

**CÀNCER COLORECTAL HEREDITARI:
APLICACIONS DIAGNÒSTIQUES DE
L'ESTUDI DE LA DOSI DELS GENS *APC*,
MLH1 I *MSH2***

Ester Castellsagué Torrents

2009

**CÀNCER COLORECTAL HEREDITARI: APLICACIONS
DIAGNÒSTIQUES DE L'ESTUDI DE LA DOSI DELS GENS *APC*,
MLH1 I *MSH2***

Memòria presentada per
Ester Castellsagué Torrents

Per optar al Grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció del
Dr. Gabriel Capellá Munar
al Institut Català d'Oncologia del
Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge
(ICO-IDIBELL)

Tesi adscrita al Departament de Genètica
de la Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona (**UB**)
Programa de Doctorat de Genètica. Bienni 2004-2006
Tutor: **Daniel Grinberg Vaisman**

Gabriel Capellá Munar

Daniel Grinberg Vaisman

Ester Castellsagué Torrents

Barcelona, 2009

Amb el suport del Comissionat per a Universitats i Recerca del Departament d'Innovació,
Universitats i Empresa de la Generalitat de Catalunya i del Fons Social Europeu

ÍNDEX

ÍNDEX	i
ABREVIATURES	v
INTRODUCCIÓ	1
1. BASES MOLECULARS DEL CÀNCER	3
- <i>L'escenari</i>	3
- <i>Els actors</i>	6
- <i>L'argument</i>	7
- <i>Panorama actual</i>	8
2. INTRODUCCIÓ AL CÀNCER COLORECTAL	10
- <i>Epidemiologia, tractament i presentació</i>	10
- <i>Biologia de l'epiteli colònic, un ambient en constant moviment</i>	12
- <i>La via de Wnt en l'epiteli intestinal i en el càncer colorectal</i>	14
- <i>La seqüència epiteli normal-adenoma-carcinoma, d'un model lineal a un model més complex</i>	16
- <i>APC, el guardià del tracte intestinal</i>	19
- <i>MSH2 i MLH1 com a cuidadors del genoma intestinal</i>	21
3. ETIOLOGIA DEL CÀNCER COLORECTAL	24
- <i>Efecte de l'ambient en el CCR</i>	24
- <i>Sondejant el panorama genètic del CCR</i>	25
4. CLASSIFICACIÓ DEL CÀNCER COLORECTAL	28
- <i>CCR esporàdic</i>	29
- <i>CCR familiar</i>	29
- <i>CCR hereditari</i>	29
- <i>Síndrome de Lynch o CCR hereditari no polipós (HNPCC)</i>	30
- <i>Poliposi adenomatosa familiar clàssica (FAP) i atenuada (AFAP)</i>	34
- <i>Poliposi associada a MUTYH (MAP)</i>	37
- <i>Poliposis hamartomatoses</i>	38
- <i>El consell genètic</i>	38
5. PAPER DE LA DOSI A NIVELL GERMINAL EN EL CÀNCER COLORECTAL	40
- <i>La dosi a nivell de DNA: grans reordenaments</i>	40
- <i>La dosi a nivell d'RNA: expressió en la línia germinal</i>	41
HIPÒTESI	43
OBJECTIUS	47

RESULTATS	51
ARTICLE 1: Detecció i caracterització de grans reordenaments de <i>MSH2</i> i <i>MLH1</i> en famílies amb síndrome de Lynch	55
ARTICLE 2: Limfoma no Hodgkin relacionat a càncer colorectal hereditari no polipós en un pacient amb una nova deleció complexa en heterozigosi en el gen <i>MHS2</i>	73
ARTICLE 3: Detecció de deleccions en el gen <i>APC</i> usant la PCR quantitativa múltiplex de fragments curts fluorescents	83
ARTICLE 4: Expressió específica d'al·lel del gen <i>APC</i> en famílies de poliposi adenomatosa	101
DISCUSSIÓ	115
CONCLUSIONS	133
BIBLIOGRAFIA	137
ANEX	155
Informes del director	157

ABREVIATURES

AA	Aminoàcid
AFAP	Poliposi adenomatosa familiar atenuada
ASE	Expressió específica d'al·lel
BER	<i>Base excision repair</i>
CCR	Càncer colorectal
cDNA	DNA complementari
CIN	Inestabilitat cromosòmica
CSCE	<i>Conformation sensitive capillary electrophoresis</i>
DGGE	<i>Denaturing gradient gel electrophoresis</i>
DHPLC	<i>Denaturing high-performance liquid chromatography</i>
DNA	Àcid desoxiribonucleic
FAP	Poliposi adenomatosa familiar
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
GWA	<i>Genome-wide association</i>
HNPCC	Càncer colorectal hereditari no polipós
kDa	Quilodaltons
LR-PCR	<i>Long range-PCR</i>
MAP	Poliposi associada a <i>MUTYH</i>
MCR	<i>Mutation cluster region</i>
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
mRNA	Àcid ribonucleic missatger
MSI	Inestabilitat de microsatèl·lits (MSI-, sense MSI. MSI+, amb MSI)
NES	<i>Nuclear export signals</i>
NMD	<i>Nonsense mediated mRNA decay</i>
PAF	<i>Population Attributable Fraction</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PTC	Codon stop prematur
QMPSF	<i>Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments</i>
RNA	Àcid ribonucleic
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SNuPE	<i>Single nucleotide primer extension analysis</i>
wt	<i>Wild type</i>

INTRODUCCIÓ

1. BASES MOLECULARS DEL CÀNCER

Anomenem càncer al grup de malalties que poden afectar qualsevol part del cos i que deriven de la replicació ràpida i descontrolada d'un grup de cèl·lules formant un tumor. Aquestes, poden disseminar i envair altres òrgans en el que es coneix com a metàstasi i que és la causa del 90% de morts per càncer.

L'escenari

Hannahan i Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000) van suggerir que existeixen un conjunt de canvis moleculars, bioquímics i cel·lulars, adquirits i compartits per la majoria o tots els tipus de càncers humans. Van enumerar fins a sis capacitats adquirides durant el desenvolupament tumoral que, conjuntament, dicten el creixement maligne dels tumors (Figura 1) i que constitueixen el focus de la recerca actual en càncer:

- Autosuficiència en senyals de creixement: Cap cèl·lula en una situació de normalitat pot proliferar en absència de senyals de creixement que es transmeten a través de receptors de membrana cap a l'interior cel·lular. Les cèl·lules tumorals s'alliberen d'aquesta dependència de senyals exògens trencant l'homeòstasi amb el teixit. Molecularment, això es dona mitjançant l'alteració de factors de creixement extracel·lulars (adquisició de l'habilitat de sintetitzar els propis factors de creixement creant un *feed-back* positiu o estimulació autocrina, per exemple el TGF α en sarcomes), l'alteració de transductors de membrana d'aquests senyals (mutació o sobreexpressió de molts receptors de membrana que s'uneixen a aquests factors de creixement, per exemple EGF-F/*erbB* o HER2/*neu*), o l'alteració dels circuits intracel·lulars que tradueixen els senyals (alteracions estructurals de proteïnes de les cascades de senyalització com SOS-Ras-Raf-MAPK).
- Insensibilitat a senyals d'inhibició del creixement: En un teixit normal, aquests senyals mantenen la quiescència cel·lular i l'homeòstasi dels teixits gràcies a receptors de membrana acoblats a circuits de senyalització intracel·lular. Bloquegen la proliferació portant les cèl·lules o bé a un estat quiescent (G0), o bé a un estat post-mitòtic associat a diferenciació específica. Els circuits que permeten respondre a aquests senyals estan relacionats majoritàriament amb el control del cicle cel·lular. Les cèl·lules tumorals han d'evadir aquests

senyals per poder proliferar. Un exemple serien les alteracions dels gens involucrats en la via de senyalització de la proteïna del retinoblastoma (pRb) que impliquen la insensibilitat a factors inhibidors del creixement.

- Evasió de l'apoptosi: L'habilitat de les poblacions cel·lulars tumorals d'expandir-se en nombre no només està determinada per la taxa de proliferació sinó també per la taxa de desgast. La mort cel·lular programada –apoptosi– representa la font principal d'aquest desgast que es dona com a conseqüència de danys cel·lulars. La resistència a l'apoptosi pot ser adquirida a través de diverses estratègies però la més comú és a través de mutacions en el gen *p53*, un component clau en la detecció de danys en el DNA cel·lular que indueix la cascada efectora apoptòtica.
- Potencial replicatiu il·limitat: A més de dependre del medi que les envolta, les cèl·lules tenen mecanismes intrínsecs que limiten el total de replicacions que poden fer. Un cop les cèl·lules arriben a un nombre determinat de divisions, aturen el seu creixement per entrar en senescència. L'escurçament dels telòmers en cada cicle de replicació és el que marca el nombre total de replicacions. Pràcticament tots els tumors adquireixen la capacitat de mantenir constant la mida dels seus telòmers aconseguint d'aquesta manera l'estat d'immortalització. La majoria de tumors ho fan mitjançant la sobreexpressió de la telomerasa.
- Manteniment de l'angiogènesi: Un tumor, com qualsevol teixit, necessita nutrients i oxigen dels vasos sanguinis per proliferar. Degut a aquesta dependència les cèl·lules tenen l'habilitat de promoure la formació i creixement de nous vasos sanguinis –angiogènesi–. Els tumors activen l'angiogènesi alterant la transcripció de certs gens com per exemple el *VEGF*, que actua com a senyal iniciador de l'angiogènesi.
- Invasió de teixits i metàstasi: Tard o d'hora en la progressió tumoral, algunes cèl·lules escapen del tumor primari i envaeixen nous teixits adjacents o distants on, si més no inicialment, nutrients i espai no són limitants. La funció de proteïnes relacionades amb l'adhesió cèl·lula-cèl·lula o cèl·lula-matriu extracel·lular com la E-cadherina es perd en la majoria de cèl·lules epitelials. A més a més, gens que codifiquen per proteases es sobreexpressen, inhibidors

de proteases s'infraexpressen, i formes inactives de proteases s'activen en les cèl·lules tumorals per poder colonitzar els teixits.

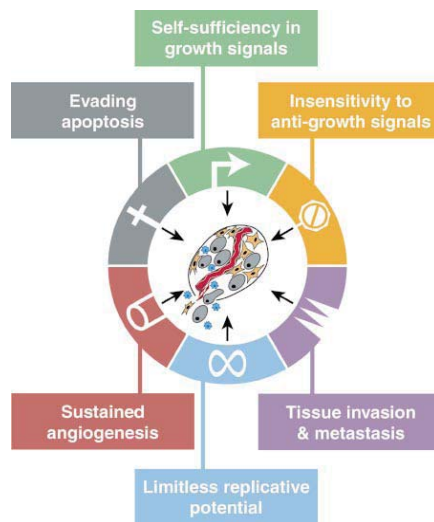


Figura 1. Capacitats adquirides del càncer.

Extret de Hanahan i Weinberg, 2000.

L'adquisició d'aquestes sis capacitats en el curs de la progressió tumoral crea un dilema. Per una banda, la majoria són adquirides, directament o indirectament, a través de canvis en el genoma de les cèl·lules cancerígenes, és a dir, a través de mutacions. Per l'altra, sabem que el genoma de les cèl·lules eucariotes, tot i estar sotmès a danys continus, manté equilibri homeostàtic gràcies al qual aquests danys es contraresten a través de múltiples mecanismes cel·lulars de reparació del DNA. Per tant, es postula que en les cèl·lules tumorals existeix un trencament d'aquest equilibri que resulta en l'acumulació de múltiples mutacions o el que es coneix com a fenotip mutador o inestabilitat genètica. Existeixen dos tipus d'aquesta inestabilitat: (i) Inestabilitat de microsatèl·lits (MSI): Comporta canvis subtils a la seqüència de DNA, tipus insercions o delecions. Aquesta inestabilitat es dona com a resultat d'una deficiència en el sistema de reparació d'errors simples d'aparellament o *mismatch repair* (per exemple, deficiències en els gens *MLH1* i *MSH2*); (ii) Inestabilitat cromosòmica (CIN): Comporta alteracions numèriques com aneuploidies i poliploidies que representen guanys i pèrdues de cromosomes sencers, o alteracions estructurals (amplificacions i delecions o translocacions i inversions). Aquesta inestabilitat es dona per mutacions de gens requerits en la segregació cromosòmica o recombinació mitòtica (per exemple, *APC*, *BRCA1* i *BLM*). Sembla que els dos tipus d'inestabilitat mantenen una relació exclouent en els tumors. El progressiu enriquiment en mutacions en aquests gens (mutacions mutadores) sumat a successives rondes de selecció seria el fet rellevant en la progressió tumoral (Loeb and Loeb, 2000) que permet la transformació de les cèl·lules cap a un comportament maligne.

Els actors

Com podem veure, quan parlem de càncer ens referim bàsicament a canvis dinàmics en el genoma, i és per això que considerem el càncer una malaltia genètica. Històricament, aquesta relació ja s'estableix cap als anys 70 quan es demostra que les radiacions i els carcinògens químics provoquen càncer a través de danys en el DNA (McCann and Ames, 1976; McCann, et al., 1975). Vogelstein i Kinzler (Vogelstein and Kinzler, 2004) van classificar els diferents tipus de gens dels quals hem parlat fins ara i que es veuen alterats, d'una forma o altra, durant la progressió tumoral, en tres grups:

- Oncogens: Són gens la funció dels quals acostuma a estar relacionada amb la regulació de la proliferació cel·lular ordenada, però que també regulen altres funcions claus de la cèl·lula. Les mutacions en aquests gens confereixen un guany de funció o una activació constitutiva que donarà lloc a un creixement descontrolat, invasivitat i malignitat de les cèl·lules. Poden ser oncogens aquells gens que codifiquen per a receptors de membrana amb activitat tirosinaquinasa, membres de vies de transducció de senyal, factors de transcripció o proteïnes implicades en el control del cicle cel·lular. La mutació en aquests tipus de gens té un efecte dominant; n'hi ha prou que el canvi afecti una de les dues còpies del gen per provocar dins la cèl·lula un avantatge de creixement. De forma il·lustrativa, podem comparar un oncogèn amb l'accelerador d'un cotxe. Quan aquest no està mutat el cotxe funciona normalment regulat per la pressió que es faci sobre l'accelerador. La mutació dels oncogens equivaldria a un encallament en l'accelerador, per tant, el cotxe continua avançant tot i treure'n el peu. Exemples d'oncogens són *RAS*, *MYC*, *SRC*, *EGFR* i *CCND1*.
- Gens supressors tumorals (*gatekeepers*): La funció principal d'aquests gens és la de controlar la proliferació cel·lular. A diferència dels oncogens, les mutacions en aquests gens redueixen l'activitat del seu producte. Aquests gens són de caràcter recessiu, és a dir, cal la inactivació d'ambdós al·lels per silenciar-los, tal i com va descriure Knudson en la seva hipòtesi del *two-hit* en el gen del retinoblastoma (Knudson, 1971). És per això, que mutacions heretades en un dels al·lels d'aquests gens, donen lloc a predisposicions hereditàries al càncer. Tot i això, també s'ha descrit que alguns gens supressors tumorals donen avantatge selectiu a la cèl·lula quan només un dels seus al·lels està inactivat (haploinsuficiència) (Santarosa and Ashworth, 2004). Per tant, podem

dir que els gens supressors tumorals són anàlegs als frens d'un cotxe, i la seva mutació equival a uns frens que no funcionen de forma que no es pot aturar el cotxe. Alguns exemples poden ser *APC*, *TP53* o *SMAD4*.

- Gens estabilitzadors (*caretakers*): Aquests gens van per una via diferent als oncogens i supressors tumorals, ja que la seva funció normal no està relacionada amb funcions de regulació de la proliferació sinó amb el manteniment de la integritat del genoma. La seva mutació implica un increment en l'acumulació de mutacions de la cèl·lula. Per tant, tots els gens poden ser afectats per la mutació d'aquests, però només mutacions en els dos tipus de gens que s'acaben de presentar afectaran el balanç net de creixement conferint un avantatge selectiu a les cèl·lules mutades. Normalment, també és necessària la inactivació dels dos al·lels perquè en resulti un efecte fisiològic. Com abans, l'herència de mutacions en heterozigosis dona lloc a síndromes hereditàries. En l'analogia amb els cotxes, aquests gens representarien la mecànica que permet que tot funcioni correctament. Alguns exemples són *MLH1*, *MSH2* i *BRCA1*.

Així doncs, podem relacionar els oncogens i els gens supressors tumorals amb les sis capacitats adquirides per les cèl·lules tumorals, i els gens estabilitzadors amb el fenotip mutador necessari perquè es puguin adquirir.

L'argument

Totes aquestes distincions, en part, ens serveixen per entendre que el càncer no es pot donar del dia a la nit. Per acumular tots aquests defectes i capacitats adquirides es necessita temps i un llarg procés escalonat que anomenem progressió tumoral, durant el qual els tumors augmenten la seva agressivitat clínica i biològica (Nowell, 2002). Aquesta definició prové dels anys 50 quan Foulds, per mitjà d'anàlisis patològics de tumors, va descriure el càncer com un procés a través del qual les cèl·lules evolucionen progressivament des de la normalitat, i passant per una sèrie d'estats premalignes, fins a tumors invasius (Foulds, 1957). Els camins que les cèl·lules agafen en el seu progrés cap a la malignitat són altament variables. Dins un mateix tipus de càncer, mutacions en certs gens només es poden trobar en un nombre determinat de tumors que, per altra banda, són histològicament idèntics. A més a més, mutacions en certs oncogens poden ser de les primeres alteracions en algunes vies de progressió tumoral i de les últimes en d'altres. Com a conseqüència, l'adquisició de les diferents

capacitats biològiques descrites pot aparèixer en diferents moments durant les diferents progressions tumorals. Per tant, la seqüència concreta en què les capacitats són adquirides pot variar molt, tant entre tumors del mateix tipus, com entre diferents tipus tumorals (Figura 2). A més, en certs tumors, un esdeveniment genètic concret pot contribuir només parcialment en l'adquisició d'una de les capacitats, mentre que en altres tumors, el mateix esdeveniment pot ajudar en l'adquisició simultània de diferents capacitats (Hanahan and Weinberg, 2000).

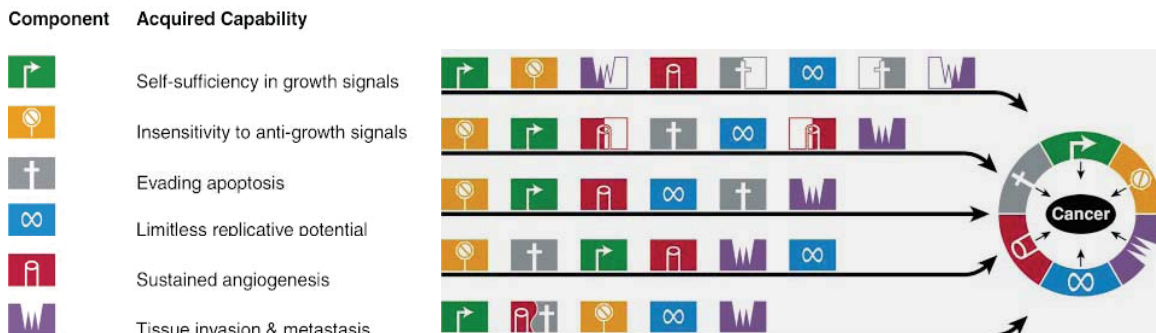


Figura 2. Exemples de diferents vies de progressió en funció de l'ordre d'adquisició. Modificat de Hanahan i Weinberg, 2000.

Panorama actual

Una de cada vuit morts al món es deu al càncer. Mundialment, el càncer causa més morts que el SIDA, la tuberculosi, i la malària juntes. El càncer és la segona causa de mort en els països econòmicament desenvolupats (seguint les malalties del cor) i la tercera en països subdesenvolupats (seguint les malalties del cor i diarrees). Els casos de càncer incrementen en els països desenvolupats degut a la disminució de la mortalitat infantil i morts per infeccions, i per l'envelliment de la població. A més, com que els països en vies de desenvolupament adopten estils de vida occidentals, com el consum de tabac, de greixos saturats i dietes riques en calories, i reducció de l'activitat física, les taxes de càncer augmentaran si no es prenen mesures preventives.

Una aproximació equilibrada pel control del càncer inclou: Prevenció primària, l'objectiu de la qual és reduir o eliminar l'exposició a factors que causen el càncer i que inclouen la modificació en els hàbits de tabac, nutrició, activitat física, exposicions ocupacionals, i infeccions cròniques. Representa el mètode més cost-efectiu a llarg termini per controlar el càncer. Detecció precoç i prevenció secundària, l'objectiu principal de la qual és detectar canvis precancerosos o estadis inicials de càncer quan

encara poden ser tractats amb la màxima efectivitat. Diagnòstic i tractament, que, incloent valoracions clíniques i patològiques acurades, és el primer pas en el maneig del càncer. Serveix per a determinar l'estadi i poder escollir el millor tractament. Les modalitats primàries del tractament al càncer són la cirurgia, la quimioteràpia, i la radioteràpia, que poden ser usades soles o combinades. Cures pal·liatives, per aquells pacients (que són majoritaris) que presenten estadis avançats de la malaltia. Per ells, l'única opció realista de tractament és l'alleujament del dolor i les cures pal·liatives. L'aproximació més bàsica per malalts terminals de càncer inclou analgèsics orals, que poden anar des de l'aspirina fins a opiacis (www.cancer.org, Global Facts and Figures 2007).

2. INTRODUCCIÓ AL CÀNCER COLORECTAL

Epidemiologia, tractament i presentació

El càncer colorectal (CCR) és una de les neoplàsies més freqüents arreu del món, essent la quarta causa de mort en homes i la tercera en dones. La seva incidència és major en el món occidental representant a Espanya la tercera neoplàsia més freqüent en homes (12,81%, freqüència relativa) després de les de pròstata (17,32%) i pulmó (16,56%), i la segona neoplàsia en incidència en dones (13,76%), després del càncer de mama (28,35%). S'estima que el risc de patir càncer colorectal en la població general és del 5%. A Espanya cada any es diagnostiquen aproximadament 26.000 nous casos de càncer de còlon (incidència) i gairebé la meitat dels pacients moren a causa de la malaltia (supervivència als 5 anys), representant així la segona mort per càncer tant en homes com en dones després dels càncer de pulmó i de mama, respectivament ("El càncer colorectal es pot prevenir", ICO, 2009). De forma absoluta, podem dir que l'estimació per l'any 2002 del nombre de defuncions degudes al CCR a Espanya era de 6.553 en homes, i 5.206 en dones (Globocan 2002). És molt important saber que quan el CCR es detecta en estadis inicials, la supervivència augmenta fins al 90%, tot i això, només el 39% dels CCRs es diagnostiquen en aquests estadis. Una vegada el càncer s'ha disseminat, la taxa de supervivència als 5 anys disminueix fins al 10%. Per això són de gran interès els estudis centrats a entendre millor la biologia del càncer per poder aplicar els coneixements a l'avenç en el diagnòstic i el tractament de la malaltia.

En el cas del CCR, l'estadi tumoral és el factor pronòstic més potent i el principal determinant del tractament dels pacients. Tant és així, que en estadis inicials la cirurgia acostuma a ser l'únic tractament necessari, mentre que en estadis més avançats són necessàries quimioteràpia i/o radioteràpia adjuvant i/o neoadjuvant. L'estadi del CCR es defineix en funció del grau d'invasió i infiltració en les diferents capes de la paret intestinal (Figura 3), de l'afectació de ganglis limfàtics i de la presència de metàstasis a distància. Al llarg del segle XX han anat apareixent diferents sistemes de classificació. El primer va ser el de Dukes, al 1937. Criticat per imprecís, és encara molt defensat entre el col·lectiu mèdic ja que a la seva senzillesa d'aplicació s'hi afegeix la capacitat de discriminar entre grups amb diferent pronòstic. L'any 1986 l'*American Joint Comitee on Cancer* (Hutter and Sobin, 1986) establí el sistema TNM que, a banda d'esclarir confusions, té en compte el nombre de nòduls limfàtics afectats. Les sigles TNM fan referència a l'extensió del tumor primari (T), la presència

de nòduls limfàtics afectats (N), i la presència de metàstasi a distància (M) (Taula 1). Aquest sistema ha permès la classificació dels CCR en quatre estadis que es correlacionen amb el pronòstic dels pacients (Taula 2).

Taula 1. Categories TNM per al càncer colorectal.

Categories T	Extensió que ocupa el tumor primari
Tx	Informació incompleta
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> . El tumor no travessa la mucosa
T1	El tumor travessa la mucosa, la muscularis mucosa i envaeix la submucosa
T2	El tumor ha travessat la submucosa i envaeix la muscularis pròpia
T3	El tumor ha travessat la muscularis pròpia i envaeix la subserosa sense arribar a cap teixit veí
T4	El tumor envaeix altres òrgans o estructures
Categories N	Absència o presència de metàstasi ganglionar
Nx	Informació incompleta
N0	No hi ha cap gangli afectat
N1	De 1 a 3 ganglis afectats
N2	4 o més ganglis afectats
Categories M	Absència o presència de metàstasi a distància
Mx	Informació incompleta
M0	No hi ha metàstasi a distància
M1	Presència de metàstasi a distància

Taula 2. Classificació del CCR pel sistema TNM i pronòstic dels pacients amb CCR en funció de l'estadi TNM

Estadi TNM	Descripció	Supervivència als 5 anys
0	Tis, N0, M0	96-100%
I	T1, N0, M0 T2, N0, M0	89-90%
II	T3, N0, M0 T4, N0, M0	50-75%
III	T1-4, N1, M0 T1-4, N2, M0	25-45%
IV	T1-4, N1-2, M1	<5%

El CCR en les primeres etapes no sol produir símptomes, és per aquest motiu que són molt importants les proves de detecció precoç com el test de sang oculta en femtes o la colonoscòpia entre d'altres. Els símptomes que produeix el càncer de còlon són molt inespecífics i no són diferents dels originats per altres malalties benignes molt freqüents en la nostra societat. Com que el càncer de còlon té un creixement progressiu, quan apareixen símptomes aquests són d'aparició recent (3-6 mesos), persistents, i amb tendència a l'empitjorament. Els signes i símptomes més freqüents són: presència de sang a la femta, canvis en la manera habitual de fer les deposicions (aparició de restrenyiment o empitjorament del restrenyiment habitual de més de tres setmanes d'evolució, diarrees, diarrees alternant amb restrenyiment, i deposicions amb la matèria fecal més prima que de costum), molèsties abdominals repetides i d'intensitat progressiva sense causa coneguda (dolor, inflamació, acumulació de

gasos, cargolaments de ventre), pèrdua de pes sense causa coneguda, i anèmia ferropènica no detectada prèviament i sense una causa que la pugui justificar.

Biologia de l'epiteli colònic, un ambient en constant moviment

Des d'una perspectiva molecular i genètica, el CCR és, probablement, la neoplàsia sòlida més estudiada. Aquest fet està directament relacionat amb la seva ubicació, que permet una molt fàcil accessibilitat als tumors. El còlon i el recte són la part terminal del tracte intestinal, començant a la vàlvula ileocecal i fins a l'anus, i exerceixen les fases finals de la digestió. Si bé anatòmicament el còlon es divideix en ascendent, transvers, descendent i sigmoide, a nivell clínic-patològic es simplifica en dues parts, el còlon proximal o dret, que inclou el cec, l'ascendent i el transvers; i el còlon distal o esquerre, format pel còlon descendent, el sigmoide i el recte (Figura 3, A). Histològicament, el gruix del tub està format per diferents capes de la llum a l'exterior: mucosa (cèl·lules epitelials, làmina pròpia, muscularis mucosa), submucosa, muscularis pròpia, subserosa i serosa (Figura 3, B). Com ja hem vist, la profunditat en la invasió d'aquestes capes serà determinant per al pronòstic de la malaltia.

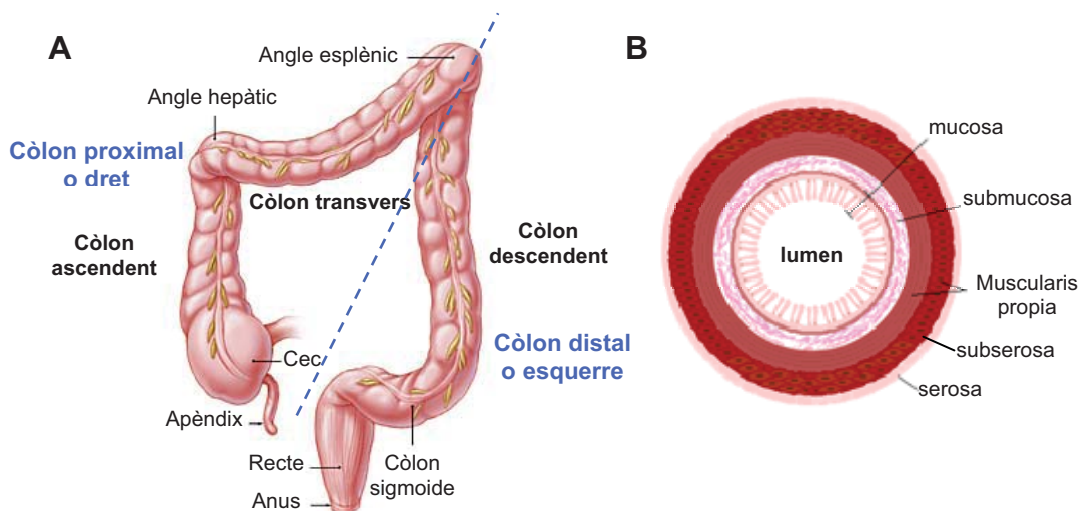


Figura 3. Anatomia de l'intestí gruixut: A. Divisions anatòmiques (negre) i clínicopatològiques (blau) del còlon i recte. **B.** Esquema de les capes histològiques que es poden observar en una secció transversal del còlon.

