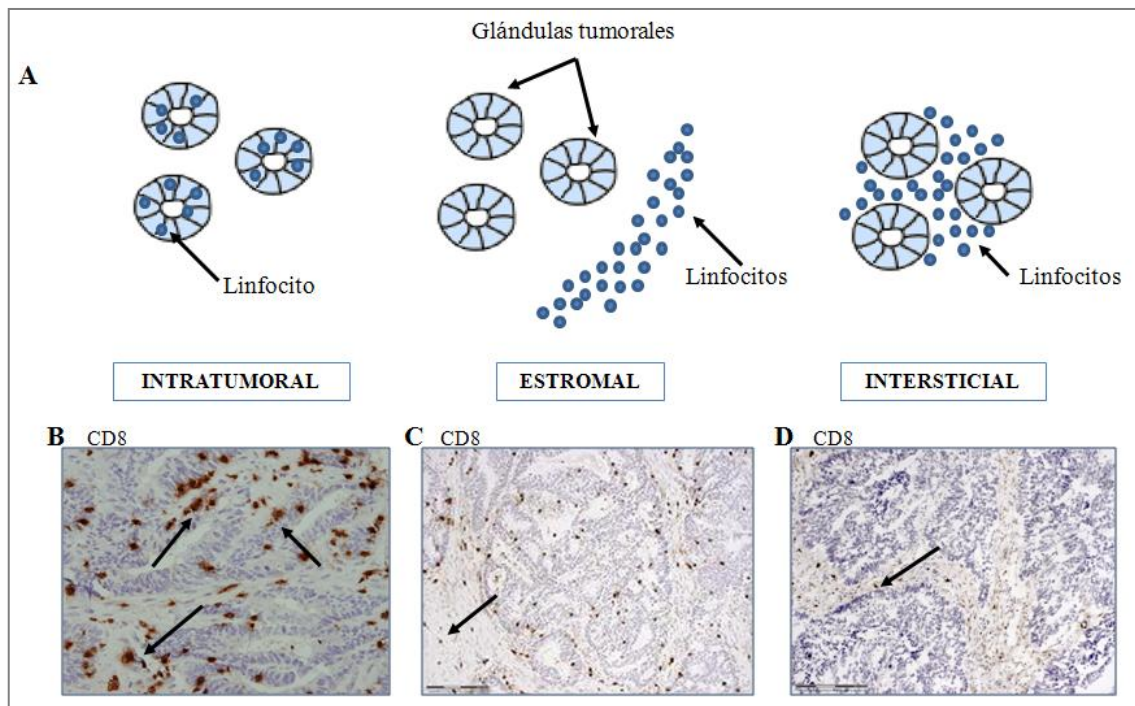


Figura 11. Patrones de infiltración inflamatoria en los carcinomas gastrointestinales estudiados. A) Esquema que representa los patrones de infiltración atendiendo a la localización anatómica: Intra-tumoral (las células inflamatorias están en íntimo contacto con las células neoplásicas); Estromal (el infiltrado inflamatorio se localiza alrededor de la masa tumoral); Intersticial (las células inflamatorias se presentan en el tabique fibroso que rodea las glándulas tumorales). En **B)** CRC MSI-H⁺ positivo, **C)** CRC Control (MSS/HLA-I-positivo) y **D)** CRC MSS/HLA-I-negativo, se señalizan los patrones de infiltración a los que hacemos referencia. **B)** muestra una presencia elevada de linfocitos T CD8⁺ intra-tumorales, mientras que **C)** tiene una infiltración por linfocitos T CD8⁺ intermedia, y **D)** muy baja.

Posteriormente, mediante la utilización de “*microarrays*”, evaluamos el perfil de expresión génica del microambiente de cada agrupación tumoral conformada según el estado MSI y el fenotipo HLA de clase I. Este estudio de expresión, focalizado en secuencias génicas relacionadas con la respuesta inmunológica anti-tumoral entre CRCs MSI y MSS, tenía como objetivo dar respuestas a las diferencias de infiltración observadas tras la IHQ. Inicialmente, la obtención del clúster jerárquico bidimensional a partir de las secuencias diferencialmente expresadas entre los tres grupos tumorales, corroboró que las muestras tendían a agruparse de acuerdo a las condiciones experimentales. Así, los CRCs con MSI-H, a excepción de un caso (CRC-4), se diferenciaban claramente de los tumores MSS (HLA-I-negativo y HLA-I-positivo), que compartían perfiles de expresión similares.

Centrándonos en la comparación de perfiles de expresión entre las agrupaciones, se determinó por un lado, que los dos grupos HLA-I-negativo (MSI-H y MSS) diferían en un pequeño número de genes con expresión diferencial, relacionados con la reactividad inmunológica local frente al tumor. Entre el grupo MSS/HLA-I-negativo y el grupo Control, destacaba sobre todo, el incremento de

expresión de genes relacionados con la vía del TGF β (*TGFB1* y *TGFB3*), y como era de esperar, la desregulación de genes relacionados con la maquinaria de procesamiento antigénico (APM) y las moléculas HLA de clase I (*TAP2*, *ERAP1*, *B2m*) en el conjunto tumoral MSS/HLA-I-negativos frente a los Controles. En concreto, la baja regulación de *TAP2* en los CRCs del grupo MSS/HLA-I-negativo, concuerda con datos publicados anteriormente, que definen la baja expresión de este gen como un factor importante que contribuye a los defectos de la AMP en CRCs con MSS (Cabrera et al., 2003).

Por otra parte, el análisis de los genes con expresión diferencial entre los CRCs con MSI-H y el grupo Control, reveló una “sobre-expresión” de procesos biológicos pertenecientes a categorías como activación leucocitaria, activación de células T, respuesta inflamatoria y producción de citoquinas en la agrupación MSI-H frente a los CRCs del grupo MSS/HLA-I-positivo (Control). Tras el examen de secuencias génicas relacionadas con funciones inmunológicas, se identificaron 52 genes de respuesta anti-tumoral cuya expresión estaba claramente diferenciada entre ambos conjuntos de tumores. En concreto, estos genes mostraban una alta regulación en los CRCs con MSI-H y se asociaban a la respuesta inflamatoria y a la actividad citotóxica celular. Entre otros, se registró una alta regulación de genes de quimioquinas atrayentes de linfocitos y macrófagos, proteínas relacionadas con la extravasación desde la sangre a los tejidos, moléculas de vías de señalización intra-celular de citoquinas, moléculas con funciones pro-inflamatorias, marcadores de macrófagos clásicos M1, que aparecían representados con mayor frecuencia que los marcadores de la subpoblación de macrófagos inmunosupresores M2, y moléculas relacionadas con la activación, proliferación y actividad citotóxica de linfocitos T. La aplicación del programa IPA (“*Ingenuity pathway analysis*”) determinó que muchos de estos genes “sobre-expresados” en los CRCs con MSI-H, se agrupaban en una misma vía de señalización vinculada a funciones pro-inflamatorias o de activación y actividad citotóxica, sugiriendo la importancia de estas vías en el grupo MSI-H. En definitiva, la “sobre-expresión” de un número considerable de genes involucrados en la respuesta inmunológica innata y antígeno-específica en los CRCs con MSI-H, determina un perfil de expresión génica que podría ser considerado como un biomarcador de los cánceres con alto grado de inestabilidad genómica. Además, indicaría la existencia de diferencias propias en la interacción tumor-hospedador con respecto a los tumores MSS, apoyando el concepto de que en el microambiente tumoral de CRCs con MSI-H existe una gran inmunogenicidad, que terminaría favoreciendo la selección de variantes tumorales con defectos en la expresión de HLA de clase I.

Los datos del “*microarray*” que demostraban una alta regulación de genes codificantes de marcadores linfocitarios (moléculas relacionados con la transducción de señales vía TCR, la activación y proliferación linfocitaria, y la actividad citotóxica) en el grupo MSI-H en comparación con los Controles, concordaban con los hallazgos inmunohistoquímicos que obtuvimos: los CRCs con MSI-H mostraban una gran infiltración por células T CD8⁺ que presentaban, además, un fenotipo activado. Estos resultados concuerdan con la información recogida en trabajos anteriores (Dolcetti et

al. 1999; Smyrk et al., 2001; Drescher et al., 2009), y apoyan el planteamiento de que el infiltrado linfocitario en los CRCs con MSI-H es el resultado de un proceso de activación inmunológica, en contraposición a otros autores que argumentan que es, simplemente, consecuencia de una proliferación de los linfocitos residentes en la lámina propia, sin relevancia inmunológica alguna (Michael-Robinson et al., 2001).

Dolcetti et al encontraron que los CTLs activados en CRCs MSI-H-positivo, a menudo mostraban polarización de sus gránulos y se localizaban muy próximos a cuerpos apoptóticos. Estos datos sugerían que la alta infiltración por linfocitos T CD8⁺ citotóxicos contribuía al elevado nivel de muerte por apoptosis de células cancerosas observado en CRCs MSI-H-positivo (Dolcetti et al., 1999). Alternativamente, la inestabilidad genómica también promueve la acumulación de alteraciones genéticas que, con el tiempo, pueden alcanzar una carga de mutación incompatible con la supervivencia celular, conduciendo a mayores tasas de apoptosis espontánea, independientemente del ataque por las células T (Michael-Robinson et al., 2001). En realidad, las dos explicaciones al aumento de la apoptosis en CRCs con MSI-H son complementarias, más que mutuamente excluyentes. Nuestro análisis de los datos obtenidos con el “*microarray*” reveló que la apoptosis fue otra de las categorías biológicas con una mayor expresión en los CRCs MSI-H frente a los Controles. Identificamos 72 genes con funciones pro- y anti-apoptóticas que mostraban una alta o baja regulación en los tumores con MSI-H. Esta observación refleja la compleja interacción entre agentes pro- y anti-apoptóticos en CRCs MSI-H-positivo que, sin duda, requiere investigaciones adicionales.

La alta prevalencia en el reclutamiento y retención de linfocitos T CD8⁺ en los CRCs MSI-H-positivo es inherente a la inestabilidad genómica de estos tumores, que conduce a la producción de una gran cantidad de antígenos tumorales específicos con capacidad para activar la respuesta inmunológica (Dalerba et al., 2003; Diederichsen et al., 2003; Drescher et al., 2009, Guidoboni et al., 2001; Ishikawa et al., 2003; Linnebuchar et al., 2001; Schwitalle et al., 2004). Sin embargo, a pesar de la enorme generación de péptidos aberrantes en tumores MSI-H, resulta llamativo que exista una gran infiltración por linfocitos T CD8⁺ que, además, expresan marcadores de activación, en tumores que han perdido totalmente la expresión de HLA de clase I. Nosotros detectamos que el grupo MSI-H, predominantemente HLA-I-negativo, mostraba una infiltración intra-tumoral y estromal por linfocitos T CD8⁺ mayor que la descrita en los tumores Control, con fenotipo MSS y con potencialidad para presentar péptidos antigénicos a través de moléculas HLA de clase I. Así mismo, encontramos una notable reducción en la densidad y localización de linfocitos T CD8⁺ en tumores MSS/HLA-I-negativo, en contraste con el conjunto de CRCs con MSI-H. Es más, no observamos diferencias significativas en la intensidad del infiltrado por linfocitos T CD8⁺ entre un tumor con MSI-H y expresión positiva de HLA clase I (CRC-4, en estadio I, pT2N0M0), y tumores MSI-H en estadios más avanzados con pérdida total de HLA de clase I. Estos datos sugieren que en los CRCs con MSI-H tiene lugar un reclutamiento específico de CTLs, que se mantiene a lo largo del desarrollo tumoral y

con independencia de la expresión de HLA de clase I. Es probable que este reclutamiento persistente tenga que ver con la liberación de quimioquinas concretas en un microambiente tumoral que es fuertemente pro-inflamatorio, y que presenta una alta infiltración por macrófagos, que son considerados esenciales en el reclutamiento linfocitario (Forssell et al., 2007). En nuestro estudio, el grupo tumoral MSI-H mostraban una alta expresión de genes que codifican citoquinas, quimioquinas atrayentes de macrófagos y linfocitos T, moléculas relacionadas con vías de señalización de citoquinas, y proteínas implicadas en la extravasación de leucocitos desde la circulación sanguínea a los tejidos. En este contexto, las citoquinas detectadas en CRCs con MSI-H se han relacionado con la quimioatracción de CTLs, y el incremento de las respuestas Th1 y la alta regulación de péptidos antigénicos potencialmente reconocibles por los linfocitos T CD8⁺ (Banerjea et al., 2004; Kloor et al., 2010).

Alternativamente, se ha planteado que el fenómeno de la presentación cruzada (“*cross-presentation*”) puede jugar un papel crucial en la respuesta inmunológica *in vivo* en CRCs MSI-H-positivo (Banerjea et al., 2005). A través de este mecanismo, ciertas células presentadoras de antígenos (APCs) (células dendríticas y, en menor medida, macrófagos) pueden internalizar antígenos derivados de células tumorales muertas, y presentarlos a través de moléculas HLA de clase I a los linfocitos T citotóxicos (Basta & Alatery, 2007; Shen & Rock, 2006). En este sentido, la presencia de linfocitos T CD8⁺ con fenotipo activado en CRCs MSI-H-positivo, que han perdido la expresión de HLA de clase I, podría ser compatible con un fenómeno de “*cross-priming*” promovido por APCs. Nosotros encontramos una infiltración intra-tumoral por macrófagos M1, que expresan altos niveles de moléculas HLA y colaboran en la promoción de respuestas Th1 (Sica et al., 2008^b), en el 50% de los tumores con MSI-H. Así mismo, mediante IHQ, observamos una expresión destacada del antígeno CD68, que es un marcador de macrófagos con capacidad para fagocitar antígenos (Figura 12) (Banerjea et al., 2004). Igualmente, tras el análisis del “*microarray*” detectamos un incremento en la expresión de la molécula co-estimuladora CD86, necesaria para una correcta activación linfocitaria, en el microambiente de tumores MSI-H en comparación con el grupo Control. Sin embargo, se precisan estudios adicionales que analicen la participación de macrófagos en la presentación cruzada en estos tumores, al margen del papel preponderante que pueden desempeñar las células dendríticas en el proceso.

Independientemente, el “*cross-priming*” de CTLs continuaría siendo ineficaz en CRCs MSI-H-positivo que muestran un fenotipo inmuno-editado (ausencia de expresión HLA de clase I). En consecuencia, que la infiltración por linfocitos T CD8⁺ se mantenga, favorecida probablemente por la liberación de quimioquinas específicas en un microambiente pro-inflamatorio, incluso tras la pérdida de expresión de HLA clase I, podría indicar que estos CTLs son una condición necesaria pero insuficiente en la defensa del hospedador frente al cáncer.

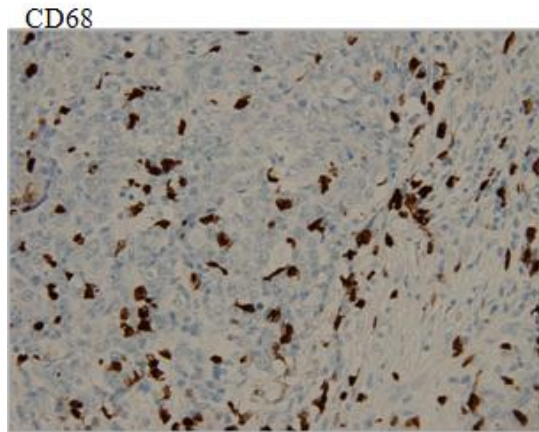


Figura 12. Infiltración intra-tumoral de macrófagos con expresión positiva del antígeno CD68 en un CRC con MSI-H (CRC-7)

La presentación cruzada de antígenos tumorales también puede implicar el uso de la maquinaria HLA de clase II por las células cancerosas. La expresión de antígenos HLA de clase II puede inducirse en tumores que provocan una fuerte respuesta inmunológica, como melanomas (Anichini et al., 2006; Méndez et al., 2009) y CRCs con MSI-H (Løvig et al., 2002). En nuestro estudio, 4/8 tumores con MSI-H mostraban una expresión HLA de clase II positiva, frente a un único caso del grupo MSS/HLA-I-negativo (datos no mostrados). Sin embargo, aunque existen resultados experimentales a favor (Bosch et al., 2010; Dissanayake et al., 2004; Qi et al., 2000), no se han encontrado evidencias que demuestren que los antígenos tumorales puedan ser presentados a través de HLA de clase II sobre la superficie de las células cancerosas a los linfocitos T “*helper*” CD4⁺ (Kloor et al., 2010). Consecuentemente, se requieren estudios funcionales que analicen la actividad de células T en respuesta a la presentación antigénica mediada por HLA de clase II sobre las células neoplásicas.

En resumen, nuestros resultados aportan pruebas que sustentan el concepto de una gran inmunogenicidad en CRCs con MSI-H. Sin embargo, nosotros señalamos que la pronunciada infiltración por linfocitos T citotóxicos encontrada en estos tumores, es independiente de la expresión tumoral HLA de clase I, del estadio tumoral y de ciertas características moleculares, como las mutaciones en *BRAF* y *KRAS*. Así mismo, la respuesta anti-tumoral en CRCs con MSI-H proporciona evidencias de una intensa inmuno-vigilancia que explicaría el mecanismo de escape tumoral observado con mayor frecuencia en CRCs con inestabilidad de microsatélites: la pérdida de expresión de HLA de clase I, a través de mutaciones que inactivan el gen *B2m*, para impedir la presentación de antígenos específicos derivados del tumor a los CTLs.

3. Estrategias de Escape Tumoral detectadas en CRCs con MSI-H.

El alto grado de inestabilidad de microsatélites (MSI-H) se ha asociado a un pronóstico favorable del paciente (Gryfe et al., 2000; Samowitz et al., 2001^b; Watson et al., 1998). Esta mejora en el resultado clínico se define como una característica inherente al fenotipo de inestabilidad, y se considera consecuencia de la gran reacción inflamatoria anti-tumoral, en forma de linfocitos que infiltran el tumor (TILs), en los CRCs con MSI-H. Sin embargo, varios grupos de investigación sugirieron que, con independencia del estado MSI, el factor que se correlaciona con un mejor pronóstico de la enfermedad es la infiltración linfocitaria tumoral (Guidoboni et al., 2001; Prall et al., 2004, Ogino et al., 2009). Consecuentemente, la hipótesis de que el desarrollo tumoral está influenciado por el sistema inmunitario del hospedador ha tomado fuerza en los últimos años (Galon et al., 2006; Galon et al., 2007; Mlecnik et al., 2011; Pagès et al., 2005; Pagès et al., 2009). Estudios genómicos detallados han demostrado que la clasificación inmunológica basada en la “*immune contexture*” (es decir, la densidad, tipo y localización del infiltrado inmunitario en el tumor) (Fridman et al., 2012; Galon et al., 2007), tiene un valor pronóstico que puede ser superior al de los métodos histopatológicos usados normalmente en el estadiaje tumoral (UICC-TNM) (Galon et al., 2006; Galon et al., 2007; Pagès et al., 2005). Concretamente, la presencia de marcadores de respuesta Th1 y de células T citotóxicas y células T memoria, se ha asociado fuertemente a un pronóstico favorable en pacientes con CRCs (Galon et al., 2006). Estos resultados sugieren que una vez que el tumor llega a ser clínicamente detectable, la respuesta inmunológica adaptativa puede jugar un papel previniendo la recurrencia del tumor y la metástasis (Galon et al., 2006; Galon et al., 2007). Aunque inicialmente se describiera en el CRC, el impacto por la infiltración de células T citotóxicas y memoria se ha demostrado en otro tipo de tumores humanos (Ascierto et al., 2011; Pagès et al., 2010), y en todos los casos se ha asociado con un aumento de la supervivencia (Fridman et al., 2012). Considerando la importancia de estos hallazgos, se ha resaltado la necesidad de incluir una puntuación inmunológica (“*immune score*”) como componente de la clasificación tumoral (Galon et al., 2012; Mlecnik et al., 2011; Pagès et al., 2009), y como un factor con valor pronóstico a tener en cuenta en la toma de decisiones relacionadas con el tratamiento del paciente, como puede ser la aplicación de nuevas estrategias terapéuticas, incluyendo la inmunoterapia (Pagès et al., 2010).