Igual que l'epidermis, l'epiteli intestinal constitueix una barrera entre el nostre cos i el món exterior, formant una monocapa de cèl·lules epitelials que revesteixen la part luminal del tracte digestiu. És a partir d'aquesta capa que s'originen els tumors colònics (Nathke, 2004). A diferència de l'intestí prim, el còlon és una superfície plana que guanya superfície gràcies a cavitats epitelials que s'estructuren en forma de

criptes (Figura 4). És precisament a les criptes, on es regula l'homeòstasi de l'epiteli colònic gràcies a un equilibri dinàmic entre producció i mort cel·lular, necessari degut a l'elevada toxicitat química i estrès mecànic que pateix l'epiteli del còlon, entre d'altres motius (Nathke, 2004). Així doncs, a diferència de la majoria de teixits adults on la motilitat només es dona com a resposta a danys, l'epiteli intestinal està en constant moviment (Heath, 1996). Les cèl·lules mare, situades al fons o nínxol de les criptes, es divideixen donant lloc a cèl·lules pluripotents o progenitores no diferenciades que viatgen en sentit ascendent ocupant aproximadament dos terços de la base de les criptes. Al final d'aquest procés, a l'arribar al terç superior de la cripta, aquestes cèl·lules deixen de proliferar i maduren a un dels tipus cel·lulars diferenciats del còlon (colonòcits, cèl·lules caliciformes o cèl·lules enteroendocrines) i continuen el seu viatge fins a la superfície de la cripta on pateixen un procés d'apoptosi i extrusió al lumen uns 3-5 dies més tard des del inici del trajecte (Figura 4) (Nathke, 2004; Radtke and Clevers, 2005). Per tant, podem distingir tres mecanismes gràcies als quals es manté l'homeòstasi epitelial: la producció cel·lular es veu compensada pel desprendiment cel·lular, la capa cel·lular epitelial es mou constantment de forma ascendent (només les cèl·lules mare escapen d'aquest flux), i la proliferació intestinal ve dictada pel nínxol de la cripta (Sancho, et al., 2004).

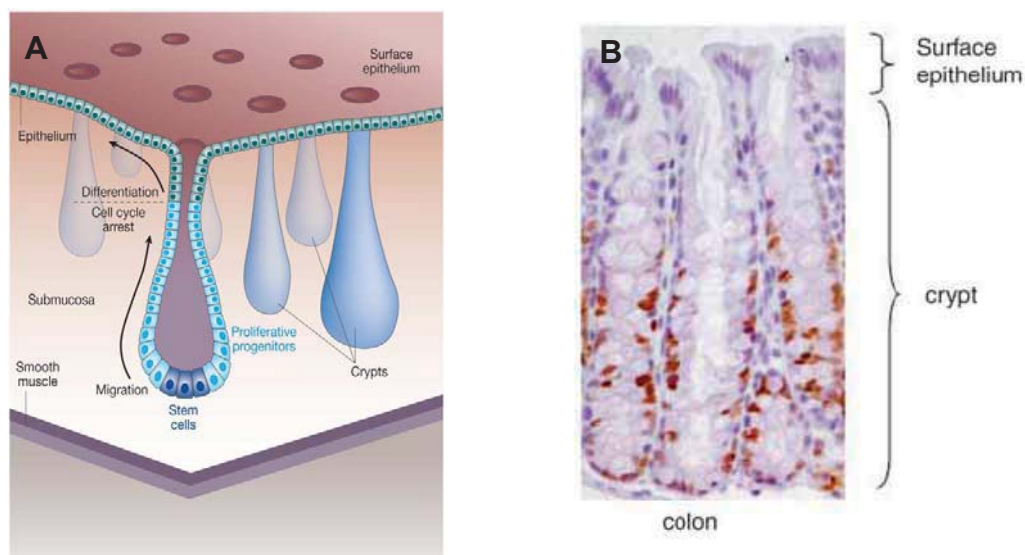


Figura 4. Epiteli del còlon: **A.** Esquema dels diferents compartiments i la migració cel·lular en l'epiteli intestinal. Extret de Reya i Clevers, 2005. **B.** Histologia de l'epiteli colònic murí on es veu el compartiment proliferatiu amb els nuclis tenyits pel marcador de proliferació cel·lular Ki67. Extret de Radtke i Clevers, 2005.

La via de Wnt en l'epiteli intestinal i en el càncer colorectal

Acabem de mostrar les criptes com una estructura compartimentada i molt ben organitzada on conviuen diferents tipus cel·lulars. Doncs bé, la força dominant que manté els pilars i l'organització d'aquestes construccions colòniques és el que coneixem com la via canònica de Wnt. Tot el viatge cel·lular ve guiat per aquesta via, des de la base de la cripta, on les cèl·lules progenitores mantenen la seva proliferació gràcies a l'activació de la via per senyals Wnt produïts per les cèl·lules de l'estroma, passant per la migració ascendent, també controlada per factors Wnt, fins arribar al terç superior on s'atura la proliferació, probablement per la seva llunyania de la font de factors activadors de Wnt (Batlle, et al., 2002). Per tant, la via de Wnt lidera la coordinació de l'expansió, el destí i el repartiment de la població de les cèl·lules de l'epiteli intestinal (Schneikert and Behrens, 2007).

Les glicoproteïnes Wnt, produïdes i secretades per diferents tipus cel·lulars són les encarregades d'activar la via de Wnt a través de la unió amb els seus receptors (frizzled) i coreceptors (LRP) de membrana. La molècula clau en aquesta cascada de senyalització és la β -catenina, una proteïna citoplasmàtica l'estabilitat de la qual està regulada pel complex de destrucció format per Axina, APC, i les dues cinases CKI i GSK3 β . Quan la via de Wnt està activada, alguns dels elements del complex de destrucció (Axina, CKI i GSK3 β) són segregats per la part citosòlica de frizzled i LRP units a l'exterior amb el lligant Wnt. D'aquesta forma, la β -catenina s'acumula i es trasllada al nucli on s'uneix i activa factors de transcripció de la família Tcf/Lef (Figura 5). S'ha postulat la β -catenina com una proteïna multifuncional que actua també en les unions adherents de les cèl·lules epitelials interaccionant directament amb E-cadherina. Actualment, no està del tot clar si les funcions adhesives i de senyalització estan interconnectades, però es creu que la β -catenina sintetitzada primer satura les unions adherents i la restant és regulada per les senyals de Wnt. En canvi, quan no hi ha senyals Wnt, la via es desactiva i es forma el complex de destrucció al citosol, que s'uneix a la β -catenina i la fosforila, marcant-la així per a la ubiquitinació i la conseqüent degradació en el proteasoma. D'aquesta forma, els factors de transcripció Tcf/Lef es mantenen reprimits (Figura 5) (Clevers, 2006).

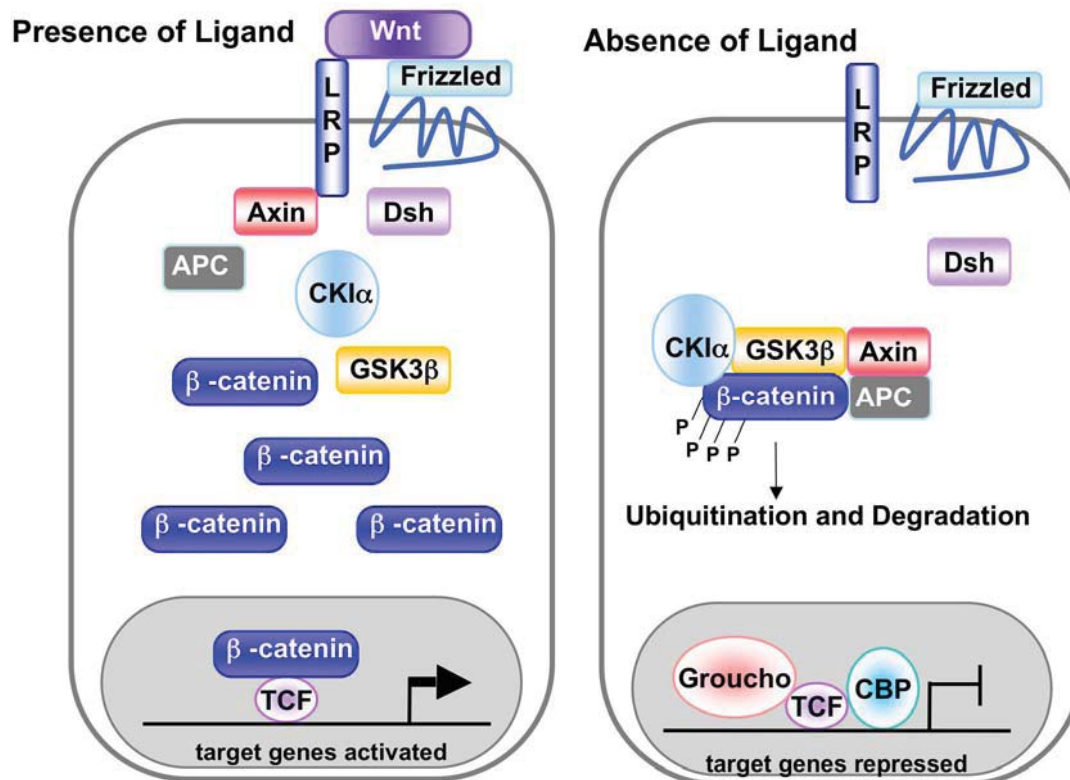


Figura 5. Via de Wnt: en el seu estat d'activació (esquerra) quan senyals de Wnt permeten que β-catenina s'acumuli al citoplasma i viatgi al nucli per activar transcripcionalment els gens de proliferació i en el seu estat d'inactivació (dreta) quan el complex de destrucció marca la β-catenina per degradació via proteasoma. Extret de www.wormbook.org.

Per tant, és fàcil deduir que és el programa genètic, que es veu activat o desactivat per aquesta via, el que modula la biologia de la cripta i que, per tant, la desregulació d'aquest programa és el que trenca l'homeòstasi de l'epiteli intestinal donant lloc al CCR. De fet, durant la progressió tumoral, la via de Wnt roman constitutivament activada al llarg de tot l'eix de la cripta, permetent que les cèl·lules adquireixin un fenotip progenitor que es manté a tots els nivells de la cripta, perdent així la seva organització (Figura 6) (van de Wetering, et al., 2002). S'han descrit molts gens regulats per β-catenina/Tcf (<http://www.stanford.edu/~rnusse/wntwindow.html>), però en destacarem només alguns, la desregulació dels quals, està directament relacionada amb el CCR: gens com *c-myc* i *ciclina D1* estan estretament relacionats amb la proliferació cel·lular, el gen de la *survivina* té un paper antiapoptòtic important, el *VEGF* codifica per un factor clarament proangiogènec, proteases com les MMPs juguen un paper clau en la degradació de la matriu extracel·lular necessària pel procés de metàstasi (Behrens and Lustig, 2004), i els receptors de les efrines (EphB) que són els responsables del posicionament cel·lular dins les criptes (Batlle, et al., 2002). La desregulació d'aquests i altres gens que es dona en la majoria de CCRs, ajuda a les cèl·lules a adquirir capacitats tumorigèniques.

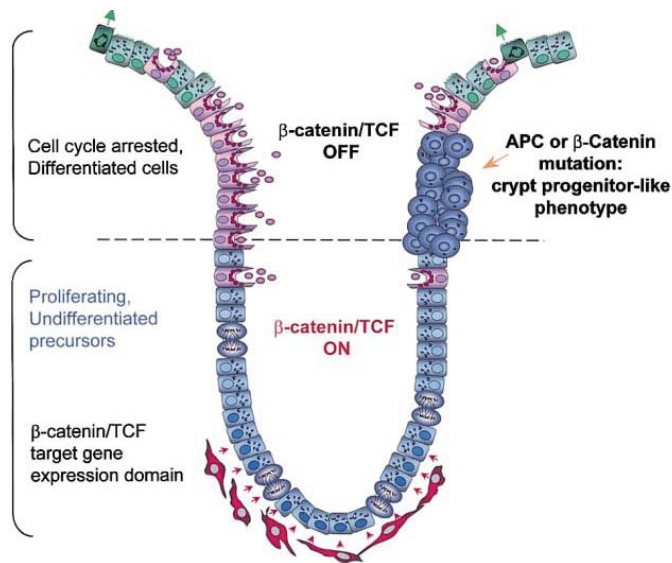


Figura 6. Representació esquemàtica d'una cripta del còlon: Al llarg de la cripta hi ha un gradient d'activació del complex β-catenina/Tcf que regula la proliferació i diferenciació cel·lulars. Extret de van de Wetering et al., 2002.

La seqüència epiteli normal-adenoma-carcinoma, d'un model lineal a un model més complex

El fet que el CCR sigui un dels tumors més coneguts, no només es deu a la seva ubicació i accessibilitat, sinó també a que poden coexistir diferents estadis tumorals en el tracte colorectal d'un mateix pacient. Gràcies a anàlisis moleculars i histopatològics d'aquests estadis, l'any 1990, Fearon i Vogelstein van proposar un model de carcinogènesi seqüencial en el qual l'adquisició de diferents alteracions a nivell molecular corresponia a l'aparició d'estadis més avançats del procés cancerós (Figura 7) (Fearon and Vogelstein, 1990). De les formes benignes a les més agressives, la progressió del CCR es divideix en les següents fases o estadis:

- Focus de criptes aberrants: Lesió més primerenca que es pot identificar i que consisteix en una hiperplàsia i/o displàsia de l'epiteli del còlon (Takayama, et al., 1998).
- Adenoma primerenc: Generalment pòlips de menys d'un cm de diàmetre
- Adenoma intermedi: Generalment pòlips adenomatosos o adenomes tubulars de més d'un cm de diàmetre i sense focus de carcinoma
- Adenoma tardà: Adenomes de més d'un cm de diàmetre amb focus de carcinoma intraepitelial (carcinoma *in situ*).
- Carcinoma: És el càncer pròpiament dit i es considera instaurat quan les cèl·lules invasives arriben a la membrana basal de l'epiteli. Aquest carcinoma invasiu és sovint la primera manifestació clínica del CCR.

- **Metàstasi:** És la colonització i creixement mitjançant una disseminació hematògena i/o limfàtica de noves lesions tumorals en òrgans a distància a partir de cèl·lules que es desprenen del tumor primari.

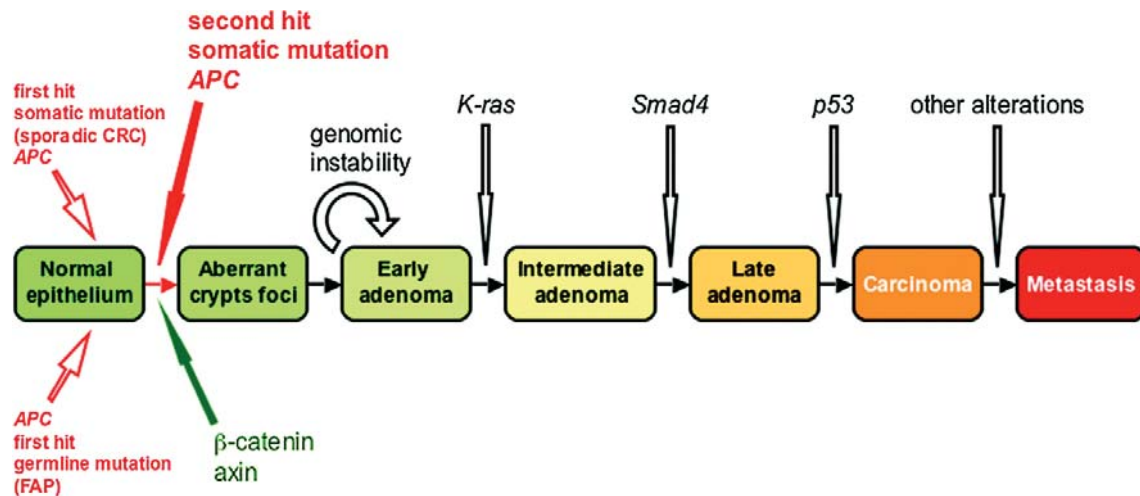


Figura 7. Seqüència adenoma-carcinoma: Adaptat de Fearon i Vogelstein, 1990.

S'han proposat dos models per explicar els primers canvis histològics associats amb la transformació neoplàsica colorectal. Vogelstein suggerí un model en el qual les cèl·lules diferenciades de la superfície de les criptes s'escampen lateralment i s'invaginen donant lloc a noves criptes (Shih, et al., 2001). L'altre model és el que postula que els adenomes s'originen a les bases de les criptes i creixen cap a la superfície donant lloc als pòlips adenomatosos (Preston, et al., 2003).

Tant en l'aparició de lesions premalignes com en l'evolució cap a la malignitat i la metàstasi, són necessàries mutacions activadores d'oncogenes i inactivadores de gens supressors tumorals (Figura 7). Inicialment, es va suggerir que entre quatre i sis d'aquestes alteracions eren suficients per produir la malignitat. Estudis posteriors que han seqüenciat tots els gens, les han elevat fins a un mínim de deu (Sjoblom, et al., 2006). L'acumulació d'aquestes alteracions genètiques, més que no pas l'ordre en què s'han adquirit, és la responsable de la transformació i progressió neoplàsica. Com podem veure, en el model proposat per Fearon i Vogelstein, la ruptura de la via de Wnt per mitjà de mutacions en el gen *APC* és un esdeveniment primerenc en el desenvolupament dels pòlips o adenomes (Figura 7). Entre un 30-70% dels adenomes i dels càncers apareixen mutats en aquest gen, a més, el 50% dels que no ho estan mostren mutacions en la β -catenina, convertint la desregulació de la via de Wnt com l'origen de les lesions premalignes, tot i que hi ha alguns estudis que demostren que no sempre és així (Takayama, et al., 2006). Posteriorment, les mutacions en oncogenes

com *K-ras* o en gens supressors tumorals com *DCC* o *Smad4* són freqüents en la transició cap a adenomes intermedis i tardans, respectivament. Finalment, les mutacions en el gen *TP53* són presents en un gran nombre de carcinomes en comparació als adenomes primerencs (Figura 7). L'acumulació d'anomalies que confereixen a les cèl·lules tumorals les seves capacitats metastàtiques són encara avui molt desconegudes (Jones, et al., 2008).

Aquest camí representa el que més tard es va definir com la via amb inestabilitat cromosòmica (CIN). Hem de recordar que, tot i que els tumors amb CIN representen un 85-92% dels CCRs, un 8-15% dels tumors colorectals presenten l'altre tipus d'inestabilitat genètica, la inestabilitat de microsatèl·lits (MSI). Per aquests tumors, es va proposar una nova via (via amb inestabilitat de microsatèl·lits) on les múltiples alteracions genètiques que deriven en la malignitat cel·lular s'aconsegueixen per deficiències en els gens reparadors del DNA o *mismatch repair* (MMR) (Kinzler and Vogelstein, 1996).

Aquestes classificacions són plenes d'excepcions i variacions. No tots els tumors CIN, ni tots els MSI segueixen la mateixa ruta o acumulen les mateixes alteracions moleculars. L'estudi de les alteracions epigenètiques han començat a mostrar com aquesta classificació es pot convertir en molt més complexa. S'ha descrit que tant la iniciació com la promoció del càncer pot ocórrer per mecanismes epigenètics (Jones and Baylin, 2002), ja sigui per hipometilació com per hipermetilació de les illes CpGs, que han demostrat ser esdeveniments comuns en molts tumors. Això ha derivat en la proposta de definició del fenotip metilador d'illes CpG (CIMP) com una via alternativa per promoure el càncer i que permetia classificar als tumors en tres subclasses: CIMP1, amb metilació intensa de múltiples gens, MSI i mutacions a *BRAF*; CIMP2, amb metilació d'un nombre limitat de gens, metilació més abundant en gens relacionats amb l'edat, i mutacions en *KRAS*; i CIMP-negatius, amb mutacions a *p53* i rarament metilats (Shen, et al., 2007). Aquesta classificació és motiu encara de controvèrsia a la comunitat científica.

Així, està clar que encara queda molt camí per recórrer tant per arribar a una classificació dels tumors que pugui ser útil pel tractament i pronòstic de la malaltia, com per entendre completament la progressió tumoral. Tot i això, i com ja podem deduir del descrit fins ara, hi ha gens clau en el procés tumoral. A continuació, aprofundirem una mica més en les funcions dels tres gens estudiats en aquesta tesi, els quals participen tant en la via amb inestabilitat cromosòmica (*APC*), com en la via

amb inestabilitat de microsatèl·lits (*MSH2* i *MLH1*), i que quan estan mutats en la línia germinal, predisposen a síndromes hereditàries de CCR.

APC, el guardià del tracte intestinal

El gen *APC* és un gen supressor tumoral que es va localitzar l'any 1987 al cromosoma 5q21 mitjançant estudis de lligament (Bodmer, et al., 1987; Leppert, et al., 1987) en famílies amb predisposició hereditària al CCR. El gen *APC* consta de 8538 pb de seqüència codificant i està format per 15 exons. L'exó 15 és el més llarg, doncs comprèn més del 75% de la seqüència codificant i és la diana majoritària de les mutacions identificades. Codifica per la proteïna APC, de 2843 aminoàcids (AA) i de massa molecular 312 kDa, que s'expressa en una àmplia varietat de teixits humans fetals i adults. A nivell cel·lular, la proteïna APC es localitza tant al nucli com al citoplasma, tot i que la seva distribució és predominantment citoplasmàtica (Brocardo, et al., 2005).

Els coneixements actuals sobre les funcions d'*APC* provenen de l'estudi de la seva estructura i de l'anàlisi de les proteïnes amb les quals interacciona. La proteïna APC consta de diferents dominis funcionals (Figura 8) dels quals només destacarem els més rellevants. A l'extrem N-terminal de la proteïna es troba el domini d'homodimerització, format per repeticions de set residus hidrofòbics. La proteïna APC wt (*wild type*) pot formar dímers tant amb la proteïna APC wt com amb la proteïna APC truncada, en aquest últim cas s'induiria doncs, un efecte dominant negatiu (Dihlmann, et al., 1999). La regió armadillo consta de set repeticions de 42 AA i està implicada en interaccions proteïna-proteïna, que podria implicar l'APC en morfologia cel·lular, motilitat, i migració a través d'actina i microtúbuls (Kawasaki, et al., 2000; Seeling, et al., 1999). En la regió central d'APC trobem repeticions de 15 i 20 aminoàcids. Les primeres són la regió d'unió a β -catenina (Su, et al., 1993). Les segones són altament conservades i també poden interaccionar amb β -catenina promovent la seva degradació (Rubinfeld, et al., 1995). Entre les repeticions de 20 AA es localitzen tres repeticions SAMP (Ser-Ala-Met-Pro) que uneixen l'axina i el seu homòleg, conductina (Behrens, et al., 1998; Kishida, et al., 1998). La regió carboxiterminal és rica en residus bàsics. Aquests residus són els que es poden unir a microtúbuls tant directament, com indirectament a través d'EB1 que és un membre d'una família de proteïnes d'unió a tubulina (Munemitsu, et al., 1994; Su, et al., 1995). També en aquesta regió, APC pot unir-se a hDLG, proteïna que es localitza en les unions cèl·lula-cèl·lula (Matsumine, et al., 1996). També s'han identificat senyals NES (*nuclear export signals*) usats per

transportar la β -catenina nuclear cap al citoplasma per a la seva degradació o incorporació a les unions adherents (Rosin-Arbesfeld, et al., 2003). Per poder entrar al nucli, APC necessita els senyals NLS (*nuclear localization signals*) (Zhang, et al., 2000). Finalment, APC també presenta alguns dominis d'unió al DNA (Deka, et al., 1999).

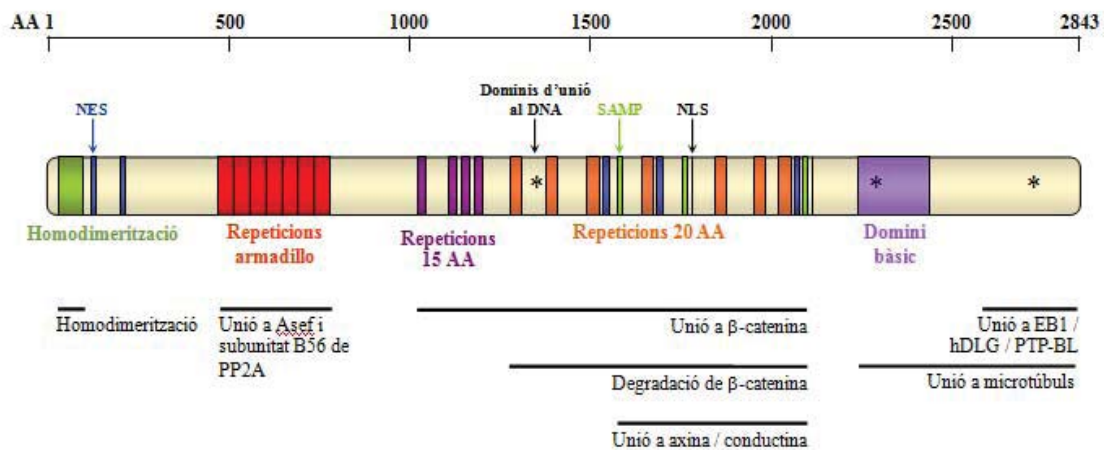


Figura 8. Dominis funcionals i interaccions de la proteïna APC

La funció més ben caracteritzada de la proteïna APC és la regulació de la via de Wnt mitjançant la formació del complex de degradació de la β -catenina. Com ja hem vist, la via de Wnt és essencial per l'homeòstasi de l'epiteli del còlon i per tant, sembla que la funció principal d'APC com a supressor tumoral resideix en la capacitat de regular de manera apropiada els nivells intracel·lulars de la β -catenina (Figura 9). Tot i això, APC també exerceix algunes funcions independents d'aquesta via que, un cop alterades, poden estar involucrades en el CCR. Per una banda, s'ha descrit que APC pot ser un regulador del citoesquelet: pot unir-se als microtúbuls gràcies al seu domini bàsic fent-los més estables i participant així en la migració cel·lular; també es localitza als cinetocors dels cromosomes metafàsics participant així en la formació i funció del fus mitòtic i generant problemes en la segregació cromosòmica i possible CIN quan està alterat; i finalment s'uneix indirectament al citoesquelet d'actina participant així en processos de migració i adhesió cel·lular (Figura 9) (Nathke, 2004). Per altra banda, com ja hem dit, podem trobar la proteïna APC també al nucli, i tot i que una de les funcions és ajudar al transport de β -catenina al citoplasma, també s'ha descrit que mitjançant la seva unió al DNA, preferentment en seqüències riques en A/T, pot regular la transcripció (Senda, et al., 2007) i la replicació del DNA (Qian, et al., 2008). Recentment, també s'ha postulat una possible funció d'APC com a regulador de la reparació del DNA (Jaiswal and Narayan, 2008).

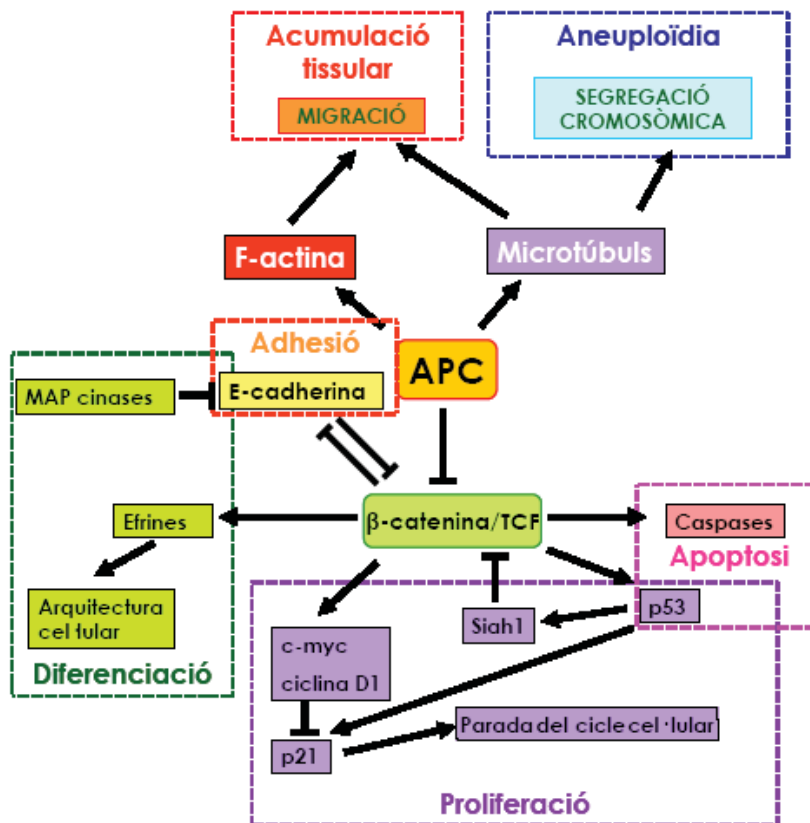


Figura 9. Esquema resum de les diferents funcions d'APC. Modificat de Näthke, 2004.

MSH2 i MLH1 com a cuidadors del genoma intestinal

Mentre que APC té múltiples funcions reguladores de la homeòstasi de l'epiteli intestinal, els gens reparadors MSH2 i MLH1 juguen un paper fonamental en el manteniment del genoma intestinal. Fishel va descriure la relació entre els homòlegs dels gens reparadors del DNA trobats en bacteris (*E coli*), llevats (*S cerevisiae*) i humans (Fishel, et al., 1994). *MSH2* es troba a la regió 2p21-p22 i està format per 16 exons. *MLH1* es troba a la regió 3p22.3 i està format per 19 exons. La seva estructura funcional no és tant coneguda com en el cas d'APC, tot i això es coneixen alguns dels seus dominis d'unió a altres proteïnes de la via de reparació del DNA (MMR) que, tal i com veurem a continuació, són necessàries per a poder exercir la seva funció (Figura 10). Alguns d'aquests proteïnes són MSH6, MSH3, PMS1, i PMS2. Tots aquests cooperen per exercir la seva funció principal, la reparació dels danys provocats durant la replicació del DNA, prevenint així que aquests errors o mutacions en el DNA es mantinguin en les següents generacions. És per això que la seva inactivació augmenta la taxa de mutació espontània (Gruber, 2006).

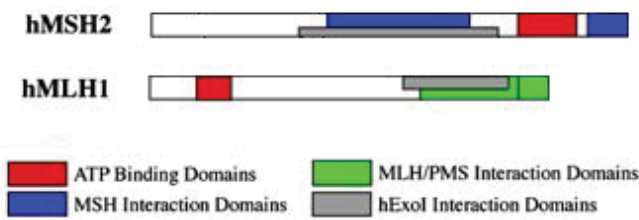


Figura 10. Dominis d'interacció de les proteïnes MSH2 i MLH1. Modificat de Boland, 2008.

El mecanisme de MMR o reparació del DNA ha estat molt estudiat i ben caracteritzat tant biològicament com genèticament en *E coli* i això ha estat de gran ajuda per entendre el funcionament d'aquesta via en organismes eucariotes. D'una manera simplista, podem dir que l'heterodímer *MSH2-MSH6* llisca al llarg de la doble cadena fins identificar mutacions que s'han de reparar (Figura 11). Aquestes modificacions poden ser tant desaparellaments entre dues bases de les cadenes homòlogues del DNA com desaparellaments provocats per petites insercions o delecions. Seguidament, una molècula d'ATP i un nou heterodímer format per *MLH1* i *PMS2* s'uneixen a *MSH2-MSH6* (Figura 11). El següent pas consisteix en la discriminació de la cadena de nova síntesi on s'ha acumulat l'error replicatiu. En *E coli* es soluciona per l'existència de llocs dGATC hemimetilats, però aquests no existeixen en eucariotes. Així doncs, s'han proposat diferents mecanismes que es poden dividir en models *cis* o mòbils, i *trans* o estacionaris. El primer model suggereix que un cop s'ha trobat l'error i gràcies a la hidròlisi del ATP, el complex proteic es mou unidireccionalment pel DNA fins a trobar un petit tall específic de cadena que permet el reconeixement de la cadena de nova síntesi. El segon model proposa que les interaccions entre les proteïnes MMR indueixen un corbament del DNA que permet l'acostament del punt de desaparellament amb el punt de discriminació de cadena. Un cop es reconeix la cadena que s'ha de reparar, es procedeix a la degradació de la cadena modificada gràcies a una exonucleasa (ExoI) que també s'uneix al complex proteic (Figura 11). Altres proteïnes també participen en el procés, ja sigui protegint el fragment transitori que queda de DNA de cadena senzilla (RPA) o resintetitzant la nova cadena de DNA (Pol δ , PCNA) (Li, 2008). Les mutacions en *MLH1* i *MSH2* són més abundants en els tumors degut a que *MSH3* i *PMS1* poden substituir funcionalment *MSH6* i *PMS2*, però no hi ha proteïnes redundants per a les dues primeres. Així, la funció d'aquests gens està clarament relacionada amb el que s'havia comentat prèviament sobre la inestabilitat de microsatèl·lits, ja que les repeticions simples de nucleòtids com els microsatèl·lits són més susceptibles a patir errors replicatius.

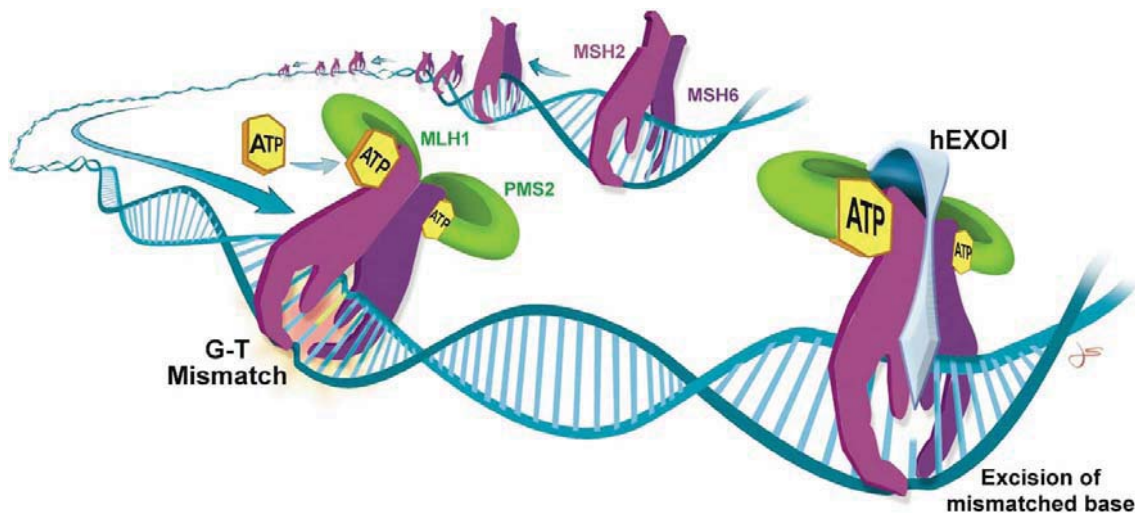


Figura 11. Model per a la via de reparació del DNA (MMR) en humans. Extret de Gruber, 2006.

A part de la seva important funció en el manteniment de la fidelitat en la replicació del DNA, també s'han descrit altres funcions importants associades a aquests gens, com per exemple la modulació de la recombinació del DNA i la facilitació de la senyalització enfront a danys en el DNA. Així doncs, queda molt clar que defectes en els gens MMR seran permissius per a la carcinogènesi.

3. ETIOLOGIA DEL CÀNCER COLORECTAL

Fins al moment hem intentat entendre els mecanismes moleculars que una vegada desregulats poden generar el creixement descontrolat de les cèl·lules de l'epiteli intestinal i generar el CCR. Ara toca doncs, entendre quins són els motius pels quals es genera aquesta desregulació. Com en la majoria dels càncers, en el CCR hi intervenen una barreja de factors ambientals i factors genètics. En alguns casos l'herència de mutacions en certs gens augmenten el risc de desenvolupar un CCR fins al 100%, altres casos són completament conseqüència de factors ambientals, i entre aquests dos extrems podem trobar una gran varietat de casos on gens i ambient participen en menor o major grau (Figura 12).

Predisposició a CCR



Figura 12. Impacte de l'ambient i els gens en la predisposició a CCR. Representació gràfica del impacte que poden tenir els gens i l'ambient al desenvolupament d'un càncer. Veiem que la barreja d'ambdós factors n'és la causa predominant.

Efecte de l'ambient en el CCR

S'ha demostrat que la dieta juga un paper clau en el risc de patir CCR. Hi ha diferències importants en la incidència d'aquesta neoplàsia entre diverses àrees geogràfiques i sempre s'associa un augment d'aquesta al fet de consumir una dieta occidental. Tot i això, encara no ha estat possible determinar de manera inequívoca quins aliments o nutrients en són els principals responsables. Tanmateix, diversos estudis mostren una associació inversa entre el consum de fibra, vegetals i fruita, i el risc de CCR (Friedenreich, et al., 1994; Howe, et al., 1992; Kim, 2000; Trock, et al., 1990), mentre que es detecta una relació directa amb el consum de carn vermella (Norat, et al., 2002) i greixos (Bagnardi, et al., 2001). Per altra banda, l'estil de vida també és molt important. S'estima que l'exercici físic regular redueix el risc de CCR (Bianchini, et al., 2002), presentant el consum de tabac (Giovannucci, 2001) i d'alcohol (Bagnardi, et al., 2001) una relació directa amb el risc de desenvolupar CCR.

Sondejant el panorama genètic del CCR

Ja hem comentat que el càncer, i com a tal, el CCR, és una malaltia genètica causada per l'acumulació de danys en el genoma que malmeten gens imprescindibles per a la homeòstasi de l'epiteli intestinal. Però el que analitzarem seguidament, són els components genètics que es troben en la línia germinal des de que naixem i que ens poden predisposar a desenvolupar un CCR.

A finals dels 80 i principis dels 90 es van començar a identificar alguns dels gens de susceptibilitat al CCR gràcies a anàlisis de lligament. Majoritàriament, eren gens supressors tumorals amb una elevada penetrància. Tot i que durant els següents anys s'ha continuat la cerca de gens de susceptibilitat, els resultats han estat poc fructífers en el sentit del seu impacte en la població afectada de CCR. Això suggerí que la major part dels CCRs poden ser deguts a una combinació de múltiples al·lels amb una penetrància individual molt més baixa. Gràcies als estudis d'associació genòmica de gran abast (*genome-wide association studies*, GWA), en els darrers tres o quatre anys el panorama de susceptibilitat genètica al CCR ha evolucionat molt (Easton and Eeles, 2008; Hemminki, et al., 2009).

Així doncs, actualment podem distingir tres tipus d'al·lels o variants de predisposició o susceptibilitat al CCR: els d'elevada, els de moderada, i els de baixa penetrància (Taula 3 i Figura 13) (Foulkes, 2008). Una mesura útil d'estimació del seu impacte en la població amb CCR és la fracció poblacional atribuïble o *population attributable fraction* que es defineix com la proporció de la incidència de la malaltia explicada per una determinada variant genètica. Així doncs, la fracció poblacional atribuïble ajuda a posar els nous descobriments sobre al·lels de baixa penetrància, en perspectiva amb els ja establerts com a gens d'elevat risc (Hemminki, et al., 2009).

Taula 3. Gens i loci implicats en l'herència del CCR en funció del risc entre els heterozigots. Modificada de Foulkes, 2008.

Penetrància elevada (risc relatiu ≥ 5.0)	Penetrància moderada (risc relatiu ≥ 1.5 i < 5.0)	Penetrància baixa (risc relatiu ≥ 1.01 i < 1.5)
APC, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	APC (I1307K), BLM (BLM^{Ash})	MUTYH*, 8q24, 18q21, 15q13, 8q23, 10p14, 11q23

* Les mutacions bial·lèliques del gen *MUTYH* es trobaven en la casella d'elevada penetrància

Dins els al·lels d'elevada penetrància, amb un valor de fracció poblacional atribuïble del 3% (Figura 13) (Hemminki, et al., 2009), trobem tots els gens que quan es presenten mutats en la línia germinal causen les síndromes hereditàries de predisposició a CCR que explicarem amb detall més endavant. Solen ser variants rares que predisposen a patir CCR amb un risc molt elevat. El gen supressor tumoral *APC* o els reparadors del DNA *MSH2* i *MLH1*, en són exemples clars i han estat l'objecte d'estudi d'aquesta tesi. Els al·lels de moderada penetrància, amb una fracció atribuïble del 4% (Figura 13) (Hemminki, et al., 2009), també solen ser variants rares en el genoma però que s'associen a un risc més baix de patir CCR. L'exemple més característic en càncer colorectal d'aquests al·lels es la variant *missense* I1307K del gen *APC*, present en un 6% de la població jueva Ashkenazi i que duplica el risc a patir CCR (Laken, et al., 1997). Finalment, tenim les variants de baixa penetrància que han començat a sortir a la llum recentment gràcies als estudis de GWA. Existeixen varies característiques que defineixen aquestes variants: són al·lels comuns que es troben com a mínim en el 10% de la població, s'associen a un risc relatiu baix, expliquen la presència del càncer en una proporció elevada de la població però només expliquen una minúscula fracció del risc familiar, es localitzen en regions no codificants, i majoritàriament tenen una funció desconeguda (Hemminki, et al., 2008). En la majoria d'estudis, aquestes variants es defineixen com a regions de risc, o fins i tot com a SNPs de risc presents en aquests loci. S'han descrit sis regions associades a susceptibilitat de CCR: 8q24 (Tomlinson, et al., 2007; Zanke, et al., 2007), 18q21 (Broderick, et al., 2007), 15q13 (Jaeger, et al., 2008), 8q23, 10p14 (Tomlinson, et al., 2008), i 11q23 (Tenesa, et al., 2008). Considerant que aquests al·lels poden ser compartits en la població i assumint interaccions epistàtiques que augmenten el seu risc, el valor de fracció poblacional atribuïble conjunt de tots aquests al·lels de baixa penetrància és del 52% (Figura 13) (Hemminki, et al., 2009). Algunes d'aquestes variants, s'han descrit també com a modificadores de predisposicions hereditàries causades per mutacions en gens d'alta susceptibilitat (Wijnen, et al., 2009).

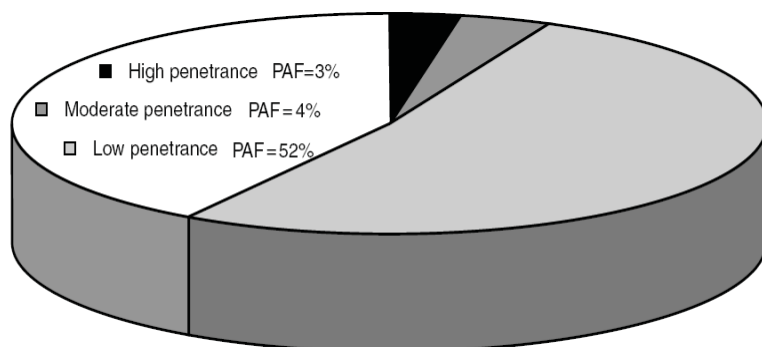


Figura 13. Contribució relativa de les variants genètiques a la susceptibilitat al CCR. PAF: *Population Attributable Fraction*. Modificat de Hemminki, 2009.

Totes aquestes anàlisis s'han fet a nivell de DNA, doncs bé, hem de tenir en compte que, per a trobar nous loci de susceptibilitat a CCR, són i seran de gran rellevància els estudis d'expressió al·lèlica en línia germinal. Un clar exemple el tenim en el *TGFBR1* (*TGF- β receptor 1*), on l'expressió diferencial dels seus al·lèls confereix un increment del risc de CCR de fins a 9 vegades (Valle, et al., 2008). Fins al moment, no s'ha trobat la causa, a nivell de DNA, d'aquesta expressió diferencial i és per això que apuntem a la rellevància que poden tenir aquest tipus d'assajos que permeten detectar canvis subtils a nivell d'expressió.

Tot i la presència d'aquests gens de baixa susceptibilitat, encara queda un llarg camí per recórrer per poder acabar d'entendre els seus lligams funcionals o per descobrir noves variants. Així doncs, des d'un punt de vista clínic, de moment, s'utilitza una classificació dels CCRs més conservadora on bàsicament es té en compte el nivell d'agregació familiar, com es detalla en el proper apartat (Figura 14).

4. CLASSIFICACIÓ DEL CÀNCER COLORECTAL

Actualment diferenciem tres grups de CCR en funció dels antecedents familiars: esporàdic, familiar, i hereditari (Figura 14).

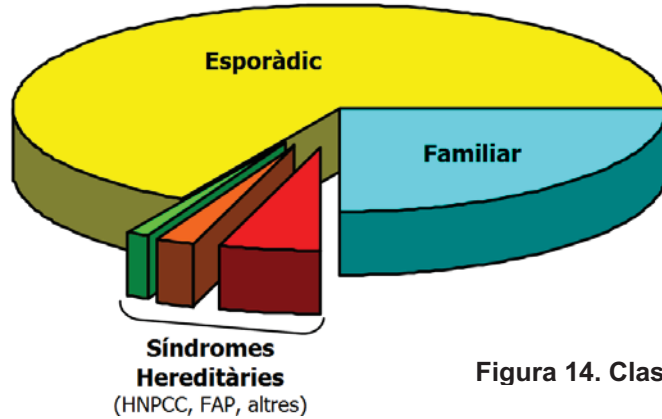


Figura 14. Classificació del CCR

Aquesta classificació és important a l'hora de determinar els factors de risc de cada individu a patir un CCR, i en funció d'això, seguir el mètode de cribratge o detecció precoç més adient en cada cas (Taula 4).

Taula 4. Recomanacions per a la detecció precoç del CCR en funció del risc individual. Extret de “El càncer colorectal es pot prevenir”, Institut Català d'Oncologia, 2009

<p>Risc alt</p> <p>Tres o més familiars amb càncer de còlon o tumors relacionats (principalment endometri), dues o més generacions afectades i almenys un dels familiars diagnosticat abans dels 50 anys d'edat.</p> <p>Presència de més de 100 pòlips al còlon i recte (poliposi colònica).</p>	<p>Seguiment mitjançant:</p> <p>Colonoscòpia cada 1 o 2 anys a partir dels 25 anys d'edat. En els casos de poliposi colònica, inicieu-lo a l'adolescència.</p> <p>Ecografia transvaginal anual a partir dels 30 anys.</p> <p>Valoració per una Unitat de Consell Genètic.</p>
<p>Risc mitjà</p> <p>Antecedent d'extirpació prèvia d'algun adenoma.</p> <p>Antecedent de càncer de còlon.</p> <p>Antecedent d'un familiar de primer grau (*) amb càncer de còlon en edat inferior a 50 anys.</p> <p>Antecedents de més d'un familiar amb càncer de còlon, un d'ells de primer grau (*) i edat inferior a 60 anys.</p>	<p>Seguiment mitjançant colonoscòpia:</p> <p>Adenomes de baix risc: als 5 anys.</p> <p>Adenoma d'alt risc: als 3 anys.</p> <p>Càncer de còlon previ: cada 2-3 anys.</p> <p>Familiars amb càncer de còlon: cada 3-5 anys començant deu anys abans de l'edat del familiar amb CCR més jove.</p>
<p>Risc mitjà-baix</p> <p>Persones a partir de 50 anys no incloses en els apartats anteriors.</p>	<p>Seguiment mitjançant:</p> <p>Prova de sang oculta en femta cada 2 anys.</p>

CCR esporàdic

El CCR esporàdic és aquell que es desenvolupa en individus sense cap antecedent familiar o personal de risc de CCR, i comprèn entre un 65% i 85% dels casos de CCR, segons les sèries estudiades (Burt, 2000; Rustgi, 1994; Winawer, et al., 1997). En absència d'aquests antecedents, l'edat és la condició que més determina el risc de CCR, de manera que del total de pacients amb CCR més del 85% són diagnosticats després dels 60 anys (Winawer, et al., 2003). L'edat de presentació habitual del CCR esporàdic oscil·la entre la sisena i vuitena dècada de la vida.

CCR familiar

Els estudis de cohorts i de casos i controls indiquen que els individus amb familiars de primer grau afectes d'adenoma o CCR tenen un risc de desenvolupar aquesta neoplàsia superior al de la població general, així com de patir-la més precoçment (Burt, 2000). Així doncs, tot i que els pacients pertanyents a aquest subgrup, que representa entre el 25% i el 30% del total de casos de CCR, presenten antecedents familiars, no compleixen els criteris diagnòstics o moleculars de les formes hereditàries.

CCR hereditari

Aquest grup inclou tots aquells individus amb un alt grau d'agregació familiar, és a dir, amb un patró molt clar d'herència de CCR dins la seva família. Aquestes síndromes representen entre un 3% i un 5% de totes les neoplàsies colorectals i hi podem distingir els següents grups que explicarem amb més detall en aquest capítol:

- Síndromes no poliposes: síndrome de Lynch o CCR hereditari no polipós (HNPCC)
- Síndromes poliposes:
 - Poliposis adenomatoses
 - Poliposi adenomatosa familiar (FAP)
 - Poliposi adenomatosa familiar atenuada (AFAP)
 - Poliposi associada a *MUTYH* (MAP)
 - Poliposis hamartomatoses: Síndrome de Peutz-Jeghers, poliposi juvenil familiar, síndrome de Cowden, síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley

Malgrat la seva baixa proporció, aquestes formes hereditàries de CCR tenen una gran importància des d'un punt de vista fisiopatològic, clínic i terapèutic. En primer lloc, l'estudi dels gens implicats en el desenvolupament d'aquestes malalties ha permès conèixer els mecanismes moleculars del desenvolupament del CCR en general. Com ja hem vist, alguns dels gens claus del procés tumoral són els que apareixen mutats en la línia germinal dels individus amb aquestes síndromes hereditàries (Fearon and Vogelstein, 1990). En segon lloc, la identificació dels gens responsables ha permès establir el diagnòstic presimptomàtic dels individus portadors de mutacions en aquests gens i, per tant, en risc de desenvolupar la malaltia, amb la conseqüent repercussió en les estratègies de cribatge. Així, el diagnòstic molecular de les formes hereditàries possibilita l'adopció de mesures terapèutiques més radicals que les emprades per les formes esporàdiques, tenint un impacte favorable en el pronòstic d'aquests malalts.

Síndrome de Lynch o CCR hereditari no polipós (HNPCC)

La síndrome de Lynch, també referit com HNPCC (*Hereditari non-polyposis colorectal cancer*), és la síndrome de predisposició a CCR més comuna. Clínicament, es tracta d'una malaltia autosòmica dominant caracteritzada per l'aparició de CCR a una edat jove (abans dels 50 anys) i un increment del risc de patir altres càncers, incloent càncer d'endometri, estómac, ovari, tracte urinari, tracte hepatobiliar, pàncrees, intestí prim, pell i més rarament cervell (Lynch, et al., 2008). S'ha proposat en alguns estudis que altres manifestacions com els sarcomes i els càncers de pròstata i mama també podrien pertànyer a l'espectre de la síndrome de Lynch (den Bakker, et al., 2003; Hirata, et al., 2006; Soravia, et al., 2003; Westenend, et al., 2005). Aquesta síndrome està associada a mutacions germinals en els gens de reparació de bases desaparellades del DNA (MMR), *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*.

En els portadors de mutacions germinals en gens MMR, la inactivació somàtica de l'al·lel wt permetrà que es desenvolupi el tumor, deixant així a les cèl·lules amb un sistema de reparació del DNA totalment defectiu (Imai and Yamamoto, 2008). Com ja hem explicat anteriorment, la inactivació d'aquests gens produeix una acumulació d'errors en les seqüències repetitives del DNA (microsatèl·lits) que dona lloc al que ja coneixem com inestabilitat de microsatèl·lits o MSI. La majoria de casos amb síndrome de Lynch (90%) presenten MSI, sent així, un molt bon marcador per a la detecció d'aquesta malaltia. Tot i això, no és del tot específic ja que com hem esmentat abans, entre un 8% i un 15% dels CCRs esporàdics també presenten aquesta inestabilitat, associada a hipermetilació somàtica del promotor de *MLH1* (Herman, et al., 1998;

Weisenberger, et al., 2006). Si la inactivació somàtica dels gens MMR és un tret característic dels tumors de pacients amb síndrome de Lynch, és fàcil deduir que la seva expressió proteica també es veurà afectada. Així doncs, a través d'immunohistoquímiques (IHQ) específiques de les proteïnes MMR i tenint en compte la seva capacitat heteromèrica, podem saber quina d'elles estarà més probablement afectada en la línia germinal (Gruber, 2006).

Per tal d'establir uns criteris per a la selecció de famílies amb elevada probabilitat de patir síndrome de Lynch, l'any 1991 es van publicar els criteris d'Amsterdam I (Vasen, et al., 1991) (Taula 6). L'any 1999 es van proposar uns nous criteris (Amsterdam II) que incloïen els càncers extracolònics associats a la malaltia (Vasen, et al., 1999) (Taula 6). Paral·lelament al descobriment de la MSI i la seva alta freqüència en la síndrome de Lynch, es van proposar l'any 1997 els criteris de Bethesda per a la identificació de tumors candidats a realitzar l'anàlisi de MSI (Rodríguez-Bigas, et al., 1997), que han estat revisats recentment (Umar, et al., 2004) (Taula 6). Aquests criteris permeten la identificació d'individus amb risc de patir síndrome de Lynch candidats a l'estudi de la MSI o IHQ de les proteïnes MLH1, MSH2, MSH6 i PMS2. En aquests casos, el diagnòstic definitiu de la síndrome dependrà de la identificació d'una mutació germinal en els gens reparadors del DNA.

Taula 6. Criteris per al diagnòstic molecular de la síndrome de Lynch

CRITERIS D'AMSTERDAM I (la família els ha de complir TOTS)

- Tres o més familiars amb CCR, un d'ells familiar de 1r grau dels altres dos
- Dues generacions successives afectes
- Almenys un tumor diagnosticat abans dels 50 anys
- Exclusió de la poliposi adenomatosa familiar
- Els tumors han de ser confirmats mitjançant un estudi histopatològic

CRITERIS AMSTERDAM II (la família els ha de complir TOTS)

- Tres o més familiars amb CCR o un tumor associat a síndrome de Lynch*, un d'ells familiar de 1r grau dels altres dos
- Dues generacions successives afectes
- Almenys un tumor diagnosticat abans dels 50 anys
- Exclusió de la poliposi adenomatosa familiar
- Els tumors han de ser confirmats mitjançant un estudi histopatològic

CRITERIS DE BETHESDA REVISATS (el individu n'ha de complir un)

- CCR diagnosticat abans dels 50 anys
- Presència de CCR sincrònic o metacrònic, o de CCR i un tumor associat a síndrome de Lynch*, independentment de l'edat
- CCR amb una histologia# de tumor MSI-alta diagnosticat abans dels 60 anys
- CCR i un o més familiars de 1r grau que presenten un tumor associat a síndrome de Lynch, i amb un dels càncers diagnosticats abans dels 50 anys
- CCR i dos o més familiars de 1r o 2n grau amb un tumor associat a HNPCC independentment de l'edat del diagnòstic

*Els tumors associats inclouen colorectal, endometri, estómac, ovari, pàncrees, ureter, pelvis renal, tracte biliar i cervell, adenomes de les glàndules sebàcies i querocantomes, i carcinomes del intestí prim

Presència de limfòcit infiltrants, reacció limfocítica similar a la malaltia del Crohn, cèl·lules en anell de segell o component mucinos i patró de creixement medul·lar

Altres controvèrsies han sorgit al voltant d'aquesta síndrome. En primer lloc, el propi nom per definir la malaltia ha estat tema de debat. Fins fa poc, el terme més usat era HNPCC, tot i això, el fet que aquesta síndrome tingui un ampli espectre de tumors que no tenen perquè ser colorectals, més l'evidència que també es poden formar adenomes o pòlips precursors dels tumors (De Jong, et al., 2004), va fer ressorgir el nom de "síndrome de Lynch". Tan sols un 45%-65% de les famílies que compleixen els criteris d'Amsterdam presenten mutacions germinals en algun dels gens MMR (Liu, et al., 1996), i això ha portat a reservar el terme "síndrome de Lynch" a aquelles famílies o individus amb una evidència molt forta de deficiències en els gens MMR, normalment associades a la identificació de mutacions o epimutacions germinals en els gens *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, o *PMS2*. Aquelles famílies que compleixen els criteris d'Amsterdam però no presenten evidències de deficiències del sistema MMR s'han referit com a famílies amb CCR familiar (Vasen, et al., 2007), CCR hereditari de tipus X (Lindor, et al., 2005) o CCR hereditari no sindròmic (HNSCRC) (Papaemmanuil, et al., 2008). Aquestes famílies tenen una incidència menor de CCR, els tumors apareixen més tard i no hi ha evidències d'un increment del risc de patir tumors extracolònics (Lindor, et al., 2005).

Les mutacions en els gens *MSH2* i *MLH1* són les que s'identifiquen més freqüentment en la síndrome de Lynch amb una prevalença similar: 34% i 42%, respectivament, en un estudi de famílies Amsterdam I (Lindor, et al., 2005), i 44% i 38%, respectivament, en la Leiden Open Variation Database (http://chromium.liacs.nl/LOVD2/colon_cancer/home.php). Les mutacions en *MSH6* són responsables d'una fracció més petita de la síndrome de Lynch i tendeixen a estar més fortament associades amb càncer d'endometri i un grau baix de MSI (Boland, et al., 2008). Les mutacions a *PMS2* són molt minoritàries (Senter, et al., 2008). Les

mutacions en els gens MMR es troben distribuïdes al llarg de tota la regió gènica i normalment donen lloc a proteïnes truncades. Les grans delecions són relativament comunes en el gen *MSH2* (sobre un 10%), menys comunes en *MLH1* i molt rares en *MSH6* i *PMS2* (Leiden Open Variation Database) i han estat objecte d'estudi d'aquesta tesi. Tot i això, fins al 30% de les mutacions, són variants de significat incert o mutacions *missense*. Recentment s'han descrit mutacions germinals epigenètiques tant en *MLH1* (Hitchins and Ward, 2008) com en *MSH2*, en aquest cas lligades a delecions del gen veí *TACSTD1* (Ligtenberg, et al., 2009).

La detecció de mutacions en els gens *MLH1* i *MSH2* es sol fer combinant mètodes de cribratge (DHPLC, CSCE, DGGE) o la seqüenciació de les regions codificants, amb tècniques que permeten la detecció d'alteracions en el nombre de còpies d'un o varis exons com MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) o la QMPSF (*Quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments*) (Gruber, 2006). En la figura 15 es mostra amb detall l'algoritme diagnòstic consensuat entre la Unitat de Consell Genètic i el Programa de Diagnòstic Molecular de Càncer Hereditari del Institut Català d'Oncologia, per a la identificació d'aquests pacients i la detecció de mutacions causants de la patologia (Figura 15).

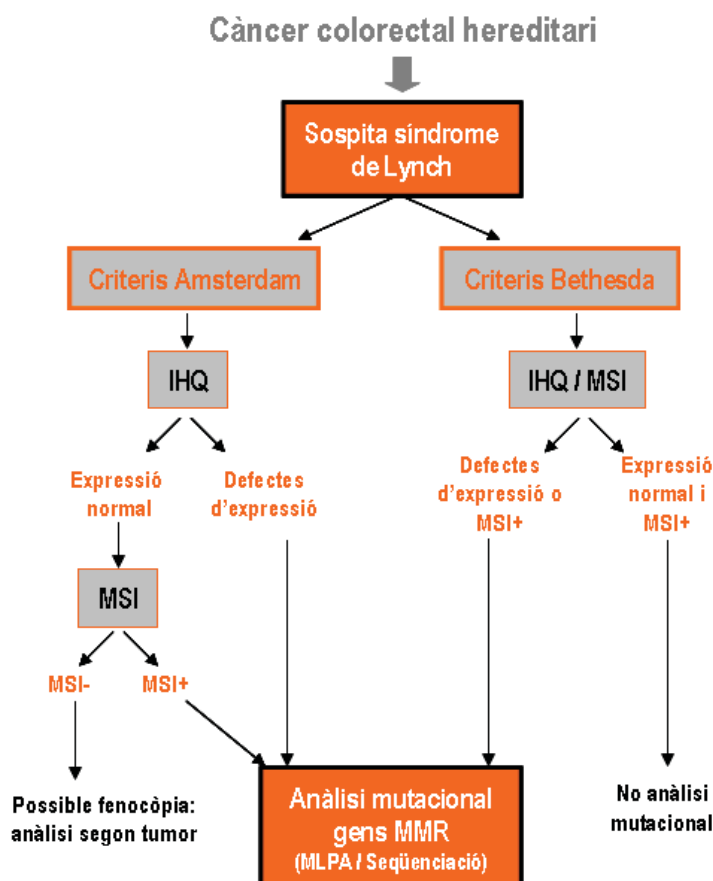


Figura 15. Algoritme diagnòstic per la síndrome de Lynch. Si la família segueix els criteris d'Amsterdam, es realitza la IHQ del tumor. Si hi ha pèrdua d'expressió d'una proteïna MMR es procedeix a l'anàlisi mutacional del gen en qüestió (primer grans delecions per MLPA o QMPSF i després seqüenciació de la regió codificant sencera). Si l'expressió proteica és normal, es fa l'anàlisi de MSI i l'anàlisi dels gens MMR en el cas que el tumor sigui inestable. Si el tumor és estable indica una possible fenocòpia i es procedeix a l'anàlisi d'un segon tumor. Si la família segueix els criteris de Bethesda, es fa la IHQ i la MSI del tumor, si una de les dues indica deficiències del sistema MMR es procedeix a l'anàlisi mutacional.