Contradictoriamente, también se han obtenido resultados que afirman que el infiltrado inflamatorio tumoral no tiene un papel protector (Nakano et al., 2001; Nielsen et al., 1999; Roncucci et al., 1996; Sheu et al., 1999; Stewart & Tsai et al., 1993). Es más, hay trabajos que han descrito que, a pesar de la marcada infiltración linfocitaria presente en CRCs con MSI-H, no se encuentra una asociación con la mejora en el resultado clínico de los pacientes con CRC MSI-H-positivo (Baker et al., 2007; Curran et al., 2000; Deschoolmeester et al., 2010; Emterling et al., 2004; Feeley et al., 1999; Messerini et al., 1999; Prall et al., 2004; Salahshor et al., 1999; Storojeva et al., 2005; Wang C et al.,

2003). Se sabe que los tumores desarrollan mecanismos responsables de la evasión del sistema inmunológico que favorecen su crecimiento y progresión (Drake et al., 2006; Garrido et al., 2006; Michel et al., 2008; Stewart & Abrams, 2008). Estas estrategias de escape tumoral consiguen alterar la respuesta inmunitaria del hospedador frente al cáncer, regulando negativamente o suprimiendo la acción anti-tumoral ejercida tanto por la inmunidad innata como por la adquirida (Whiteside, 2006), en perjuicio de cualquier efecto beneficioso sobre la supervivencia.

Nosotros no observamos diferencias significativas entre los grupos tumorales de estudio tras realizar un análisis de la supervivencia, probablemente debido al insuficiente número de muestras (datos no mostrados). Los resultados que obtuvimos tras combinar el estudio inmunohistoquímico y el análisis del “*microarray*”, sugirieron que en el microambiente de CRCs con MSI-H existe un predominio de la respuesta inflamatoria y la función citotóxica. Estos datos concuerdan con que en CRCs MSI-H-positivos se haya descrito una actividad Th1 (Banerjee et al., 2004; Kloor et al., 2010) que promueve el rechazo tumoral y que se ha correlacionado con un mejor pronóstico (Galon et al., 2006), en contraste con la respuesta Th2 que induce la inmuno-tolerancia.

Uno de los factores que tuvimos en cuenta en el análisis del tipo de respuesta inmunitaria presente en los CRCs con MSI-H, fue la presencia de macrófagos asociados al tumor (TAMs). Existen numerosas evidencias que los asocian al proceso de tumorigénesis (Lewis & Pollard, 2006) y a mal pronóstico en varios tipos de cáncer (Hanada et al., 2000; Lee et al., 1997; Leek et al., 1996; Lissbrant et al., 2000; Murdoch et al., 2008; Nishie et al., 1999; Salvesen & Akslen, 1999). La mayoría de los TAMs tienen un fenotipo M2 que está relacionado con funciones inmunosupresoras y de promoción tumoral (regulación de la angiogénesis, remodelamiento tisular y producción de citoquinas Th2) (Sica et al., 2008^a). Nosotros identificamos la presencia de macrófagos M2 en todos los CRCs del grupo MSI-H. Sin embargo, no se observó que fuese el resultado de un proceso de polarización, ya que se obtuvo una densidad de infiltración similar a la que presentaban los macrófagos M1 o “clásicos”, implicados en la respuesta Th1 anti-tumoral. En cambio, el análisis de expresión génica sí detectó una mayor representación en la “sobre-expresión” de marcadores de macrófagos M1, frente a los marcadores de la subpoblación M2, en los tumores MSI-H.

En contraste con lo descrito en otros tumores, la infiltración por macrófagos en el cáncer de colon se ha correlacionado con un buen pronóstico (Forssell et al., 2007; Klintrup et al., 2005). La alta infiltración por linfocitos T CD8⁺ y fundamentalmente, la interacción entre macrófagos y linfocitos, desempeña un papel fundamental en la respuesta anti-tumoral ejercida por el macrófago (Forssell et al., 2007). En función de estos datos, los resultados de infiltración que obtuvimos en los CRCs con MSI-H (gran presencia de linfocitos T CD8⁺ y moderada infiltración por macrófagos, con distribución intra-tumoral hasta en el 50% de los CRCs MSI-H-positivo), apoyarían el papel preponderante de la actividad frente al cáncer en el microambiente de tumores con MSI-H.

No obstante, analizamos posibles estrategias que pudiesen interferir con la eficacia de la respuesta inmunológica del hospedador en CRCs con MSI-H, en favor del sobre-crecimiento tumoral. Estudiamos la expresión de galectina-3 y del ligando PD-L1 por las células tumorales en los tres grupos de carcinomas. Detectamos la presencia de ambas moléculas, con función inmuno-reguladora de la actividad de las células T, en todos los grupos tumorales. Sin embargo, no encontramos una vinculación entre la expresión de galectina-3 y la presencia de macrófagos en el microambiente de tumores con MSI-H. Contrariamente, observamos una tendencia al incremento de expresión de PD-L1 en tumores con alta expresión de CD8 (MSI-H), aunque se precisan más estudios que puedan corroborar esta observación. Se han encontrado hallazgos similares en relación a la expresión de PD-L1 en carcinomas hepatocelulares (Shi et al., 2011). Se desconocen cuáles son los mecanismos que regulan la expresión de PD-L1 en células tumorales, pero se ha descrito que varias citoquinas, incluyendo IFN- γ , pueden actuar como inductores de la expresión de esta molécula sobre la superficie de células neoplásicas (Muhlbauer et al., 2006). Además, varias proteínas de las vías del IFN- γ presentan una alta regulación en CRCs con una intensa infiltración por células T CD8⁺ (Galon et al., 2006; Pagès et al., 2005).

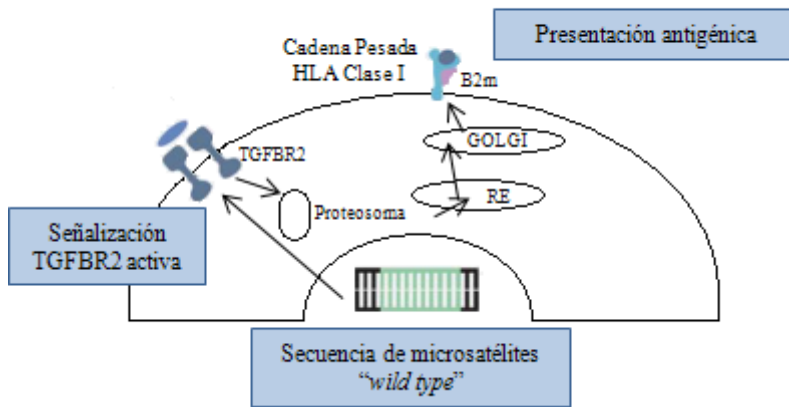
Por otra parte, el descenso en la expresión de la cadena ζ del complejo CD3 en linfocitos T infiltrantes, es otra estrategia de inmuno-evasión descrita frecuentemente en células neoplásicas (Koneru et al., 2005; Yu et al., 2011). Aunque se desconoce el mecanismo exacto que conduce a defecto inmunológico en TILs, se cree que la depleción de arginina motivada por la actividad de células MDSCs (“*Myeloid-derived suppressor cells*”), puede contribuir a esta alteración que perjudica fuertemente la activación de los linfocitos T (Kusmartsev & Gabrilovich, 2006; Nagaraj & Gabrilovich, 2007; Ochoa et al., 2007; Rodríguez et al., 2005; Sinha et al., 2007^b). Los datos de nuestro microarray demostraban una alta expresión del gen que codifica la cadena ζ (CD247) en los CRCs con MSI-H frente a los tumores control. Estos resultados fueron, además, confirmados por IHQ. En nuestro estudio, por tanto, la baja expresión de la cadena ζ en TILs no parece ser un mecanismo de escape tumoral importante en CRCs con MSI-H, a pesar de la abundante presencia de linfocitos T CD8⁺. Sin embargo, no pueden extraerse conclusiones acerca de la infiltración por MDSCs en los tumores MSI-H sin realizar estudios adicionales.

Por el contrario, sí hemos detectado dos posibles mecanismos implicados en el escape tumoral de los CRCs MSI-H-positivo de nuestro estudio. Uno de ellos está relacionado con la expresión, en el microambiente tumoral, de factores asociados a macrófagos M2 que inhiben la respuesta de células T y promueven la progresión tumoral. Por ejemplo, reconocimos una alta regulación de los genes *ARG2* (“*fold change*” = 3.14) y *VSIG* (*V-set and immunoglobulin domain containing 4*, “*fold change*” = 4.08), en los tumores MSI-H frente al grupo Control (Bronte et al., 2005; Mumenthaler et al., 2008; Norian et al., 2009; Vogt et al., 2006). La segunda estrategia de inmuno-evasión observada en el grupo MSI-H, es la pérdida total de moléculas HLA de clase I sobre la superficie de la célula tumoral. Esta

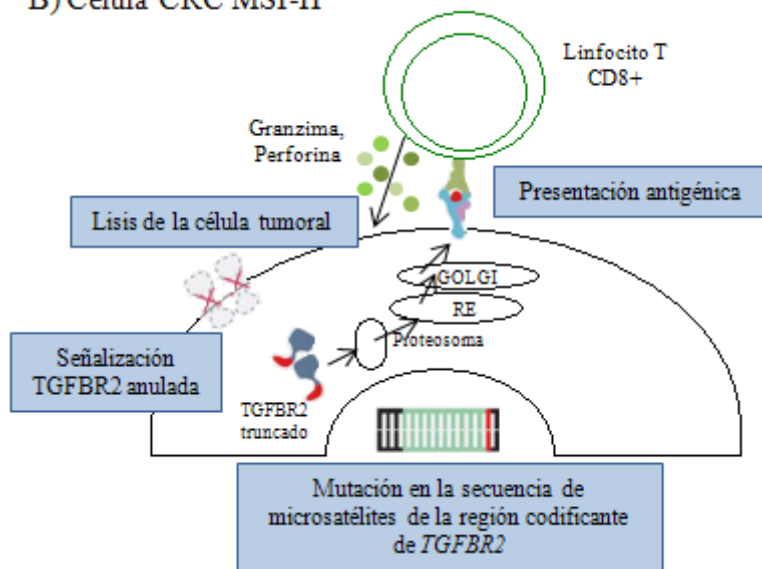
ausencia o baja regulación de HLA de clase I hace a las células tumorales susceptibles a la actividad de células NK. De hecho, el análisis de nuestro microarray evidenció la “sobre-expresión” de genes que codifican ligandos de NKG2D (*MICA*, *MICB*, *ULBP2*), que junto a la falta de HLA de clase I, potenciaría la actividad citotóxica de células NK y linfocitos T NKG2D⁺. Llamativamente, los estudios de infiltración revelaron la escasa presencia de células NK en todos los tumores analizados, sin encontrar diferencias de acuerdo a la expresión HLA de clase I en la superficie tumoral, lo que concuerda con publicaciones previas (Cózar et al., 2005; Sandel et al., 2005; Whiteside et al., 1998). Esta reducida presencia, o incluso ausencia, de linfocitos NK en la mayoría de los infiltrados tumorales, se ha propuesto como un posible mecanismo de escape tumoral, que previene el reclutamiento de estas células NK hasta el sitio del tumor (Whiteside, 2008).

De acuerdo con trabajos previos, nosotros describimos que el principal mecanismo molecular que interfiere en la presentación antigénica mediada por HLA de clase I en CRCs con MSI-H, es la acumulación de mutaciones somáticas en el gen *B2m* (Bicknell et al., 1996; Cabrera et al., 2001; Kloor et al., 2005). En estos tumores, las mutaciones (deleciones e inserciones) se acumulan en las secuencias de microsatélites de los exones 1 y 2 del gen como consecuencia de un sistema MMR defectuoso, pero, a su vez constituyen un reflejo de la gran presión inmunológica ejercida por la alta infiltración de CTLs en el microambiente de tumores con inestabilidad genómica. La deficiencia del sistema MMR provoca una intensa respuesta inmunitaria como consecuencia de la inducción de mutaciones de pauta de lectura, que dan lugar a la generación de una gran cantidad de péptidos antigénicos, y sin embargo, al mismo tiempo, contribuye al inmuno-escape mediante la inactivación del gen *B2m* (Figura 13). Nosotros creemos que la inactivación molecular del gen *B2m* puede jugar un papel crucial en el desarrollo de tumores con MSI-H, sin embargo esta observación merece un análisis más detallado que mostraremos a continuación.

A) Célula Normal



B) Célula CRC MSI-H



C) Célula CRC MSI-H

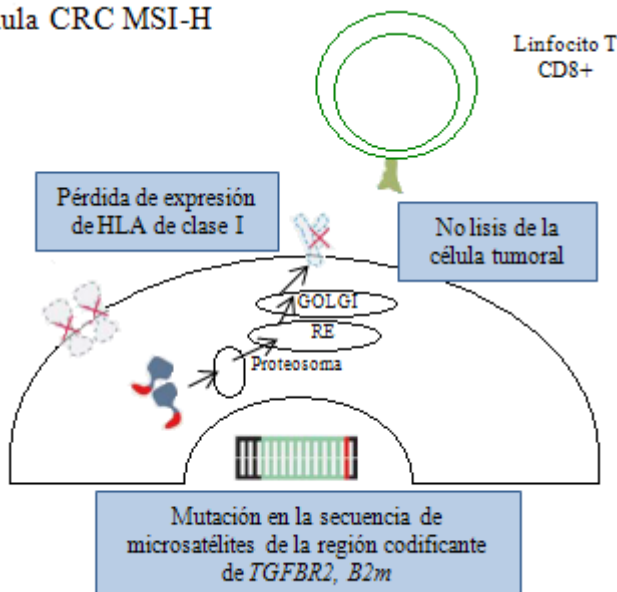


Figura 13. Inmunogenicidad e inmuno escape causado por mutaciones en microsatélites contenidas en regiones génicas codificantes. A) Esquema de una célula normal, con un sistema MMR competente y una maquinaria de presentación antigénica funcional. El sistema inmunitario es tolerante frente a los péptidos normales presentados por las moléculas HLA de clase I. B) Esquema de una célula de CRC con fenotipo MSI-H y con mutaciones en secuencias repetitivas del gen *TGFBR2*, pero con un proceso de presentación antigénica intacto. Los nuevos péptidos generados como consecuencia de mutaciones que alteran la pauta de lectura, se degradan en el proteosoma y son presentados a los linfocitos T CD8⁺ a través de moléculas HLA de clase I. Los linfocitos CD8⁺ reconocen los péptidos antigénicos derivados de los neoantígenos, y pueden inducir la muerte celular liberando el contenido de sus gránulos. C) Esquema de una célula de CRC con fenotipo MSI-H, *TGFBR2* mutado y una maquinaria de presentación antigénica alterada. Como consecuencia de la presión ejercida por el sistema inmunitario, mediante el reconocimiento de los neopéptidos antigénicos presentados por moléculas HLA de clase I, se seleccionan variantes tumorales durante el desarrollo del CRC con defectos en la presentación antigénica mediada por HLA. Las mutaciones en las secuencias de repetición del gen *B2m* resultan en la pérdida total de moléculas HLA de clase I. Como resultado, se altera el reconocimiento y la muerte de las células tumorales por el sistema inmunitario adaptativo.

Imagen adaptada de Kloor, *Int. J. Cancer*, 2010; 12: 1001-10.

4. Papel del gen *B2m* en la carcinogénesis MSI-H.

4.1. Mecanismos de mutación en el gen *B2m* de tumores humanos.

La alta frecuencia de deleción/inserción (del/ins) en secuencias de repetición de mono- o di-nucleótidos codificantes del gen *B2m*, está fuertemente asociada a CRCs con MSI-H. En el contexto de un sistema MMR deficiente, las mutaciones que afectan al gen *B2m* son fundamentalmente deleciones, cuya causa molecular es un deslizamiento de la ADN polimerasa sobre la secuencia repetitiva en la hebra de ADN que actúa como molde durante la replicación (Marra & Boland, 1996). El gen *B2m* contiene cuatro secuencias de microsatélites distribuidas a lo largo de su región codificante: una repetición de di-nucleótidos CT ([CT]₄) que comprende los codones 13-15 en el exón 1, y tres repeticiones de mono-nucleótidos (A₅ [codones 67-68]; C₅ [codones 91-92]; y A₅ [codones 94-95]) en el exón 2. Todas estas secuencias repetitivas acumulan mutaciones de pauta de lectura, pero la región [CT]₄ muestra una tasa de mutación superior a la del resto de microsatélites del gen, razón por la cual ha venido denominándose como un “punto caliente” (“*hotspot*”) de mutación en CRCs con MSI-H (Bicknell et al., 1996). Sin embargo, la descripción de del/ins en la secuencia de repetición de CT del exón 1 en otro tipo de cánceres, como líneas celulares de melanoma (Hicklin et al., 1998; Pérez et al., 1999) cuyos tumores primarios son considerados MSS, o incluso CRCs con fenotipo MSS (Bicknell et al., 1996), sugiere que en realidad, es una región “*hotspot*” de mutación en tumores humanos, incluso en ausencia de MSI-H. Por otro lado, al contrario que en los CRCs con MSI-H, no se han detectado mutaciones de pauta de lectura en las secuencias de repetición contenidas en el exón 2 del gen *B2m* en líneas celulares de melanoma, ni en otros tipos de cánceres humanos, lo que indicaría que son el resultado del aumento de inestabilidad genómica en CRCs con un sistema MMR ineficaz.

En CRCs con MSI-H también se han observado mutaciones de sustitución de nucleótido (“*single nucleotide substitution*”) en regiones no repetitivas de *B2m*, aunque con una frecuencia menor que la recogida para las del/ins en secuencias de microsatélites del gen (Bernal et al., 2012 [revisión]; Bicknell et al., 1996; Kloor et al., 2007). En general, las sustituciones de base que afectan al gen *B2m* en tumores humanos conducen a mutaciones sin sentido (“*Nonsense*”) que generan un codón de parada prematuro; mutaciones de pérdida de sentido (“*Missense*”) con diferentes consecuencias funcionales; o mutaciones que modifican el proceso de “*splicing*” del pre-RNAm, resultando en deleciones o inserciones de fragmentos en el ARNm.