Finalment, és important destacar que existeix un síndrome de deficiència constitucional de MMR (Wimmer and Etzler, 2008) en què els individus afectats són portadors de mutacions bial·lèliques en un dels gens MMR. Es caracteritzen pel desenvolupament de càncers a la infància, sobretot de caràcter hematològic i/o tumors cerebrals, CCR a edats molt joves i taques cafè amb llet.

Poliposi adenomatosa familiar clàssica (FAP) i atenuada (AFAP)

La poliposi adenomatosa familiar és una síndrome hereditària autosòmica dominant que representa menys del 1% de tots els CCRs (Lynch and de la Chapelle, 2003b). La seva forma clàssica (FAP) es caracteritza per la presència de 100 o més pòlips adenomatosos en el còlon i el recte (Vasen, et al., 2008) diagnosticats normalment entre els 20 i 30 anys i que, si no són eliminats adequadament amb una colectomia profilàctica total o parcial, derivaran de forma inevitable en un carcinoma colorectal cap als 40-50 anys (Figura 16, A) (Fearnhead, et al., 2001; Lynch and de la Chapelle, 2003a). A més, aproximadament un 70% dels pacients de FAP també presenten manifestacions extracolòniques com adenomes gastroduodenals, osteomes, quists epidèrmics, hipertròfia congènita de l'epiteli pigmentari de la retina i tumors desmoides. Algunes d'aquestes manifestacions extracolòniques són la major causa de mortalitat en els pacients de FAP després de la cirurgia (Fearnhead, et al., 2001). Existeix una variant atenuada d'aquesta malaltia, l'AFAP, que es diferencia de la forma clàssica per la presència d'un nombre inferior de pòlips (generalment més de 15 i sempre menys de 100), localitzats preferentment al còlon dret, d'evolució menys agressiva, aparició més tardana, i amb una expressió de manifestacions extracolòniques més limitada (Figura 16, B) (Knudsen, et al., 2003; Nielsen, et al., 2007b).

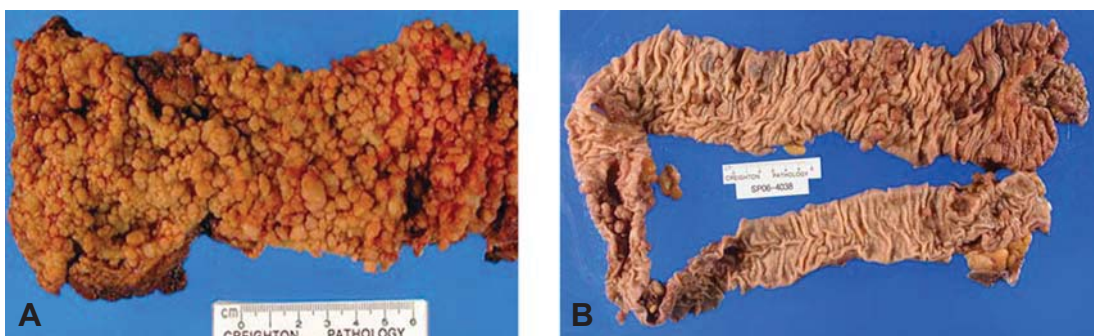


Figura 16. Còlons de pacients amb poliposi. A. FAP clàssica amb varis centenars de pòlips adenomatosos. **B.** AFAP uns 59 adenomes i un CCR. Modificat de Gatalica i Torlakovic, 2008.

Les formes clàssiques i atenuades s'associen, amb diferent prevalença, a mutacions germinals en el gen *APC* amb penetrància propera al 100%. Com ja hem vist, *APC* juga un paper clau en la via de Wnt de regulació de la homeòstasi de l'epiteli colònic i la inactivació del qual és important pel procés de tumorigènesi colorectal. Alguns casos, principalment poliposi atenuades, també s'han associat a mutacions bial·lèliques en el gen *MUTYH* (també dit *MYH*), però actualment s'accepta que aquests casos pertanyen a la poliposi associada a *MUTYH* (MAP), que explicarem més endavant. En general, es detecten mutacions germinals en el gen *APC* en el 80%-90% de les famílies FAP i el 20%-30% de les AFAP. En les famílies FAP, la majoria d'aquestes mutacions són *nonsense* (~30%) o *frameshift* (~68%) que donen lloc a una proteïna truncada a la regió C-terminal (Galiatsatos and Foulkes, 2006). La resta són variants *missense*, mutacions d'*splicing* o grans delecions (Aretz, et al., 2004; Montera, et al., 2001; Sieber, et al., 2002a). La detecció d'aquestes últimes ha estat possible gràcies al desenvolupament, en els darrers anys, de tècniques com l'MLPA o la QMPSF (Aretz, et al., 2005; Charbonnier, et al., 2000) i han estat objecte d'estudi d'aquesta tesi. En canvi, en les famílies AFAP, les mutacions *missense* representen més de la meitat de les mutacions detectades, i les grans delecions hi són molt rarament trobades. A diferència d'altres síndromes colorectals no s'han trobat mutacions epigenètiques com a causants de la poliposi (Romero-Gimenez, et al., 2008). La major part de les mutacions germinals del gen *APC* es localitzen entre els codons 157 i 1595, i els dos codons més freqüentment mutats es troben a les posicions 1061 (11%) i 1309 (17%), essent les mutacions al codó 1309 les que s'associen a un fenotip més sever. En la figura 17 es mostra amb detall l'algoritme diagnòstic que es segueix, com a treball conjunt entre la Unitat de Consell Genètic i el Programa de Diagnòstic Molecular de Càncer Hereditari del Institut Català d'Oncologia, per a la identificació d'aquests pacients i la detecció de mutacions causants de la patologia (Figura 17).

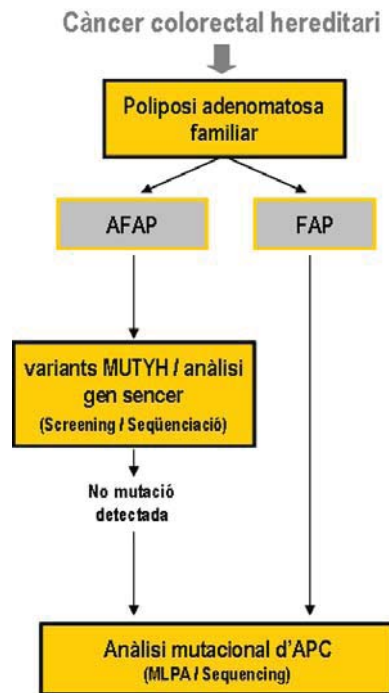


Figura 17. Algoritme diagnòstic per la poliposi adenomatosa familiar i la poliposi associada a *MUTYH*. Davant d'una família amb poliposi clàssica es procedeix directament al anàlisi mutacional del gen *APC* (primer de grans delecions per MLPA seguit de la seqüenciació de la regió codificant sencera). Si el patró és recessiu o la clínica és atenuada primer es fa l'anàlisi mutacional del gen *MUTYH* i si no es detecta cap mutació es procedeix a l'anàlisi de l'*APC*.

De fet s'han descrit correlacions genotip-fenotip, de tal manera que la localització de la mutació germinal d'*APC* condiona la severitat i l'espectre clínic de la malaltia (Galiatsatos and Foulkes, 2006; Nagase, et al., 1992; Nieuwenhuis and Vasen, 2007). A la poliposi clàssica, les mutacions germinals del gen *APC* es solen trobar entre el codó 157 (exó 4) i el codó 1595 (exó 15). Més concretament, és a la regió MCR, (*Mutation cluster region*; codons 1268 i 1513), on s'acumulen el 80% de les mutacions somàtiques d'*APC* (Miyoshi, et al., 1992), on es localitzen les mutacions germinals que originen les poliposis més severes (>5000 adenomes colorectals), en les que l'edat d'aparició de la poliposi se situa entre la primera i segona dècada de vida i la mitjana d'edat d'aparició del CCR és d'aproximadament 34 anys (Nagase, et al., 1992). Els pacients amb poliposi atenuada tendeixen a presentar mutacions germinals en tres regions característiques del gen *APC*: abans del codó 157 (extrem 5'), a l'exó 9 i després del codó 1595 (extrem 3') (Soravia, et al., 1998; Spirio, et al., 1993). Tot i això, les raons de l'associació entre la mutació germinal i la gravetat de la PAF no són clares. Una possibilitat és que la probabilitat d'iniciació del tumor i de la seva progressió estigui relacionada amb la retenció o no de la regió d'unió a la β -catenina, tot i que l'estabilitat de la proteïna també hi pot estar relacionada. S'ha descrit que la mutació més freqüent (c.1309: delecio de 5 pb) produeix una proteïna truncada molt estable amb un possible efecte dominant negatiu important, mantenint la regió d'homodimerització, mentre que les mutacions en els extrems 3' i 5' donen lloc a proteïnes més inestables. Tot i això, la localització i el tipus de mutació germinal d'*APC* no poden explicar les diferències de gravetat de la malaltia dins una mateixa família o

entre diferents famílies amb la mateixa mutació germinal. La influència del micro i del macroambient podria explicar, en part, aquestes diferències. S'ha posat de manifest que hi pot haver diferències acusades en el fenotip de dos bessons del mateix sexe, i aquest fet només es podria explicar per la presència de gens modificadors (Houlston, et al., 2001).

Com a supressor tumoral i d'acord amb la hipòtesi del *two-hit* de Knudson (Knudson, 1971), s'espera que el gen *APC* quedi completament inactivat en aquests pacients, per mitjà d'una mutació somàtica del segon al·lel o la pèrdua de l'al·lel wt (Knudson, 1993). S'ha descrit que el tipus de mutació somàtica d'*APC* ve condicionada per la localització de la mutació germinal (Lamlum, et al., 1999; Rowan, et al., 2000; Sieber, et al., 2006), el què suposaria una variació significativa de la hipòtesi de Knudson que pressuposava que les dues mutacions eren independents. Si la mutació germinal es troba entre els codons 1194 i 1392, llavors hi ha una pèrdua de l'al·lel wt com a segon *hit*. Si la mutació germinal es troba fora d'aquesta regió, llavors el segon *hit* és una mutació truncant a la regió MCR. Es pot lligar això al que comentàvem abans sobre la severitat de les mutacions. Les mutacions properes al codó 1309 proporcionen un avantatge selectiu molt fort i tendrien a adquirir un segon *hit* per pèrdua al·lèlica deixant com a única representació d'*APC* en la cèl·lula aquella amb la mutació avantatjosa. Per això en el cas que la mutació germinal no està en aquesta regió, el segon *hit* s'hauria de donar al MCR.

Poliposi associada a *MUTYH* (MAP)

Recentment s'ha demostrat que la presència de mutacions germinals bial·lèliques en el gen *MUTYH* origina la MAP, una síndrome de poliposi autosòmica recessiva sovint indistingible en les seves manifestacions clíniques de les formes clàssiques o atenuades de la FAP (Al-Tassan, et al., 2002). El gen *MUTYH* codifica una DNA glicosilasa implicada en la reparació del DNA (BER, *Base Excision Repair*). Alguns pacients amb MAP presenten manifestacions extracolòniques, indicant-nos que aquests trets no estan restringits només a pacients amb mutacions germinals en el gen *APC*. Fins ara, les mutacions bial·lèliques en el gen *MUTYH* s'han identificat només en famílies diagnosticades de FAP o AFAP, explicant fins una tercera part dels pacients amb AFAP. En un estudi, es van identificar mutacions bial·lèliques de *MUTYH* en el 7,5% dels pacients amb un fenotip de FAP clàssic i sense cap mutació prèviament identificada en el gen *APC* (Sieber, et al., 2003). Dues variants, Y165C i G382D, suposen el 75% de les variants identificades en el gen *MYH* en caucàsics (Al-Tassan,

et al., 2002). En la figura 17 es mostra com s'identifiquen aquestes mutacions dins l'algoritme diagnòstic de la poliposi (Figura 17).

Les vies moleculars de les poliposis relacionades amb *APC* i *MUTYH* convergeixen a nivell somàtic, atès que la disfunció de la *MUTYH* augmenta la taxa de mutacions somàtiques en el gen *APC*, la qual cosa, a la vegada, dona lloc a la transformació neoplàstica. El patró de mutacions somàtiques en els càncers i adenomes en la poliposi associada a *MUTYH*, a nivell de l'*APC* i d'altres gens com *KRAS*, es caracteritza per un excés significatiu de transversions G:C>T:A (Lipton, et al., 2003).

Poliposis hamartomatoses

Les síndromes de poliposi hamartomatososa són un grup poc freqüent de poliposi on es desenvolupen múltiples pòlips hamartomatosos a una edat jove, i on s'ha vist una predisposició a desenvolupar CCR. La millora en el coneixement de la base genètica d'aquestes malalties està ajudant al diagnòstic i classificació dels pacients. Com ja hem dit, n'hi ha de diferents tipus (Síndrome de Peutz-Jeghers, poliposi juvenil familiar, síndrome de Cowden, síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley) però com que s'allunyen del focus d'aquest treball, no hi entrarem en detall.

El consell genètic

En el procés de consell genètic s'avalua el risc personal i familiar de susceptibilitat hereditària al càncer mitjançant la realització d'una exhaustiva història clínica sobre els antecedents familiars i personals de càncer del pacient. És un procés de comunicació que tracta els problemes associats amb l'aparició, o amb el risc d'aparició, d'una malaltia genètica en una família. Aquest procés requereix de la participació de varis professionals formats en aquest camp per ajudar al individu o la família a: (i) entendre els aspectes de la malaltia o síndrome, incloent el diagnòstic, les possibles causes i el maneig mèdic actual; (ii) diferenciar com l'herència pot contribuir a la malaltia i el risc de transmissió a familiars; (iii) entendre les opcions per enfrontar-se al risc de transmissió; (iv) escollir l'actuació que sigui més apropiada en funció del risc, la dinàmica familiar, els seus principis ètics i/o religiosos i actuar d'acord a aquests principis; (v) adaptar-se de la millor manera possible a la malaltia i al risc de transmetre-la.

Per a la majoria de les síndromes de predisposició hereditària al càncer, els components comuns del procés de consell genètic inclouen construir i avaluar un arbre genealògic, obtenir la història mèdica personal i familiar, i proporcionar informació sobre el risc genètic. Si es realitza un estudi genètic, el procés incorpora l'assessorament previ, l'estudi, l'assessorament posterior i el seguiment. Després de l'estudi genètic, s'informa a aquells individus no portadors de la mutació que tenen el risc de la població general a patir la neoplàsia en qüestió. En aquelles persones amb un test positiu, se'ls informarà del risc de desenvolupar un càncer tot recomanant-los les estratègies de prevenció i cribratge adequades.

En aquells casos en què es detecta la mutació patogènica, una de les aplicacions del consell genètic en conjunt amb el diagnòstic molecular és la possibilitat de realitzar diagnòstic prenatal o fins i tot preimplantacional. El passat 21 d'abril del 2009 es va aprovar per primera vegada a l'estat espanyol el diagnòstic preimplantacional per evitar la transmissió d'una mutació que predisposa a desenvolupar un càncer hereditari. Concretament es tracta d'una mutació en el gen *BRCA1* que predisposa a càncer de mama i ovari. Aquest pas, aprovat per la Comissió Nacional de Reproducció Humana Assistida, ha plantejat certs dilemes ètics pel fet de tractar-se d'un gen amb una penetrància elevada però no del 100% en dones i inferior en homes i que, amb un bon seguiment i prevenció, la malaltia causada per la mutació pot ser tractada a temps.

5. PAPER DE LA DOSI A NIVELL GERMINAL EN EL CÀNCER COLORECTAL

La dosi a nivell de DNA: grans reordenaments

Majoritàriament, quan parlem de grans reordenaments, parlem de delecions d'un, varis o tots els exons d'un gen que fins i tot poden afectar a gens contigus. Aquest terme també contempla duplicacions i inversions de fragments relativament grans d'un gen. Tot i això, aquests últims tipus de reordenaments s'han descrit en menor proporció en els gens responsables del CCR hereditari.

La incorporació de la detecció de grans reordenaments del DNA com a tècnica de cribratge mutacional de les famílies amb síndromes hereditàries de CCR és un fet recent que ha permès millorar-ne el diagnòstic molecular. Ja hem vist que tant en la síndrome de Lynch com en la FAP clàssica i atenuada existeixen famílies en les quals no som capaços de detectar la mutació germinal. Fins fa relativament pocs anys una de les causes principals era la limitació tecnològica, ja que les tècniques usades per cercar mutacions puntuals, com ara la seqüenciació, emmascaren aquest tipus de reordenaments degut a la presència de l'al·lel wt en heterozigosi. Clàssicament, la detecció dels reordenaments s'ha fet mitjançant tècniques com *Southern-blot*, segregació no parental de marcadors polimòrfics, FISH (*fluorescence in situ hybridization*), PCR quantitativa, o anàlisis d'RNA entre d'altres (Aretz, et al., 2005; Flintoff, et al., 2001; Mauillon, et al., 1996; Mueller, et al., 2004; Renkonen, et al., 2005; Su, et al., 2000; van der Luijt, et al., 1997; Wijnen, et al., 1998). Gràcies al seu ús, ja s'havien pogut detectar grans reordenaments tant en *MSH2* i *MLH1* com en *APC*. Tot i això, aquests mètodes solen ser llargs i dificultosos de forma que no poden ser fàcilment incorporats en la rutina del diagnòstic molecular. El desenvolupament de tècniques com la QMPSF (Charbonnier, et al., 2000) i l'MLPA (Schouten, et al., 2002), basades en la detecció per fluorescència de l'amplificació quantitativa dels diferents exons d'un gen, han permès que això sigui possible .

Gràcies a aquestes tècniques, es van començar a cercar grans reordenaments en les famílies amb síndrome de Lynch i poliposi en les quals prèviament, no s'havien detectat mutacions en els gens *MMR* i *APC*, respectivament. Així, actualment sabem que les famílies amb síndrome de Lynch presenten grans delecions dels gens *MMR* en un 5%-20% dels casos en funció dels criteris clínics i moleculars utilitzats que poden ser heterogenis (Di Fiore, et al., 2004; Gille, et al., 2002; Grabowski, et al., 2005; Nakagawa, et al., 2003; Taylor, et al., 2003; van der Klift, et al., 2005; Viel, et al., 2002;

Wang, et al., 2003; Zhu, et al., 2005). Aquest tipus de mutacions són més freqüents en *MSH2* i en *MLH1*, sobretot les de *MSH2* que s'ha descrit que estan involucrades en un 10% dels casos que compleixen els criteris d'Amsterdam (Di Fiore, et al., 2004). En el cas de la poliposi, es calcula que les grans delecions representen un 5% dels casos FAP (Aretz, et al., 2005; Meuller, et al., 2004; Renkonen, et al., 2005), i es troben molt rarament en les famílies AFAP (Nielsen, et al., 2007a; Su, et al., 2002; Venesio, et al., 2003).

La dosi a nivell d'RNA: expressió en la línia germinal

Es postula que gran part del component genètic de la diversitat fenotípica humana, incloent la susceptibilitat a malalties, pot ser resultat de canvis en l'expressió dels gens. Aquests canvis d'expressió, poden ser deguts tant a elements reguladors que actuen en *cis* o simplement a canvis a nivell genòmic que es troben en regions no codificants i que per tant s'escapen de ser detectats en els cribratges a nivell de DNA. Una de les formes de quantificar variacions en l'expressió gènica és a través de l'expressió al·lèlica diferencial o expressió específica d'al·lel (*allele-specific expression*, ASE), en la qual es mesura la proporció expressada d'un al·lel respecte l'altre. Recentment, aquesta quantificació específica d'al·lel s'ha usat molt per a la detecció d'aquests canvis resultant en evidències clares que els desequilibris al·lèlics a nivell d'expressió poden ocórrer freqüentment en els gens humans i poden jugar un paper crucial en la susceptibilitat a malalties (Bray, et al., 2003; Brinckmann, et al., 2007; Curia, et al., 1999; Chen, et al., 2008; Knight, 2004; Lo, et al., 2003; Milani, et al., 2007; Renkonen, et al., 2003; Renkonen, et al., 2005; Tournier, et al., 2004b; Valle, et al., 2008; Yan, et al., 2002a; Yan, et al., 2002b; Zhang, et al., 2005).

Particularment, els síndromes de càncer hereditari han estat un dels focus de les anàlisis d'ASE. Per una banda, l'observació que les grans delecions a nivell de DNA poden explicar aquestes síndromes reforça la teoria que l'haploinsuficiència pot ser responsable del desenvolupament dels tumors. S'han detectat petites disminucions de l'expressió d'*APC* en famílies on prèviament no s'havien trobat mutacions a nivell de DNA (De Rosa, et al., 1999; Kanter-Smoler, et al., 2008; Powell, et al., 1993; Venesio, et al., 2003; Yan, et al., 2002a). En la mateixa línia però referint-nos a anàlisis d'ASE, s'han trobat també desequilibris germinals en l'expressió dels al·lèls del gen *APC* (Kanter-Smoler, et al., 2008; Powell, et al., 1993; Renkonen, et al., 2005; Yan, et al., 2002a) en famílies amb poliposi sense mutació germinal detectada. Aquest fenomen també s'ha reportat en famílies amb la síndrome de Lynch sense mutacions

detectades en els gens MMR on es detecta expressió diferencial dels al·lells dels gens *MSH2* i *MLH1* (Renkonen, et al., 2003), i en famílies amb predisposició a càncer de mama amb desequilibris en el gen *BRCA1* (Chen, et al., 2008).

Per l'altra banda, també han estat sotmeses a estudis d'ASE, famílies amb mutacions ja detectades en els gens de predisposició a càncer. Anàlisis d'ASE dels gens *MSH2*, *MLH1*, *BRCA1*, *BRCA 2* i *NF1* (causant de la neurofibromatosis) mostren que les mutacions que generen codons *stop* prematurs (*premature stop codons*, PTCs) donen lloc a desequilibris en l'expressió al·lèlica dels gens mutats (Brinckmann, et al., 2007; Chen, et al., 2008; Perrin-Vidoz, et al., 2002; Renkonen, et al., 2003; Tournier, et al., 2004b). Aquest desequilibri es deu al fenomen de *nonsense mediated decay* (NMD), un mecanisme cel·lular de vigilància del RNA missatger (mRNA) que assegura la degradació d'aquells mRNAs que podrien donar lloc a proteïnes truncades amb un probable efecte patogènic dominant negatiu o guany de funció (Cartegni, et al., 2002). També s'ha vist que les mutacions que donen lloc a PTCs en l'últim exó d'un gen, no solen presentar expressió diferencial dels al·lells (Perrin-Vidoz, et al., 2002; Tournier, et al., 2004b), fet que s'explica pel model d'escaneig (*scanning model*) del NMD. De forma resumida, direm que durant el procés d'*splicing*, les unions exó-exó queden marcades per un complex proteic que és eliminat durant la primera ronda de traducció a mesura que passen els ribosomes. Per tant, quan els ribosomes troben un PTC abans del últim exó aturen la traducció, fent que encara restin un o més complexos proteics que no seran eliminats i que marquen l'mRNA per ser degradat. Però, quan aquest PTC es troba en l'últim exó, tot i que la traducció proteica finalitzi abans del previst, no restarà cap unió exó-exó més endavant, fent que el mRNA no quedi marcat per a la degradació (Cartegni, et al., 2002). Les mutacions que no alteren el marc de lectura donen lloc a una expressió equilibrada d'ambdós al·lells (Brinckmann, et al., 2007; Renkonen, et al., 2003). Al contrari que per altres gens de predisposició al càncer, fins al moment no hi ha estudis encaminats a analitzar sistemàticament el impacte de les mutacions del gen *APC* a nivell d'RNA.

HIPÒTESI

Tant en la síndrome de Lynch com en la FAP clàssica i atenuada existeixen famílies en les quals no som capaços de detectar la mutació germinal causant de la malaltia. L'emascament de grans reordenaments del DNA degut a la presència de l'al·lel wt en els gens MMR i APC, respectivament, n'ha estat una de les causes. El desenvolupament de tècniques com la QMPSF i l'MLPA ha permès descobrir que les grans delecions són una de les causes patogèniques d'aquestes malalties.

Recentment, s'ha començat a estudiar el paper que l'expressió específica d'al·lel (ASE) juga en la predisposició al càncer. S'han reportat desequilibris en l'expressió al·lèlica dels gens MMR en famílies amb sospita de síndrome de Lynch i en APC en famílies amb poliposi adenomatosa familiar on no s'havia trobat la causa patogènica usant tècniques d'anàlisi de DNA. Al contrari que amb els gens MMR, fins el moment no hi ha estudis encaminats a analitzar sistemàticament el impacte de les mutacions del gen APC en l'ASE.

La nostra hipòtesi és que l'anàlisi de la dosi tant a nivell de DNA (grans reordenaments) com d'RNA (ASE) dels principals gens de predisposició hereditària a càncer colorectal (*MSH2*, *MLH1* i *APC*) ens permetran millorar l'estratègia de diagnòstic molecular de les famílies amb síndrome de Lynch i poliposi, al mateix temps que la comprensió del procés tumorogènic.

OBJECTIUS

Objectiu general

Aquesta tesi es centra en comprendre com els canvis de dosi, en la línia germinal, dels principals gens involucrats en el CCR hereditari, afecten al desenvolupament de la malaltia, centrant-nos tant en la dosi a nivell de DNA com d'RNA. L'adquisició d'aquests coneixements ha de servir no només per millorar la comprensió del procés tumorigènic, sinó també per fer nous avenços que es puguin aplicar al diagnòstic molecular d'aquestes síndromes.

Objectius específics

- Anàlisi i caracterització molecular de gran delecions a nivell de DNA dels gens *MSH2* i *MLH1* involucrats en la síndrome de Lynch mitjançant la tècnica QMPSF (*quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments*).
- Disseny i posada a punt de la QMPSF del gen *APC* involucrat en la poliposi adenomatosa familiar (FAP). Anàlisi i caracterització molecular de grans delecions en aquest gen.
- Estudi de la dosi a nivell d'RNA del gen *APC* mitjançant l'estudi de la seva expressió específica d'al·lel (ASE) en la línia germinal, tant en famílies portadores de mutació com famílies on no se n'ha pogut identificar cap.

RESULTATS

Els resultats obtinguts del treball experimental realitzat en aquesta tesi estan inclosos en varis articles científics, ja sigui publicats o en preparació. En aquesta memòria els resultats es descriuran breument i seguidament s'adjuntaran els articles.

Article 1

“Detecció i caracterització de grans reordenaments de *MSH2* i *MLH1* en famílies amb síndrome de Lynch”

Article 2

“Limfoma no Hodgkin relacionat a càncer colorectal hereditari no polipós en un pacient amb una nova deleció complexa en heterozigosi en el gen *MHS2*”

Article 3

“Detecció de delecions en el gen *APC* usant la PCR quantitativa multiplex de fragments curts fluorescents”

Article 4

“Expressió específica d'al·lel del gen *APC* en famílies de poliposi adenomatosa”

ARTICLE 1***Detection and characterization of MSH2 and MLH1 genomic rearrangements in Lynch syndrome families***

Ester Castellsagué, Marga Nadal, Jesus del Valle, Marta Pineda, Sara González, Ignacio Blanco, Thierry Frebourg, and Gabriel Capellá

Manuscrit en preparació

Resum del treball: La síndrome de Lynch és la síndrome hereditària més comuna de càncer colorectal i està causada per mutacions germinals heterozigotes en els gens *MSH2* i *MLH1* majoritàriament. La major part d'aquestes mutacions són puntuals però el desenvolupament d'assajos semiquantitatius com la PCR multiplex de fragments curts fluorescents (QMPSF) ha permès descobrir que una part de les famílies amb la síndrome de Lynch són portadores de grans reordenaments en aquests gens. A més, cada vegada es dóna més importància a la confirmació i caracterització molecular d'aquest tipus de mutacions. En aquest treball vam analitzar els grans reordenaments d'una cohort de 34 famílies amb sospita de síndrome de Lynch (10 Amsterdam i 24 Bethesda) sense cap mutació prèviament detectada. Vam usar la QMPSF per a la cerca de delecions i vam confirmar els resultats usant l'MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*). Vam utilitzar diverses aproximacions com la PCR llarga (LR-PCR), la seqüenciació i el FISH per caracteritzar la naturalesa molecular dels reordenaments trobats. En total, vam detectar 3 delecions parcials del gen *MSH2* (dels exons 1-2, 3-6 i 9-10) i una deleció del gen *MLH1* sencer, en famílies que complien els criteris d'Amsterdam. No vam trobar cap reordenament en les famílies amb criteris de Bethesda. Vam aconseguir seqüenciar el punt de ruptura exacte de dues de les delecions i vam caracteritzar parcialment les dues restants. D'aquesta manera, vam demostrar la participació de les seqüències repetitives Alu en la formació de grans reordenaments en el gen *MSH2*. Els nostres resultats confirmen la importància d'utilitzar una metodologia per detectar alteracions en el nombre de còpies del DNA com a primer pas en la rutina diagnòstica de les famílies amb sospita de síndrome de Lynch.

Detection and characterization of *MSH2* and *MLH1* genomic rearrangements in Lynch syndrome families

Ester Castellsagué¹, Marga Nadal¹, Jesus del Valle¹, Marta Pineda¹, Sara González¹, Ignacio Blanco², Thierry Frebourg³, and Gabriel Capellá^{*1}.

¹ Translational Research Laboratory, IDIBELL-Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain; ² Genetic Counseling Unit, IDIBELL-Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain; ³ Department of Genetics, Inserm U614, Faculty of Medicine, Rouen, France.

* Address correspondence to this author at: Laboratori de Recerca Translacional (LRT1), Institut Català d'Oncologia, Hospital Duran i Reynals, Gran via 199-203, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain. Fax +34 93-260-74-66; e-mail gcapella@iconcologia.net.

Key words: Lynch syndrome, QMPSF, gross rearrangements, molecular diagnostics, mismatch repair genes.

Abbreviations: QMPSF (quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments), MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification), FISH (fluorescence *in situ* hybridization), MMR (mismatch repair), MSI (microsatellite instability), IHC (immunohistochemistry), wt (wild-type).