Los mecanismos enzimáticos implicados en la generación de mutaciones que implican la sustitución de nucleótidos en el ADN, no están del todo claros. Los datos obtenidos de la bibliografía en relación a estas mutaciones en la secuencia del gen *B2m* en tumores humanos, permite destacar que existe una preferencia por mutaciones que afectan a nucleótidos de Guanina (G) o de Citosina (C) y que resultan, principalmente en transversiones (cambio de una purina por una pirimidina o *viceversa*)

(Bernal et al., 2012 [revisión]). La presencia de transversiones en *B2m* que implican el cambio de C→G o G→C podrían suponer la participación de componentes del sistema MMR o del sistema de reparación de escisión de nucleótidos (“*Nucleotide Excision Repair*”: NER) (Pitsikas et al., 2009). Sin embargo, las modificaciones de C también podrían ser compatibles con la actividad de la enzima AID (*Activation-Induced cytidine Deaminase*). Bajo condiciones fisiológicas, la expresión de AID está restringida principalmente a las células B activadas de centros germinales, induciendo los procesos de hipermutación somática y de recombinación génica que conlleva el cambio de clase de inmunoglobulinas (Shivarov et al., 2009). No obstante, se ha encontrado una expresión aberrante de AID, asociada normalmente a condiciones de inflamación crónica, en diversos tumores humanos (Dedeoglu et al., 2004; Endo et al., 2008; Marusawa H & Chiba, 2010). De esta forma, la actividad de AID constituiría un posible mecanismo de generación de mutaciones que podría afectar a genes relacionados con el desarrollo tumoral (especialmente, el gen supresor de tumores *p53*) en células no-linfoideas (Kinoshita & Nonaka, 2006; Marusawa H & Chiba, 2010; Okazaki et al., 2007; Takaishi & Wang, 2007). La AID cataliza la desaminación de citosinas resultando en la formación de uracilos que serán procesados por sistemas de reparación del ADN (Di Noia & Neuberger, 2007). Las mutaciones sobre el par C:G ocurren cuando se localizan dentro de las secuencias consenso de reconocimiento WRC [(A/T)(A/G)C = AAC, AGC, TAC, TGC] o GYW [G(C/T)(A/T) = GCA, GCT, GTA, GTT] (Di Noia & Neuberger, 2007). Nosotros analizamos si las sustituciones de nucleótidos que afectaban al par C:G observadas en el gen *B2m* de varios tumores humanos, incluida una línea celular de cáncer de colon con MSI (Co₃₈), sucedían dentro de secuencias consenso para la actividad de AID. Sólo dos melanomas mostraban secuencias de reconocimiento con cambios en C (Tabla 10), sugiriendo que la expresión de AID no parece desempeñar un papel importante en la generación de mutaciones “sin sentido” o de “pérdida de sentido” en el gen *B2m*. Sin embargo, desconocemos la frecuencia real de sustituciones de nucleótidos en *B2m* que no alteran la expresión tumoral de HLA de clase I. Es más, un análisis inmunohistoquímico sobre cortes en parafina obtenidos de muestras de CRC, reveló una expresión heterogénea de la enzima AID por las células tumorales (Figura 14). Este hallazgo indica que la actividad de AID podría desempeñar un papel durante la carcinogénesis colorrectal que merece estudios más detallados.

Tabla 10. Sustituciones de nucleótidos que afectan al par C:G en el gen *B2m* de varios tumores humanos.

Tumor	Mutación	Localización	Sustitución de aminoácido	Secuencia consenso de AID
Co ₂₄	C→A	Codón 30, Ex2	Tyr10Stop	GTT TAC TCA C
Co ₃₆	C→T	Codón 6, Ex1	Ala6Val	GTG GCC TTA
Co ₃₇	C→A	Codón 30, Ex2	Tyr10Stop	GTT TAC TCA C
Co ₃₈	C→G	Codón 11, Ex1	Ala11Gly	CTC GCG CTA
Co ₄₃	C→A	Codón 108, Ex2	Ser108Stop	TTG TCA CAG
Me ₉	C→G	Codón 86, Ex2	Tyr86Stop	TTG TAC TAC
Me ₁₃	C→G	Codón 31, Ex2	Ser31Stop	TAC TCA CGT
Me ₁₄	C→G	Codón 31, Ex2	Ser31Stop	TAC TCA CGT
Me ₁₅	C→G	Codón 45, Ex2	Cys45Trp	AAT TGC TAT
Lu ₂	C→T	Codón 22, Ex1	Gln22Stop	ATC CAG CGT

En la última columna se indica la secuencia del gen *B2m* que contiene el cambio de un nucleótido de citosina (color rojo). Sólo dos tumores (Me₉ and Me₁₅) mostraban secuencias de nucleótidos que coincidían con secuencias consenso reconocidas por AID, que aparecen subrayadas (TAC; GCT) y/o sombreada (TGC). (Co: carcinoma colorrectal; Me:melanoma; Lu: carcinoma de pulmón). Co₃₈ corresponde a una línea tumoral de cáncer de colon con MSI.

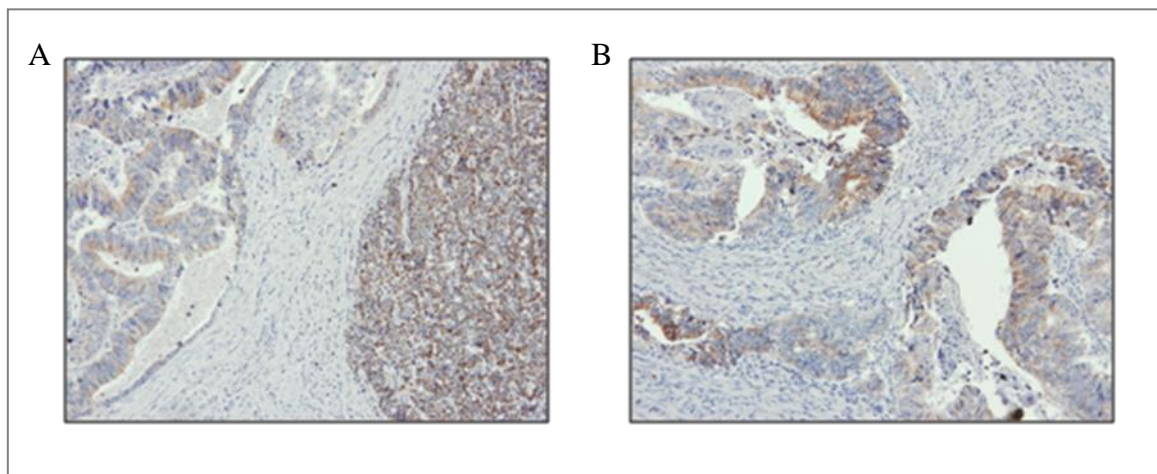


Figura 14. Expresión de la enzima AID (*Activation-Induced Cytidine Deaminase*) en CRCs.
A) La especificidad del anticuerpo monoclonal frente a AID se comprobó mediante la detección de niveles endógenos de la proteína AID en células B de centros germinales (flecha negra) presentes en los cortes de tejidos de CRC. **B)** Se detectó una expresión heterogénea de AID en células tumorales de las muestras de CRC.

En tumores humanos, la pérdida total de una cadena β_2m funcional se produce fundamentalmente por mutaciones bialélicas que inactivan al gen (en homo o heterocigosis) y que se observan, principalmente en carcinomas de colon con o sin fenotipo MSI (Bicknell et al., 1994; Bicknell et al., 1996; Cabrera et al., 2003); o por mutaciones presentes en una copia del gen *B2m* en

combinación con la pérdida de la otra copia del gen (LOH), que están presentes con mayor frecuencia en melanomas (Chang et al., 2005; Del Campo et al., 2010; Hicklin et al., 1998; Paschen et al., 2006). En CRCs con MSI-H es infrecuente observar pérdidas alélicas o reordenamientos cromosómicos, pero el análisis de LOH en tumores con inestabilidad genómica se ve dificultado porque la deficiencia en MMR induce también alteraciones en la longitud de marcadores polimórficos empleados convencionalmente en el estudio de LOH (Boland et al., 1998). Nosotros observamos que en CRCs con MSI-H, todos los microsatélites asociados a la región 15q21 empleados para el análisis de LOH en *B2m* mostraban MSI. La utilización de otro tipo de técnicas ayudaría a solventar esta cuestión, como el empleo de SNPs en heterocigosidad, localizados dentro o adyacentes al gen *B2m*, o el uso de FISH (Hibridación Fluorescente *in situ*) con sondas marcadas, específicas para *B2m* (Paschen et al., 2003).

Es posible encontrar, igualmente, mutaciones presentes en heterocigosis que reducen la expresión de la cadena β_2m en CRCs con MSI-H (Bicknell et al., 1994). Sin embargo, es frecuente detectar una mutación monolélica en *B2m* que contribuye a anular la expresión de la proteína en CRCs con MSI-H (Bernal et al., 2011; Bicknell et al., 1996; Cabrera et al., 2003; Kloor et al., 2007; kloor et al., 2007). Sin descartar la posibilidad de que la mutación esté presente en homo o hemicigosis, se han descrito otros mecanismos que pueden contribuir a la deficiencia de β_2m en estos casos, como la existencia de mutaciones o alteraciones epigenéticas en secuencias no codificantes del gen, o el efecto dominante negativo que puede provocar una proteína β_2m truncada (Hill et al., 2003). Sin embargo, es frecuente que el ADN aislado del tejido tumoral pueda estar contaminado con el de células no-cancerosas, lo que podría llevar a subestimar sustancialmente la frecuencia de mutaciones en homocigosis en el tejido tumoral (kloor et al., 2010).

La posibilidad de mutaciones homocigotas en cáncer es algo no infrecuente, y se da por un mecanismo conocido como disomía uniparental. Este proceso podría ser la causa que justifique la inactivación completa del gen *B2m*. Este mecanismo se ha descrito en los genes *NPM1* y *FLT3* de tumores hematológicos que, aparentemente, no presentan alteraciones citogenéticas (aneuploidía), por lo que ha sido denominado como “*Copy neutral LOH*” (O’keefe et al., 2010). En este sentido, estas características también se observan en los CRC con MSI-H. Un estudio del “número de copias” es, por tanto, necesario para resolver si la disomía uniparental afecta al gen *B2m* en tumores de colon MSI-H-positivo. Este mecanismo facilitaría el proceso de inmuno-selección de clonas HLA totalmente negativas (este aspecto se desarrolla en profundidad en el apartado siguiente).

4.2. *B2m* es un gen diana importante en la carcinogénesis MSI-H

Durante la última década se ha identificado un grupo de genes, con diversas funciones relacionadas con el cáncer (Figura 15), calificados como dianas de la tumorigénesis MSI-H (Duval & Hamelin, 2002, Koh et al., 2005; Konishi & Issa, 2007, Ropero et al., 2006). Sin embargo, se cuestiona si las mutaciones acumuladas en las secuencias repetitivas codificantes de muchos de estos

loci tienen un significado funcional (es decir, son relevantes y están bajo selección positiva durante la progresión tumoral), o si algunos de estos genes son simplemente marcadores de la MSI, que presentan mutaciones irrelevantes o neutras (Perucho, 2003).

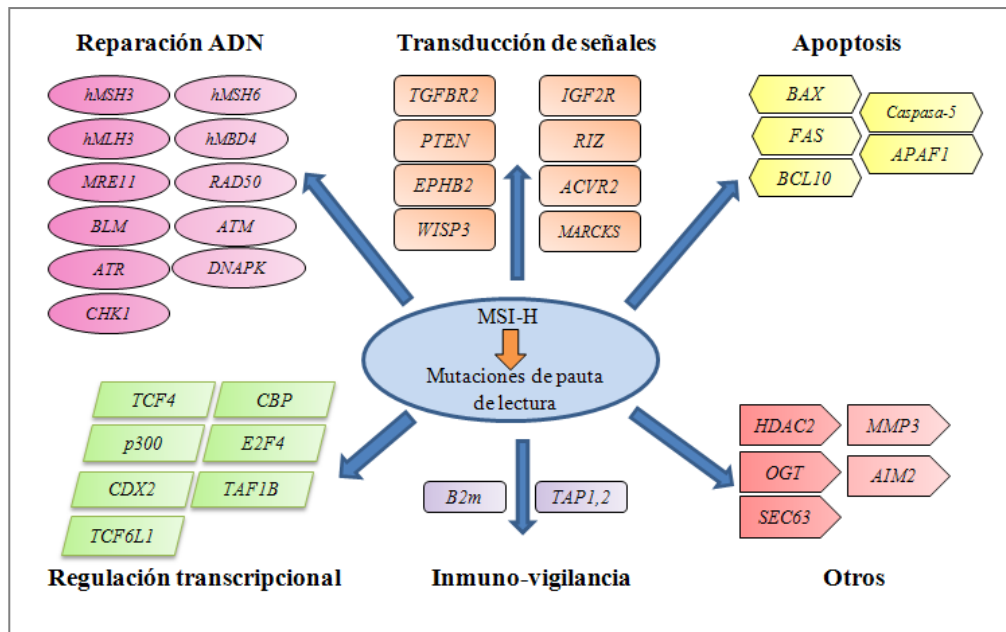


Figura 15. Genes Diana en Tumores con MSI-H.

Imagen adaptada de Imai & Yamamoto, Carcinogenesis, 2008; 29: 673-80

Determinar la funcionalidad de una mutación es clave para probar su relevancia en la progresión tumoral MSI-H, incluso con independencia de la incidencia de la alteración (Perucho, 2003). El gen *TGFBR2* se considera un auténtico gen diana de la tumorigénesis MSI-H (Woerner et al., 2003). Muestra una alta frecuencia de mutación en tumores con inestabilidad genómica (60-90%), y las alteraciones descritas en este gen están presentes desde un estadio tumoral temprano (Duval et al., 2001; Grady et al., 1998; Shin et al., 2000; Woerner et al., 2005), aumentando su incidencia con el grado de displasia y la transición a carcinoma (Woerner et al., 2005). De todos los genes diana de la tumorigénesis MSI-H (Figura 15), nosotros analizamos la existencia de mutaciones en secuencias de repetición contenidas en exones de los genes *B2m*, *TAP1* y *TAP2*, implicados en la inmuno-vigilancia, y además, del gen *TGFBR2*. Nuestro análisis con marcadores de microsatélites reveló que 6/8 tumores con MSI-H mostraban una mutación (deleción de mononucleótido) en la secuencia de repetición del gen *TGFBR2*. El estudio de expresión génica confirmó los resultados anteriores tras detectarse una baja regulación del gen *TGFBR2* en el grupo MSI-H, en comparación con los tumores Control (“*fold-change*”= -1.53). Igualmente, se encontraron mutaciones de pauta de lectura en el gen *B2m*, compatibles con defectos en el sistema MMR, en 4/7 CRCs con MSI-H. Estos resultados contrastaban

con la ausencia de mutaciones en las secuencias de microsatélites de los genes *TAP1* y *TAP2* en todos los CRCs MSI-H-positivo.

Estos datos, junto a varias evidencias que demuestran la funcionalidad de las mutaciones que afectan al gen *B2m*, confirman que es un gen diana fundamental de la carcinogénesis MSI-H.

Nosotros hemos encontrado una alta frecuencia de mutación del gen *B2m* en los CRCs con MSI-H (~ 57%), acorde a los valores mencionados en la literatura (30-60%) (Cabrera et al., 2003; Kloor et al., 2005; Yamamoto et al., 2001). Sin embargo, son alteraciones menos frecuentes en los carcinomas gastrointestinales con MSS. La frecuencia de mutación descrita, que afecta a secuencias de repetición contenidas en la región codificante del gen *B2m*, es muy superior a la que se esperaría se obtuviese por azar, que es, concretamente, menor a 1% en microsatélites con una longitud de 5 nucleótidos en CRCs con MSI-H (Woerner et al., 2010). Además, no se han observado mutaciones en repeticiones de nucleótidos que muestran una extensión significativamente mayor que las secuencias de microsatélites del gen *B2m*, presentes en regiones codificantes o no codificantes de otros genes en tumores con un sistema MMR alterado (Yamamoto et al., 1997). Igualmente, dos CRCs con MSI-H mostraban mutaciones heterocigotas en el gen *B2m*, responsables de la pérdida de expresión de la proteína. La inactivación bialélica observada en el gen *B2m* parece ser un evento común en CRCs con MSI-H (Cabrera et al., 2003; Kloor et al., 2005), sin embargo, no se ha documentado que suceda en todos los genes diana de la carcinogénesis MSI-H (Boland & Goel, 2010).

Otro dato a tener en cuenta es que las mutaciones que afectan al gen *B2m* se han detectado en estadios muy tempranos de la tumorigénesis MSI-H. En adenomas colorrectales la frecuencia de mutación es del 16%, pero sigue aumentando durante la progresión tumoral y alcanza el 40% en CRCs MSI-H-positivo con metástasis en ganglios linfáticos (Kloor et al., 2005). Estos datos apoyan la argumentación de que las mutaciones en *B2m* juegan un papel en la promoción del tumor, no sólo en estadios iniciales del desarrollo, sino también durante la invasión local y la expansión, coincidiendo con lo que se ha descrito para otros genes relevantes inactivados en cánceres MSI-H, como *TGFBR2* (Parsons et al., 1995; Woerner et al., 2005). Contrariamente, se desconoce el papel potencial que pueden desempeñar las mutaciones en otros genes diana en los diferentes pasos de la carcinogénesis MSI-H.

El empleo de la inmunohistoquímica con el uso de anticuerpos monoclonales específicos frente a la cadena β_2m citoplasmática, la cadena pesada HLA-BC libre, y al complejo HLA-ABC- β_2m en superficie celular, proporciona también, pruebas objetivas de la importancia de las mutaciones que inactivan al gen *B2m* en CRCs con MSI-H. En todos nuestros casos MSI-H con defectos en *B2m*, el examen inmunohistoquímico revelaba un patrón homogéneo de pérdida total de la proteína afectada en todo el tejido tumoral, que se correspondía con una falta completa de expresión de antígenos HLA de clase I sobre la superficie de células neoplásicas, aunque se detectara expresión citoplasmática de la cadena pesada HLA. Este patrón de extensión de las mutaciones en *B2m* a la totalidad de las células cancerosas sugiere que, en algún momento del desarrollo tumoral MSI-H, las mutaciones en las

secuencias de repetición contenidas en los exones del gen *B2m*, son seleccionadas positivamente porque confieren una ventaja en el crecimiento, que finalmente promueve la expansión clonal de las células tumorales portadoras de esas alteraciones en *B2m*. Los datos inmuno-histológicos descritos en los CRCs MSI-H-positivo con mutaciones en *B2m*, concuerdan con lo que se esperaría de mutaciones que inactivan genes diana claves en la carcinogénesis MSI-H. Sin embargo, no abundan los estudios inmunohistoquímicos que determinen la extensión de mutaciones específicas de la MSI-H en el tejido tumoral, sobre todo de aquellas mutaciones que tienen un valor neutro o irrelevante (p.ejemplo, las mutaciones en el gen *IGFIIR* [Yashiro et al., 2010]) en la carcinogénesis MSI-H.

Todas estas observaciones indican que el gen *B2m* es un gen diana con importancia en la carcinogénesis MSI-H. La gran relevancia funcional que tienen las mutaciones específicas de MSI-H en *B2m*, durante el desarrollo local del tumor y su expansión, es debido a que favorecen la resistencia de células tumorales al ataque de linfocitos T citotóxicos, impidiendo la presentación antigénica mediada por HLA de clase I. Constituyen, por tanto, un mecanismo molecular fundamental que promueve el escape tumoral de la acción del sistema inmunológico en tumores con MSI-H. La alta frecuencia de mutación en el gen *B2m* relacionada con la deficiencia del sistema MMR, y la coexistencia de alteraciones distintas en las dos copias del gen como un suceso común en CRCs con MSI-H, apuntan hacia una prevalencia de mecanismos moleculares responsables de defectos irreversibles en HLA de clase I, sobre alteraciones que conducen a lesiones HLA reversibles (Garrido et al., 2010). La selección de variantes tumorales con lesiones estructurales que impiden recuperar la expresión HLA de clase I, refleja el enorme control ejercido por la inmuno-vigilancia que somete a las células tumorales a una gran presión selectiva en el microambiente de tumores con MSI-H. La observación de una pronunciada infiltración linfocitaria en adenomas MSI-H (Meijer et al., 2009), junto a la detección de mutaciones inactivantes del gen *B2m* en estadios iniciales del desarrollo tumoral (Kloor et al., 2007), sugieren además, que la inmuno-selección juega un papel importante desde fases tempranas de la tumorigénesis MSI-H.