ABSTRACT

Lynch syndrome is the most common hereditary colorectal cancer syndrome and is caused by heterozygous germline mutations most often in the *MSH2* and *MLH1* genes. Development of semiquantitative assays such as quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments (QMPSF), have permitted to find that a relatively high number of Lynch families are carriers of gross rearrangements in these genes. Also, increasing importance is given to molecular characterization of this type of mutations. We analyzed a subset of 34 Lynch syndrome suspected families (10 Amsterdam and 24 Bethesda) without detectable point mutations for gross rearrangements using the QMPSF assay and confirming results by multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA). We used different approaches such as long-range PCR (LR-PCR), sequencing, and FISH to further characterize the molecular nature of the deletions. We detected 3 partial deletions of *MSH2* (exons 1-2, 3-6, and 9-10) and a whole gene deletion of *MLH1*, in Amsterdam families. No rearrangement was found in Bethesda families. We found the exact breakpoint of two deletions and partially characterized the other two. Involvement of Alu repetitive elements in gross rearrangements formation was demonstrated. Our findings confirm the importance of using copy number alteration methodology as a first step in the routine testing of suspected Lynch syndrome in the clinical setting.

INTRODUCTION

Lynch syndrome, also known as hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC), is the most common hereditary colorectal cancer syndrome and affects subjects developing cancer in the fourth or fifth decade of life. Cancers of the endometrium, stomach, small intestine, hepatobiliary system, upper ureteral tract, ovary, and rarely the brain are also associated to the disease (Gruber, 2006). It is an autosomal dominant disorder caused by heterozygous germline mutations in DNA mismatch repair (MMR) genes, most often in *MSH2*, *MLH1*, and *MSH6*. Such molecular defects frequently lead to microsatellite instability (MSI) and loss of expression of the MMR proteins in the tumor tissue (Gruber, 2006).

Mutations of *MSH2*, *MLH1*, and *MSH6* genes can be detected in up to 88% of the families fulfilling Amsterdam criteria with MSI tumors (Lagerstedt Robinson, et al., 2007). While point mutations account for the majority of detected mutations, gross rearrangements are also detected. Some reports have suggested that the point mutation to genomic rearrangement ratio could be 3:1 (van der Klift, et al., 2005). However, these estimates are highly heterogeneous oscillating between 5% to 30%, of all pathogenic mutations depending upon the population analyzed (Di Fiore, et al., 2004; Gille, et al., 2002; Grabowski, et al., 2005; Nakagawa, et al., 2003; Taylor, et al., 2003; van der Klift, et al., 2005; Viel, et al., 2002; Wang, et al., 2003; Zhu, et al., 2005) and the presence of recurrent/founder deletions (Clendenning, et al., 2008; Chan, et al., 2001; Moisisio, et al.,

1996; Stella, et al., 2007). The highest relative incidence of genomic deletions occurs in the *MSH2* and *MLH1* genes, whereas *MSH6* is less frequently affected.

A simple, semiquantitative procedure based on quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments (QMPSF) has been shown to be useful for detecting genomic deletions or duplications of several cancer associated genes such as MMR (Charbonnier, et al., 2000), *BRCAs* (Casilli, et al., 2002; Tournier, et al., 2004), and *APC* (Castellsague, et al., 2008). Other techniques, such as the commercial multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA), are broadly used to detect rearrangements. Detailed characterization of rearrangement breakpoints and underlying recombination mechanism have not been always reported, but great efforts have been recently done to this aim (Li, et al., 2006; van der Klift, et al., 2005).

In the present study we aimed to test the prevalence of *MSH2* and *MLH1* gross rearrangements in a cohort of Lynch syndrome suspected families using QMPSF and MLPA. Total or partial molecular characterization was performed for all rearrangements found.

PATIENTS AND METHODS

Subjects

A total of 82 Lynch syndrome suspected families (45 meeting Amsterdam and 37 meeting revised Bethesda criteria and Amsterdam less one criterion) were screened. All informative microsatellite analysis of the tumors resulted to be unstable (MSI+). Pathogenic point mutations were detected in 48 (35 Amsterdam and 13 revised Bethesda criteria). Point mutations were distributed as follows: 26 in *MLH1*, 21 in *MSH2* and 1 in *MSH6*. We screened for copy number alterations affected members of the 34 negative for point mutations families (10 Amsterdam and 24 Bethesda or Amsterdam less one criteria). Informative immunohistochemical staining of the tumors was obtained in 28 cases for *MSH2* (6 lost and 22 retained staining) and 23 for *MLH1* (9 lost and 14 retained staining). DNAs from healthy individuals were used as controls. In addition 5 arbitrarily selected Amsterdam families not presenting instability in tumors (MSI-) were included as negative controls.

Informed consent was obtained from all of the subjects who participated in the study.

Tumor analyses

Prior to DNA extraction from tumor paraffin-embedded tissue, histopathological classification of hematoxylin-eosin stained blocks was carried out and a representative portion of the tumor and normal tissue was scraped off. DNA extraction was performed using a QIAamp DNAMini Kit (Qiagen). MSI analysis was performed on paired tumor-normal tissue DNA samples using the markers *BAT26* and *D12S95* (as a first screening), and *BAT25*, *D4S2948*, *D21S415*, and *D21S1235* (as a second screening) as described previously (Gonzalez-Garcia, et al., 2000). Tumors with two or more unstable markers were considered to be MSI+ otherwise, they were considered as MSI-. To detect the presence or absence of the expression of *MLH1* and *MSH2* proteins, formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections were stained using standard immunohistochemical techniques with mouse primary antibodies: anti-*MLH1* (clone G168-15, PharMingen) and anti-*MSH2* (clone G219-1129, PharMingen).

Detection of gross rearrangements: QMPSF analysis and MLPA confirmation

DNA from peripheral blood lymphocytes was obtained using the FlexiGene DNA kit (Qiagen). Screening for gross rearrangements was done using the QMPSF of *MSH2* and *MLH1* genes as described elsewhere (Charbonnier, et al., 2000). This method is based on the simultaneous amplification of short genomic sequences of all exons under quantitative conditions, using dye labeled primers, and the superimposition of the electropherograms of patients and controls. A 2-fold reduction of a peak corresponds to a heterozygous deletion. Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) was used to confirm the QMPSF results using 100 ng of DNA and the MRC-Holland *MSH2/MLH1* P003 kit (Amsterdam), according to the supplier's instructions. Fragment analysis was performed on an ABI 310 Genetic Analyzer and the results analyzed using the GeneScan and Genotyper software (Applied Biosystems). Calculations using peak height from *MSH2* and control probes were performed following a previously described method (Taylor, et al., 2003).

Molecular characterization of gross rearrangements.

QMPFSF: QMPFSF was also used as a complementary tool for the characterization of some deletions. A QMPFSF assay was developed to test two fragments of the promoter region of *MSH2* and two exons of its upstream gene, *TACSTD1*, and was used to characterize exon 1 and 2 deletion; a QMPFSF including 3 amplicons of *MSH2* intron 6 (located at positions +2400, +6000, and +11000 from the end of exon 6) was useful for exon 3 to 6 deletion; and a QMPFSF including 2 amplicons of *MSH2* intron 8 (at positions +7000 and +15000 from the end of exon 8) helped with exons 9 and 10 deletion. All primers are available upon request.

Long-range PCR analysis: Long-range PCR (LR-PCR) was used to amplify the deleted fragments from mutated patients when upstream and downstream non-deleted limits were known. Three different LR-PCR were used in this study: for exons 1 and 2 deletion, TACSTD1_e7F (5'-ATGGGGAACAACCTGGATCTG -3') and MSH2_e3R (5'-CCACATACCCAACCTCCAACC -3') primers were used with Expand Long Template PCR System (Roche) following manufacturer's instructions at 64°C annealing temperature; for exons 3 to 6 deletion, MSH2_e2F (5'-TTCTGGTTCGTCAGTATAGAGT -3') and MSH2_i6+9000R (5'-CACTGATTACCACCATAGACTA -3') primers amplified the deleted fragment using Ecocast Taq (Ecogen) according to manufacturer's instructions at 55°C annealing temperature; and exons 9 and 10 deletion was amplified as described elsewhere (Pineda, et al., 2008) with MSH2_i8+8000F (5'-AGGGGGTTCGACCTCATATAG -3') and MSH2_i10+1150R (5'-GGGACTTCCTGAGATTAGCC -3') using Expand Long Template PCR System (Roche). Subsequent purification using illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare) and sequencing by means of the BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) were performed.

FISH: We performed FISH on chromosome spreads obtained from peripheral blood of the relevant patients. Cultures were set up a few hours after blood collection in heparinized tubes. We added 500 µL whole blood to a flask containing 9 mL RPMI 1640 (Gibco) with 10% FCS, 5 mg/L phytohemagglutinin

(Gibco), 100 000 U/L penicillin, and 100 mg/L streptomycin. Cultures were set up in duplicate and incubated at 37 °C for 72 h. We harvested cells by colcemid treatment (0.4 mg/L), hypotonic lysis and carnoy's fixation and then performed FISH. Briefly, we used 5 different probes from chromosome 3 to cytogenetically clone the deletion breakpoints RP11-385E12, RP11-129K12, RP11-170E06, RP11-418P10, and RP11-467K09 (covering approximately 750 Kb). All probes were obtained from the 32K BAC Rearray of the Children's Hospital Oakland Research Institute (www.chori.org/bccpcc) and kindly provided by Luis Pérez-Jurado. Probes (1 µg of each) were directly labeled with spectrum green or red by a standard nick translation reaction, hybridized in pairs, and detected according to standard protocols (Nadal, et al., 2007). The FISH analysis was performed under an Olympus BX60 fluorescence microscope equipped with the appropriate filter set, and images were captured using the Cytovision software (Applied Imaging).

RESULTS

Screening for gross rearrangements

QMPFSF analysis revealed that 3 of the 34 selected families harbored *MSH2* genomic rearrangements leading to deletions involving exons 1 and 2, 3 to 6, and 9 and 10, respectively (Figure 1, A-C). One of the remaining 31 families harbored a whole *MLH1* gene deletion (Figure 1, D). No deletions were detected in the few MSS cases analyzed.

While no gross rearrangements were detected in the 24 Bethesda families included, they were detected in 4 of 10 families meeting Amsterdam criteria (Table 1 and Supplementary Figures 1-4). *MSH2* deletions were detected in the three families showing IHC expression loss of *MSH2* (100%) (Table 1). *MLH1* deletion was detected in one of the three families showing IHC loss of *MLH1* protein expression (Table 1).

Molecular characterization of deletions

We confirmed all 4 of the observed deletions using MLPA (data not shown) and in other family members showing cosegregation with the disease (Supplementary Figures 1-4). Moreover, further characterization analyses were carried out, providing insight into the molecular nature of these aberrations.

For deletion of exons 1 and 2 of *MSH2* gene (Figure 1, A), downstream breakpoint was located in a small region between exons 2 and 3 while upstream breakpoint location was much more uncertain. We used a QMPFSF of the upstream region including 2 amplicons of *MSH2* promoter and 2 amplicons of exons 1 and 7 of the *TACSTD1* gene, located 16 Kb upstream *MSH2* (Charbonnier, et al., 2002). Both promoter fragments and none *TACSTD1* fragments appeared deleted (Figure 2). Subsequent LR-PCR was done with primers located in intron 7 of the *TACSTD1* and intron 2 of the *MSH2* genes. No wt band of 30 Kb was expected to be amplified because of its big size, but a deleted 4-5 Kb fragment was amplified in a carrier of the deletion but not in a control DNA (Figure 2, B).

For deletion encompassing exons 3 to 6 (Figure 1, B), an intron 6 QMPFSF assay showed that the breakpoint was located between its +6000 and +11000 positions (Figure 3, A). LR-PCR was performed using primers located in exon 2 and intron 6 and amplified a deleted fragment of ~2.5 Kb in the patient DNA and none in a control DNA (Figure 3, B). Sequencing of the deleted fragment led to the identification of the breakpoint of the deletion that encompassed ~14.5 Kb (g.6139_20550del; NC_000002.10, GI:89161199) and involved Alu repetitive elements located in both intron 2 and intron 6 (Figure 3, C) suggesting a non-allelic homologous recombination. The deletion junction breakpoint was located in a stretch of 27 bp with 100% homology between the parental strands.

Characterization of the deletion encompassing exons 9 and 10 of *MSH2* (Figure 1, C) gene has already been published (Pineda, et al., 2008). Briefly, a QMPFSF of intron 8 showed that upstream breakpoint was located between its +7000 and +15000 positions (Figure 4, A). Subsequent LR-PCR with primers of intron 8 and intron 10 resulted in the amplification of the wt band in a control DNA and a deleted fragment of ~4,5 kb in the deletion carrier (Figure 4, B). Sequencing of this fragment revealed a novel *MSH2* rearrangement resulting in a large deletion of 13 kb coupled with the insertion of a 249-bp inverted sequence from intron 8 involving repetitive Alu and LINE elements (g.[51309_56216del; 56217_56465inv; 56466_64246del]; NC_000002, GI:89161199) (Figure 4, C and D). A putative mechanism underlying this

mutation was serial replication slippage *in trans* (Chen, et al., 2005).

Finally, FISH analyses were performed to characterize the whole gene deletion found in *MLH1* gene (Figure 1, D). Five probes (5'-3': RP11-385E12, RP11-129K12, RP11-170E06, RP11-418P10, and RP11-467K09) covering about 230 Kb and 470 Kb upstream and downstream the gene, respectively, were used. The first four probes yielded a single signal in one of the chromosome 3 homologues (Figure 5, A and B) giving evidence of an upstream large extension of the deletion. Last probe, RP11-467K09, yielded both chromosome 3 signals demonstrating that the downstream breakpoint was somewhere between RP11-418P10, and RP11-467K09.

DISCUSSION

Using MMR genes QMPFSF we found 3 deletions in *MSH2* and 1 deletion in *MLH1* in our cohort of 34 Lynch syndrome suspected families without a previously detected point mutation (12%). We found a good correlation between deletions and loss of *MSH2* or *MLH1* expression in tumors, according to previous reports (Di Fiore, et al., 2004) and reinforcing the usefulness of IHC assays if the efficiency of the technique is assured (Shia, 2008). Our prevalence of gross rearrangements is in agreement with results from a French cohort validating QMPFSF reliability (Di Fiore, et al., 2004). Also, our results are in line with previous reports using other methodologies such as MLPA and confirm the higher incidence of *MSH2* deletions (Gille, et al., 2002; Grabowski, et al., 2005; Nakagawa, et al., 2003; Taylor, et al., 2003; van der Klift, et al., 2005; Viel, et al., 2002; Wang, et al., 2003; Zhu, et al., 2005). They highlight the importance of performing *MSH2* and *MLH1* deletion analysis in the assessment of Lynch syndrome. In our experience the ratio between point mutations and gross deletions is approximately 10:1, in the lower range of published results probably linked to the fact that we do not have founder rearrangement mutations.

We only found gross deletions in families fulfilling Amsterdam criteria. The association of deletions with a strong family history (Supplementary Figures 1-4) has been also reported (Gylling, et al., 2009). While we have not detected gross deletions in Bethesda families, they have been reported to occur albeit at a lower frequency (Di Fiore, et al.,

2004; Gille, et al., 2002; Nakagawa, et al., 2003; Viel, et al., 2002; Wang, et al., 2003; Zhu, et al., 2005).

In all of the detected cases MLPA confirmed QMPSF results. We consider confirmation with an independent technique as mandatory prior to its use in the genetic counseling process. Molecular characterization of the breakpoints provides additional verification (Wehner, et al., 2005) and is of help in gaining insight into the underlying molecular mechanisms (Li, et al., 2006; van der Klift, et al., 2005).

All *MSH2* deletions accumulate in the first half of the gene, where a higher proportion of Alu sequences are present (Charbonnier, et al., 2002). In fact, these sequences appear to be involved in all the deletions found. One of them, the one involving the promoter and exons 1-2, has been previously described (Charbonnier, et al., 2005; Charbonnier, et al., 2002). Two of them, those located at exons 1-2 and 3-6, share a breakpoint located in intron 2, where Alu sequences and breakpoints accumulate (Li, et al., 2006). Also, two deletions involve introns 6 and 8 having the highest prevalence of breakpoints probably due to its length (Li, et al., 2006). The repetitive Alu and LINE elements found in the

rearrangement breakpoints might be involved in the formation of the mutation. Thus, characterization of *MSH2* rearrangements further support that Alu-mediated non-allelic homologous recombination is the main mechanism leading to deletions in *MSH2* (Li, et al., 2006; van der Klift, et al., 2005).

We could not characterize the upstream breakpoint for *MLH1* deletion that was at least 230 Kb from the gene. While this aberration may have affected other genes this fact has had no apparent influence in the phenotype shown (Supplementary Figure 4).

We have detected copy number alterations in about 40% of Amsterdam families that screened negative for point mutations in *MSH2* and *MLH1* genes. This percentage represents about 8% of all identified mutations in these genes in Lynch syndrome families. Considering these results as well as the availability of rapid and easy to perform techniques such as QMPSF or MLPA, we introduced gross rearrangements screening as a first step in our diagnostic algorithm. More efforts will be done to elucidate the disease causing mutation mechanism leading to the Lynch syndrome suspected cases that still screen negative for mutations.

REFERENCES:

- Casilli F, Di Rocco ZC, Gad S, Tournier I, Stoppa-Lyonnet D, Frebourg T, Tosi M. 2002. Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Hum Mutat* 20(3):218-26.
- Castellsague E, Gonzalez S, Nadal M, Campos O, Guino E, Urioste M, Blanco I, Frebourg T, Capella G. 2008. Detection of APC gene deletions using quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Clin Chem* 54(7):1132-40.
- Clendenning M, Baze ME, Sun S, Walsh K, Liyanarachchi S, Fix D, Schunemann V, Comeras I, Deacon M, Lynch JF and others. 2008. Origins and prevalence of the American Founder Mutation of *MSH2*. *Cancer Res* 68(7):2145-53.
- Chan TL, Yuen ST, Ho JW, Chan AS, Kwan K, Chung LP, Lam PW, Tse CW, Leung SY. 2001. A novel germline 1.8-kb deletion of hMLH1 mimicking alternative splicing: a founder mutation in the Chinese population. *Oncogene* 20(23):2976-81.
- Charbonnier F, Baert-Desurmont S, Liang P, Di Fiore F, Martin C, Frerot S, Olschwang S, Wang Q, Buisine MP, Gilbert B and others. 2005. The 5' region of the *MSH2* gene involved in hereditary non-polyposis colorectal cancer contains a high density of recombinogenic sequences. *Hum Mutat* 26(3):255-61.
- Charbonnier F, Olschwang S, Wang Q, Boisson C, Martin C, Buisine MP, Puisieux A, Frebourg T. 2002. *MSH2* in contrast to *MLH1* and *MSH6* is frequently inactivated by exonic and promoter rearrangements in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 62(3):848-53.
- Charbonnier F, Raux G, Wang Q, Drouot N, Cordier F, Limacher JM, Saurin JC, Puisieux A, Olschwang S, Frebourg T. 2000. Detection of exon deletions and duplications of the mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families using multiplex polymerase chain reaction of short fluorescent fragments. *Cancer Res* 60(11):2760-3.
- Chen JM, Chuzhanova N, Stenson PD, Ferec C, Cooper DN. 2005. Complex gene rearrangements caused by serial replication slippage. *Hum Mutat* 26(2):125-34.
- Di Fiore F, Charbonnier F, Martin C, Frerot S, Olschwang S, Wang Q, Boisson C, Buisine MP, Nilbert M, Lindblom A and others. 2004. Screening for genomic rearrangements of the MMR genes must be included in the routine diagnosis of HNPCC. *J Med Genet* 41(1):18-20.
- Gille JJ, Hogervorst FB, Pals G, Wijnen JT, van Schooten RJ, Dommering CJ, Meijer GA, Craanen ME, Nederlof PM, de Jong D and others. 2002. Genomic deletions of *MSH2* and *MLH1* in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. *Br J Cancer* 87(8):892-7.

- Gonzalez-Garcia I, Moreno V, Navarro M, Marti-Rague J, Marcuello E, Benasco C, Campos O, Capella G, Peinado MA. 2000. Standardized approach for microsatellite instability detection in colorectal carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 92(7):544-9.
- Grabowski M, Mueller-Koch Y, Grasbon-Frodl E, Koehler U, Keller G, Vogelsang H, Dietmaier W, Kopp R, Siebers U, Schmitt W and others. 2005. Deletions account for 17% of pathogenic germline alterations in MLH1 and MSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) families. *Genet Test* 9(2):138-46.
- Gruber SB. 2006. New developments in Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) and mismatch repair gene testing. *Gastroenterology* 130(2):577-87.
- Gylling A, Ridanpaa M, Vierimaa O, Aittomaki K, Avela K, Kaariainen H, Laivuori H, Poyhonen M, Sallinen SL, Wallgren-Pettersson C and others. 2009. Large genomic rearrangements and germline epimutations in Lynch syndrome. *Int J Cancer* 124(10):2333-40.
- Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovцова J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Peltomaki P and others. 2007. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst* 99(4):291-9.
- Li L, McVety S, Younan R, Liang P, Du Sart D, Gordon PH, Hutter P, Hogervorst FB, Chong G, Foulkes WD. 2006. Distinct patterns of germ-line deletions in MLH1 and MSH2: the implication of Alu repetitive element in the genetic etiology of Lynch syndrome (HNPCC). *Hum Mutat* 27(4):388.
- Moisio AL, Sistonen P, Weissenbach J, de la Chapelle A, Peltomaki P. 1996. Age and origin of two common MLH1 mutations predisposing to hereditary colon cancer. *Am J Hum Genet* 59(6):1243-51.
- Nadal M, Pera G, Pujadas J, Abril J, Gonzalez L, Aguilo F, Condom E, Gomez-Zaera M, Nunes V. 2007. Aneuploidy of chromosome Y in prostate tumors and seminal vesicles: a possible sign of aging rather than an indicator of carcinogenesis? *Mol Carcinog* 46(7):543-52.
- Nakagawa H, Hampel H, de la Chapelle A. 2003. Identification and characterization of genomic rearrangements of MSH2 and MLH1 in Lynch syndrome (HNPCC) by novel techniques. *Hum Mutat* 22(3):258.
- Pineda M, Castellsague E, Musulen E, Llorca G, Frebourg T, Baert-Desurmont S, Gonzalez S, Capella G, Blanco I. 2008. Non-Hodgkin lymphoma related to hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a patient with a novel heterozygous complex deletion in the MSH2 gene. *Genes Chromosomes Cancer* 47(4):326-32.
- Shia J. 2008. 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* 10(4):293-300.
- Stella A, Surdo NC, Lastella P, Barana D, Oliani C, Tibiletti MG, Viel A, Natale C, Piepoli A, Marra G and others. 2007. Germline novel MSH2 deletions and a founder MSH2 deletion associated with anticipation effects in HNPCC. *Clin Genet* 71(2):130-9.
- Taylor CF, Charlton RS, Burn J, Sheridan E, Taylor GR. 2003. Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. *Hum Mutat* 22(6):428-33.
- Tournier I, Paillerets BB, Sobol H, Stoppa-Lyonnet D, Lidereau R, Barrois M, Mazoyer S, Coulet F, Hardouin A, Chompret A and others. 2004. Significant contribution of germline BRCA2 rearrangements in male breast cancer families. *Cancer Res* 64(22):8143-7.
- van der Klift H, Wijnen J, Wagner A, Verkuilen P, Tops C, Otway R, Kohonen-Corish M, Vasen H, Oliani C, Barana D and others. 2005. Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer* 44(2):123-38.
- Viel A, Petronzelli F, Della Puppa L, Lucci-Cordisco E, Fornasarig M, Pucciarelli S, Rovella V, Quaia M, Ponz de Leon M, Boiocchi M and others. 2002. Different molecular mechanisms underlie genomic deletions in the MLH1 Gene. *Hum Mutat* 20(5):368-74.
- Wang Y, Friedl W, Lamberti C, Jungck M, Mathiak M, Pagenstecher C, Propping P, Mangold E. 2003. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes. *Int J Cancer* 103(5):636-41.
- Wehner M, Mangold E, Sengteller M, Friedrichs N, Aretz S, Friedl W, Propping P, Pagenstecher C. 2005. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: pitfalls in deletion screening in MSH2 and MLH1 genes. *Eur J Hum Genet* 13(8):983-6.
- Zhu M, Li J, Zhang X, Liu X, Friedl W, Zhang Y, Wu X, Propping P, Wang Y. 2005. Large genomic aberrations in MSH2 and MLH1 genes are frequent in Chinese colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 160(1):61-7.

TABLES

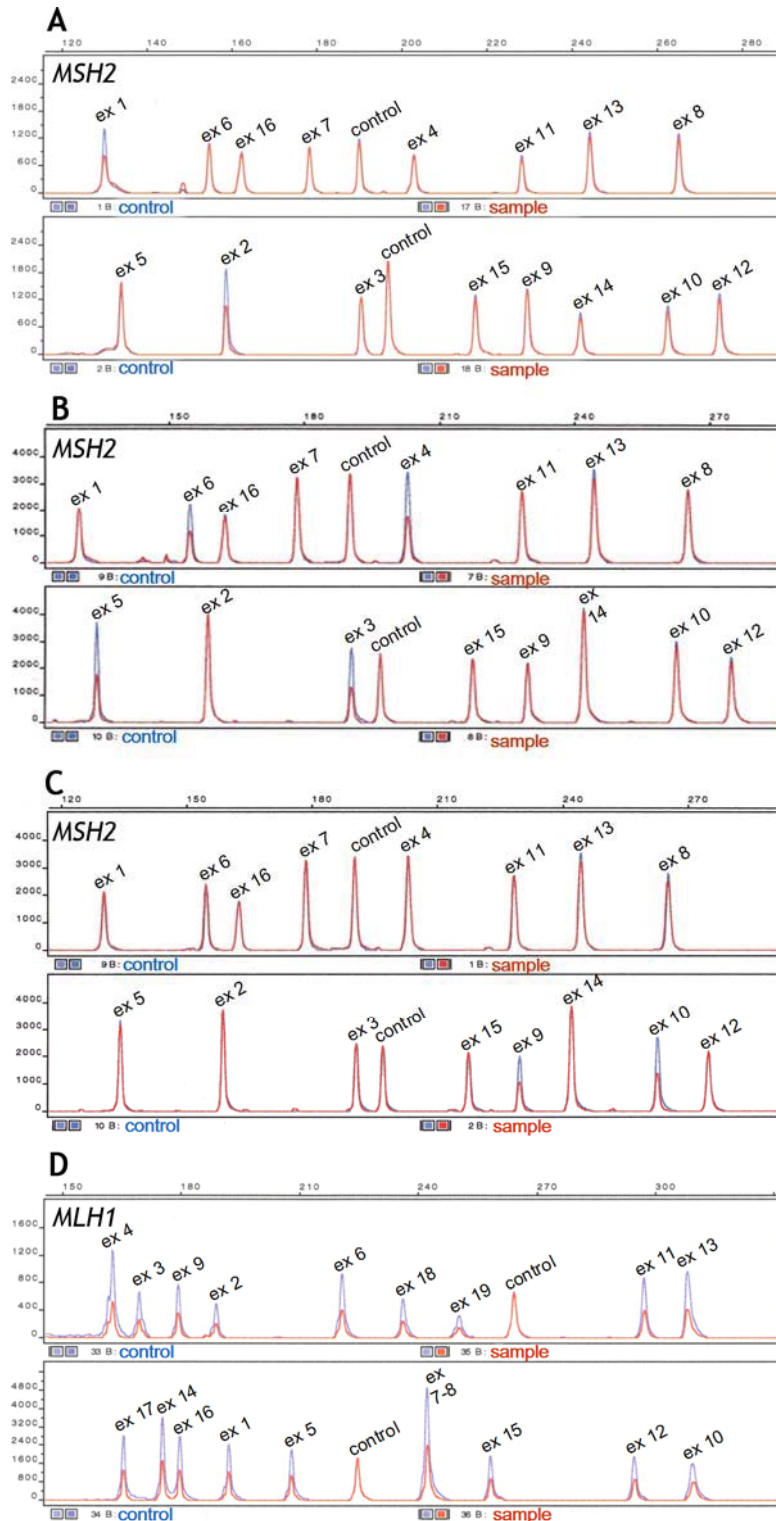
Table 1. Histopathological and molecular characteristics of tumors from probands with *MSH2* and *MLH1* deletions

	<i>MSH2</i> rearrangements		<i>MLH1</i> rearrangements	
	Amsterdam (n=10*)	Bethesda (n=24*)	Amsterdam (n=7^)	Bethesda (n=24^)
IHC-	3/3 (100%)	0/3	1/3 (33%)	0/6
IHC?	0/3	0/5	0/2	0/8
IHC+	0/4	0/16	0/2	0/10
	3/10 (30%)	0/24	1/7 (14%)	0/24

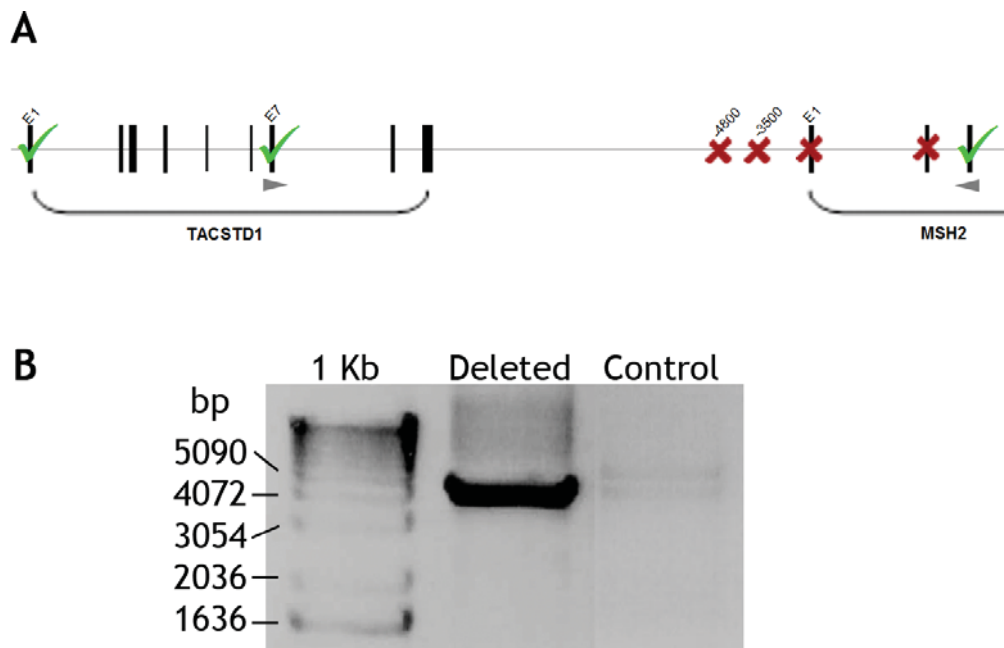
* Without *MSH2* or *MLH1* point mutations. ^ Without *MSH2* or *MLH1* point mutations, or *MSH2* genomic rearrangements. *IHC*-, loss of expression. *IHC*?, not informative. *IHC*+, retained expression.