4.3. Implicación clínica de las mutaciones en el gen *B2m* de CRCs con MSI-H.

La inmuno-evasión mediada por alteraciones en la secuencia del gen *B2m* tiene una implicación pronóstica importante en CRCs con MSI-H y en general, en neoplasias humanas. Las mutaciones en *B2m* se han descrito como uno de los defectos estructurales (lesiones “*hard*”), junto a la LOH en los cromosomas 6 y 15, que hacen irrecuperable la expresión de HLA de clase I en tumores humanos (Garrido et al., 2010). En contraste, las lesiones “*soft*”, que implican el silenciamiento transcripcional de genes que codifican la cadena pesada y componentes de la maquinaria de procesamiento, pueden revertirse gracias al tratamiento con citoquinas (Garrido et al., 2010; Seliger et al., 2008) o con agentes que modifican la acetilación de histonas o la metilación (Khan et al., 2008; Rodríguez et al., 2007; Serrano et al., 2001). En pacientes con melanoma, la pérdida de HLA de clase I

durante el desarrollo del tumor debido a mecanismos irreversibles, como las mutaciones en *B2m*, se ha asociado a un fallo en la eficacia de estrategias de inmunoterapia basadas en la activación de células T (Benítez et al., 1998; Paschen et al., 2003). Es más, durante la inmunoterapia, se ejerce una presión selectiva adicional que favorece el crecimiento de células tumorales deficientes en HLA de clase I con alteraciones estructurales, resultando en el desarrollo de lesiones metastásicas que progresan durante la evolución tumoral (Aptsiauri et al., 2008; Restifo et al., 1996). Estos resultados destacan la importancia que tiene el desarrollo de la terapia génica para corregir los defectos en *B2m* y, consecuentemente, restaurar la expresión de HLA de clase I (Del Campo et al., 2009), con el objetivo de conseguir la máxima eficacia en la inmunoterapia basada en células T. Recientemente, varias investigaciones destacan la utilización de anticuerpos frente a las moléculas β_2m /HLA de clase I en la superficie tumoral, inductores de vías de señalización apoptóticas, como una nueva y prometedora terapia en el tratamiento del mieloma múltiple y de tumores sólidos con expresión positiva de HLA de clase I (Yang & Yi, 2010).

En CRCs con MSI-H, la presencia de mutaciones (del/ins) en secuencias repetitivas codificantes del gen *B2m*, constituye el principal mecanismo molecular implicado en la falta de expresión de moléculas HLA de clase I. Además, es interesante que se haya detectado un incremento de la frecuencia de mutación en *B2m* desde adenomas a CRCs, y dentro de CRCs con MSI-H, desde el estadio I (~ 27%) al estadio III (~43%), pero que no se hayan encontrado alteraciones en *B2m* en carcinomas colorrectales MSI-H-positivo en estadio IV (Kloor et al., 2005). Estos datos sugieren que, aunque tengan un papel en la promoción del crecimiento local del tumor y en el desarrollo de metástasis en ganglios linfáticos, las mutaciones en *B2m* pueden interferir en la formación de metástasis hepáticas en CRCs con MSI-H. Esto indicaría que los pacientes con CRCs MSI-H-positivo y falta de expresión de HLA de clase I debido a mutaciones en *B2m*, tienen un potencial metastásico reducido, y que contrariamente, la formación de metástasis distales requiere la expresión de antígenos HLA de clase I por las células tumorales (Kloor et al., 2007; Menon et al., 2004^a). En nuestro trabajo, sólo se detectaron dos casos que desarrollaron metástasis hepáticas: uno de ellos pertenecía al grupo MSI-H, con expresión negativa de HLA de clase I pero sin mutaciones en el gen *B2m* (CRC-8); mientras que el segundo caso era un control MSS/HLA-I-positivo. Probablemente, sería necesario un tamaño de muestras mayor para obtener resultados acordes a los datos descritos anteriormente.

La razón que explica que pacientes con CRCs MSI-H-positivo y mutaciones en *B2m* tengan un menor riesgo de desarrollar metástasis hepáticas, guarda relación con varias evidencias que demuestran un control de linfocitos NK en la diseminación sanguínea de células tumorales deficientes en HLA de clase I, hasta tejidos distantes para inducir metástasis (Ericsson et al., 2001; Garrido et al., 1989; Jager et al., 2002; Ma et al., 1994; Yang H et al., 2004). Mientras que, por otro lado, la actividad citotóxica de linfocitos T promovería la destrucción de células tumorales con expresión de HLA de clase I en el tumor primario o en las metástasis. En este contexto, se ha descrito que la ausencia total

de HLA de clase I por las células tumorales se correlaciona con un pronóstico favorable en pacientes con CRCs, a diferencia de aquéllos con tumores que muestran una expresión intermedia de HLA de clase I (Menon et al., 2004^b; Watson et al., 2006), que podrían escapar de la citotoxicidad mediada tanto por células NK como por linfocitos T (Garrido et al., 1997; Watson et al., 2006).

Alternativamente, las mutaciones en *B2m* también pueden influenciar el potencial metastásico de cánceres MSI-H, pero de una forma HLA-independiente. La cadena β_2m tiene actividad como factor de crecimiento y molécula de señalización en células neoplásicas (Huang et al., 2006; Huang WC et al., 2010), y se ha comprobado que su “sobre-expresión” potencia una transición epitelio-mesenquimal que promueve la metástasis ósea en varios tipos de tumores humanos (Josson et al., 2011).

Más allá de la importancia que tiene la recuperación de un gen *B2m* funcional para lograr re-expresar o potenciar la expresión de HLA de clase I con la intención de conseguir el rechazo tumoral, el hecho de que las mutaciones en el gen *B2m* se asocien con una ausencia de formación de metástasis y un menor riesgo de recaída de la enfermedad en cánceres con MSI-H (Tikidzhieva et al., 2012), reafirma que deban incluirse como un factor pronóstico a tener en cuenta en futuros ensayos clínicos.

En conclusión, los datos expuestos subrayan la relevancia de dos nuevos biomarcadores con valor pronóstico como futuras herramientas a emplear en la práctica clínica para la clasificación de CRCs con MSI-H: la puntuación inmunológica o “*immune score*”, es decir, la cuantificación de la densidad y localización de las células inmunológicas en el tumor (principalmente linfocitos T CD3⁺ y CD8⁺), y el análisis de mutaciones que inactivan el gen *B2m*. Aunque se consideran factores pronósticos y potencialmente predictivos particularmente relacionados con el cáncer colorrectal, podrían ser aplicables a la mayoría de tumores, de ahí que se estén poniendo muchos esfuerzos por estandarizar y validar los distintos ensayos destinados, sobre todo, a la determinación de la puntuación inmunológica, antes de potenciar su utilización en la rutina clínica.

No obstante, a pesar de que un valor alto de “*immuno-score*” (gran infiltración por linfocitos T CD8⁺ y células memoria) se correlaciona con un mejor pronóstico del paciente con CRC, la consideración de *B2m* como un “*driver gen*” (gen con mutaciones que proporcionan una ventaja selectiva en el crecimiento tumoral) (Vogelstein et al., 2013), pone de manifiesto la relevancia que tienen las mutaciones que inactivan a *B2m*, como mecanismo molecular que conduce a la inmuno-edición (pérdida de HLA de clase I) de variantes tumorales que logran evadir la respuesta de células T CD8⁺ citotóxicas, en beneficio del desarrollo del tumor primario. Sin embargo, al mismo tiempo, la inmunoselección de alteraciones en la secuencia de *B2m* en CRCs con MSI-H, altamente inmunogénicos, proporciona una desventaja en la formación de metástasis en órganos distales como el hígado, debido al control ejercido por células NK, que favorece una mejora en la supervivencia de los pacientes con este tipo de tumor.

Hasta el momento no se han realizado estudios que combinen la expresión de HLA de clase I, la presencia/ausencia de mutaciones en el gen *B2m* y la densidad de infiltración linfocitaria en CRCs MSI-H-positivo, y su correlación con el resultado clínico de pacientes con este tipo de tumores. Nuestro trabajo constituye una primera aproximación en el análisis de la relación entre los patrones de infiltración inflamatoria tumoral y la pérdida de antígenos HLA de clase I, debido a mutaciones que anulan la expresión de una cadena β_2m funcional, en carcinomas colorrectales con alto grado de inestabilidad de microsatélites (MSI-H). Creemos que profundizar en este tipo de estudios mejoraría la futura utilización de ambos biomarcadores (determinación del patrón de infiltración tumoral y análisis de mutaciones en *B2m*) en las funciones de definir mejor el pronóstico de pacientes con cáncer colorrectal, contribuir a identificar pacientes con alto riesgo de recurrencia, y facilitar la toma de decisiones en lo referente al cuidado del enfermo, ayudando a seleccionar a aquellos pacientes que se beneficiarían más de terapias coadyuvantes. También significativamente, el estudio de estos dos factores pronósticos proporcionaría dianas frente a las que dirigir estrategias de inmunoterapia, favoreciendo el desarrollo de este campo del tratamiento, que hasta ahora ha tenido escasos éxitos en el cáncer colorrectal.

VII. CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

1. El fenotipo de alto grado de inestabilidad de microsatélites (MSI-H) en el cáncer colorrectal, se correlaciona con una elevada infiltración tumoral por linfocitos T CD8⁺ y macrófagos, y con un patrón de expresión de genes relacionados con la respuesta inflamatoria y la actividad citotóxica. Estas características apoyan, que los tumores que se desarrollan a partir de la vía MSI de carcinogénesis, estarían sometidos a un fuerte control inmunológico.
2. En carcinomas colorrectales con alto grado de inestabilidad de microsatélites (MSI-H), las mutaciones que inactivan el gen *B2m*, conducen a la pérdida de expresión de antígenos HLA de clase I, y constituyen un mecanismo molecular fundamental implicado en el escape tumoral de la inmuno-vigilancia. En este sentido, el gen *B2m* sería un gen diana con un papel relevante en la selección de variantes débilmente inmunogénicas durante la progresión de los tumores MSI.
3. En carcinomas colorrectales con MSI-H, la gran densidad de infiltración por linfocitos T citotóxicos (CTLs) se mantiene, aún cuando los tumores sufren pérdida completa de antígenos de HLA de clase I. La alta infiltración se favorecería por la liberación de quimioquinas específicas en un microambiente tumoral fuertemente inflamatorio.
4. En tumores con alto grado de inestabilidad de microsatélites, las mutaciones detectadas en el gen *B2m* son, principalmente, pequeñas deleciones y en menor medida inserciones, que se concentran en secuencias de repetición de regiones codificantes del gen. Mientras, en tumores con fenotipo estable (MSS), la inactivación del gen se produce a través de mutaciones puntuales y grandes deleciones.
5. La expresión de moléculas reguladoras negativas de la actividad de linfocitos T (ej. PD-L1 y Galectina-3), puede contribuir, también, al escape inmunológico en algunos cánceres de colon. Sin embargo, en contraste con las alteraciones en la expresión de HLA de clase I, el patrón de expresión heterogéneo detectado, indicaría que estas moléculas aparecen neoexpresadas en las células tumorales como consecuencia de alteraciones en la regulación de expresión génica de la célula tumoral. Por tanto, su contribución al crecimiento y progresión de tumores está aún por definir.
6. La secuencia repetitiva (CT)₄ localizada en el exón 1 del gen *B2m* es un punto caliente de mutación observado en diversos tumores humanos, tengan o no el fenotipo de inestabilidad de microsatélites (MSI).

VIII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993; 260(5109): 812-6
- Aebi S, Kurdi-Haidar B, Gordon R, Cenni B, Zheng H, Fink D, Christen RD, Boland CR, Koi M, Fishel R, Howell SB. Loss of DNA mismatch repair inacquired resistance to cisplatin. *Cancer Res*. 1996; 56: 3087-90
- Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R & Yuasa Y. Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res*. 1997; 57: 3920-23.
- Almand B, Clark JI, Nikitina E, van Beynen J, English NR, Knight SC Carbone DP & Gabrilovich DI. Increased production of immature myeloid cells in cancer patients: a mechanism of immunosuppression in cancer. *J Immunol*. 2001. 166: 678-89.
- Andreola G, Rivoltini L, Castelli C, Huber V, Perego P, Deho P Squarcina P, Accornero P, Lozupone F, Lugini L, Stringaro A, Molinari A, Arancia G, Gentile M, Parmiani G & Fais S. Induction of lymphocyte apoptosis by tumor cell secretion of FasL-bearing microvesicles. *J Exp Med*. 2002; 195: 1303-16.
- Anichini A, Mortarini R, Nonaka D, Molla A, Vegetti C, Montaldi E, Wang X & Ferrone S. Association of antigen-processing machinery and HLA antigen phenotype of melanoma cells with survival in American Joint Committee on Cancer stage III and IV melanoma patients. *Cancer Res*. 2006; 66: 6405-11.
- Aptsiauri N, Carretero R, Garcia-Lora A, Real LM, Cabrera T & Garrido F. Regressing and progressing metastatic lesions: resistance to immunotherapy is predetermined by irreversible HLA class I antigen alterations. *Cancer Immunol Immunother*. 2008; 57(11):1727-33.
- Aquilina G, Hess P, Branch P, MacGeoch C, Casciano I, Karran P & Bignami M. A mismatch recognition defect in colon carcinoma confers DNA microsatellite instability and a mutator phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 8905-09.
- Ascierto ML, De Giorgi V, Liu Q, Bedognetti D, Spivey TL, Murtas D, Uccellini L, Ayotte BD, Stroncek DF, Chouchane L, et al. An immunologic portrait of cancer. *J Transl Med*. 2011; 9: 146.
- Bacchetta R, Gambineri E & Roncarolo MG. Role of regulatory T cells and FOXP3 in human diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 120(2): 227-35.
- Baker K, Zlobec I, Tornillo L, Terracciano L, Jass JR & Lugli A. Differential significance of tumour infiltrating lymphocytes in sporadic mismatch repair deficient versus proficient colorectal cancers: a potential role for dysregulation of the transforming growth factor-beta pathway. *Eur J Cancer*. 2007; 43: 624-31.
- Balkwill F & Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001; 357(9255): 539-45.
- Banerjea A, Ahmed S, Hands RE, Huang F, Han X, Shaw PM, Feakins R, Bustin SA & Dorudi S. Colorectal cancers with microsatellite instability display mRNA expression signatures characteristic of increased immunogenicity. *Mol Cancer*. 2004; 3: 21.
- Banerjea A, Bustin S & Dorudi S. The immunogenicity of colorectal cancers with high-degree microsatellite instability. *World J Surg Oncol*. 2005; 3: 26.

- Basta S & Alatery A. The cross-priming pathway: a portrait of an intricate immune system. *Scand J Immunol.* 2007; 65(4): 311-9
- Baxevanis CN, Dedoussis GV, Papadopoulos NG, Missitzis I, Stathopoulos GP & Papamichail M. Tumor specific cytolysis by tumor infiltrating lymphocytes in breast cancer. *Cancer.* 1994; 74: 1275-82.
- Benhattar J, Losi L, Chaubert P, Givel JC & Costa J. Prognostic significance of K-ras mutations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology.* 1993; 104(4): 1044-8.
- Benítez R, Godelaine D, Lopez-Nevot MA, Brasseur F, Jiménez 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; 52:520-9.
- Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF & Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet.* 2001; 27(1): 20-1.
- Bettstetter M, Dechant S, Ruemmele P, Grabowski M, Keller G, Holinski-Feder E, Hartmann A, Hofstaedter F & Dietmaier W. Distinction of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic microsatellite-unstable colorectal cancer through quantification of MLH1 methylation by real-time PCR. *Clin Cancer Res.* 2007; 13(11): 3221-8.
- Bicknell DC, Rowan A & Bodmer WF. b2 microglobulin gene mutations: a study of established colorectal cell lines and fresh tumors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 4751-55.
- Bicknell DC, Kaklamanis L, Hampson R, Bodmer WF & Karran P. Selection for b2-microglobulin mutation in mismatch repair defective colorectal carcinomas. *Curr Biol.* 1996; 6: 1695-7.
- Bingle L, Brown NJ & Lewis CE. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J Pathol.* 2002; 196(3): 254-65.
- Bjorkman PJ & Parham P. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu Rev Biochem.* 1990; 59: 253-88.
- Blank C & Mackensen A. Contribution of the PD-L1/PD-1 pathway to T-cell exhaustion: an update on implications for chronic infections and tumor evasion. *Cancer Immunol Immunother.* 2007; 56: 739-45.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas 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 in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998; 58(22):5248-57.
- Boland CR. Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes. *Fam cancer.* 2005; 4(3): 211-8.
- Boland CR. Clinical uses of microsatellite instability testing in colorectal cancer: an ongoing challenge. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 754-6.
- Boland CR, Koi M, Chang DK & Carethers JM. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer.* 2008; 7(1): 41-52.
- Boland R & Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2010; 138(6): 2073-87.

- Bosch JJ, Iheagwara UK, Reid S, Srivastava MK, Wolf J, Lotem M, Ksander BR & Ostrand-Rosenberg S. Uveal melanoma cell-based vaccines express MHC II molecules that traffic via the endocytic and secretory pathways and activate CD8(+) cytotoxic, tumor-specific T cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2010; 59: 103-112.
- Boyle P & Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ.* 2000; 321(7264): 805–8.
- Branch P, Aquilina G, Bignami M & Karran P. Defective mismatch binding and a mutator phenotype in cells tolerant to DNA damage. *Nature.* 1993; 362: 652-54.
- Bray F, Ren JS, Masuyer E & Ferlay J. Estimates of global cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer.* 2012; 132(5): 1133-45.
- Bretthauer M. Evidence for colorectal cancer screening. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2010; 24(4): 417–25.
- Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, et al. Mutation in the DNA mismatch repair homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature.* 1994; 368: 258–261.
- Bronte V & Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5: 641-54.
- Bronte V, Kasic T, Gri G, Gallana K, Borsellino G, et al. Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers. *J Exp Med.* 2005; 201: 1257-68.
- Browning MJ, Krausa P, Rowan A, Bicknell DC, Bodmer JG & Bodmer WF. Tissue typing the HLA-A locus from genomic DNA by sequence-specific PCR: comparison of HLA genotype and surface expression on colorectal tumor cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90: 2842-45.
- Buckowitz A, Knaebel H, Benner A, Blaker H, Gebert J, Kienle P, von Knebel Doeberitz M & Kloor M. Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. *Br J Cancer.* 2005, 92: 1746-53.
- Bui JD & Schreiber RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol.* 2007; 19(2): 203-8.
- Burnet FM. Cancer—a biological approach. *Br Med J.* 1957; 1:841–47.
- Cabrera CM, Jimenez 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: b2-microglobulin inactivation in MSI-positive tumors and LMP7/TAP2 downregulation in MSI-negative tumors. *Tissue Antigens.* 2003; 61: 211-9.
- 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.
- Califice S, Castronovo V & Van Den Brule F. Galectin-3 and cancer (Review). *Int J Oncol.* 2004; 25: 983-92.
- Carethers JM, Hawn MT, Chauhan DP, Luce MC, Marra G, Koi M, Boland CR. Competency in mismatch repair prohibits clonal expansion of cancer cells treated with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *J Clin Invest.* 1996; 98:199-206.
- Cawkwell L, Li D, Lewis FA; Martin I, Dixon MR & Quirke P. Microsatellite instability in colorectal cancer: improved assessment using fluorescent polymerase chain reaction. *Gastroenterology.* 1995 109: 465-471.
- Chan TL, Zhao W, Leung SY & Yuen ST; Cancer Genome Project. BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer Res.* 2003; 63(16): 4878-81.

- Chang DK, Metzgar D, Wills C & Boland CR. Microsatellites in the eukaryotic DNA mismatch repair genes as modulators of evolutionary mutation rate. *Genome Res.* 2001; 11(7):1145-46.
- Chang CC, Ogino T, Mullins DW, Oliver JL, Yamshchikov GV, Bandoh N, Slingsluff CL Jr & Ferrone S. Defective human leukocyte antigen class I-associated antigen presentation caused by a novel b2 – microglobulin loss-of-function in melanoma cells. *J Biol Chem.* 2006; 281(27): 18763-73.
- Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G & Wahl SM. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003; 198(12): 1875-86.
- Chiba T, Ohtani H, Mizoi T, Naito Y, Sato E, Nagura H, et al. Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. *Br J Cancer.* 2004; 91: 1711-17.
- Chung DC & Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med.* 2003; 138: 560-70.
- Coral S, Sigalotti L, Gasparollo A, Cattarossi I, Visintin A, Cattelan A, Altomonte M & Maio M. Prolonged upregulation of the expression of HLA class I antigens and costimulatory molecules on melanoma cells treated with 5-aza-20-deoxycytidine (5-AZA-CdR). *J Immunother.* 1999; 22: 16-24.
- Cózar JM, Canton J, Tallada M, Concha A, Cabrera T, Garrido F & Ruiz-Cabello Osuna F. Analysis of NK cells and chemokine receptors in tumor infiltrating CD4 T lymphocytes in human renal carcinomas. *Cancer Immunol Immunother.* 2005; 54: 858-66
- Cresswell P, Bangia N, Dick T & Diedrich G. The nature of the MHC class I peptide loading complex. *Immunol Rev.* 1999; 172: 21-28.
- Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Krzysiek R, Knutson KL, Daniel B, Zimmermann MC, David O, Burow M, Gordon A, Dhurandhar N, Myers L, Berggren R, Hemminki A, Alvarez RD, Emilie D, Curiel DT, Chen L & Zou W. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nature Med.* 2003; 9: 562-67.
- Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L & Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004; 10(9): 942-9.
- Curran B, Lenehan K, Mulcahy H, Tighe O, Bennett MA, Kay EW, et al. Replication error phenotype, clinicopathological variables, and patient outcome in Dukes' B stage II (T3, N0, M0) colorectal cancer. *Gut.* 2000; 46: 200-4.
- Dahm CC, Keogh RH, Spencer EA, Greenwood DC, Key TJ, Fentiman IS, Shipley MJ, Brunner EJ, Cade JE, Burley VJ, Mishra G, Stephen AM, Kuh D, White IR, Luben R, Lentjes MA, Khaw KT & Rodwell Bingham SA. Dietary fiber and colorectal cancer risk: a nested case-control study using food diaries. *J Natl Cancer Inst.* 2010; 102(9): 614–26.
- Dalerba P, Maccalli C, Casati C, Castelli C & Parmiani G. Immunology and immunotherapy of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2003; 46: 33-57.
- Davidson PJ, Davis MJ, Patterson RJ, Ripoche MA, Poirier F & Wang JL. Shuttling of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. *Glycobiology.* 2002; 12: 329-37.

- Davidson PJ, Li SY, Lohse AG, Vandergaast R, Verde E, Pearson A, Patterson RJ, Wang JL & Arnoys EJ. Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. I. Conditions and signals for nuclear import. *Glycobiology*. 2006; 16: 602-11.
- Dedeoglu F, Horwitz B, Chaudhuri J, Alt FW & Geha RS. Induction of activation-induced cytidine deaminase gene expression by IL-4 and CD40 ligation is dependent on STAT6 and NFkappaB. *Int Immunol*. 2004; 16: 395-404.
- Del Campo AB, Aptsiauri N, Mendez R, Zinchenko S, Vales A, Paschen A, Ward S, Ruiz-Cabello F, Gonzalez-Aseguinolaza G & Garrido F. Efficient recovery of HLA class I expression in human tumor cells after b2m gene transfer using adenoviral vector: implications for cancer immunotherapy. *Scand J Immunol*. 2009; 70: 125-35
- Del Campo A, Mendez R, Carretero J, Maleno I, Zinchenko S, Ruiz-Cabello F, Kyte JA, Aamdal S, Gaudernak G, Aptsiauri N & Garrido F. Analysis of HLA class I expression in metastatic lesions obtained from a melanoma patient before and after treatment with tumor-mRNA-transfected DCs: immunoselection of cells with beta 2-microglobulin gene alterations. *Tissue Antigens*. 2010; 75: 488
- Deschoolmeester V, Baay M, Van Marck E, Weyler J, Vermeulen P, Lardon F & Vermorken JB. Research article Tumor infiltrating lymphocytes: an intriguing player in the survival of colorectal cancer patients. *BMC Immunol*. 2010; 11:19
- Dhomen N & Marais R. New insight into BRAF mutations in cancer. *Curr Opin Genet Dev*. 2007; 17(1): 31-9.
- Di Noia J & Neuberger M. Molecular Mechanisms of Antibody Somatic Hypermutation. *Annu Rev Biochem*. 2007; 76:1-22
- Diederichsen AC, Hjelmberg JB, Christensen PB, Zeuthen J & Fenger C. Prognostic value of the CD4+/CD8+ ratio of tumour infiltrating lymphocytes in colorectal cancer and HLA-DR expression on tumour cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2003; 52: 423-8.
- Dierssen JW, de Miranda NF, Ferrone S, van Puijenbroek M, Cornelisse CJ, Fleuren GJ, van Wezel T & Morreau H. HNPCC versus sporadic microsatellite-unstable colon cancers follow different routes toward loss of HLA class I expression. *BMC Cancer*. 2007; 7:33.
- Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullman F, Fishel R & Rüschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair expression. *Cancer Res*. 1997; 57: 4749-56.
- 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; 1:447-56.
- Dissanayake SK, Thompson JA, Bosch JJ, Clements VK, Chen PW, Ksander BR & Ostrand-Rosenberg S. Activation of tumor-specific CD4(+) T lymphocytes by major histocompatibility complex class II tumor cell vaccines: a novel cell-based immunotherapy. *Cancer Res*. 2004; 64: 1867-74.
- Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Guidoboni M, Capozzi E, Vecchiato N, Macri E, Fornasarig M & Boiocchi M. High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Am J Pathol*. 1999; 154: 1805-13.
- Domingo E, Espín E, Armengol M, Oliveira C, Pinto M, Duval A, Brennetot C, Seruca R, Hamelin R, Yamamoto H & Schwartz S Jr. Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and MLH1 inactivation. *Genes Chromosomes Cancer*. 2004^a; 39(2): 138-42.

- Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, French AJ, Westra J, Frebourg T, Espín E, Armengol M, Hamelin R, Yamamoto H, Hofstra RM, Seruca R, Lindblom A, Peltomäki P, Thibodeau SN, Aaltonen LA & Schwartz S Jr. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet.* 2004^b; 41(9):664-8.
- Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, Alhopuro P, Moutinho C, Espín E, Armengol M, Sijmons RH, Kleibeuker JH, Seruca R, Aaltonen LA, Imai K, Yamamoto H, Schwartz S Jr & Hofstra RM. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene.* 2005; 24(24): 3995-8.
- Drake CG, Jaffee E & Pardoll DM. Mechanisms of immune evasion by tumors. *Adv Immunol.* 2006; 90: 51-81
- Draviam VM, Shapiro I, Aldridge B & Sorger PK. Misorientation and reduced stretching of aligned sister kinetochores promote chromosome missegregation in EB1- or APC-depleted cells. *EMBO J.* 2006; 25: 2814-27.
- Drescher KM, Sharma P, Watson P, Gatalica Z, Thibodeau SN & Lynch HT. Lymphocyte recruitment into the tumor site is altered in patients with MSI-H colon cancer. *Fam Cancer.* 2009; 8(3): 231-39.
- Duesberg P, Li R, Fabarius A & Hehlmann R. Aneuploidy and cancer: from correlation to causation. *Contrib Microbiol.* 2006; 13: 16-44.
- Dumic J, Dabelic S & Flogel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1760: 616-35.
- Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ & Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol.* 2002; 3: 991- 98.
- Dunn GP, Old LJ & Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 329-360.
- Dunn GP, Koebel CM & Schreiber RD. Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol.* 2006; 6: 836-48.
- Duval A, Rolland S, Compoin A, Tubacher E, Iacopetta B, Thomas G & Hamelin R. Evolution of instability at coding and non-coding repeat sequences in human MSI-H colorectal cancers. *Hum Mol Genet.* 2001; 10: 513-18
- Duval A & Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res.* 2002; 62(9):2447-54
- Ehrlich P. Über den jetzigen stand der karzinomforschung. *Ned Tijdschr Geneesk.* 1909; 5: 273-290.
- Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet.* 2000; 355:1745-50.
- Emterling A, Wallin A, Arbmán G & Sun XF. Clinicopathological significance of microsatellite instability and mutated RIZ in colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2004; 15: 242-246.
- Endo Y, Marusawa H, Kou T, Nakase H, Fujii S, Fujimori T, Kinoshita K, Honjo T & Chiba T. Activation-induced cytidine deaminase links between inflammation and the development of colitis-associated colorectal cancers. *Gastroenterology.* 2008; 135: 889-98
- Ercolini AM, Ladle BH, Manning EA, Pfannenstiel LW, Armstrong TD, Machiels JP, Bieler JG, Emens LA, Reilly RT & Jaffee EM. Recruitment of latent pools of high-avidity CD8(+) T cells to the antitumor immune response. *J Exp Med.* 2005; 201: 1591-1602.

- Ericsson C, Seregard S, Bartolazzi A, Levitskaya E, Ferrone S, Kiessling R & Larsson O. Association of HLA class I and class II antigen expression and mortality in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001; 42: 2153–6.
- Eshleman JR, Casey G, Kochera ME, Sedwick WD, Swinler SE, Veigl ML, Willson JK, Schwartz S & Markowitz SD. Chromosome number and structure both are markedly stable in RER colorectal cancers and are not destabilized by mutation of p53. *Oncogene.* 1998; 17: 719–25.
- Espana L, Fernandez Y, Rubio N, Torregrosa A, Blanco J & Sierra A. Overexpression of Bcl-xL in human breast cancer cells enhances organ-selective lymph node metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* 2004; 87: 33–44.
- Fallarino F, Grohmann U, You S, McGrath BC, Cavener DR, Vacca C, Orabona C, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC & Puccetti P. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J Immunol.* 2006; 176(11): 6752–61.
- Fearon ER & Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell.* 1990; 61: 759–767
- Feeley KM, Fullard JF, Heneghan MA, Smith T, Maher M, Murphy RP, et al. Microsatellite instability in sporadic colorectal carcinoma is not an indicator of prognosis. *J Pathol.* 1999; 188: 14–17.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year.
- Ferrone S & Marincola FM. Loss of HLA class I antigens by melanoma cells: molecular mechanisms, functional significance and clinical relevance. *Immunol Today.* 1995; 16, 487–94.
- Filipazzi P, Valenti R, Huber V, Pilla L, Canese P, Iero M, Castelli C, Mariani L, Parmiani G & Rivoltini L. Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine. *J Clin Oncol.* 2007; 25: 2546–53.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M & Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell.* 1993; 75:1027–38.
- Fishel R, Ewel A & Lescoe MK. Purified human MSH2 protein binds to DNA containing mismatched nucleotides. *Cancer Res.* 1994; 54: 5539–42.
- Fishel R. Mismatch repair, molecular switches, and signal transduction. *Genes Dev.* 1998; 12: 2096–2101.
- Forssell J, Oberg A, Henriksson ML, Stenling R, Jung A & Palmqvist R. High macrophage infiltration along the tumor front correlates with improved survival in colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 1472–79
- Fransén K, Klintonäs M, Osterström A, Dimberg J, Monstein HJ & Söderkvist P. Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis.* 2004; 25(4):527–33.
- Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, Fitz LJ, Malenkovich N, Okazaki T, Byrne MC, Horton HF, Fouser L, Carter L, Ling V, BowmanMR, Carreno BM, Collins M, Wood CR & Honjo T. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med.* 2000; 192(7): 1027–34.

- Fricke I, Mirza N, Dupont J, Lockhart C, Jackson A, Lee JH, Sosman JA & Gabrilovich DI. Vascular endothelial growth factor-trap overcomes defects in dendritic cell differentiation but does not improve antigen-specific immune responses. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 4840-48.
- Fridman WH, Pages F, Sautes-Fridman C & Galon J: The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 2012; 12: 298-306.
- Fujiwara T, Stolker J, Watanabe T, Rashid A, Longo P, Eshleman J, Booker S, Lynch HT, Jass JR, Green JS, Kim H, Jen J, Vogelstein B & Hamilton SR. Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am J Pathol.* 1998; 153: 1063-78.
- Fung SM, Ramsay G & Katzen AL. Mutations in *Drosophila myb* lead to centrosome amplification and genomic instability. *Development.* 2002; 129: 347–359.
- Gabrilovich DI & Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2009; 9(3): 162-74.
- Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pagès C, Tosolini M, Camus M, Berger A, Wind P, Zinzindohoué F, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH & Pagès F. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006; 313: 1960-64.
- Galon J, Fridman W-H & Pages F. The adaptive immunologic microenvironment in colorectal cancer: A novel perspective. *Cancer Res.* 2007; 67: 1883-86.
- Galon J, Pagès F, Marincola FM, Thurin M, Trinchieri G, Fox BA, Gajewski TF & Ascierto PA. The immune score as a new possible approach for the classification of cancer. *J Transl Med.* 2012; 10:1.
- Garrido ML, Perez M, Delgado C, Rojano J, Algarra I, Garrido A & Garrido F. Immunogenicity of H-2 positive and H-2 negative clones of a mouse tumour, GR9. *J Immunogenet.* 1989; 13: 159-67.
- Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar JJ, López-Botet M, Duggan-Keen M & Stern PL. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today.* 1997; 18: 89-95.
- Garrido F & Algarra I. MHC antigens and tumor escape from immune surveillance. *Adv Cancer Res.* 2001; 83:117-58.
- Garrido F, Ruiz-Cabello F, Cabrera T, Pérez-Villar JJ, López-Botet M, Duggan-Keen M, Stern PL. Implications for immunosurveillance of altered HLA class I phenotypes in human tumours. *Immunol Today.* 2006; 18: 89-95.
- Garrido F, Cabrera T & Aptsiauri N. “Hard” and “soft” lesions underlying the HLA class I alterations in cancer cells: implications for immunotherapy. *Int J Cancer.* 2010; 127: 249-56
- Giacomini CP, Leung SY, Chen X, Yuen ST, Kim YH, Bair E & Pollack JR. A gene expression signature of genetic instability in colon cancer. *Cancer Res.* 2005; 65(20): 9200-5.
- Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Chang DK, Ricciardiello L, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM & Boland CR. Characterization of sporadic colon cancer by patterns of genomic instability. *Cancer Res.* 2003; 63(7): 1608-14.
- Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, Compton C, Mayer RJ, Bertagnolli MM & Boland CR. Frequent inactivation of *PTEN* by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res.* 2004; 64: 3014–21.

- Goldstein NS, Bhanot P, Odish E & Hunter S. Hyperplastic-like colon polyps that preceded microsatellite-unstable adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2003; 119(6): 778-96
- Gollin SM. Mechanisms leading to chromosomal instability. *Semin cancer Biol.* 2005; 15(1): 33-42.
- Gonzalez CA & Riboli E. Diet and cancer prevention: contributions from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. *Eur J Cancer.* 2010; 46(14): 2555–62.
- Gordon S & Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(12): 953-64.
- Grady WM, Rajput A, Myeroff L, Liu DF, Kwon K, Willis J & Markowitz S. Mutation of the type II transforming growth factor-beta receptor is coincident with the transformation of human colon adenomas to malignant carcinomas. *Cancer research.* 1998; 58(14): 3101-04.
- Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2004; 23(1-2): 11-27.
- Grady WM & Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology.* 2008;135(4): 1079-99.
- Green RA, Wollman R & Kaplan KB. APC and EB1 function together in mitosis to regulate spindle dynamics and chromosome alignment. *Mol Biol Cell.* 2005; 16: 4609–22.
- Greenon JK, Bonner JD, Ben-Yzhak O, Cohen HI, Miselevich I, Resnick MB, Trougouboff P, Tomsho LD, Kim E, Low M, Almog R, Rennert G & Gruber SB. Phenotype of microsatellite unstable colorectal carcinomas: Well-differentiated and focally mucinous tumors and the absence of dirty necrosis correlate with microsatellite instability. *Am J Surg Pathol.* 2003; 27: 563-70
- Griffioen M, Ouwerkerk IJ, Harten V & Schrier PI. HLA-B locus- specific downregulation in human melanoma requires enhancer A as well as a sequence element located downstream of the transcription initiation site. *Immunogenetics.* 2000; 52: 121-8
- Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, 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
- Guidoboni M, Gafa R, Viel A, Doglioni C, Russo A, Santini A, Del Tin L, Macrì E, Lanza G, Boiocchi M & Dolcetti R. Microsatellite instability and high content of activated cytotoxic lymphocytes identify colon cancer patients with a favorable prognosis. *Am J Pathol.* 2001; 159: 297-304.
- Haggar FA & Boushey RP. Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clin Colon Rectal Surg.* 2009; 22(4): 191-7.
- Halama N, Michel S, Kloor M, Zoernig I, Pommerencke T, von Knebel DM, et al. The localization and density of immune cells in primary tumors of human metastatic colorectal cancer shows an association with response to chemotherapy. *Cancer Immun.* 2009; 9:1.
- Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Clendenning M, Sotamaa K, Prior T, Westman JA, Panescu J, Fix D, Lockman J, LaJeunesse J, Comeras I & de la Chapelle A. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26(35): 5783-8.
- HanadaT, Nakagawa M, Emoto A, Nomura T, Nasu N & Nomura Y. Prognostic value of tumor-associated macrophage count in human bladder cancer. *IntJ Urol.* 2000; 7: 263-9.
- Hanahan D & Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000; 100: 57-70.