FIGURES

Figure 1. QMPSF electropherograms showing the MMR deletions found

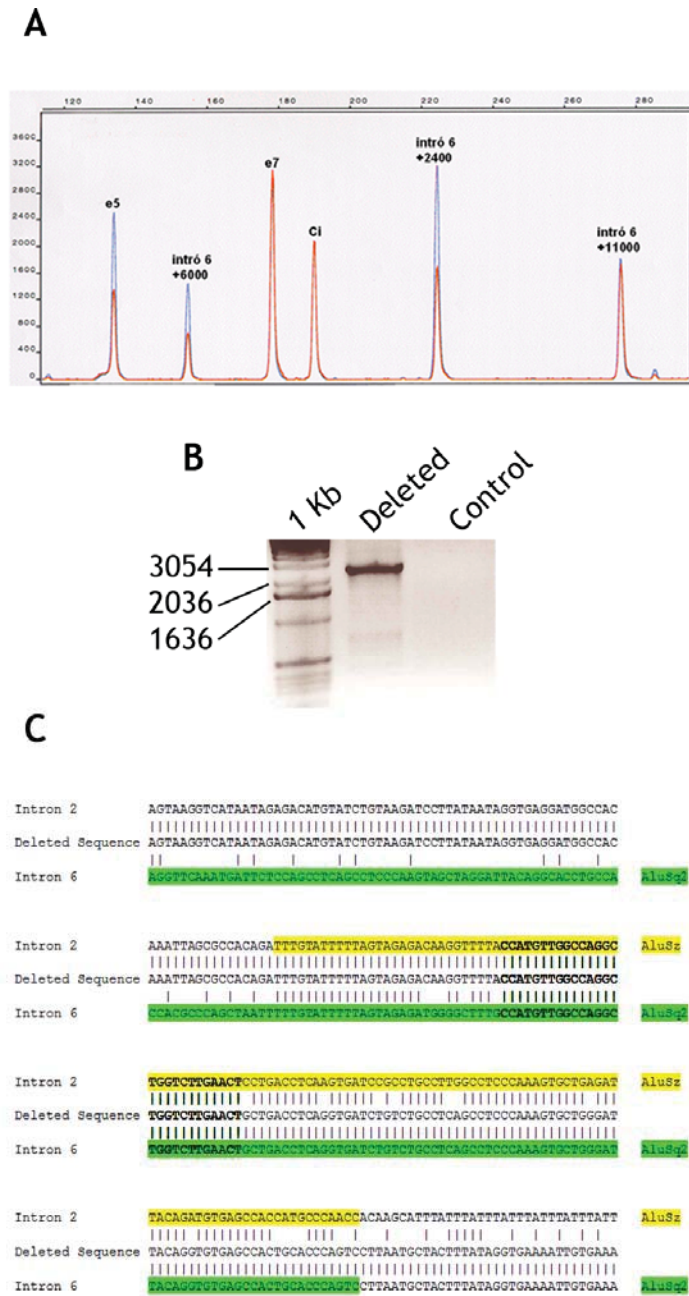


QMPSF of *MSH2* gene showing the heterozygous deletions encompassing exons 1 and 2 (A), 3 to 6 (B), and 9 and 10 (C). Panel D shows the QMPSF of *MLH1* gene with a heterozygous deletion of the whole gene. Electropherograms from a control (in blue) and deletion carriers (in red) were superimposed using the internal control. The y axis displays fluorescence in arbitrary units, and the x axis indicates the size in bp.

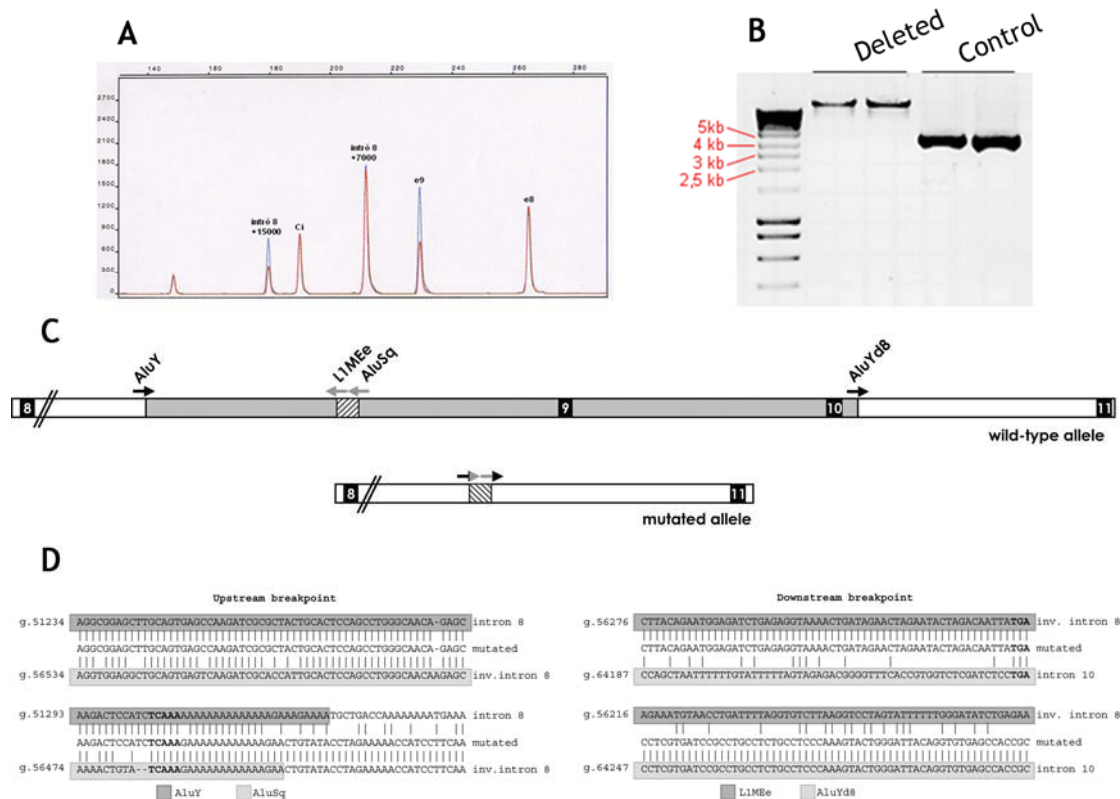
Figure 2. Characterization of exons 1-2 *MSH2* deletion

Schematic representation of the region analyzed is shown in panel **A**. Red crosses and green ticks represent the deleted and non-deleted amplicons that has been analyzed by a QMPSF of the upstream region of the deletion. Exons from both *TACSTD1* and *MSH2* genes are depicted as black boxes. Grey triangles represent the primers used for the LR-PCR shown in panel **B**, where a deleted fragment of 4-5 Kb is amplified in a carrier of the mutation. No specific band is amplified in a control DNA.

Figure 3. Molecular characterization of exons 3 to 6 *MSH2* deletion

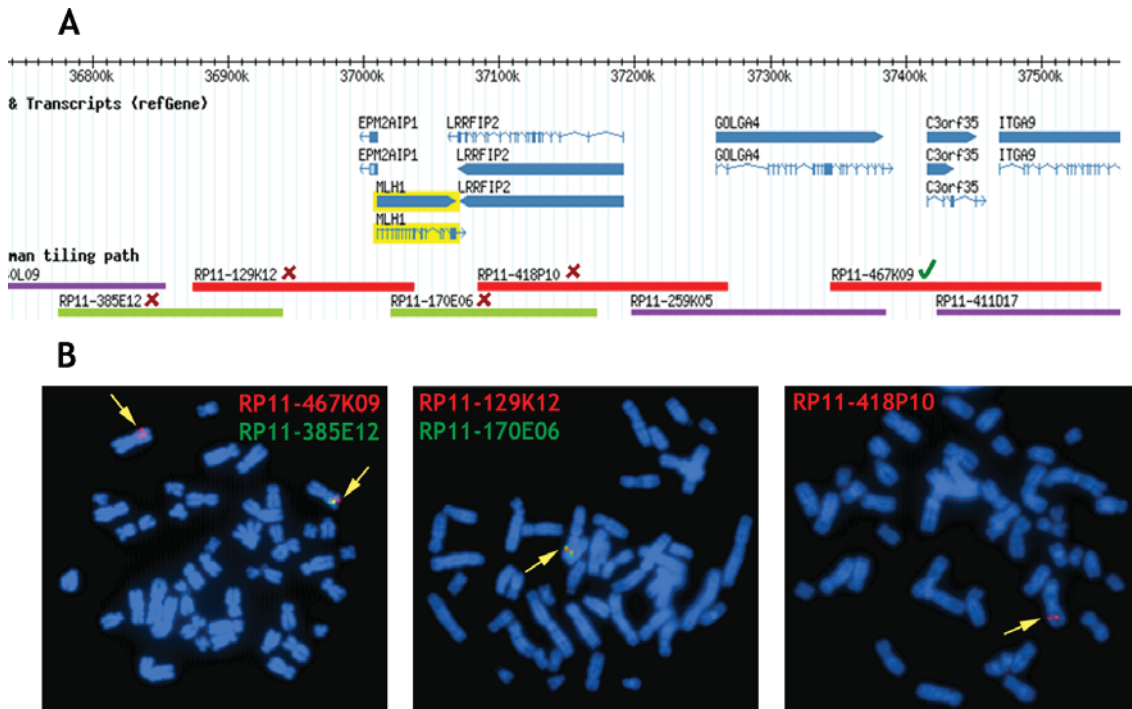


Panel **A** shows a QMPSTF assay done with 3 different fragments of the large intron 6, exon 5, exon 7 and an internal control amplicon. Deleted sample (in red) was superimposed to a control DNA (in blue). LR-PCR was performed using primers located in exon 2 (*MSH2_e2F*) and intron 6 (*MSH2_i6+9000R*) and amplified a deleted fragment of ~2.5 Kb in the patient DNA (**B**). No amplification was found in a control DNA. Sequencing of the deleted fragment led to find the breakpoint (g.6139_20550del; NC_000002.10, GI:89161199). Panel **C** shows the sequence alignment of the region encompassing the breakpoint (“Deleted Sequence”) and the parental strands mediating the deletion (“Intron 2” and “Intron 6”). Sequence identities are indicated by vertical bars. The breakpoint is indicated by the letters in bold. Alu sequences involved in the deletion are highlighted in yellow (“AluSz” in intron 2) and green (“AluSq2” in intron 6).

Figure 4. Molecular characterization of exons 9 and 10 *MSH2* deletion

Panel **A** shows a QMPSF assay done with 2 different fragments of intron 8, exon 8, exon 9 and an internal control amplicon. Deleted sample (in red) was superimposed to a control DNA (in blue). **B** shows a LR-PCR from intron 8 (*MSH2*_i8+7000F) to intron 10 (*MSH2*_i10+2000R). Wt band only appears in a control DNA while a deleted fragment of ~4,5 kb is amplified in the deletion carrier DNA. **C** is a schematic representation of the genomic structures of the wild-type and mutated alleles of *MSH2*. Exons are represented as black boxes. Repetitive elements involved in the rearrangement and its orientation are indicated by arrows. The deleted region is represented in grey and the dashed box depicts the inverted sequence. Alignment of wild-type sequence involved in the rearrangement and the upstream and downstream breakpoint sequences is shown in panel **D**. Numbers indicate genomic position according to NC_000002; GI: 89161199. Sequence identities are indicated by vertical bars. Repetitive elements are shaded and bold letters indicate regions where recombination may have occurred. Upstream breakpoint is located within homologous AluY and AluSq sequences, whereas downstream breakpoint occurs within non-homologous L1MEe and AluYd8 elements.

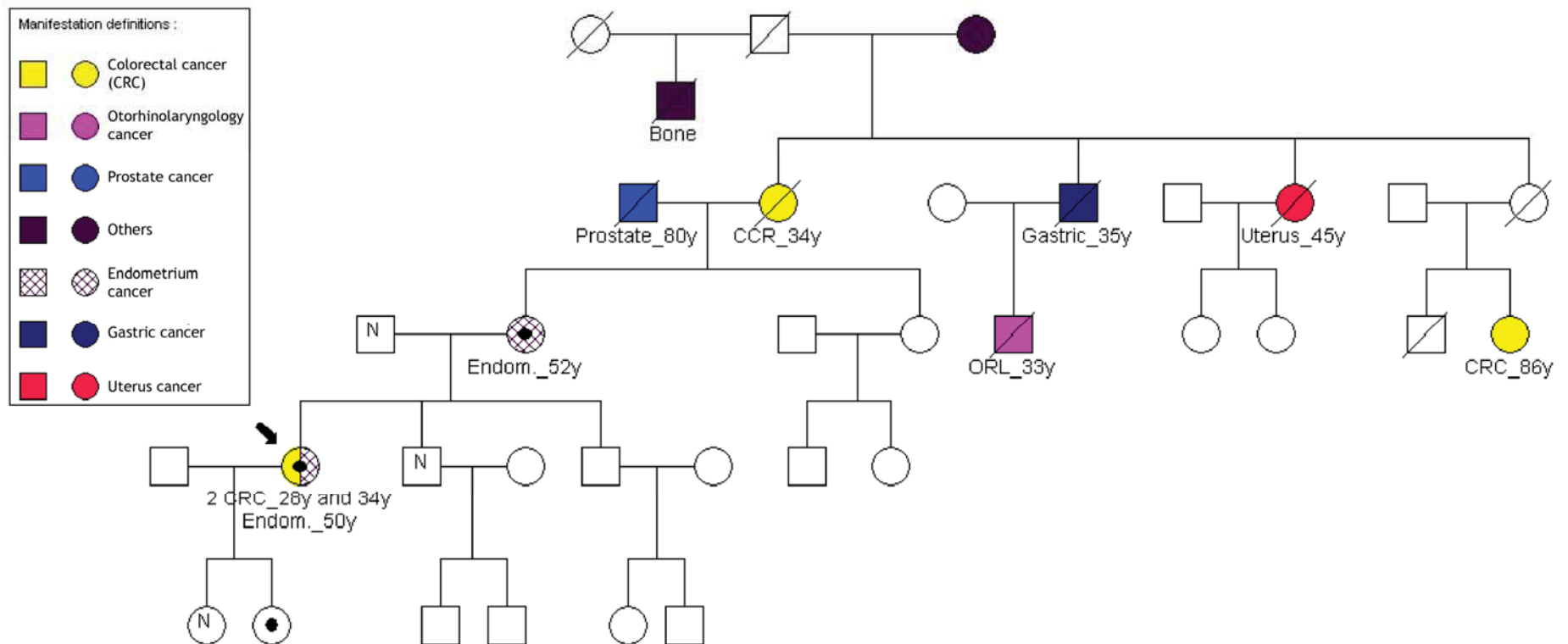
Figure 5. Characterization of the whole *MLH1* gene deletion



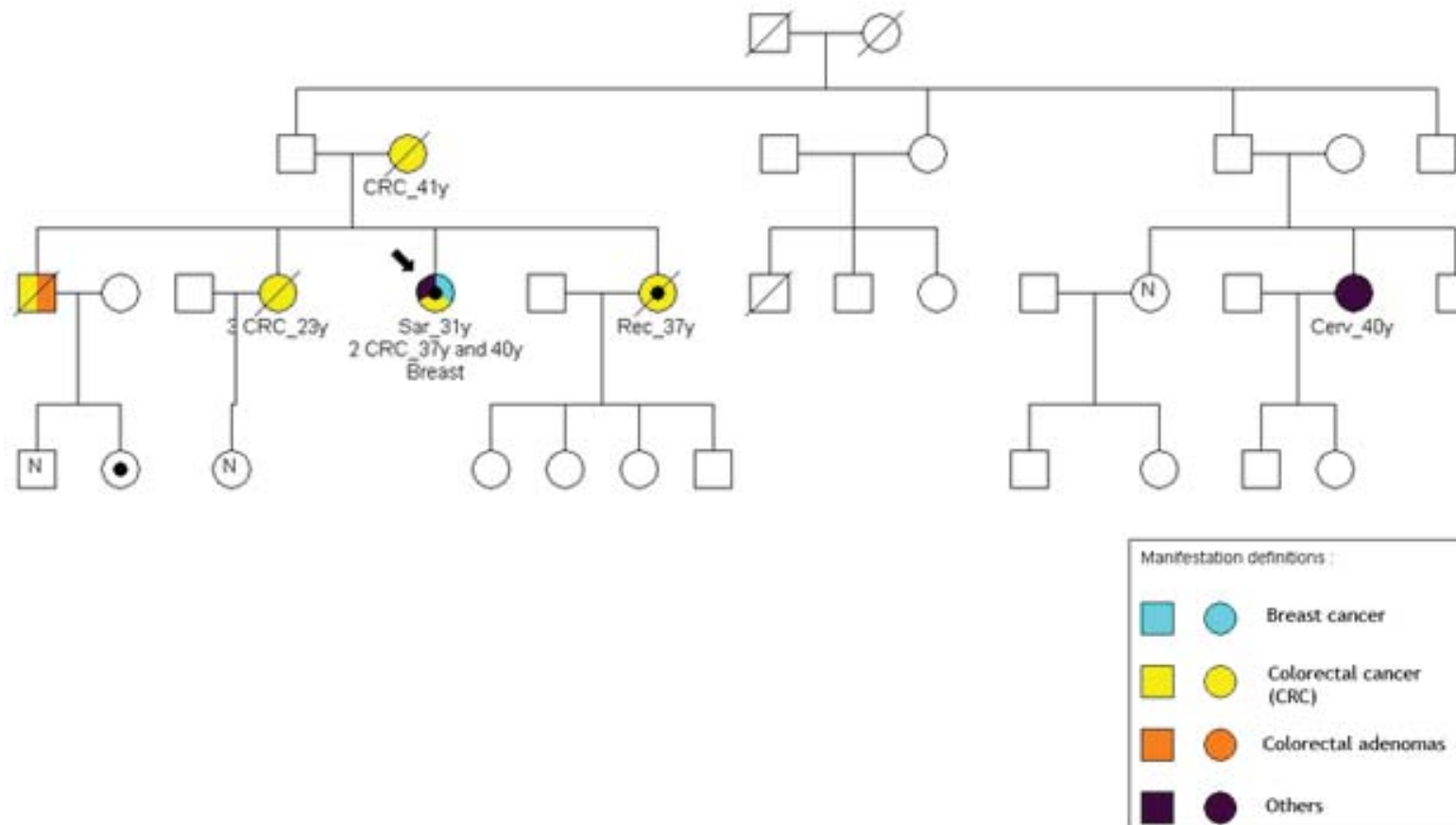
Panel **A** shows the genomic region in chromosome 3 that has been analyzed by FISH. Highlighted in yellow appears *MLH1* gene and FISH probes that were hybridized appear as red or green. A red cross indicates the probe appeared deleted while a green tick means it was not deleted. Panel **B** shows the hybridizations on patients metaphases. The presence of fluorescence in only one chromosome 3 depicts the deletion of the covered region. All probes but RP11-467K09, appear deleted in one of the chromosomes 3 homologues. A yellow arrow indicates presence of signal on chromosome 3.

SUPPLEMENTARY FIGURES

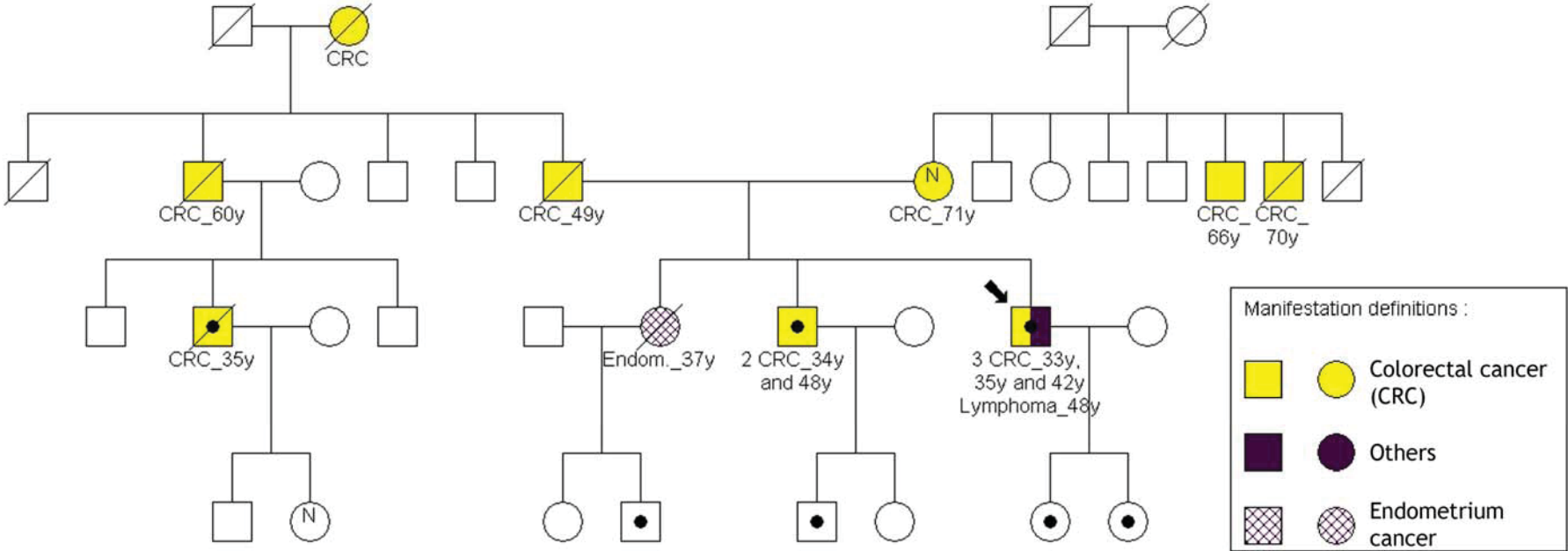
Supplementary Figure 1. Pedigree from family carrying the *MSH2* exons 1-2 deletion: The proband is indicated by an arrow. Cancer localization is indicated by colors (see legend) and below each affected individual. Age at diagnosis is indicated in affected members. Lines crossing the individuals mean diseased, carriers of the mutation are depicted by dots and non-carriers by the symbol *N*.



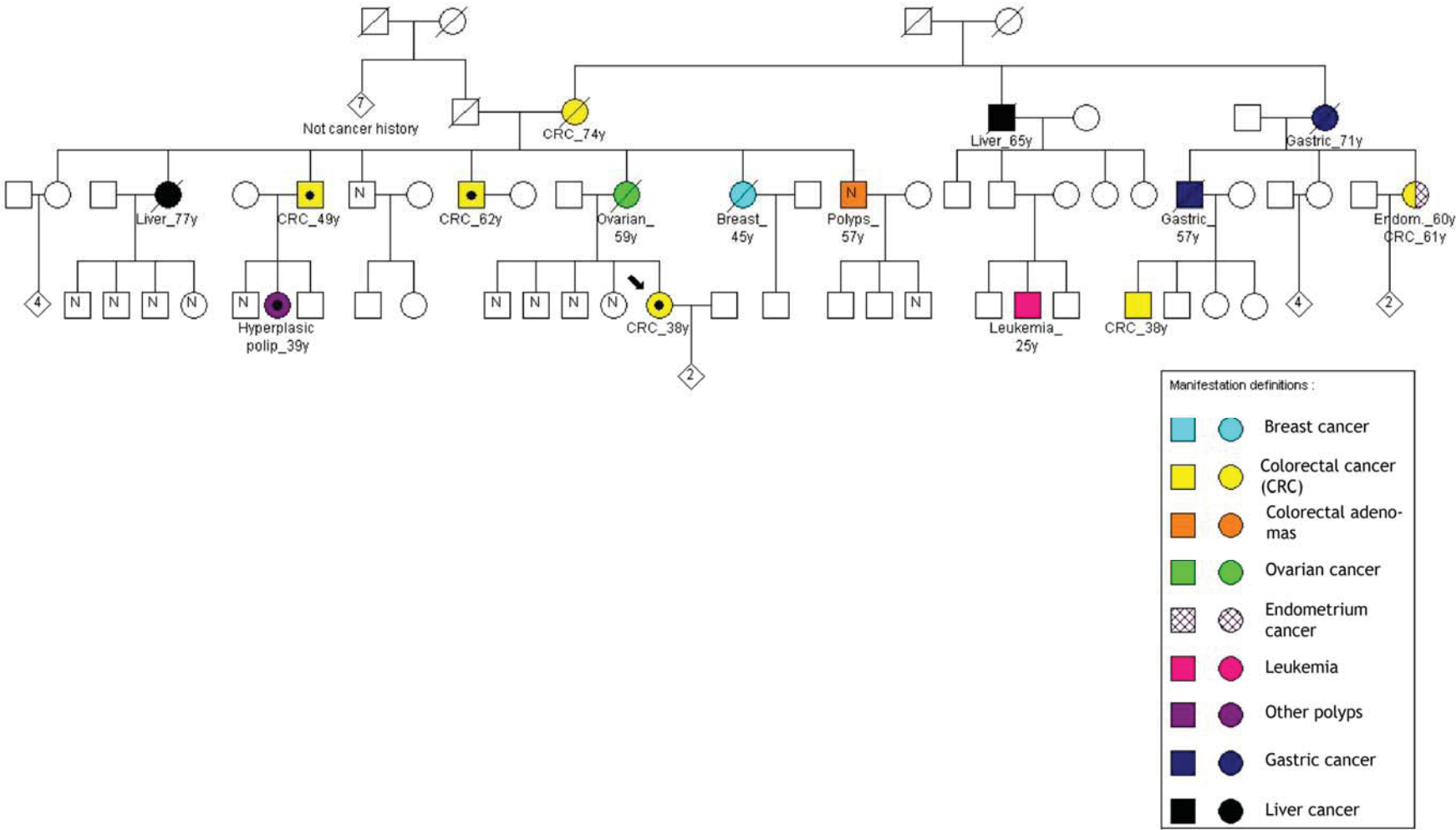
Supplementary Figure 2. Pedigree from family carrying the *MSH2* exons 3-6 deletion: The proband is indicated by an arrow. Cancer localization is indicated by colors (see legend) and below each affected individual. Age at diagnosis is indicated in affected members. Lines crossing the individuals mean diseased, carriers of the mutation are depicted by dots and non-carriers by the symbol *N*.



Supplementary Figure 3. Pedigree from family carrying the *MSH2* exons 9-10 deletion: The proband is indicated by an arrow. Cancer localization is indicated by colors (see legend) and below each affected individual. Age at diagnosis is indicated in affected members. Lines crossing the individuals mean diseased, carriers of the mutation are depicted by dots and non-carriers by the symbol *N*.



Supplementary Figure 4. Pedigree from family carrying the *MLH1* whole gene deletion: The proband is indicated by an arrow. Cancer localization is indicated by colors (see legend) and below each affected individual. Age at diagnosis is indicated in affected members. Lines crossing the individuals mean diseased, carriers of the mutation are depicted by dots and non-carriers by the symbol *N*.



ARTICLE 2

Non-Hodgkin lymphoma related to hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a patient with a novel heterozygous complex deletion in the MHS2 gene.

Marta Pineda*, **Ester Castellsagué***, Eva Musulén, Gemma Llor, Thierry Frebourg, Stephanie Baert-Desurmont, Sara González, Gabriel Capellá, and Ignacio Blanco.

(*) Aquests autors han contribuït equitativament en aquest treball

Genes, chromosomes and cancer 47:326-332 (2008).

ARTICLE 3:

Detection of APC gene deletions using quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments

Ester Castellsagué, Sara González, Marga Nadal, Olga Campos, Elisabet Guinó, Miguel Urioste, Ignacio Blanco, Thierry Frebourg, and Gabriel Capellá.

Clinical Chemistry 54:7, 1132-1140 (2008).

ARTICLE 4:

ALLELE-SPECIFIC EXPRESSION OF APC IN ADENOMATOUS POLYPOSIS FAMILIES

Ester Castellsagué, Sara González, Elisabet Guinó, Kristen N. Stevens, Victoria M. Raymond, Conxi Lázaro, Ignacio Blanco, Stephen B. Gruber, Gabriel Capellá.

Gastroenterology, en revisió.

DISCUSSIÓ

L'objectiu d'aquesta tesi és l'estudi de la dosi en la línia germinal dels gens implicats en les dues síndromes hereditàries més freqüents de CCR (síndrome de Lynch i FAP), de forma que tant els resultats com la discussió segueixen el mateix fil conductor: primer, l'anàlisi de la dosi a nivell de DNA, i tot seguit, l'anàlisi de la dosi a nivell d'RNA, sempre treballant amb línia germinal.

Al iniciar el projecte, la necessitat d'estudiar la dosi a nivell de DNA, o el que és el mateix, analitzar grans reordenaments gènics, en aquestes dues síndromes era evident: aproximadament el 64% i el 20% de les famílies amb sospita de síndrome de Lynch i FAP, respectivament, romanien sense cap mutació detectada després dels cribratges moleculars duts a terme pel grup de diagnòstic molecular del Institut Català d'Oncologia.

Dosi a nivell de DNA: grans reordenament en gens reparadors

Vàrem començar per l'anàlisi de grans reordenaments en les famílies amb sospita síndrome de Lynch per una raó molt concreta: l'existència d'una tècnica ben documentada, fàcilment aplicable a la rutina de diagnòstic i validada per a la detecció de grans delecions i duplicacions en els gens *MSH2* i *MLH1*, la QMPSF (Charbonnier, et al., 2002; Charbonnier, et al., 2000). Aquesta, a més, també s'havia adaptat per l'estudi d'altres gens com els *BRCA*, involucrats en càncer de mama (Casilli, et al., 2002; Tournier, et al., 2004a), corroborant així la seva fiabilitat. La QMPSF es basa en l'amplificació quantitativa de tots els exons d'un gen i la detecció de la dosi de cadascun d'ells en funció de la intensitat de la fluorescència dels diferents fragments, tenint com a referència un fragment no deleccionat i comparant els perfils dels pacients amb els d'individus control.