- 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: 3721-25.
- Haydon AM & Jass JR. Emerging pathways in colorectal-cancer development. *Lancet Oncol.* 2002; 3: 83-88.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP *et al.* Incidence and functional consequences of *hMLH1* promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95: 6870-75.
- Herman JG & Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003; 349: 2042-54.
- Hicklin DJ, Dellaratta DV, Kishore R, Liang B, Kageshita T & Ferrone S. Beta2-microglobulin gene mutations in human melanoma cells: molecular characterization and implications for immune surveillance. *Melanoma Res.* 1997; 7 suppl 2: S67-S74.
- Hicklin DJ, Wang Z, Arienti F, Rivoltini L, Parmiani G & Ferrone S. Beta2-Microglobulin mutations, HLA class I antigen loss, and tumor progression in melanoma. *J Clin Invest.* 1998; 101: 2720-29
- Hill DM, Kasliwal T, Schwarz E, Hebert AM, Chen T, Gubina E, Zhang L & Kozlowski S. A dominant negative mutant beta 2-microglobulin blocks the extracellular folding of a major histocompatibility complex class I heavy chain. *J Biol Chem.* 2003; 278: 5630-8.
- Hiraoka S, Kato J, Fujiki S, Kaji E, Morikawa T, Murakami T, Nawa T, Kuriyama M, Uraoka T, Ohara N & Yamamoto K. The presence of large serrated polyps increases risk for colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2010; 139(5): 1503-10.
- Hirata T, Yamamoto H, Taniguchi H, Horiuchi S, Oki M, Adachi Y, Imai K & Shinomura Y. Characterization of the immune escape phenotype of human gastric cancers with and without high-frequency microsatellite instability. *J Pathol.* 2007; 211(5): 516-23.
- Hoffmann TK, Dworacki G, Tsukihira T, Meidenbauer N, Gooding W, Johnson JT & Whiteside TL. Spontaneous apoptosis of circulating T lymphocytes in patients with head and neck cancer and its clinical importance. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(8): 2553-62
- Hoffmeister M, Schmitz S, Karmrodt E, Stegmaier C, Haug U, Arndt V & Brenner H. Male sex and smoking have a larger impact on the prevalence of colorectal neoplasia than family history of colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2010; 8(10): 870-876.
- Holliday, R. *Genet. Res.* 1964; 5: 282-304.
- Huang L, Wang X, Gong W, Huang Y & Jiang B. The comparison of the clinical manifestations and risk factors of colorectal cancer and adenomas: results from a colonoscopy-based study in southern Chinese. *Int J Colorectal Dis.* 2010; 25(11): 1343-51.
- Huang WC, Wu D, Xie Z, Zhau HE, Nomura T, Zayzafoon M, Pohl J, Hsieh CL, Weitzmann MN, Farach-Carson MC & Chung LW. beta2-microglobulin is a signaling and growth-promoting factor for human prostate cancer bone metastasis. *Cancer Res.* 2006; 66: 9108-16
- Huang WC, Zhau HE & Chung LW. Androgen receptor survival signalling is blocked by anti- β 2-microglobulin monoclonal antibody via a mitogen-activated protein kinase/lipogenic pathway in human prostate cancer cells. *J Biol Chem.* 2010; 285: 7947-56
- Iacopetta B, Griou F, Amanuel B. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Asia Pac J Clin Oncol.* 2010; 6(4): 260-9.

- Ichihara F, Kono K, Takahashi A, Kawaida H, Sugai H & Fujii H. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood and tumor-infiltrating lymphocytes in patients with gastric and esophageal cancers. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 4404-08.
- Iglesias D, Fernández-Peralta AM, Nejda N, Daimiel L, Azcoita MM, Oliart S & González-Aguilera JJ. RIS1, a gene with trinucleotide repeats, is a target in the mutator pathway of colorectal carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006; 167(2): 138-44.
- Iino H, Jass JR, Simms LA, Young J, Leggett B, Ajioka Y & Watanabe H. DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer? *J Clin Pathol.* 1999; 52(1): 5-9
- Imai K & Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis.* 2008; 29(4): 673-80.
- Imreh MP, Zhang QJ, de Campos-Lima PO, Imreh S, Krausa P, Browning M, Klein G & Masucci MG. Mechanisms of allele-selective down-regulation of HLA class I in Burkitt's lymphoma. *Int J Cancer.* 1995; 62: 90-96
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D & Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature.* 1993; 363: 558-61.
- Ishikawa T, Fujita T, Suzuki Y, Okabe S, Yuasa Y, Iwai T, et al. Tumor-specific immunological recognition of frameshift-mutated peptides in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res.* 2003; 63: 5564-72.
- Issa JP. The epigenetics of colorectal cancer. *Ann NY Acad Sci.* 2000; 910: 140-53; discusión 153-5.
- Iwai Y, Ishida M, Tanaka Y, Okazaki T, Honjo T & Minato N. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99: 12293-97.
- Jager MJ, Hurks HM, Levitskaya J & Kiessling R. HLA expression in uveal melanoma: there is no rule without some exception. *Human Immunol.* 2002; 63: 444-51.
- Jallepalli PV & Lengauer C. Chromosome segregation and cancer: cutting through the mystery. *Nat Rev Cancer.* 2001; 1:109-117.
- Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW & Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology.* 2010; 138(6): 2044-58.
- Jass JR, Cottier DS, Jeevaratnam P, Pokos V, Holdaway KM, Bowden ML Van de Water NS, Browett PJ. Diagnostic use of microsatellite instability in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Lancet.* 1995; 346: 1200-01.
- Jass JR, Do K-A, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP, Searle J, Radford-Smith G, Young J & Leggett B. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut.* 1998; 42: 673-79
- Jass JR, Iino H, Ruzskiewicz A, Painter D, Solomon MJ, Koorey DJ, Cohn D, Furlong KL, Walsh MD, Palazzo J, Edmonston TB, Fishel R, Young J & Leggett BA. Neoplastic progression occurs through mutator pathways in hyperplastic polyposis of the colorectum. *Gut.* 2000; 47(1): 43-9.
- Jass JR, Whitehall VL, Young J & Leggett BA. Emerging concepts in colorectal neoplasia. *Gastroenterology.* 2002; 123: 862-876.
- Jass JR. Role of the pathologist in the diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Dis Markers.* 2004; 20(4-5): 215-24.

- Jass JR. Hereditary non-poliposys colorectal cáncer: the rise and fall of a confusing term. *World J Gastroenterology*. 2006; 12: 4943-50
- Jiricny J. Eukaryotic mismatch repair: an update. *Mutat Res*. 1998; 409(3): 107-21.
- Josson S, Nomura T, Lin JT, Huang WC, Wu D, Zhau HE, Zayzafoon M, Weizmann MN, Gururajan M & Chung LW. b2-Microglobulin induces epithelial to mesenchymal transition and confers cancer lethality and bone metastasis in human cancer cells. *Cancer Res*. 2011; 71: 2600-10
- Jung YJ, Kim JY & Park JH. TGF-beta1 inhibits Fas-mediated apoptosis by regulating surface Fas and cFLIPL expression in human leukaemia/lymphoma cells. *Int J Mol Med*. 2004; 13: 99-104.
- Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, Spring KJ, Wynter CV, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, McGivern A, Matsubara N, Tanaka N, Higuchi T, Young J, Jass JR & Leggett BA. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut*. 2004; 53(8): 1137-44.
- Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM & Kolodner R Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1997; 57: 808-11
- 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: 7556-61.
- Karin M & Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol*. 2005; 5: 749-759.
- Kat A, Thilly WG, Fang WH, Longley MJ, Li GM & Modrich P. An alkylation-tolerant, mutator human cell line is deficient in strand-specific mismatch repair. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 6424-28
- Kern SE, Fearon ER, Tersmette KW, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y, White R, Vogelstein B & Hamilton SR. Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma. *JAMA*. 1989; 261: 3099-3103.
- Khan AN, Gregorie CJ & Tomasi TB. Histone deacetylase inhibitors induce TAP, LMP, Tapasin genes and MHC class I antigen presentation by melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother*. 2008; 57: 647-54
- Kim DH, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Yaun SS, Colditz GA, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Harnack L, Jacobs EJ, Leitzmann M, Mannisto S, Miller AB, Potter JD, Rohan TE, Schatzkin A, Speizer FE, Stevens VL, Stolzenberg-Solomon R, Terry P, Toniolo P, Weijenberg MP, Willett WC, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A & Hunter DJ. Pooled analyses of 13 prospective cohort studies on folate intake and colon cancer. *Cancer Causes Control*. 2010; 21(11): 1919-30
- Kim H, Jen J, Vogelstein B & Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol*. 1994; 145: 148-56.
- Kim H, Nam SW, Rhee H, Shan Li L, Ju Kang H, Hye Koh K, Kyu Kim N, Song J, Tak-Bun Liu E & Kim H. Different gene expression profiles between micro-satellite instability-high and microsatellite stable colorectal carcinomas. *Oncogene*. 2004; 23: 6218-25.
- Kim JM, Rasmussen JP & Rudensky AY. Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol*. 2007; 8(2): 91-7.
- Kim R, Emi M, Tanabe K, Uchida Y & Toge T. The role of Fas ligand and transforming growth factor beta in tumor progression: molecular mechanisms of immune privilege via Fas-mediated apoptosis and potential targets for cancer therapy. *Cancer*. 2004; 100: 2281-91.

- Kim R, Emi M & Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology*. 2007; 21(1): 1-14.
- Kinoshita K & Nonaka T. The dark side of activation-induced cytidine deaminase: relationship with leukemia and beyond. *Int J Hematol*. 2006; 83: 201-7.
- Kinzler KW & Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*. 1996; 87: 159–170.
- Kinzler KW & Vogelstein B. *The Genetic Basis of Human Cancer*. 1998; McGraw–Hill, Toronto.
- Klingler H, Hemmerle C, Bannwart F, Haider R, Cattaruzza MS & Marra G. Expression of the hMSH6 mismatch-repair protein in colon cancer and HeLa cells. *Swiss Med Wkly*. 2002; (5-6):57-63.
- Klintrup K, Makinen JM, Kauppila S, Väre PO, Melkko J, Tuominen H, Tuppurainen K, Mäkelä J, Karttunen TJ, Mäkinen MJ. Inflammation and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2005; 41(17): 2645-54.
- Kloor M, Becker C, Benner A, Woerner SM, Gebert J, Ferrone S & von Knebel Doeberitz M. Immunoselective pressure and human leukocyte antigen class I antigen machinery defects in microsatellite unstable colorectal cancers. *Cancer Res*. 2005; 65: 6418-24.
- Kloor M, Michel S, Buckowitz B, Rüschoff J, Büttner R, Holinski-Feder E, Dippold W, Wagner R, Tariverdian M, Benner A, Schwitalle Y, Kuchenbuch B, et al. Beta2-microglobulin mutations in microsatellite unstable colorectal tumors. *Int J Cancer*. 2007; 121: 454-8.
- Knudson AG. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 10914–21.
- Knudson AG. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Jr.Proc Natl Acad Sci USA*. 1971; 68(4): 820-3.
- Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2001; 1(2): 157-62.
- Koch M, Beckhove P, Op den Winkel J, Autenrieth D, Wagner P, Nummer D, et al. Tumor infiltrating T lymphocytes in colorectal cancer: Tumor-selective activation and cytotoxic activity in situ. *Ann Surg*. 2006; 244: 986-92.
- Koh KH Kang HJ, Li LS, Kim NG, You KT, Yang E, Kim H, Kim HJ, Yun CO, Kim KS & Kim H. Impaired nonhomologous end-joining in mismatch repair-deficient colon carcinomas. *Lab Invest*. 2005; 85: 1130-38.
- Kohonen-Corish MR, Daniel JJ, Chan C, Lin BP, Kwun SY, Dent OF, Dhillon VS, Trent RJ, Chapuis PH & Bokey EL. Low microsatellite instability is associated with poor prognosis in stage C colon cancer. *J Clin Oncol*. 2005; 23(10): 2318-24.
- Koinuma K, Shitoh K, Miyakura Y, Furukawa T, Yamashita Y, Ota J, Ohki R, Choi YL, Wada T, Konishi F, Nagai H & Mano H. Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer*. 2004; 108(2): 237-42.
- Kondo Y & Issa JP. Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2004; 23:29–39.
- Koneru M, Schaer D, Monu N, Ayala A & Frey AB. Defective proximal TCR signaling inhibits CD8+ tumor-infiltrating lymphocyte lytic function. *J Immunol*. 2005; 174: 1830-40.
- Konishi K, Yamochi T, Makino R, Kaneko K, Yamamoto T, Nozawa H, Katagiri A, Ito H, Nakayama K, Ota H, Mitamura K & Imawari M. Molecular differences between sporadic serrated and conventional colorectal adenomas. *Clin Cancer Res*. 2004; 10(9): 3082-90.
- Konishi K & Issa JP. Targeting aberrant chromatin structure in colorectal carcinomas. *Cancer J*. 2007; 13, 49-55.

- Kornstein MJ, Brooks JS & Elder DE. Immunoperoxidase localization of lymphocyte subsets in the host response to melanoma and nevi. *Cancer Res.* 1983; 43: 2749-53.
- Krishna M, Burgart LJ, French AJ, et al. Predictive value of histopathology for mutator phenotype (microsatellite instability) in colorectal carcinoma. *Gastroenterology.* 1997; 112: A595.
- Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, de la Chapelle A & Peltomäki P. Genetic and epigenetic modification of *MLH1* accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. *Am J Pathol.* 2000; 156: 1773-79.
- Kusmartsev S & Gabrilovich DI. Role of immature myeloid cells in mechanisms of immune evasion in cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2006; 55: 237-45.
- Kuss I, Hathaway B, Ferris RL, Gooding W & Whiteside TL. Decreased absolute counts of T lymphocyte subsets and their relation to disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(11): 3755-62
- Lahue RS, Au KG & Modrich P. DNA mismatch correction in a defined system. *Science.* 1989; 245: 160-4.
- Lanza G, Ferracin M, Gafà R, Veronese A, Spizzo R, Pichiorri F, Liu CG, Calin GA, Croce CM & Negrini M. mRNA/microRNA gene expression profile in microsatellite unstable colorectal cancer. *Mol Cancer.* 2007; 6: 54
- Larsson SC & Wolk A. Meat consumption and risk of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective studies. *Int J Cancer.* 2006; 119(11): 2657-64.
- Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, Iwai Y, Long AJ, Brown JA, Nunes R, Greenfield EA, Bourque K, Boussiotis VA, Carter LL, Carreno BM, Malenkovich N, Nishimura H, Okazaki T, Honjo T, Sharpe AH & Freeman GJ. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol.* 2002; 2: 261-68.
- Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomäki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell.* 1993; 75: 1215-25.
- Lee AH, Happerfield LC, Bobrow LG & Millis RR. Angiogenesis and inflammation in invasive carcinoma of the breast. *J Clin Pathol.* 1997; 50: 669-73.
- Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, Greenall M, Clarke J & Harris AL. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res.* 1996; 56: 4625-9.
- Lengauer C, Kinzler KW & Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers. *Nature.* 1997; 386: 623-27.
- Lengauer C, Kinzler K & Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature.* 1998; 396: 643-649.
- Lewis CE & Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res.* 2006; 66(2): 605-12.
- Li SY, Davidson PJ, Lin NY, Patterson RJ, Wang JL & Arnoys EJ. Transport of galectin-3 between the nucleus and cytoplasm. II. Identification of the signal for nuclear export. *Glycobiology.* 2006; 16: 612-22.
- Lin SY, Yeh KT, Chen WT, Chen HC, Chen ST, Chiou HY & Chang JG. Promoter CpG methylation of tumor suppressor genes in colorectal cancer and its relationship to clinical features. *Oncol Rep.* 2004; 11: 341-48.
- Lind GE, Thorstensen L, Lovig T, Meling GI, Hamelin R, Rognum TO, Esteller M & Lothe RA. A CpG island hypermethylation profile of primary colorectal carcinomas and colon cancer cell lines. *Mol Cancer.* 2004; 3: 28.

- Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, Haile R, Casey G, Baron J, Gallinger S, Bapat B, Aronson M, Hopper J, Jass J, LeMarchand L, Grove J, Potter J, Newcomb P, Terdiman JP, Conrad P, Moslein G, Goldberg R, Ziogas A, Anton-Culver H, de Andrade M, Siegmund K, Thibodeau SN, Boardman LA & Seminara D. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: Familial colorectal cancer type X. *JAMA*. 2005; 293(16):1979-85.
- Linnebacher M, Gebert J, Rudy W, Woerner S, Yuan YP, Bork P & von Knebel Doeberitz M. Frameshift peptide-derived T-cell epitopes: a source of novel tumor- specific antigens. *Int J Cancer*. 2001; 93:6-11.
- Lissbrant IF, Stattin P, Wikstrom P, Damber JE, Egevad L & Bergh A. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. *Int J Oncol*. 2000; 17:445-51.
- Litzinger MT, Fernando R, Curiel TJ, Grosenbach DW, Schlom J & Palena C. The IL-2 immunotoxin denileukin diftitox reduces regulatory T cells and enhances vaccine-mediated T-cell immunity. *Blood*. 2007; 110: 3192-3201.
- Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomäki 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.
- Liyanaage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol*. 2002; 169: 2756-61.
- Loeb LA. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*. 2001; 61: 3230-39.
- Loeb LA, Loeb KR & Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100: 776-781.
- Lothe RA, Peltomäki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, Pylkkänen L, Heimdal K, Andersen TI, Møller P, Rognum TO, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res*. 1993; 53: 5849-52
- Løvåg T, Andersen SN, Thorstensen L, Diep CB, Meling GI, Lothe RA & Rognum TO. Strong HLA-DR expression in microsatellite stable carcinomas of the large bowel is associated with good prognosis. *Br J Cancer*. 2002; 87: 756-62.
- Lynch HT & de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348(10): 919-32.
- Lynch HT & Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer*. 1996; 78: 1149-67.
- Ma D, Luyten GP, Luidert TM & Niederkorn JY. Relationship between natural killer cell susceptibility and metastasis of human uveal melanoma cells in a murine model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994; 36: 435-41.
- Mäkinen MJ, George SM, Jernvall P, Mäkelä J, Vihko P & Karttunen TJ. Colorectal carcinoma associated with serrated adenoma--prevalence, histological features, and prognosis. *J Pathol*. 2001; 193(3): 286-94.
- Malkhosyan S, Rampino N, Yamamoto H & Perucho M. Frameshift mutator mutations. *Nature*. 1996; 382: 499-500.

- Mantovani A, Ming WJ, Balotta C, Abdeljalil B & Bottazzi B. Origin and regulation of tumor-associated macrophages: the role of tumor-derived chemotactic factor. *Biochim Biophys Acta*. 1986; 865(1): 59-67.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P & Sica A. Macrophage polarization: tumor associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol*. 2002; 23(11): 549-55.
- Marincola FM, Shamamian P, Alexander RB, Gnarr JR, Turetskaya RL, Nedospasov SA, Simonis TB, Taubenberger JK, Yannelli J, Mixon A, et al. Loss of HLA haplotype and B locus down-regulation in melanoma cell lines. *J Immunol*. 1994; 153: 1225-37.
- Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ & Ferrone S: Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Adv Immunol*. 2000; 74: 181-273.
- Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, Brattain M & Willson JKV. Inactivation of the type II TGF receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science*. 1995; 268: 1336-38.
- Markowitz SD & Bertagnoli MM. Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009; 361(25): 2449-60.
- Marra G & Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Nat Cancer Int*. 1995; 87(15): 1114-25.
- Marra G & Boland CR. DNA repair and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am*. 1996; 25:755-72.
- Marra G & Schär P. Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochem J*. 1999; 338 (Pt 1):1-13.
- Marusawa H & Chiba T. Helicobacter pylori-induced activation-induced cytidine deaminase expression and carcinogenesis. *Curr Opin Immunol*. 2010; 22(4): 442-7.
- McGivern A, Wynter CV, Whitehall VL, Kambara T, Spring KJ, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, Simms LA, Leggett BA, Young J & Jass JR. Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Fam Cancer*. 2004; 3(2):101-7.
- Meijer TW, Hoogerbrugge N, Nagengast FM, Ligtenberg MJ & van Krieken JH. In Lynch syndrome adenomas, loss of mismatch repair proteins is related to an enhanced lymphocytic response. *Histopathology*. 2009; 55: 414-22.
- Méndez R, Aptsiauri N, Del Campo A, Maleno I, Cabrera T, Ruiz-Cabello F, Garrido F & Garcia-Lora A. HLA and melanoma: multiple alterations in HLA class I and II expression in human melanoma cell lines from ESTDAB cell bank. *Cancer Immunol Immunother*. 2009; 58: 1507-15.
- Menon AG, Janssen-van Rhijn CM, Morreau H, Putter H, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Fleuren GJ & Kuppen PJ. Immune system and prognosis in colorectal cancer: a detailed immunohistochemical analysis. *Lab Invest*. 2004^a; 84(4): 493-501.
- Menon AG, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Putter H, Janssen-van Rhijn CM, Keijzer R, Fleuren GJ & Kuppen PJ. p53 and HLA class-I expression are not down-regulated in colorectal cancer liver metastases. *Clin Exp Metastasis*. 2004^b; 21: 79.
- Messerini L, Ciantelli M, Baglioni S, Palomba A, Zampi G & Papi L. Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic mucinous colorectal cancers. *Hum Pathol*. 1999; 30: 629-34.

- Michael-Robinson JM, Biemer-Huttman AE, Purdie DM, Walsh MD, Simms LA, Biden KG, Young JP, Leggett BA, Jass JR & Radford-Smith GL. Tumour infiltrating lymphocytes and apoptosis are independent features in colorectal cancer stratified according to microsatellite instability status. *Gut*. 2001; 48: 360-66.
- Michel S, Benner A, Tariverdian M, Wentzensen N, Hoefler P, Pommerenke T, Grabe N, von Knebel Doeberitz M & Kloor M. High density of FOXP3-positive T cells in infiltrating colorectal cancers with microsatellite instability. *Br J Cancer*. 2008; 99: 1867-73.
- Michor F, Iwasa Y, Rajagopalan H, Lengauer C & Nowak MA. Linear model of colon cancer initiation. *Cell Cycle*. 2004; 3(3): 358-62.
- Migliore L, Migheli F, Spisni R & Coppedè F. Genetics, cytogenetics, and epigenetics of colorectal cancer. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011: 792362.
- Mihm MC, Clemente C & Cascinelli N. Tumor infiltrating lymphocytes in lymph node melanoma metastases—a histopathologic prognostic indicator and an expression of local immune response. *Lab Invest*. 1996; 74: 43-47.
- Mirza N, Fishman M, Fricke I, Dunn M, Neuger AM, Frost TJ, Lush RM, Antonia S & Gabrilovich DI. All-trans-retinoic acid improves differentiation of myeloid cells and immune response in cancer patients. *Cancer Res*. 2006; 66: 9299-9307.
- Miyakura Y, Sugano K, Akasu T, Yoshida T, Maekawa M, Saitoh S *et al*. Extensive but hemiallelic methylation of the *hMLH1* promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004; 2: 147-56.
- Mlecnik B, Tosolini M, Kirilovsky A, Berger A, Bindea G, Meatchi T, Bruneval P, Trajanoski Z, Fridman WH, Pages F & Galon J. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. *J Clin Oncol*. 2011; 29: 610-18.
- Moretta L, Bottino C, Pende D, Mingari MC, Biassoni R & Moretta A: Human natural killer cells: their origin, receptors and function. *Eur J Immunol*. 2002; 32: 1205–11.
- Mori Y, Selaru FM, Sato F, Yin J, Simms LA, Xu Y, Oлару A, Deacu E, Wang S, Taylor JM, Young J, Leggett B, Jass JR, Abraham JM, Shibata D & Meltzer SJ. The impact of microsatellite instability on the molecular phenotype of colorectal tumors. *Cancer Res*. 2003; 63(15): 4577-82.
- Mori Y, Yin J, Sato F, Sterian A, Simms LA, Selaru FM, Schulmann K, Xu Y, Oлару A, Wang S, Deacu E, Abraham JM, Young J, Leggett BA & Meltzer SJ. Identification of genes uniquely involved in frequent microsatellite instability colon carcinogenesis by expression profiling combined with epigenetic scanning. *Cancer Res*. 2004; 64: 2434–38.
- Morris M, Platell C & Iacopetta B. Tumor-infiltrating lymphocytes and perforation in colon cancer predict positive response to 5-fluorouracil chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2008; 14(5):1413-17.
- Muhlbauer M, Fleck M, Schutz C, Weiss T, Froh M, Blank C, Scholmerich J, Hellerbrand C. PDL-1 is induced in hepatocytes by viral infection and by interferon-alpha and -gamma and mediates T cell apoptosis. *J Hepatol*. 2006; 45: 520-28
- Mumenthaler SM, Yu H, Tze S, Cederbaum SD, Pegg AE, Seligson DB & Grody WW. Expression of arginase II in prostate cancer. *Int J Oncol*. 2008; 32(2): 357-65.
- Nagaraj S & Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells. *Adv Exp Med Biol*. 2007; 601: 213-223.

- Naito Y, Saito K, Shiiba K, Ohuchi A, Saigenji K, Nagura H & Ohtani H. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998; 58: 3491-94.
- Nakano O, Sato M, Naito Y, Suzuki K, Orikasa S, Aizawa M, Suzuki Y, Shintaku I, Nagura H & Ohtani H. Proliferative activity of intratumoral CD8+ T lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: Clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer Res.* 2001; 61: 5132-36.
- Nangia-Makker P, Balan V & Raz A. Regulation of tumor progression by extracellular Galectin-3. *Cancer Microenvironment.* 2008; 1: 43-51.
- Nie Y, Yang G, Song Y, Zhao X, So C, Liao J, Wang LD & Yang CS. DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis.* 2001; 22: 1615-23.
- Nielsen HJ, Hansen U, Christensen IJ, Reimert CM, Brunner N & Moesgaard F: Independent prognostic value of eosinophil and mast cell infiltration in colorectal cancer tissue. *J Pathol.* 1999; 189:487-95.
- Nishie A, Ono M, Shono T, Fukushi J, Otsubo M, Onoue H, Ito Y, Inamura T, Ikezaki K, Fukui M, Iwaki T, Kuwano M. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. *Clin Cancer Res.* 1999; 5: 1107-13.
- Norian LA, Rodriguez PC, O'Mara LA, Zabaleta J, Ochoa AC, Cella M & Allen PM. Tumor-infiltrating regulatory dendritic cells inhibit CD8+T cell function via L -arginine metabolism. *Cancer Res.* 2009; 69: 3086-94
- Nowak MA, Komarova NL, Sengupta A, Jallepalli PV, Shih IeM, Vogelstein B & Lengauer C. The role of chromosomal instability in tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 99(25):16226-31.
- Ochoa AC, Zea AH, Hernandez C & Rodriguez PC. Arginase, prostaglandins, and myeloid-derived suppressor cells in renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007; 13: 721s-726s.
- Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Suemoto Y, Meyerhardt JA & Fuchs CS. Molecular correlates with MGMT promoter methylation and silencing support CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer. *Gut.* 2007; 56(11): 1564-71.
- Ogino & Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn.* 2008; 10(1):13-27.
- Ogino S, Nosho K, Irahara N, Meyerhardt JA, Baba Y, Shima K, Glickman JN, Ferrone CR, Mino-Kenudson M, Tanaka N, Dranoff G, Giovannucci EL & Fuchs CS. Lymphocytic reaction to colorectal cancer is associated with longer survival, independent of lymph node count, microsatellite instability, and CpG island methylator phenotype. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(20): 6412-20.
- Oh K, Redston M, Odze RD. Support for hMLH1 and MGMT silencing as a mechanism of tumorigenesis in the hyperplastic-adenoma-carcinoma (serrated) carcinogenic pathway in the colon. *Hum Pathol.* 2005; 36(1):101-11.
- Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, Mizuno T, Yoriki R, Kashizuka H, Yane K, Tsushima F, Otsuki N, Yagita H, Azuma M & Nakajima Y. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005; 11: 2947-53.
- Okazaki IM, Kotani A & Honjo T. Role of AID in tumorigenesis. *Adv Immunol.* 2007; 94: 245-73.
- O'Keefe C, McDevitt MA & Maciejewski JP. Copy neutral loss of heterozygosity: a novel chromosomal lesion in myeloid malignancies. *Blood.* 2010; 115(14): 2731-9

- Oliveira C, Pinto M, Duval A, Brennetot C, Domingo E, Espín E, Armengol M, Yamamoto H, Hamelin R, Seruca R & Schwartz S Jr. BRAF mutations characterize colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency. *Oncogene*. 2003; 22(57): 9192-6.
- Olschwang S, Hamelin R, Laurent-Puig P, Thuille B, De Rycke Y, Li YJ, Muzeau F, Girodet J, Salmon RJ & Thomas G. Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997; 94: 12122-27.
- Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T & Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1999; 59(13): 3128-33.
- Ormandy LA, Hillemann T, Wedemeyer H, Manns MP, Greten TF & Korangy F. Increased populations of regulatory T cells in peripheral blood of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2005; 65: 2457-64.
- Pagès F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, Mlecnik B, Kirilovsky A, Nilsson M, Damotte D, Meatchi T, Bruneval P, Cugnenc PH, Trajanoski Z, Fridman WH & Galon J. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2005; 353: 2654-66.
- Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, Lagorce C, Wind P, Marliot F, Bruneval P, Zatloukal K, Trajanoski Z, Berger A, Fridman WH & Galon J. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 5944-51.
- Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Tartour E, Sautès-Fridman C & Fridman WH. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene*. 2010; 29: 1093-102.
- Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary coloncancer. *Science*. 1994; 263: 1625-29.
- 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: 1227-36.
- Parsons R, Myeroff LL, Liu B, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW & Vogelstein B. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1995; 55: 5548-50.
- Paschen A, Mendez RM, Jimenez P, Sucker A, Ruiz-Cabello F, Song M, Garrido F & Schadendorf D. Complete loss of HLA class I antigen expression on melanoma cells: a result of successive mutational events. *Int J Cancer*. 2003; 103: 759-67.
- Paschen A, Arens N, Sucker A, Greulich-Bode KM, Fonsatti E, Gloghini A, Striegel S, Schwinn N, Carbone A, Hildenbrand R, Cerwenka A, Maio M & Schadendorf D. The coincidence of chromosome 15 aberrations and b2m gene mutations is causative for the total loss of human leukocyte antigen class I expression in melanoma. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 3297-3305.
- Peltenburg LT & Schrier PI. Transcriptional suppression of HLA-B expression by c-Myc is mediated through the core promoter elements. *Immunogenetics*. 1994; 40(1): 54-61. PubMed PMID: 8206526.
- Peng W, Wang HY, Miyahara Y, Peng G & Wang RF. Tumor-associated galectin-3 modulates the function of tumor-associated T cells. *Cancer Res*. 2008; 68(17): 7228-36.

- Pérez B, Benitez R, Fernández MA, Oliva MR, Soto JL, Serrano S, Lo´pez Nevot MA, Garrido F. A new beta 2 microglobulin mutation found in a melanoma tumor cell line. *Tissue Antigens*. 1999; 53: 569-72
- Perucho M. Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nat Med*. 1996; 2 (6):630–631.
- Perucho M. Tumors with microsatellite instability: many mutations, targets and paradoxes. *Oncogene*. 2003; 22: 2223-35.
- Phillips SM, Banerjea A, Feakins R, Li SR, Bustin SA & Dorudi S. Tumour-infiltrating lymphocytes in colorectal cancer with microsatellite instability are activated and cytotoxic. *Br J Surg*. 2004; 91: 469–75.
- Pino MS & Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010^a; 138(6): 2059-72.
- Pino MS & Chung DC. Application of molecular diagnostics for the detection of Lynch syndrome. *Expert Rev Mol Diagn*. 2010^b; 10(5): 651-65
- Pitsikas P, Polosina YY & Cupples CG. Interaction between the mismatch repair and nucleotide excision repair pathways in the prevention of 5-azacytidine-induced CG-to-GC mutations in Escherichia coli. *DNA Repair*. 2009; 8: 354-59.
- Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:71.
- Prall F, Duhrkop T, Weirich V, Ostwald C, Lenz P, Nizze H & Barten M. Prognostic role of CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes in stage III colorectal cancer with and without microsatellite instability. *Human Path*. 2004; 35: 808-16.
- Qi L, Rojas JM & Ostrand-Rosenberg S. Tumor cells present MHC class II-restricted nuclear and mitochondrial antigens and are the predominant antigen presenting cells in vivo. *J Immunol*. 2000; 165: 5451-61.
- Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B & Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*. 2002; 418(6901): 934.
- Rajagopalan H. & Lengauer C. CIN-ful cancers. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2004; 54, S65–S68.
- 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: 967-69.
- Raut CP, Pawlik TM & Rodriguez-Bigas MA. Clinicopathologic features in colorectal cancer patients with microsatellite instability. *Mutat Res*. 2004; 568: 275–82.
- Real LM, Jimenez P, Kirkin A, Serrano A, García A, Cantón J, Zeuthen J, Garrido F & Ruiz-Cabello F. Multiple mechanisms of immune evasion can coexist in melanoma tumor cell lines derived from the same patient. *Cancer Immunol Immunother*. 2001; 49(11): 621-8.
- Reckamp KL, Krysan K, Morrow JD, Milne GL, Newman RA, Tucker C, Elashoff RM, Dubinett SM & Figlin RA. A phase I trial to determine the optimal biological dose of celecoxib when combined with erlotinib in advanced non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2006; 12: 3381-88.
- Restifo NP, Marincola FM, Kawakami Y, Taubenberger J, Yannelli JR, Rosenberg SA. Loss of functional beta 2-microglobulin in metastatic melanomas from five patients receiving immunotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88: 100
- Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, & Gallinger S. Tumor microsatellite-instability status as a

- predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* . 2003; 349: 247–57.
- Ripberger E, Linnebacher M, Schwitalle Y, Gebert J & von Knebel Doeberitz M. Identification of an HLA-A0201-restricted CTL epitope generated by a tumor-specific frameshift mutation in a coding microsatellite of the OGT gene. *J Clin Immunol*. 2003; 23: 415-23.
- Risio M, Reato G, di Celle PF, Fizzotti M, Rossini FP & Foà R. Microsatellite instability is associated with the histological features of the tumor in nonfamilial colorectal cancer. *Cancer Res*. 1996, 56: 5470-74.
- Rodriguez PC, Hernandez CP, Quiceno D, Dubinett SM, Zabaleta J, Ochoa JB, Gilbert J & Ochoa AC. Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma. *J Exp Med*. 2005; 202: 931-39.
- Rodriguez T, Mendez R, del Campo A, Jimenez P, Aptsiauri N, Garrido F & Ruiz-Cabello F. Distinct mechanisms of loss of IFN-gamma mediated HLA class I inducibility in two melanoma cell lines. *BMC Cancer*. 2007; 7: 34
- Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L & Srivastava S. A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89(23): 1758-62.
- Romero P, Valmori D, Pittet MJ, Zippelius A, Rimoldi D, Levy F, Dutoit V, Ayyoub M, Rubio-Godoy V, Michielin O, Guillaume P, Batard P, Luescher IF, Lejeune F, Liénard D, Rufer N, Dietrich PY, Speiser DE & Cerottini JC. Antigenicity and immunogenicity of Melan-A/MART-1 derived peptides as targets for tumor reactive CTL in human melanoma. *Immunol Rev*. 2002; 188: 81-96.
- Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K & Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev*. 2006; 212: 28-50.
- Roncucci L, Fante R, Losi L, Di Gregorio C, Micheli A, Benatti P, Madenis N, Ganazzi D, Cassinadri MT, Lauriola P & Ponz de Leon M. Survival for colon and rectal cancer in a population-based cancer registry. *Eur J Cancer*. 1996; 32A:295-302.
- Ropero S, Fraga MF, Ballestar E, Hamelin R, Yamamoto H, Boix-Chornet M, Caballero R, Alaminos M, Setien F, Paz MF, Herranz M, Palacios J, Arango D, Orntoft TF, Aaltonen LA, Schwartz S Jr & Esteller M. A truncating mutation of HDAC2 in human cancers confers resistance to histone deacetylase inhibition. *Nat Genet*. 2006; 38: 566-69.
- Ropponen KM, Eskelinen MJ, Lipponen PK, Alhava E & Kosma VM. Prognostic value of tumour-infiltrating lymphocytes (TILs) in colorectal cancer. *J Pathol*. 1997; 182: 318-24.
- Rüschoff J, Dietmaier W, Luttges J, Seitz G, Bocker T, Zimgibl H, Schlegel J, Schackert HK, Jauch KW & Hofstaedter F. Poorly differentiated colonic adenocarcinoma, medullary type. Clinical, phenotypic and, molecular characteristics. *Am J Pathol*. 1997; 150: 1815-25.
- Rustgi AK. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev*. 2007; 21(20): 2525-38
- Saeterdal I, Bjørheim J, Lislud K, Gjertsen MK, Bukholm IK, Olsen OC, Nesland JM, Eriksen JA, Møller M, Lindblom A & Gaudernack G. Frameshift-mutation-derived peptides as tumor-specific antigens in inherited and spontaneous colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001; 98: 13255-60.
- Salahshor S, Kressner U, Fischer H, Lindmark G, Glimelius B, Pahlman L, et al. Microsatellite instability in sporadic colorectal cancer is not an independent prognostic factor. *Br J Cancer*. 1999; 81: 190-3.

- Salahshor S, Koelble K, Rubio C & Lindblom A. Microsatellite instability and hMLH1 and hMSH2 expression analysis in familial and sporadic colorectal cancer. *Lab Invest.* 2001; 81: 535-41.
- Salvesen HB & Akslen LA. Significance of tumour-associated macrophages, vascular endothelial growth factor and thrombospondin-1 expression for tumour angiogenesis and prognosis in endometrial carcinomas. *Int J Cancer.* 1999; 84: 538-43.
- Samowitz WS, Slattery ML & Kerber RA. Microsatellite instability in human colonic cancer is not a useful indicator of familial colorectal cancer. *Gastroenterology.* 1995; 109: 1765-71.
- Samowitz WS, Holden JA, Curtin K, Edwards SL, Walker AR, Lin HA, Robertson MA, Nichols MF, Gruenthal KM, Lynch BJ, Leppert MF & Slattery ML. Inverse relationship between microsatellite instability and K-ras and p53 gene alterations in colon cancer. *Am J Pathol.* 2001^a; 158(4): 1517-24.
- Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Schaffer D, Coleman LW, Leppert M & Slattery ML. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001^b; 10: 917-23
- Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA, Wolff RK & Slattery ML. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology.* 2005; 129(3): 837-45.
- Sandel MH, Speetjens FM, Menon AG, Albertsson PA, Basse PH, Hokland M, Nagelkerke JF, Tollenaar RA, van de Velde CJ, Kuppen PJ. Natural killer cells infiltrating colorectal cancer and MHC class I expression. *Mol Immunol.* 2005; 42:541-46
- Sanjuan X, Fernandez PL, Castells A, Castronovo V, van den Brule F, Liu FT, Cardesa A & Campo E. Differential expression of galectin 3 and galectin 1 in colorectal cancer progression. *Gastroenterology.* 1997; 113: 1906-15.
- Schmielau J & Finn OJ. Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients. *Cancer Res.* 2001; 61: 4756-60.
- Schoen RE. The case for population-based screening for colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2: 65-70.
- Schwitalle Y, Linnebacher M, Ripberger E, Gebert J & von Knebel Doeberitz M. Immunogenic peptides generated by frameshift mutations in DNA mismatch repair deficient cancer cells. *Cancer Immun.* 2004; 4: 14.
- Schwitalle Y, Kloor M, Eiermann S, Linnebacher M, Kienle P, Knaebel HP, Tariverdian M, Benner A & von Knebel Doeberitz M. Immune response against frameshift-induced neopeptides in HNPCC patients and healthy HNPCC mutation carriers. *Gastroenterology.* 2008; 134: 988-97.
- Seliger B, Maeurer MJ & Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunol Today.* 2000; 21: 455-64.
- Seliger B, Cabrera T, Garrido F & Ferrone S: HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells. *Semin Cancer Biol.* 2002; 12: 3-13.
- Seliger B, Atkins D, Bock M, Ritz U, Ferrone S, Huber C & Storkel S. Characterization of human lymphocyte antigen class I antigen-processing machinery defects in renal cell carcinoma lesions with special emphasis on transporter- associated with antigen-processing down-Regulation. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 1721-27.