Tal i com s'exposa en l'article 1 de l'apartat de resultats, es van seleccionar 34 famílies amb sospita de síndrome de Lynch en les quals no s'havia detectat cap mutació en els gens *MSH2* i *MLH1*. Deu d'aquestes famílies complien criteris d'Amsterdam (Vasen, et al., 1999) i les 24 restants, complien els més laxes criteris revisats de Bethesda per a agregació familiar de CCR (Umar, et al., 2004). Totes les famílies en les quals vam detectar grans delecions (3 delecions en *MSH2* i 1 en *MLH1*) complien els restrictius criteris d'Amsterdam, eren MSI+ i també presentaven pèrdua en l'expressió de *MSH2* o *MLH1*, en funció del gen afectat. Així doncs, vam trobar grans delecions de *MSH2* i *MLH1* en un 30% i un 14%, respectivament, de les famílies Amsterdam sense mutació prèvia identificada, reproduint així les proporcions obtingudes en un estudi francès realitzat amb la mateixa tècnica i en el qual la selecció de famílies va ser molt similar a

la nostra (Di Fiore, et al., 2004). D'aquesta forma hem corroborat en una sèrie diferent, la fiabilitat de la tècnica QMPSF per a la detecció de grans delecions en els gens MMR. Altres estudis també concorden amb els nostres resultats i altres s'hi allunyen, tot i això, arribar a un consens respecte la proporció de grans reordenaments és força difícil degut a l'heterogeneïtat dels criteris usats en cada assaig, tant clínics (Amsterdam, Bethesda, agregació familiar,...) com moleculars (MSI i IHC en els tumors,...). Tot i això, van der Klift conclou en la revisió d'un important nombre d'estudis, que entre un 5% i un 20% de les famílies amb CCR hereditari no polipós són portadores de grans reordenaments en els gens *MSH2* i *MLH1*, essent més freqüents en el primer gen (Di Fiore, et al., 2004; Gille, et al., 2002; Grabowski, et al., 2005; Nakagawa, et al., 2003; van der Klift, et al., 2005; Wang, et al., 2003; Zhu, et al., 2005). Així, si tenim en compte les 34 famílies i els dos gens estudiats en la nostra cohort, veurem que estem també dins aquest ampli rang amb una proporció del 12%. Una de les petites discordances amb la resta d'assajos, recau en l'absència de grans delecions en les famílies Bethesda en la nostra sèrie que probablement es deu al reduït nombre de famílies que hem estudiat. En l'estudi francès que abans mencionàvem, troben un 8% i un 3% de reordenaments en un total de 212 i 106 famílies que no compleixen els criteris d'Amsterdam (Di Fiore, et al., 2004), i cal recordar que el nostre estudi es limita a 24 famílies amb aquestes característiques. També és molt important remarcar que totes les grans delecions que vam trobar es troben en famílies MSI+ i IHC- en els seus tumors. Així doncs, corroborarem que aquests dos marcadors són bons indicadors de l'absència de funció reparadora que pot ser deguda, en aquest cas, a un canvi en la dosi del DNA en la línia germinal. Tot i això, en el cas de *MLH1* la IHC és menys específica per la freqüent inactivació del gen per hipermetilació del tumor (Shia, 2008).

Així, les grans delecions representaven aproximadament un 8% (4/52) del total de mutacions detectades en reparadors, un 13% (3/24) i un 4% (1/27) si separem *MSH2* i *MLH1*, respectivament. Aquests resultats ens van servir per introduir l'anàlisi de grans delecions dels gens reparadors *MSH2* i *MLH1* en la rutina del diagnòstic molecular del nostre centre, de forma que un 12% de les famílies en les quals fins aleshores no es podia oferir un seguiment molecular dels familiars, podrien gaudir-ne si així ho volien. Aquesta elevada incidència més el fet que s'hagin desenvolupat tècniques fàcilment incorporables a una rutina de diagnòstic molecular (MLPA i QMPSF), fa que l'anàlisi de grans delecions sigui el primer test genètic a realitzar en famílies amb sospita de síndrome de Lynch. D'aquesta forma, el fet de poder descartar la seqüenciació completa del gens *MSH2* i/o *MLH1* en un nombre considerable de mostres portadores

de grans delecions, resulta un estalvi important de temps i de diners. A dia d'avui, tot i no constar com a resultats d'aquesta tesi, sinó com a resultats del grup de diagnòstic molecular del Institut Català d'Oncologia, s'han trobat, comptant les aquí descrites, un total de 11 grans delecions (7 en *MSH2* i 4 en *MLH1*), el que representa un 12% de totes les mutacions trobades (16% i 8,5% per *MSH2* i *MLH1*). Aquest percentatge està en el rang baix de les series reportades (Zhang, et al., 2006) pero és molt inferior a la relacio 3:1 entre mutacions puntuals i reordenaments publicat per Van Der Klift. La manca de reordenaments recurrents en la nostra experiència pot explicar aquestes discrepàncies.

Tan important és trobar aquests reordenaments com ser capaç de confirmar-los i/o caracteritzar-los. Per una banda, tècniques com l'MLPA o la QMPSF, que es basen en la hibridació de sondes o *primers* per cada un dels exons d'un gen, poden donar falsos positius si existeixen polimorfismes o mutacions puntuals en el lloc de la hibridació (Pagenstecher, et al., 2007; Wehner, et al., 2005). D'altra banda, la caracterització de dels punts de ruptura acotant el reordenament, permet crear una PCR simple per fer un cribratge de la mutació en els familiars. Així doncs, les quatre delecions trobades mitjançant QMPSF en l'estudi descrit en l'article 1 d'aquesta tesi, van ser confirmades mitjançant MLPA a més de ser identificades en altres familiars, cosegregant amb la malaltia. També es van fer esforços per a la seva caracterització molecular. Pensem que aquesta estratègia de confirmació és fonamental si volem utilitzar aquests resultats en la clínica de forma segura.

En la primera deleció esmentada, exons 1 i 2 del gen *MSH2*, si bé el punt de ruptura *downstream* quedava més o menys acotat dins l'intró 2, el punt de ruptura *upstream* era molt més incert. Així, vam fer una QMPSF amb dos fragments del promotor del gen (que van resultar també delecionats) i dos fragments pels exons 1 i 7 del gen *TACSTD1*, proper a *MSH2* (que van resultar intactes). Seguidament vam fer una PCR llarga (LR-PCR) usant primers de les regions no delecionades contigües a la deleció, i vam obtenir un fragment corresponent al al·lel delecionat d'unes 4-5 Kb en un portador de la mutació. L'obtenció d'aquest fragment de PCR ens serveix tant per confirmar la deleció com per deduir que avarca aproximadament unes 25-26 Kb. S'ha descrit que les delecions de la regió promotora de *MSH2* són molt freqüents degut a l'elevada densitat de seqüències recombinogèniques de la regió 5' d'aquest gen (Charbonnier, et al., 2005; Charbonnier, et al., 2002). A més, donat que el punt de ruptura a 5' d'aquest tipus de delecions és molt heterogeni (Charbonnier, et al., 2002), és força improbable que la deleció que aquí hem descrit hagi estat prèviament caracteritzada.

Així doncs, els següents passos per determinar la naturalesa molecular d'aquest reordenament aniran encaminats a la seqüenciació del fragment obtingut en la LR-PCR. La predicció que podem fer per aquesta gran deleció és l'anul·lació de l'expressió de l'al·lel mutat ja que, com a mínim gran part del promotor apareix deletat però no hem fet estudis d'RNA que ho confirmin.

D'altra banda, vam ser capaços de trobar el punt de ruptura exacte del segon reordenament, la deleció dels exons 3 al 6 del gen *MSH2* (g.6139_20550del; NC_000002.10, GI:89161199), d'unes 14,5 Kb. Inicialment vam fer ús de la QMPSF del llarg intró 6 i seguidament vam fer la LR-PCR que vam seqüenciar. En aquesta deleció s'hi veuen implicades seqüències repetitives de tipus Alu situades tant en l'intró 2 com en l'intró 6, de forma que el mecanisme més probable pel qual s'hagi donat el reordenament és una recombinació homòloga no al·lèlica, responsable de fins un 85% d'aquest tipus de mutacions en el gen *MSH2* (Li, et al., 2006; van der Klift, et al., 2005). De fet, en el cas que ens ocupa, l'homologia entre les seqüències Alu és altament elevada: fins a 27 pb amb un 100% d'homologia entre les cadenes originals. La deleció d'aquests exons prediu un canvi en la pauta de lectura que es traduiria en una proteïna MSH2 truncada que no hem confirmat, doncs no hem fet estudis a nivell d'RNA .

Una altra deleció que vam poder caracteritzar totalment va ser la dels exons 9 i 10 d'*MSH2* (g.[51309_56216del; 56217_56465inv; 56466_64246del]; NC_000002 GI:89161199). Primer vam usar la QMPSF del llarg intró 8 per acotar-la una mica i després vam fer la LR-PCR i seqüenciació del producte obtingut fins a trobar el punt de ruptura. Aquest reordenament consisteix en una gran deleció d'unes 13 Kb acompanyada per de la inserció d'una seqüència invertida d'intró 8 de 249 pb. El mecanisme pel qual s'ha donat aquesta mutació involucra seqüències repetitives Alu i LINE. El punt de ruptura proximal o 5' està format per dues seqüències Alu en sentit oposat i amb un grau raonable d'homologia. El punt de ruptura distal o 3' està format per un element LINE i un Alu sense homologia entre ells. S'ha postulat el *serial replication slippage in trans* com el mecanisme causal per aquest tipus de delecions (Chen, et al., 2005). Aquest error es dona durant la replicació del DNA i es produeix degut a un lliscament de la cadena directora naixent fins a una repetició invertida de la cadena tardana, seguit de l'amplificació d'un fragment d'aquesta i finalitzat per un nou lliscament de la cadena que hibrida amb una nova seqüència amb certa homologia de la cadena directora. Així, si es dona aquest fenomen existeix una "doble" deleció deguda als dos lliscaments en *trans* i l'amplificació d'una zona invertida enmig de les

dues regions delecionades. Igual que abans, la deleció en l'RNA dels exons 9 i 10, portaria a un canvi en la pauta de lectura i una proteïna truncada, tot i que no ho podem assegurar al no haver fet els estudis pertinents.

Aquest últim cas el vam reportar, per la seva especial presentació clínica, a la revista *Genes, Chromosomes and Cancer* l'any 2008 i és l'article 2 d'aquesta tesi. El vam identificar en un pacient, que compleix els criteris d'Amsterdam tant per la branca materna com paterna i que va desenvolupar tres CCRs metacrònics que van ser tractats quirúrgicament i, posteriorment, un limfoma. Gràcies a la caracterització molecular de la deleció vam poder dissenyar un test basat en una simple PCR que amplificava de forma específica l'al·lel mutat o el wt. Així, vam poder dilucidar l'origen patern de la mutació, permetent-nos analitzar el DNA provinent de parafines tumorals d'alguns individus èxits, que hagués estat insuficient i de mala qualitat per ser analitzat mitjançant la QMPSF. El que ens va cridar l'atenció d'aquest cas va ser l'aparició del limfoma uns anys després, ja que no pertany a l'espectre tumoral de la síndrome de Lynch (Gruber, 2006). El que sí que s'ha associat a limfomagènesi són les mutacions bial·lèliques dels gens MMR que donen lloc a una síndrome autosòmica recessiva anomenada deficiència constitucional de MMR que presenta una elevada incidència de limfomes amb MSI (Bandipalliam, 2005; de Vos, et al., 2005; Scott, et al., 2007). Aquesta es va descartar ja que hi havia expressió de MSH2 en teixit normal del individu índex. L'absència de mutacions en *MLH1* i *MSH6* en la línia germinal descartava també que fos un heterozigot compost. Tot i que s'havien descrit altres casos relativament similars al nostre (Hirano, et al., 2002; Rosty, et al., 2000), no s'havia pogut establir, fins el moment, una relació clara entre la mutació en un gen MMR i la limfomagènesi. En el nostre cas, el limfoma presentava MSI, perdia l'expressió de la proteïna MSH2 i a més a més, vam poder demostrar mitjançant MLPA, que aquest tumor presentava la deleció dels exons 9 i 10 en homozigosi. Aquests tres fets establien una relació causal clara entre la mutació germinal i l'aparició del tumor. La inactivació de l'al·lel wt en tumor per mitjà d'una mutació somàtica idèntica a la de la línia germinal, s'ha descrit que ocorre freqüentment en portadors de grans deleccions dels gens *MSH2* i *MLH1*, i que el mecanisme més probable pel qual té lloc és la conversió gènica (Zhang, et al., 2006). Tot i això, no podem descartar una recombinació mitòtica o la pèrdua del cromosoma wt seguida per una duplicació cromosòmica (Zhang, et al., 2006). A més de la deficiència constitutiva de MMR, existeixen altres evidències que confirmen el paper que poden jugar els gens MMR en la limfomagènesi: la presència de MSI en alguns limfomes humans, sobretot els associats a immunodeficiències (Bedi, et al., 1995; Duval, et al., 2004; Gamberi, et

al., 1997; Indraccolo, et al., 1999; Nagy, et al., 2000; Starostik, et al., 2000); la deficiència d'expressió dels gens MMR en neoplàsies de les cèl·lules B (Kotoula, et al., 2002); i la presència de mutacions somàtiques d'*MSH2* en limfomes limfoblàstics (Lowsky, et al., 1997). Mecanísticament, la proteïna MSH2 evita la recombinació entre seqüències divergents gràcies al reconeixement i unió a les bases desaparellades, tal i com ho demostra un augment en la taxa de recombinació en cèl·lules mare embrionàries de ratolins deficients per *MSH2* (Abuin, et al., 2000). Tenint en compte que les neoplàsies hematològiques sovint són el resultat de reordenaments cromosòmics, s'ha postulat que la deficiència en aquest gen pot portar a la limfomagènesi degut a l'augment en la taxa de reordenaments cromosòmics en altres gens diana (Abuin, et al., 2000). Així, vam descriure el primer cas d'un limfoma amb MSI i pèrdua d'expressió de la proteïna MSH2, lligat a una mutació germinal en heterozigosi del gen *MSH2*. A més, vam demostrar que la pèrdua de les dues còpies d'un gen MMR pot jugar un paper crític en la limfomagènesi associada a la síndrome de Lynch.

Com podem veure, totes les grans delecions que hem trobat en el gen *MSH2*, es situen en la seva primera meitat, la qual està relacionada amb la presència de la major part dels Alus en aquesta zona (Charbonnier, et al., 2002). A més, dues de les delecions (exons 1-2 i exons 3-6) tenen un dels seus punts de ruptura situat al intró 2, l'intró amb la màxima densitat tant de punts de ruptura com d'Alus (Li, et al., 2006). Els introns on s'han descrit més punts de ruptura fins el moment són el 6, 7 i 8, suposadament per la seva grandària (Li, et al., 2006), el que quadra amb les delecions que inclouen els exons 3-6 i 9-10 trobades en la nostra sèrie.

El gen *MLH1* conté menys seqüències Alu que l'*MSH2* (un Alu cada 1,4 Kb respecte un cada 0,8 Kb, respectivament) (RepeatMasker) i aquesta podria ser una de les raons per les quals hi trobem menys grans reordenaments. En la població estudiada tan sols vam trobar una gran delecio, del gen complet, en *MLH1*. La tècnica FISH la va corroborar ja que es tracta d'una delecio molt gran que implica altres gens. Quatre de les cinc sondes de FISH que vam hibridar van resultar donar senyal només en un dels homòlegs del cromosoma 3, quedant d'aquesta forma la regió 5' sense acotar. Una bona aproximació seria continuar acotant amb noves sondes de FISH fins trobar una regió no delecionada. La sonda situada més a 3' no apareix delecionada i per tant s'hauria de començar un acotament més fi a partir del disseny de noves sondes per MLPA o parelles de primers per QMPSF en la zona que queda entre la penúltima i l'última sondes.

Totes les delecions aquí mencionades, han estat prèviament descrites per altres autors (Leiden Open Variation Database), tot i això, no podem assegurar que siguin exactament les mateixes, degut al buit que existeix en la caracterització molecular dels reordenaments.

- Les grans delecions dels gens *MSH2* i *MLH1*, responsables de la síndrome de Lynch, representen en conjunt un 7% de les mutacions detectades en les famílies de la nostra sèrie. Així, és clarament recomanable la introducció del cribratge de grans reordenaments en l'algoritme del diagnòstic molecular de les famílies amb sospita de síndrome de Lynch.
- Hem reportat el primer cas d'un limfoma amb MSI i una pèrdua de la proteïna MSH2, lligat a una mutació germinal heterozigota del gen *MSH2*, i hem demostrat que la pèrdua de la funció d'un gen MMR podria ser crítica en limfomes lligats a individus amb síndrome de Lynch.

Dosi a nivell de DNA: grans reordenaments en APC

Com ja hem dit al inici de la discussió, la QMPSF del gen *APC* no estava ni dissenyada ni posada a punt com en els gens reparadors. Els grans reordenaments en aquest gen ja s'havien descrit com una causa freqüent de poliposi gràcies a l'ús de tècniques com el Southern blot, FISH, i altres que, excepte en el cas del MLPA, són poc pràctiques per a usar-les de forma rutinària (Aretz, et al., 2005; Flintoff, et al., 2001; Mueller, et al., 2004; Renkonen, et al., 2005; Su, et al., 2000; van der Luijt, et al., 1997). Davant de la necessitat d'estudiar la possible presència de grans reordenaments en les famílies amb poliposi, vam decidir dissenyar i posar a punt la QMPSF pel gen *APC*, tal i com es descriu en l'article 3 d'aquesta tesi, publicat l'any 2008 a *Clinical Chemistry*.

Un cop validada la tècnica, usant 23 controls negatius i un control positiu amb una delecio citogenètica a 5q, vam analitzar 45 individus afectes de poliposi no relacionats (13 FAP i 32 AFAP) de famílies on prèviament no s'havia detectat cap mutacio ni en el gen *APC* ni en el gen *MUTYH*, per ser analitzades de possibles reordenaments gènics. En total, vam detectar 3 grans delecions en individus FAP, dues d'elles parcials i una altra que incloïa el gen *APC* complet. Les delecions parcials comprenien els exons 9 i 10 en un dels casos, i de l'exó 11 fins al 15 en l'altre. Així doncs, les grans delecions representaven un 23% (3/13) de les famílies FAP sense mutacio detectada, el que concorda amb el prèviament reportat a la literatura, on el rang és ampli i va des d'un 6% fins un 48% (Aretz, et al., 2005; Bunyan, et al., 2004; Nielsen, et al., 2007a; Renkonen, et al., 2005; Sieber, et al., 2002b; Stekrova, et al., 2007). Les grans delecions en *APC* expliquen un 5% (4/75) de totes les poliposis i un 6% (4/65) de

totes les mutacions detectades en les famílies FAP, ja que també tenim en compte aquí la deleció citogenètica que vam usar de control positiu. Aquests resultats concorden amb els publicats a la literatura (Aretz, et al., 2005; Bunyan, et al., 2004; Cao, et al., 2006; Meuller, et al., 2004; Nielsen, et al., 2007a; Renkonen, et al., 2005) i confirmen la necessitat d'introduir el cribratge de grans delecions en les famílies amb poliposi.

No vam trobar cap gran reordenament en les 32 famílies amb poliposi atenuada. Tot i que en alguns casos s'han reportat grans delecions en aquestes famílies, aquests són molt minoritaris, de forma que es pot establir una correlació entre gran deleció i un fenotip clàssic de poliposi (Aretz, et al., 2005; Mihalatos, et al., 2005; Nielsen, et al., 2007a; Sieber, et al., 2002b; Stekrova, et al., 2007). Fins el moment, aquesta és la relació genotip-fenotip més clara que s'ha pogut trobar quan parlem de grans delecions. De fet, Nielsen i col·laboradors, detectaren en 2 de les 3 famílies AFAP portadores d'una gran deleció, que aquesta anava de l'exó 7 fins al 13, creant probablement un manteniment de la pauta de lectura que explicaria el fenotip més lleu (Nielsen, et al., 2007a). En aquesta revisió de totes les grans delecions descobertes fins el moment, no es troba cap més diferència significativa del fenotip respecte les mutacions puntuals. Aquesta manca de correlació fa créixer els interrogants entre possibles relacions genotip-fenotip en les famílies amb poliposi ja que no es fàcil explicar com les delecions totals d'*APC* donen un fenotip clàssic de la malaltia mentre que l'haploinsuficiència deguda a mutacions en els extrems del gen que generen proteïnes inestables s'associa a un fenotip menys agressiu. Tot i que els factors ambientals i/o altres condicionants genètics puguin tenir un paper modificador important és difícil anticipar com podrien actuar.

Igual que amb els gens reparadors, en el cas d'*APC* també vam confirmar les tres grans delecions trobades mitjançant MLPA, corroborant així la fiabilitat del nostre assaig. A més, vam intentar caracteritzar molecularment les dues delecions parcials del gen. Pel que fa a la deleció dels exons 9 i 10, vam poder seqüenciar el punt de ruptura (g.80715_88725; NC_000005.8; GI:51511721), el qual no implicava cap seqüència repetitiva, suggerint que el mecanisme pel qual s'havia produït era una recombinació no homòloga, ja descrita en aquest gen (Cao, et al., 2001). La identificació i caracterització d'aquesta gran deleció va permetre que un dels individus d'aquesta família es pogués sotmetre a un diagnòstic prenatal, mitjançant MLPA i una PCR simple dissenyada específicament per detectar aquesta deleció. Segons el publicat fins a dia d'avui, aquesta és la primera deleció dels exons 9 i 10 del gen *APC*

que s'ha descrit. Tot i que serien necessaris estudis a nivell d'RNA per confirmar-ho, la deleció d'aquests dos exons produiria un canvi en la pauta de lectura i, per tant, una proteïna truncada. Pel que fa la deleció dels exons 11 fins al 15, vam intentar esbrinar l'abast de la deleció en la seva part distal o 3' usant FISH i PCR quantitativa de fragments *downstream* de l'exó 15. Vam poder acotar la situació del punt de ruptura a 3' en una regió d'unes 83 Kb. Aquesta deleció també implicava el gen *SRP19* i com a mínim una part del gen *REEP5*, ambdós *downstream* d'*APC*. Aquesta deleció ja ha estat descrita anteriorment (Nielsen, et al., 2007a), tot i que sense conèixer el punt de ruptura exacte no podem afirmar que es tracti de la mateixa mutació. Pel que fa a la deleció del gen *APC* complet, podem dir que és una de les més usuals representant aproximadament el 50% de les grans delecions trobades fins el moment (Nielsen, et al., 2007a).

Actualment, el cribratge de grans delecions en el gen *APC* ja ha estat incorporat en la rutina del diagnòstic molecular com a estudi molecular inicial del gen en les famílies amb poliposi. Tot i això, fins el moment no s'han trobat més grans delecions que les que acabem de descriure.

- La QMPSF del gen *APC* que hem dissenyat i posat a punt permet la detecció de grans delecions en aquest gen.
- Les grans delecions del gen *APC*, responsable de la poliposi adenomatosa familiar, representen un 6% de les mutacions detectades en les famílies de la nostra sèrie. Així, és clarament recomanable la introducció del cribratge de grans reordenaments en l'algoritme del diagnòstic molecular de les famílies amb poliposi adenomatosa familiar.

Fins aquí hem comprovat que tant en les famílies amb síndrome de Lynch com en les famílies amb poliposi, la QMPSF ha estat una eina molt útil per identificar aquells individus portadors de grans delecions. En ambdós casos hem obtingut resultats molt similars als prèviament reportats a la literatura usant majoritàriament la tècnica MLPA. Així, la QMPSF pot ser usada o com a mètode principal d'anàlisi de la dosi a nivell de DNA, o com a mètode complementari per a confirmar els resultats de l'MLPA. Tant la QMPSF com l'MLPA són tècniques simples, ràpides i fàcils d'usar, amb un clar avantatge de l'MLPA al vendre's com a kit, actualment disponible per a molt gens (www.mrc-holland.com). D'aquesta forma s'evita el costós procés de posada a punt de la tècnica i es redueix la variabilitat entre diferents centres.

Ambdues tècniques tenen avantatges i inconvenients. La QMPSF dels gens reparadors es separa en 2 reaccions per a cada un d'ells, i la de l'*APC* la vam distribuir

en 3 reaccions múltiplex diferents, mentre que l'MLPA sol presentar-se en forma d'una sola PCR. Tot i que és més ràpid tenir-ho tot en una sola reacció, la distribució dels exons en diferents PCRs múltiplex sense seguir un ordre correlatiu disminueix l'aparició d'artefactes. El fet que no sigui un kit comercial fa que la QMPSF sigui més flexible i per tant sigui més senzill adaptar-la a l'anàlisi de regions gèniques concretes que vulguem interrogar en un moment determinat, com vam fer amb regions intròniques del gen MSH2 per acotar el punt de ruptura d'una deleció. La qualitat del DNA és crucial en ambdós mètodes per obtenir resultats coherents i reproduïbles.

El mètode per calcular pèrdues en la dosi de DNA és molt important. La forma més robusta de calcular-ho numèricament per QMPSF va resultar ser una variació del mètode usat per l'anàlisi de l'MLPA, on es tenen en compte totes les mostres analitzades en un experiment, partint de la base que la major part resultaran ser homozigotes. Així, s'obté una ràtio per a cada exó i mostra que, si és proper a 1 (rang 0,8-1,2) indica dosi diploide i, si és proper a 0,5 (rang 0,4-0,6) indica càrrega haploide. Per altra banda, la comparació mostra-control de forma individual, tan numèricament com visualment és útil però menys acurada.

Aquestes tècniques d'anàlisi de la dosi de DNA també es poden aplicar a nivell somàtic, a més de nivell germinal. La QMPSF s'ha emprat per estudiar les variacions somàtiques en el nombre de còpies de certs gens, per usar-ho com a valor pronòstic en CCR (Killian, et al., 2007). Per l'altra, en l'article 2 d'aquesta tesi, vam usar l'MLPA per estudiar la inactivació somàtica de l'al·lel wt en mostres parafinades de CCR i limfoma.

Dosi a nivell d'RNA: expressió específica d'al·lel en APC

Gràcies a l'anàlisi de grans reordenaments hem pogut trobar la causa patogènica molecular d'algunes de les famílies amb sospita de síndrome de Lynch o poliposi en les quals no s'havien detectat anomalies a nivell de DNA durant el cribratge molecular. Tot i això, encara resten famílies amb un patró d'heretabilitat clar però cap diagnòstic molecular. Això ens va portar cap a l'estudi de canvis en l'expressió gènica a nivell germinal. És un fet conegut que gran part de la variació fenotípica entre organismes propers es pot atribuir a canvis en l'expressió gènica més que alteracions en la seqüència proteica. Com a conseqüència, podem esperar que variacions en el fenotip de certes malalties podrien ser causades per canvis dels nivells d'expressió, més que per alteracions estructurals de gens (Yan, et al., 2002a). Així, s'ha suggerit una connexió entre el genotip i la susceptibilitat a una malaltia basada en canvis en

l'expressió gènica (Yan, et al., 2002b). L'anàlisi de l'expressió a nivell germinal, obre les portes a la detecció de possibles elements reguladors en *cis* i fa possible la detecció indirecta de canvis patològics que s'escapen en els mètodes de cribratge del DNA. Per superar les variacions que poden existir en l'expressió entre diferents individus degudes a factors ambientals o fisiològics, un mètode alternatiu per al seu anàlisi ha estat la comparació de l'expressió relativa dels al·lels d'un mateix gen en el mateix tipus cel·lular, o el que és el mateix, l'expressió específica d'al·lel (ASE). Una de les tècniques més usades per mesurar l'ASE ha estat sens dubte l'SNuPE (*single nucleotide primer extension analysis*).

Aquesta hipòtesi ha estat analitzada en gens responsables de predisposició hereditària a desenvolupar tumors i els gens reparadors n'han estat objecte d'estudi. Així, s'han publicat varis estudis on es mesura l'ASE tant en famílies que complien els criteris d'Amsterdam que eren portadores de mutacions com en famílies on no s'havia detectat la mutació (Curia, et al., 1999; Renkonen, et al., 2003; Tournier, et al., 2004b). En famílies amb síndrome de Lynch, on ja s'ha detectat una mutació patològica, s'ha observat un clar desequilibri de la expressió específica d'al·lel associada a una disminució d'expressió de l'al·lel mutat si les mutacions trenquen la pauta de lectura i generen codons *stop* prematurs (PTC) abans de l'última unió exó-exó. Aquest desequilibri en l'expressió dels dos al·lels del gen és secundari a l'activació de la maquinària del *nonsense mediated mRNA decay* (NMD). El NMD és un mecanisme cel·lular de vigilància de la integritat del mRNA que assegura la degradació d'aquelles molècules que podrien donar lloc a proteïnes truncades amb un probable efecte patològic dominant negatiu o guany de funció (Cartegni, et al., 2002). Aquelles mutacions que, tot i trencar la pauta de lectura, generen un PTC en l'últim exó del gen, no poden activar la maquinària NMD i això es fa palès en una expressió equilibrada dels dos al·lels. També hi ha excepcions a aquesta norma en mutacions localitzades al primer exó i es pensa que en aquesta situació no s'activa la maquinària de destrucció del mRNA perquè existeix una reiniciació de la traducció en un codó d'inici més distal (Tournier, et al., 2004b). Les mutacions que mantenen la pauta de lectura, tampoc presenten desequilibris en l'ASE. En aquests treballs, es va demostrar que l'expressió al·lèlica diferencial en la línia germinal podia ser una de les causes patològiques en aquelles famílies altament sospitoses de patir síndrome de Lynch però en les quals no s'havia pogut detectar cap mutació en els gens reparadors.

A diferència dels gens reparadors i altres gens de predisposició al càncer com *BRCA1-2* i *NF1* (Brinckmann, et al., 2007; Chen, et al., 2008; Perrin-Vidoz, et al., 2002), no hi

ha estudis encaminats a determinar l'efecte de les mutacions del gen *APC* sobre l'ASE. Per contra, sí que s'ha reportat la presència de desequilibris al·lèlics en l'expressió d'*APC* en famílies amb poliposi on no s'ha aconseguit detectar la causa genètica de la malaltia (Kanter-Smoler, et al., 2008; Renkonen, et al., 2005; Yan, et al., 2002a). El nostre darrer objectiu va ser analitzar la presència de desequilibris en ASE en la línia germinal de dos grups de famílies amb poliposi: 36 famílies amb mutació prèviament detectada al gen *APC*, o *APC(+)*; i 23 sense mutació detectada ni en *APC* ni en *MUTYH*, o *APC/MUTYH(-)*. Aquest estudi apareix descrit en detall en l'article 4 d'aquesta tesi.