- Seliger B, Ruiz-Cabello F & Garrido F. IFN inducibility of major histocompatibility antigens in tumors. *Adv Cancer Res.* 2008; 101: 249-76
- Serafini P, Borrello I & Bronte V. Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression. *Semin Cancer Biol.* 2006; 16: 53-65.
- Serrano A, Brady CS, Jimenez P, Duggan-Keen MF, Mendez R, Stern P, Garrido F & Ruiz-Cabello F. A mutation determining the loss of HLA-A2 antigen expression in a cervical carcinoma reveals novel splicing of human MHC class I classical transcripts in both tumoral and normal cells. *Immunogenetics.* 2000; 51(12): 1047-52.
- Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, Mendez R, Traversari C, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Reexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *Int J Cancer.* 2001; 94: 243-51
- Shawar SM, Vyas JM, Rodgers JR & Rich RR. Antigen presentation by major histocompatibility complex class I-B molecules. *Annu Rev Immunol.* 1994; 12: 839-80.
- Shen L & Rock KL. Priming of T cells by exogenous antigen cross-presented on MHC class I molecules. *Curr Opin Immunol.* 2006; 18(1): 85-91.
- Sheu BC, Hsu HN, Ho RH, Lin RH, Torng PL & Huang SC. Reversed CD4/CD8 percentages of tumor-infiltrating lymphocytes correlate with disease progression in human cervical cancer. *Cancer.* 1999; 86: 1537-43.
- Shi F, Shi M, Zeng Z, Qi RZ, Liu ZW, Zhang JY, Yang YP, Tien P & Wang FS. PD-1 and PDL-1 upregulation promotes CD8(+) T-cell apoptosis and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma patients. *Int J Cancer.* 2011; 128(4): 887-96.
- Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn.* 2008; 10(4): 293-300.
- Shih IM, Zhou W, Goodman SN, Lengauer C, Kinzler KW & Vogelstein B.. Evidence that genetic instability occurs at an early stage of colorectal tumorigenesis. *Cancer Res.* 2001; 61: 818-822.
- Shin KH, Park YJ & Park JG. Mutational analysis of the transforming growth factor beta receptor type II gene in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and early-onset colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(2): 536-40.
- Shivarov V, Shinkura R, Doi T, Begum NA, Nagaoka H, Okazaki IM, Ito S, Nonaka T, Kinoshita K & Honjo T. Molecular mechanism for generation of antibody memory. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009; 364: 569-75
- Sica A, Larghi P, Mancino A, Rubino L, Porta C, Totaro MG, Rimoldi M, Biswas SK, Allavena P & Mantovani A. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol.* 2008^a; 18(5): 349-55.
- Sica A, Allavena P & Mantovani A. Cancer related inflammation: the macrophage connection. *Cancer Lett.* 2008^b; 267(2): 204-15.
- Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinemann K, Fidalgo P, Phillips RK, Bisgaard ML, Orntoft TF, Aaltonen LA, Hodgson SV, Thomas HJ & Tomlinson IP . Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med.* 2003; 348(9): 791-9.
- Sinha P, Clements VK, Fulton AM & Ostrand-Rosenberg S. Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells. *Cancer Res.* 2007^a; 67: 4507-13.

- Sinha P, Clements VK, Bunt SK, Albelda SM & Ostrand-Rosenberg S. Cross-talk between myeloid- derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol.* 2007^b; 179: 977-83.
- Sinicrope FA & Sargent DJ. Clinical implications of microsatellite instability in sporadic colon cancers. *Curr Opin Oncol.* 2009; 21: 369-73.
- Smyrk TC, Watson P, Kaul K & Lynch HT. Tumor- infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. *Cancer.* 2001; 91: 2417-22.
- Somasundaram R, Jacob L, Swoboda R, Caputo L, Song H, Basak S, Monos D, Peritt D, Marincola F, Cai D, Birebent B, Bloome E, Kim J, Berencsi K, Mastrangelo M, Herlyn D. Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor- β . *Cancer Res.* 2002; 62: 5267-72.
- Soong TW & Hui KM. Locus-specific transcriptional control of HLA genes. *J Immunol.* 1992; 149(6): 2008-20.
- Söreide K, Janssen EA, Söiland H, Körner H, Baak JP. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Br J Surg.* 2006; 93(4):395-406
- 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(3): 255-7.
- Stewart TH & Tsai S. The possible role of stromal cell stimulation in worsening the prognosis of a subset of patients with breast cancer. *Clin Expt Metastasis.* 1993; 11: 295-305.
- Stewart TJ, Greenelch KM, Lutsiak ME & Abrams SI. Immunological responses can have both pro- and antitumour effects: implications for immunotherapy. *Exp Rev Mol Med.* 2007; 9: 1-20.
- Stewart TJ & Abrams SI. How tumours escape mass destruction. *Oncogene.* 2008; 27: 5894-5903.
- Storojeva I, Boulay J, Heinimann K, Ballabeni P, Terracciano L, Laffer U, et al. Prognostic and predictive relevance of microsatellite instability in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 2005; 14: 241-9.
- Swann JB & Smyth MJ. Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 2007; 117: 1137-46.
- Takaishi S & Wang TC. Providing AID to p53 mutagenesis. *Nat Med.* 2007; 13(4): 404-6.
- Tang R, Changchien CR, Wu MC, Fan CW, Liu KW, Chen JS, Chien HT & Hsieh LL. Colorectal cancer without high microsatellite instability and chromosomal instability--an alternative genetic pathway to human colorectal cancer. *Carcinogenesis.* 2004; 25(5):841-6
- Teng MW, Swann JB, Koebel CM, Schreiber RD & Smyth MJ. Immune-mediated dormancy: an equilibrium with cancer. *J Leukoc Biol.* 2008; 84(4): 988-93.
- Terabe M, Matsui S, Park JM, Mamura M, Noben-Trauth N, Donaldson DD, Chen W, Wahl SM, Ledbetter S, Pratt B, Letterio JJ, Paul WE & Berzofsky JA. Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte- mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence. *J Exp Med.* 2003; 198: 1741-52.
- Thibodeau SN, Bren G & Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 1993; 260: 816-19.
- Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, Tester D, Burgart LJ, Roche PC, McDonnell SK, Schaid DJ, Vockley CW, Michels VV, Fair GH Jr, & O'Connell MJ. Microsatellite instability in colorectal

- cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH 1. *Cancer Res.* 1998; 58: 1713-18.
- Thomas DA & Massague J. TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance. *Cancer Cell.* 2005; 8: 369-80.
- Thomas L. Delayed hypersensitivity in health and disease. In: Lawrence, HS., editor. Cellular and Humoral Aspects of the Hypersensitive States. Hoeber-Harper; New York: 1959. p. 529-532.
- Thompson RH, Kuntz SM, Leibovich BC, Dong H, Lohse CM, Webster WS, Sengupta S, Frank I, Parker AS, Zincke H, Blute ML, Sebo TJ, Cheville JC & Kwon ED. Tumor B7-H1 is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma patients with long-term follow-up. *Cancer Res.* 2006; 66: 3381-85.
- Tikidzhieva A, Benner A, Michel S, Formentini A, Link K-H, Dippold W, von Knebel Doeberitz M, Kornmann M & Kloor M. Microsatellite instability and beta2-microglobulin mutations as prognostic markers in colon cancer: results of the FOGT-4 trial. *Br J Cancer.* 2012; 106: 1239-45
- Titu LV, Monson JR & Greenman J. The role of CD8(+) T cells in immune responses to colorectal cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2002; 51: 235-47.
- Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC, Torlakovic G & Nesland JM. Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol.* 2003; 27(1): 65-81.
- Torres MJ, Ruiz-Cabello F, Skoudy A, Berrozpe G, Jimenez P, Serrano A, Real FX & Garrido F. Loss of an HLA haplotype in pancreas cancer tissue and its corresponding tumor derived cell line. *Tissue Antigens.* 1996; 47: 372-81.
- Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB & Issa JP. CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999^a; 96(15): 8681-6.
- Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair KW, Li Q, Ohe-Toyota M, Baylin SB & Issa JP. Identification of differentially methylated sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Res.* 1999^b; 59:2307-12.
- Trautmann K, Terdiman JP, French AJ, Roydasgupta R, Sein N, Kakar S, Fridlyand J, Snijders AM, Albertson DG, Thibodeau SN, Waldman FM. Chromosomal instability in microsatellite-unstable and stable colon cancer. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(21): 6379-85.
- Tsao JL, Yatabe Y, Salovaara R, Järvinen HJ, Mecklin JP, Aaltonen LA, Tavaré S & Shibata D. Genetic reconstruction of individual colorectal tumor histories. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(3): 1236-41
- Tuppurainen K, Mäkinen JM, Junttila O, Liakka A, Kyllönen AP, Tuominen H, Karttunen TJ & Mäkinen MJ. Morphology and microsatellite instability in sporadic serrated and non-serrated colorectal cancer. *J Pathol.* 2005; 207(3): 285-94.
- Tuupanen S, Karhu A, Järvinen H, Mecklin JP, Launonen V & Aaltonen LA. No evidence for dual role of loss of heterozygosity in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Oncogene.* 2007; 26(17): 2513-7.
- Vakkila J & Lotze MT. Inflammation and necrosis promote tumour growth. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4: 641-48.
- Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM & Lynch HT. The international collaborative group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum.* 1991; 34(5):424- 25.
- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP & Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the international collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology.* 1999; 116(6): 1453- 56.

- Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD & Markowitz SD. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95: 8698–02
- Vogt L, Schmitz N, Kurrer MO, Bauer M, Hinton HI, Behnke S, Gatto D, Sebbel P, Beerli RR, Sonderegger I, Kopf M, Saudan P et al. VSIG4, a B7 family related protein, is a negative regulator of T cell activation. *J Clin Invest*. 2006; 116: 2817-26.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr & Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013; 339(6127): 1546-58
- Wahlberg SS, Schmeits J, Thomas G, Loda M, Garber J, Syngal S, Kolodner RD & Fox E. Evaluation of microsatellite instability and immunohistochemistry for the prediction of germ-line MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res*. 2002; 62: 3485-92.
- Waldner M, Schimanski CC, Neurath MF. Colon cancer and the immune system: the role of tumor invading T cells. *World J Gastroenterol*. 2006 ; 12(45): 7233-8
- Wang C, van Rijnsoever M, Grieu F, Bydder S, Elsaleh H, Joseph D, et al. Prognostic significance of microsatellite instability and Ki-ras mutation type in stage II colorectal cancer. *Oncology*. 2003; 64: 259-65.
- Wang J, Sun L, Myeroff L, Wang X, Gentry LE, Yang J, Liang J, Zborowska E, Markowitz S, Willson JK & Brattain MG. Demonstration that mutation of the type II transforming growth factor receptor inactivates its tumor suppressor activity in replication error-positive colon carcinoma cells. *J Biol Chem*. 1995; 270: 22044–49.
- Wang L, Cunningham JM, Winters JL, Guenther JC, French AJ, Boardman LA, Burgart LJ, McDonnell SK, Schaid DJ & Thibodeau SN. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res*. 2003; 63(17): 5209-12.
- Wang T, Niu G, Kortylewski M, Burdelya L, Shain K, Zhang S, Bhattacharya R, Gabrilovich D, Heller R, Coppola D, Dalton W, Jove R, Pardoll D & Yu H. Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. *Nat Med*. 2004; 10: 48-54.
- Wang Z, Cummins JM, Shen D, Cahill DP, Jallepalli PV, Wang TL, Parsons DW, Traverso G, Awad M, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Willson JK, Markowitz SD, Goldberg ML, Karess R, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE & Lengauer C. Three classes of genes mutated in colorectal cancers with chromosomal instability. *Cancer Res*. 2004; 64: 2998-3001.
- Watson NF, Ramage JM, Madjd Z, Spendlove I, Ellis IO, Scholefield JH, Durrant LG. Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis. *Int J Cancer*. 2006; 118: 6-10.
- Watson P, Lin KM, Rodriguez-Bigas MA, Smyrk T, Lemon S, Shashidharan M, Franklin B, Karr B, Thorson A & Lynch HT. Colorectal Carcinoma Survival among Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma Family Members. *Cancer*. 1998; 83: 259-66
- Wei S, Kryczek I & Zou W. Regulatory T-cell compartmentalization and trafficking. *Blood*. 2006; 108(2): 426-31.
- Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science*. 1991; 254: 1138–1146.

- Wheeler JM, Loukola A, Aaltonen LA, Mortensen NJ & Bodmer WF. The role of hypermethylation of the *hMLH1* promoter region in HNPCC versus MSI+ sporadic colorectal cancers. *J Med Genet.* 2000; 37: 588-92.
- Whitehall VL, Walsh MD, Young J, Leggett BA & Jass JR. Methylation of O-6-methylguanine DNA methyltransferase characterizes a subset of colorectal cancer with low-level DNA microsatellite instability. *Cancer Res.* 2001; 61(3):827-30.
- Whiteside TL. Tumor Infiltrating Lymphocytes in Human Malignancies. Medical Intelligence Unit. 1993; R.G. Landes Co.:Austin, TX.
- Whiteside TL, Vujanovic NL & Herberman RB. Natural killer cells and tumor therapy. *Curr Topics Microbiol Immunol.* 1998; 230: 221-44.
- Whiteside TL. Immune suppression in cancer: effects on immune cells, mechanisms and future therapeutic intervention. *Semin Cancer Biol.* 2006; 16: 3-15.
- Whiteside TL. The Local Tumor Microenvironment. In: Kaufmann H, Wolchok JD (eds). General Principles of Tumor Immunotherapy: Basic and Clinical Applications of Tumor Immunology. 2007 Springer, pp 145–167.
- Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogen.* 2008; 27(45):5904-12.
- Witkin EM & Sicurella NA. Pure clones of lactose-negative mutants obtained in escherichia coli after treatment with 5-bromouracil. *J Mol Biol.* 1964; 8:610-13
- Woerner SM, Benner A, Sutter C, Schiller M, Yuan YP, Keller G, Bork P, Doeberitz MK & Gebert JF. Pathogenesis of DNA repair-deficient cancer: a statistical meta-analysis of putative Real Common Target genes. *Oncogene.* 2003; 22(15): 2226- 35.
- Woerner SM, Kloor M, Mueller A, Rueschoff J, Friedrichs N, Buettner R, Buzello M, Kienle P, Knaebel HP, Kunstmann E, Pagenstecher C, Schackert HK, et al. Microsatellite instability of selective target genes in HNPCC-associated colon adenomas. *Oncogene.* 2005; 24: 2525-35.
- Woerner SM, Yuan YP, Benner A, Korff S, von Knebel Doeberitz M & Bork P. SelTarbase, a database of human mononucleotide microsatellite mutations and their potential impact to tumorigenesis and immunology. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38
- Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR & June CH. Regulatory CD4+CD25+ T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 4766-72.
- Wood LD, Parsons DW, Jones S, Lin J, Sjöblom T, Leary RJ, Shen D, Boca SM, Barber T, Ptak J, Silliman N, Szabo S, Dezso Z, Ustyanksky V, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Karchin R, Wilson PA, Kaminker JS, Zhang Z, Croshaw R, Willis J, Dawson D, Shipitsin M, Willson JK, Sukumar S, Polyak K, Park BH, Pethiyagoda CL, Pant PV, Ballinger DG, Sparks AB, Hartigan J, Smith DR, Suh E, Papadopoulos N, Buckhaults P, Markowitz SD, Parmigiani G, Kinzler KW, Velculescu VE & Vogelstein B. The genomic landscapes of human breast and colorectal cancers. *Science.* 2007; 318: 1108–13.
- Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ & Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol.* 2007; 13: 3784–9.
- Wynter CV, Walsh MD, Higuchi T, Leggett BA, Young J & Jass JR. Methylation patterns define two types of hyperplastic polyp associated with colorectal cancer. *Gut.* 2004; 53(4): 573-80.

- Wynter CV, Kambara T, Walsh MD, Leggett BA, Young J & Jass JR. DNA methylation patterns in adenomas from FAP, multiple adenoma and sporadic colorectal carcinoma patients. *Int J Cancer*. 2006; 118(4): 907-15.
- Yamamoto H, Sawai H & Perucho M. Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res*. 1997; 57:4420-26.
- Yamamoto H, Yamashita K & Perucho M. Somatic mutation of the b2-microglobulin gene associates with unfavorable prognosis in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Gastroenterology*. 2001; 120: 1565-7.
- Yang H, Dithmar S & Grossniklaus HE. Interferon alpha 2b decreases hepatic micrometastasis in a murine model of ocular melanoma by activation of intrinsic hepatic natural killer cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004; 45: 2056-64.
- Yang J & Yi Q. Killing tumor cells via their surface β 2M or MHC class I molecules. *Cancer*. 2010; 116(7): 1638-45.
- Yang L, DeBusk LM, Fukuda K, Fingleton B, Green-Jarvis B, Shyr Y, Matrisian LM, Carbone DP & Lin PC. Expansion of myeloid immune suppressor Gr⁺CD11b⁺ cells in tumor-bearing host directly promotes tumor angiogenesis. *Cancer Cell*. 2004; 6: 409-21.
- Yang S, Farraye FA, Mack C, Posnik O & O'Brien MJ. BRAF and KRAS mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status. *Am J Surg Pathol*. 2004; 28(11): 1452-9.
- Yashiro M, Hirakawa K & Boland R. Research article Mutations in TGFbeta-RII and BAX mediate tumor progression in the later stages of colorectal cancer with microsatellite instability. *BMC Cancer*. 2010; 10: 303
- Youn JI, Nagaraj S, Collazo M, Gabrilovich DI. Subsets of myeloid-derived suppressor cells in tumor-bearing mice. *J Immunol*. 2008 Oct 15;181(8):5791-802.
- Young J, Simms LA, Biden KG, Wynter C, Whitehall V, Karamatic R, George J, Goldblatt J, Walpole I, Robin SA, Borten MM, Stitz R, Searle J, McKeone D, Fraser L, Purdie DR, Podger K, Price R, Buttenshaw R, Walsh MD, Barker M, Leggett BA & Jass JR. Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol*. 2001; 159: 2107–16.
- Yu B, Zhang W. Down-regulation of CD3zeta is a breast cancer biomarker associated with immune suppression. *Cell Biol Int*. 2011; 35(2):165-9
- Yu F, Finley RL Jr., Raz A & Kim HR. Galectin-3 translocates to the perinuclear membranes and inhibits cytochrome c release from the mitochondria. A role for synexin in galectin-3 translocation. *J Biol Chem*. 2002; 277: 15819-27.
- Yu H, Kortylewski M & Pardoll D. Crosstalk between cancer and immune cells: role of STAT3 in the tumour microenvironment. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7: 41-51.
- Zea AH, Rodriguez PC, Atkins MB, Hernandez C, Signoretti S, Zabaleta J, McDermott D, Quiceno D, Youmans A, O'Neill A, Mier J & Ochoa AC. Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion. *Cancer Res*. 2005; 65: 3044-48.
- Zitvogel L, Tesniere A & Kroemer G. Cancer despite immuno-surveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol*. 2006; 6: 715-27.

Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat Rev Cancer*. 2005; 5(4): 263-74.