Per fer-ho, vam adaptar la metodologia del SNUPE usant el kit SNaPshot per mesurar l'ASE a través d'un polimorfisme codificant freqüent situat a l'exó 11 del gen *APC*. En aquelles famílies amb mutació en el gen *APC*, vam trobar una forta associació entre un desequilibri en l'expressió al·lèlica i les mutacions situades fora de l'últim exó del gen (12/14, 86%). Aquests desequilibris eren estranys en els casos portadors de mutacions dins de l'exó 15 del gen (2/22, 9%). Aquestes dues observacions concorden, tot i que de forma imperfecta, amb el model de NMD en mamífers que ja s'havia observat en els gens reparadors, *BRCA1-2* i *NF1* (Brinckmann, et al., 2007; Chen, et al., 2008; Perrin-Vidoz, et al., 2002; Renkonen, et al., 2003; Tournier, et al., 2004b). Per altra banda, les nostres observacions en el gen *APC* contrasten amb les de Renkonen i col·laboradors que no van detectar desequilibris en l'expressió al·lèlica en una petita sèrie de 4 famílies portadores de mutacions en els exons 6 al 9 del gen *APC* (Renkonen, et al., 2005).

Per confirmar la contribució del NMD en els desequilibris observats, vam realitzar cultius curts de limfòcits i els vam tractar amb puromicina, un conegut inhibidor de la traducció i, per tant, del NMD (Andreutti-Zaugg, et al., 1997). Com ja s'havia observat prèviament pel gen *NF1* (Pros, et al., 2006), existia un augment de l'expressió desigual dels al·lèls *in vitro*, senyalant un augment del NMD i per tant, de la degradació dels transcrits *nonsense* en condicions de cultiu. El tractament amb puromicina restaurava completament l'expressió equilibrada del dos al·lèls en tots els casos analitzats excepte en el cas amb l'expressió diferencial més gran on la restauració era només parcial. No podem saber si això es deu a la intensitat del desequilibri al·lèlic o a altres factors com poden ser limitacions de l'assaig.

Com ja hem dit abans, els nostres resultats concorden perfectament amb el model del NMD, excepte en alguns casos. Una de les excepcions es presenta en una família

amb una mutació al intró 14 que produeix un *splicing* de l'exó 14 i l'aparició d'un PTC molt a l'inici de l'exó 15. L'associació d'aquest cas a un desequilibri en l'ASE podríem atribuir-la a l'especial posició del PTC dins l'últim exó del gen i potser també al context de la seqüència, ambdós factors coneguts per poder influir en el NMD. Una altra excepció es troba en una família portadora d'una mutació en l'exó 15 del gen i que també presenta expressió diferencial. El fet que existeixin dues famílies més amb aquesta mutació i expressió equilibrada del al·lels i que el seu desequilibri hagi estat corroborat en els cultius, fan que una possible explicació sigui que a més de la mutació detectada en l'exó 15, sigui portador d'algun altre canvi que activi el NMD. Per a les altres dues excepcions, dues famílies amb mutacions en l'exó 4 del gen que no presenten expressió diferencial tot i que sí presenten valors d'ASE propers al límit entre la normalitat i el desequilibri, una limitació metodològica sembla l'explicació més plausible. A les nostres mans l'SNaPshot ha resultat ser una tècnica molt sensible i capaç de quantificar l'expressió al·lèlica diferencial, tal i com ja s'havia demostrat prèviament (Bray, et al., 2003; Valle, et al., 2008; Yan, et al., 2002b; Zhang, et al., 2005). Tot i això, una homogeneïtzació en el processament de les mostres pot ser clau per l'obtenció de resultats del tot fiables. Nosaltres vam analitzar mostres de dues sèries independents, una amb origen al Institut Català d'Oncologia, i l'altra a la Universitat de Michigan on els protocols de processament de les mostres són diferents. Tot i que els resultats entre ambdós grups són molt similars, les dues excepcions esmentades provenen del mateix centre. S'ha descrit que el processament de les mostres i la qualitat de l'RNA són claus en els anàlisis d'ASE i poden influir en els resultats obtinguts. Per exemple, es va veure que en les sangs envellides, existia una disminució de l'efecte del NMD que limitava la detecció de desequilibris al·lèlics existents (Pros, et al., 2006), i això és el que pot haver passat en aquests dos casos.

El NMD pot ser considerat un modificador de les conseqüències fenotípiques dels PTC i ha ajudat a entendre correlacions genotip-fenotip en alguns desordres genètics (Khajavi, et al., 2006). En les mutacions fora de l'exó 15, el NMD podria promoure una pèrdua de funció parcial o haploinsuficiència *in vivo*, tot i que no ho puguem evidenciar amb una correlació fenotípica en la nostra sèrie. Tot i això, el fet que l'últim i llarg exó 15 acumuli la majoria de les mutacions detectades en el gen *APC*, ens fa pensar que el NMD pot ser un mecanisme addicional que influeix en la regulació de l'efecte dominant negatiu d'algunes mutacions.

Finalment, també vam trobar desequilibris en l'ASE en absència de mutacions detectades en *APC* i *MUTYH*, tant en una família FAP com en una AFAP, descartant

d'aquesta forma un possible efecte de l'haploinsuficiència en l'heterogeneïtat fenotípica. La causa patogènica en aquestes famílies podria trobar-se en els introns del gen. El dilema que això presenta és si podem considerar aquests desequilibris com a patogènics sense haver-ne trobat una causa genètica. L'anàlisi de familiars afectes pot ser una bona aproximació per veure si s'estableix una correlació entre els desequilibris en l'expressió i la malaltia en aquestes dues famílies. De fet, altres estudis han descrit una heretabilitat de l'ASE en aquest i altres gens sense aconseguir trobar-hi una causa genètica patogènica (Valle, et al., 2008; Yan, et al., 2002a; Yan, et al., 2002b). Per acabar d'aprofundir en aquest tema, seria també interessant mesurar l'estat del polimorfisme en el DNA tumoral d'aquests individus sense mutació patogènica coneguda per tal de veure quin dels dos al·lels es perd per mutació somàtica. Tant Renkonen com Yan i els seus col·laboradors, s'han adonat que majoritàriament, l'al·lel que es perd en el tumor és el que, en línia germinal, s'associa a una expressió més elevada (Renkonen, et al., 2005; Yan, et al., 2002a), cosa que suggereix que l'expressió disminuïda d'un al·lel en la línia germinal com a possible causa patogènica.

L'exó 15 del gen *APC* representa un 75% de la seva seqüència codificant, el que fa que la seqüenciació d'aquesta regió amb finalitats diagnòstiques sigui una feina tediosa i llarga de realitzar. A més a més, com que les mutacions d'*APC* es distribueixen al llarg de tot el gen, aproximadament el 70% s'acumulen en aquest exó, que és per on es comencen els cribratges diagnòstics. Tenint en compte els resultats obtinguts en el grup de famílies *APC*(+) del nostre estudi, creiem que un precibratge mitjançant la mesura d'ASE en les famílies amb poliposi portaria a una disminució significativa del temps ocupat per la seqüenciació de l'exó 15 (6574 pb), en aquelles famílies que presentessin expressió al·lèlica diferencial. Tot i això, per considerar aquesta possibilitat, s'hauria d'incorporar l'ús d'altres polimorfismes per tal de poder augmentar en nombre de mostres informatives i usar protocols molt estandarditzats de processament de mostres.

Així doncs, la bona correlació trobada entre la presència del NMD i mutacions fora de l'exó 15 obren les portes a noves aproximacions en el diagnòstic molecular on s'usaria la mesura d'ASE com a precibratge indicador de la localització de la possible mutació en les famílies amb FAP. Segons els nostres resultats, els desequilibris en l'ASE es presenten en una fracció molt petita de les famílies *APC/MUTYH*(-). En aquestes famílies doncs, l'haploinsuficiència com a possible causa patogènica de la malaltia s'haurà d'analitzar amb més profunditat.

- En les famílies amb poliposi adenomatosa familiar i mutació identificada en el gen *APC*, es produeix expressió al·lèlica diferencial dels dos al·lells exclusivament quan la mutació produeix un PTC abans de l'últim exó del gen. Aquest tret és fàcilment mesurable mitjançant SNaPshot i pot ser de gran utilitat com a precibratge en el diagnòstic molecular guiant-nos en la ubicació de la mutació patogènica.
- Hem detectat que en un 9% de les famílies amb poliposi adenomatosa familiar sense mutació prèviament detectada ni en *APC* ni en *MUTYH*, la possible causa de la malaltia produeix expressió al·lèlica diferencial, apuntant a algun dany desconegut a nivell de DNA.

Discussió global

Si tenim en compte tots els resultats presentats en aquesta tesi, veiem que hem aconseguit trobar la causa patogènica de la malaltia mitjançant l'anàlisi de grans reordenaments en una part de les famílies amb sospita de síndrome de Lynch i poliposi on no s'havia aconseguit mitjançant els cribratges tradicionals pels gens *MSH2*, *MLH1* i *APC*. A més, gràcies a l'anàlisi de l'ASE, hem vist que algunes famílies amb poliposi poden ser portadores d'algun canvi potencialment patogènic, pel moment desconegut, que produeix anomalies en l'expressió d'un dels al·lells del gen. Tot i això, encara queden famílies amb sospita de síndrome de Lynch i amb poliposi que romanen sense una causa patogènica definida.

Com ja hem explicat en la introducció, una part de les famílies amb sospita de síndrome de Lynch poden no ser portadores de mutacions en els gens reparadors i pertànyer al que s'ha definit recentment com CRC familiar (Vasen, et al., 2007), CRC hereditari de tipus X (Lindor, et al., 2005) o CCR hereditari no sindròmic (HNSCRC) (Papaemmanuil, et al., 2008). Tot i això, per comprovar l'ASE en els gens reparadors, seria interessant fer un estudi similar al d'*APC* però en les famílies amb sospita de síndrome de Lynch. També, la presència de mutacions en les regions intròniques o reguladores no estudiades i que no es manifestin en una expressió diferencial dels al·lells, poden haver estat passades per alt tant en MMR com en *APC*. El mosaicisme pot també ser la causa d'una subestimació de les mutacions, sobretot en poliposi on la taxa de mutacions *de novo* és més elevada que en reparadors (Plasilova, et al., 2006; Vasen, et al., 2008). La hipermetilació dels promotors podria ser una explicació per algunes de les famílies sense mutació identificada. Tot i que hem descartat la presència d'hipermetilació en el gen *APC* (Romero-Gimenez, et al., 2008), existeixen estudis pels gens reparadors on es postula que la hipermetilació tant de *MLH1* com de *MSH2* pot ser una causa de la síndrome de Lynch i que aquesta podria ser heretada (Chan, et al., 2006; Hitchins and Ward, 2008; Hitchins, et al., 2007; Morak, et al., 2008). De fet, les epimutacions germinals en *MSH2* s'han relacionat amb delecions en

gen *TACSTD1*, molt proper a l'extrem 5' de *MSH2* (Kovacs, et al., 2009; Ligtenberg, et al., 2009). Això ens porta directament a pensar en mutacions en altres gens com a responsables d'aquestes patologies. En el cas de la síndrome de Lynch s'hi han vist involucrats altres gens reparadors com *MSH6* i *PMS2* tot i que són responsables d'una petita part de les famílies amb la malaltia (Boland, et al., 2008; Senter, et al., 2008) i en aquells casos en què es tenen evidències, el nostre grup de diagnòstic ja en fa els estudis moleculars pertinents. En el cas de la poliposi, ja hem dit que també s'estudia el gen *MUTYH*. En ocasions molt puntuals s'han trobat mutacions en altres gens com *AXIN2* (Renkonen, et al., 2005). Lligat a la presència d'altres gens, també hi ha l'opció que existeixin gens modificadors lligats a la síndrome de Lynch (Wijnen, et al., 2009) o a la poliposi (Houlston, et al., 2001) que puguin modificar així el seu fenotip. Finalment, és important remarcar la importància del rigor en la definició dels criteris clínics per classificar les famílies com a possibles candidates a patir la síndrome de Lynch o poliposi clàssica o atenuada. En alguns casos els fenotips estan pobrament definits o no es disposa d'una història familiar clara i això pot portar a considerar famílies com a possibles portadores de mutació que realment no ho siguin.

Una de les coses que seria interessant interrogar a continuació, és la dosi a nivell de proteïna en la línia germinal. Aquí, hem mostrat els canvis en la dosi a nivell de DNA i d'RNA, per tant el següent pas seria poder esbrinar, com tots aquests canvis es tradueixen en proteïna, al mateix temps que podríem trobar diferències proteiques en pacients que semblen ser normals als altres dos nivells. Al cap i a la fi, la proteïna és l'últim pas en aquesta escala de nivells i, per tant, de qui dependrà una bona o mala funció de l'activitat dels gens que hem estudiat. L'enriquiment del sèrum mitjançant cromatografia d'afinitat i el posterior anàlisi proteic per masses podria ser una aproximació inicial.

Gràcies a les anàlisis realitzades al llarg d'aquesta tesi, s'han fet avenços que milloren el coneixement dels gens analitzats i permeten noves aplicacions diagnòstiques en les famílies amb sospita de síndrome de Lynch i poliposi adenomatosi familiar. Així, hem augmentat la detecció de causes patogèniques en aquestes dues malalties i dissenyat aproximacions que poden ajudar a millorar-ne el diagnòstic molecular i, com a conseqüència, a millorar l'assessorament i el consell genètic de les famílies afectades.

CONCLUSIONS

- La proporció de grans delecions trobada en els gens *MSH2*, *MLH1* i *APC* recolza l'ús del cribratge de grans reordenaments en la rutina del diagnòstic molecular de la síndrome de Lynch y la poliposi adenomatosa familiar, respectivament.
- Hem demostrat que les mutacions heterozigotes en els gens MMR poden donar lloc a l'aparició de limfomes en famílies amb la síndrome de Lynch.
- Les mutacions que generen PTC abans de l'últim exó del gen *APC* es manifesten amb una expressió diferencial dels dos al·lels del gen. Això pot ser de gran utilitat en el diagnòstic molecular de la poliposi adenomatosa familiar guiant-nos en la ubicació de la mutació i per tant en la seleccio de l'area del gen s'ha d'analitzar abans.
- L'expressió al·lèlica diferencial d'*APC* a nivell germinal es detecta a una petita proporció de les famílies amb poliposi adenomatosa familiar on no s'han trobat alteracions pels mètodes de cribratge tradicionals, indicant que pot ser la causa de la malaltia.

BIBLIOGRAFIA

A

- Abuin A, Zhang H, Bradley A. 2000. Genetic analysis of mouse embryonic stem cells bearing Msh3 and Msh2 single and compound mutations. *Mol Cell Biol* 20(1):149-57.
- Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, Hodges AK, Davies DR, David SS, Sampson JR and others. 2002. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 30(2):227-32.
- Andreutti-Zaugg C, Scott RJ, Iggo R. 1997. Inhibition of nonsense-mediated messenger RNA decay in clinical samples facilitates detection of human MSH2 mutations with an in vivo fusion protein assay and conventional techniques. *Cancer Res* 57(15):3288-93.
- Aretz S, Stienen D, Uhlhaas S, Pagenstecher C, Mangold E, Caspari R, Propping P, Friedl W. 2005. Large submicroscopic genomic APC deletions are a common cause of typical familial adenomatous polyposis. *J Med Genet* 42(2):185-92.
- Aretz S, Uhlhaas S, Sun Y, Pagenstecher C, Mangold E, Caspari R, Moslein G, Schulmann K, Propping P, Friedl W. 2004. Familial adenomatous polyposis: aberrant splicing due to missense or silent mutations in the APC gene. *Hum Mutat* 24(5):370-80.

B

- Bagnardi V, Blangiardo M, La Vecchia C, Corrao G. 2001. A meta-analysis of alcohol drinking and cancer risk. *Br J Cancer* 85(11):1700-5.
- Bandipalliam P. 2005. Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer* 4(4):323-33.
- Battle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T and others. 2002. Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111(2):251-63.
- Bedi GC, Westra WH, Farzadegan H, Pitha PM, Sidransky D. 1995. Microsatellite instability in primary neoplasms from HIV + patients. *Nat Med* 1(1):65-8.
- Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W. 1998. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 280(5363):596-9.
- Behrens J, Lustig B. 2004. The Wnt connection to tumorigenesis. *Int J Dev Biol* 48(5-6):477-87.
- Bianchini F, Kaaks R, Vainio H. 2002. Weight control and physical activity in cancer prevention. *Obes Rev* 3(1):5-8.
- Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P and others. 1987. Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328(6131):614-6.
- Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM. 2008. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* 7(1):41-52.
- Bray NJ, Buckland PR, Owen MJ, O'Donovan MC. 2003. Cis-acting variation in the expression of a high proportion of genes in human brain. *Hum Genet* 113(2):149-53.

- Brinckmann A, Mischung C, Bassmann I, Kuhnisch J, Schuelke M, Tinschert S, Nurnberg P. 2007. Detection of novel NF1 mutations and rapid mutation prescreening with Pyrosequencing. *Electrophoresis* 28(23):4295-301.
- Brocardo M, Nathke IS, Henderson BR. 2005. Redefining the subcellular location and transport of APC: new insights using a panel of antibodies. *EMBO Rep* 6(2):184-90.
- Broderick P, Carvajal-Carmona L, Pittman AM, Webb E, Howarth K, Rowan A, Lubbe S, Spain S, Sullivan K, Fielding S and others. 2007. A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk. *Nat Genet* 39(11):1315-7.
- Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, Wilkins E, Thomas NS, Shea-Simonds J, Duncan PJ, Curtis CE, Robinson DO, Harvey JF and others. 2004. Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Br J Cancer* 91(6):1155-9.
- Burt RW. 2000. Colon cancer screening. *Gastroenterology* 119(3):837-53.

C

- Cao X, Eu KW, Seow-Choen F, Zhao Y, Cheah PY. 2001. Topoisomerase-I- and Alu-mediated genomic deletions of the APC gene in familial adenomatous polyposis. *Hum Genet* 108(5):436-42.
- Cao X, Hong Y, Eu KW, Loi C, Cheah PY. 2006. Singapore familial adenomatous polyposis (FAP) patients with classical adenomatous polyposis but undetectable APC mutations have accelerated cancer progression. *Am J Gastroenterol* 101(12):2810-7.
- Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. 2002. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* 3(4):285-98.
- Casilli F, Di Rocco ZC, Gad S, Tournier I, Stoppa-Lyonnet D, Frebourg T, Tosi M. 2002. Rapid detection of novel BRCA1 rearrangements in high-risk breast-ovarian cancer families using multiplex PCR of short fluorescent fragments. *Hum Mutat* 20(3):218-26.
- Clevers H. 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127(3):469-80.
- Curia MC, Palmirotta R, Aceto G, Messerini L, Veri MC, Crognale S, Valanzano R, Ficari F, Fracasso P, Stigliano V and others. 1999. Unbalanced germ-line expression of hMLH1 and hMSH2 alleles in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 59(15):3570-5.
- Chan TL, Yuen ST, Kong CK, Chan YW, Chan AS, Ng WF, Tsui WY, Lo MW, Tam WY, Li VS and others. 2006. Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 38(10):1178-83.
- Charbonnier F, Baert-Desurmont S, Liang P, Di Fiore F, Martin C, Frerot S, Olschwang S, Wang Q, Buisine MP, Gilbert B and others. 2005. The 5' region of the MSH2 gene involved in hereditary non-polyposis colorectal cancer contains a high density of recombinogenic sequences. *Hum Mutat* 26(3):255-61.
- Charbonnier F, Olschwang S, Wang Q, Boisson C, Martin C, Buisine MP, Puisieux A, Frebourg T. 2002. MSH2 in contrast to MLH1 and MSH6 is frequently inactivated by exonic and promoter rearrangements in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 62(3):848-53.
- Charbonnier F, Raux G, Wang Q, Drouot N, Cordier F, Limacher JM, Saurin JC, Puisieux A, Olschwang S, Frebourg T. 2000. Detection of exon deletions and duplications of the mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal

- cancer families using multiplex polymerase chain reaction of short fluorescent fragments. *Cancer Res* 60(11):2760-3.
- Chen JM, Chuzhanova N, Stenson PD, Ferec C, Cooper DN. 2005. Intrachromosomal serial replication slippage in trans gives rise to diverse genomic rearrangements involving inversions. *Hum Mutat* 26(4):362-73.
- Chen X, Weaver J, Bove BA, Vanderveer LA, Weil SC, Miron A, Daly MB, Godwin AK. 2008. Allelic imbalance in BRCA1 and BRCA2 gene expression is associated with an increased breast cancer risk. *Hum Mol Genet* 17(9):1336-48.

D

- De Jong AE, Morreau H, Van Puijenbroek M, Eilers PH, Wijnen J, Nagengast FM, Griffioen G, Cats A, Menko FH, Kleibeuker JH and others. 2004. The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. *Gastroenterology* 126(1):42-8.
- De Rosa M, Scarano MI, Panariello L, Carlomagno N, Rossi GB, Tempesta A, Borgheresi P, Renda A, Izzo P. 1999. Three submicroscopic deletions at the APC locus and their rapid detection by quantitative-PCR analysis. *Eur J Hum Genet* 7(6):695-703.
- de Vos M, Hayward B, Bonthron DT, Sheridan E. 2005. Phenotype associated with recessively inherited mutations in DNA mismatch repair (MMR) genes. *Biochem Soc Trans* 33(Pt 4):718-20.
- Deka J, Herter P, Sprenger-Haussels M, Koosch S, Franz D, Muller KM, Kuhnen C, Hoffmann I, Muller O. 1999. The APC protein binds to A/T rich DNA sequences. *Oncogene* 18(41):5654-61.
- den Bakker MA, Seynaeve C, Kliffen M, Dinjens WN. 2003. Microsatellite instability in a pleomorphic rhabdomyosarcoma in a patient with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Histopathology* 43(3):297-9.
- Di Fiore F, Charbonnier F, Martin C, Frerot S, Olschwang S, Wang Q, Boisson C, Buisine MP, Nilbert M, Lindblom A and others. 2004. Screening for genomic rearrangements of the MMR genes must be included in the routine diagnosis of HNPCC. *J Med Genet* 41(1):18-20.
- Dihlmann S, Gebert J, Siermann A, Herfarth C, von Knebel Doeberitz M. 1999. Dominant negative effect of the APC1309 mutation: a possible explanation for genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 59(8):1857-60.
- Duval A, Raphael M, Brennetot C, Poirel H, Buhard O, Aubry A, Martin A, Krimi A, Leblond V, Gabarre J and others. 2004. The mutator pathway is a feature of immunodeficiency-related lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(14):5002-7.

E

- Easton DF, Eeles RA. 2008. Genome-wide association studies in cancer. *Hum Mol Genet* 17(R2):R109-15.

F

- Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. 2001. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 10(7):721-33.
- Fearon ER, Vogelstein B. 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61(5):759-67.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. 1994. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 77(1):167.
- Flintoff KJ, Sheridan E, Turner G, Chu CE, Taylor GR. 2001. Submicroscopic deletions of the APC gene: a frequent cause of familial adenomatous polyposis that may be overlooked by conventional mutation scanning. *J Med Genet* 38(2):129-32.
- Foulds L. 1957. Tumor progression. *Cancer Res* 17(5):355-6.
- Foulkes WD. 2008. Inherited susceptibility to common cancers. *N Engl J Med* 359(20):2143-53.
- Friedenreich CM, Brant RF, Riboli E. 1994. Influence of methodologic factors in a pooled analysis of 13 case-control studies of colorectal cancer and dietary fiber. *Epidemiology* 5(1):66-79.

G

- Galiatsatos P, Foulkes WD. 2006. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 101(2):385-98.
- Gamberi B, Gaidano G, Parsa N, Carbone A, Roncella S, Knowles DM, Louie DC, Shibata D, Chaganti RS, Dalla-Favera R. 1997. Microsatellite instability is rare in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 89(3):975-9.
- Gille JJ, Hogervorst FB, Pals G, Wijnen JT, van Schooten RJ, Dommering CJ, Meijer GA, Craanen ME, Nederlof PM, de Jong D and others. 2002. Genomic deletions of MSH2 and MLH1 in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. *Br J Cancer* 87(8):892-7.
- Giovannucci E. 2001. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10(7):725-31.
- Grabowski M, Mueller-Koch Y, Grasbon-Frodl E, Koehler U, Keller G, Vogelsang H, Dietmaier W, Kopp R, Siebers U, Schmitt W and others. 2005. Deletions account for 17% of pathogenic germline alterations in MLH1 and MSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) families. *Genet Test* 9(2):138-46.
- Gruber SB. 2006. New developments in Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) and mismatch repair gene testing. *Gastroenterology* 130(2):577-87.

H

- Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70.
- Heath JP. 1996. Epithelial cell migration in the intestine. *Cell Biol Int* 20(2):139-46.

- Hemminki K, Forsti A, Bermejo JL. 2008. The 'common disease-common variant' hypothesis and familial risks. *PLoS ONE* 3(6):e2504.
- Hemminki K, Forsti A, Lorenzo Bermejo J. 2009. Surveying the genomic landscape of colorectal cancer. *Am J Gastroenterol* 104(3):789-90.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW and others. 1998. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(12):6870-5.
- Hirano K, Yamashita K, Yamashita N, Nakatsumi Y, Esumi H, Kawashima A, Ohta T, Mai M, Minamoto T. 2002. Non-Hodgkin's lymphoma in a patient with probable hereditary nonpolyposis colon cancer: report of a case and review of the literature. *Dis Colon Rectum* 45(2):273-9.
- Hirata K, Kanemitsu S, Nakayama Y, Nagata N, Itoh H, Ohnishi H, Ishikawa H, Furukawa Y. 2006. A novel germline mutation of MSH2 in a hereditary nonpolyposis colorectal cancer patient with liposarcoma. *Am J Gastroenterol* 101(1):193-6.
- Hitchins MP, Ward RL. 2008. MLH1 germ-line epimutations: is there strong evidence of its inheritance? *Gastroenterology* 134(1):359-60.
- Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G, Suter CM, Martin DI, Hawkins NJ, Ward RL. 2007. Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N Engl J Med* 356(7):697-705.
- Houlston R, Crabtree M, Phillips R, Crabtree M, Tomlinson I. 2001. Explaining differences in the severity of familial adenomatous polyposis and the search for modifier genes. *Gut* 48(1):1-5.
- Howe GR, Benito E, Castelletto R, Cornee J, Esteve J, Gallagher RP, Iscovich JM, Deng-ao J, Kaaks R, Kune GA and others. 1992. Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *J Natl Cancer Inst* 84(24):1887-96.
- Hutter RV, Sobin LH. 1986. A universal staging system for cancer of the colon and rectum. Let there be light. *Arch Pathol Lab Med* 110(5):367-8.

I

- Imai K, Yamamoto H. 2008. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 29(4):673-80.
- Indraccolo S, Minuzzo S, Nicoletti L, Cretella E, Simon M, Papakonstantinou G, Hehlmann R, Mion M, Bertorelle R, Roganovic J and others. 1999. Mutator phenotype in human hematopoietic neoplasms and its association with deletions disabling DNA repair genes and bcl-2 rearrangements. *Blood* 94(7):2424-32.

J

- Jaeger E, Webb E, Howarth K, Carvajal-Carmona L, Rowan A, Broderick P, Walther A, Spain S, Pittman A, Kemp Z and others. 2008. Common genetic variants at the CRAC1 (HMPS) locus on chromosome 15q13.3 influence colorectal cancer risk. *Nat Genet* 40(1):26-8.

- Jaiswal AS, Narayan S. 2008. A novel function of adenomatous polyposis coli (APC) in regulating DNA repair. *Cancer Lett* 271(2):272-80.
- Jones PA, Baylin SB. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3(6):415-28.
- Jones S, Chen WD, Parmigiani G, Diehl F, Beerewinkel N, Antal T, Traulsen A, Nowak MA, Siegel C, Velculescu VE and others. 2008. Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(11):4283-8.

K

- Kanter-Smoler G, Fritzell K, Rohlin A, Engwall Y, Hallberg B, Bergman A, Mueller J, Gronberg H, Karlsson P, Bjork J and others. 2008. Clinical characterization and the mutation spectrum in Swedish adenomatous polyposis families. *BMC Med* 6:10.
- Kawasaki Y, Senda T, Ishidate T, Koyama R, Morishita T, Iwayama Y, Higuchi O, Akiyama T. 2000. Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science* 289(5482):1194-7.
- Khajavi M, Inoue K, Lupski JR. 2006. Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. *Eur J Hum Genet* 14(10):1074-81.
- Killian A, Di Fiore F, Le Pessot F, Blanchard F, Lamy A, Raux G, Flaman JM, Paillet B, Michel P, Sabourin JC and others. 2007. A simple method for the routine detection of somatic quantitative genetic alterations in colorectal cancer. *Gastroenterology* 132(2):645-53.
- Kim YI. 2000. AGA technical review: impact of dietary fiber on colon cancer occurrence. *Gastroenterology* 118(6):1235-57.
- Kinzler KW, Vogelstein B. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87(2):159-70.
- Kishida S, Yamamoto H, Ikeda S, Kishida M, Sakamoto I, Koyama S, Kikuchi A. 1998. Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem* 273(18):10823-6.
- Knight JC. 2004. Allele-specific gene expression uncovered. *Trends Genet* 20(3):113-6.
- Knudsen AL, Bisgaard ML, Bulow S. 2003. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer* 2(1):43-55.
- Knudson AG. 1993. Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(23):10914-21.
- Knudson AG, Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(4):820-3.
- Kotoula V, Hytiroglou P, Kaloutsi V, Barbanis S, Kouidou S, Papadimitriou CS. 2002. Mismatch repair gene expression in malignant lymphoproliferative disorders of B-cell origin. *Leuk Lymphoma* 43(2):393-9.
- Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z, Otto S, Olah E. 2009. Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 30(2):197-203.

L

- Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, Oddoux C, Ostrer H, Giardiello FM, Hamilton SR, Hampel H, Markowitz A, Klimstra D and others. 1997. Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet* 17(1):79-83.
- Lamlum H, Ilyas M, Rowan A, Clark S, Johnson V, Bell J, Frayling I, Efstathiou J, Pack K, Payne S and others. 1999. The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nat Med* 5(9):1071-5.
- Leppert M, Dobbs M, Scambler P, O'Connell P, Nakamura Y, Stauffer D, Woodward S, Burt R, Hughes J, Gardner E and others. 1987. The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science* 238(4832):1411-3.
- Li GM. 2008. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res* 18(1):85-98.
- Li L, McVety S, Younan R, Liang P, Du Sart D, Gordon PH, Hutter P, Hogervorst FB, Chong G, Foulkes WD. 2006. Distinct patterns of germ-line deletions in MLH1 and MSH2: the implication of Alu repetitive element in the genetic etiology of Lynch syndrome (HNPCC). *Hum Mutat* 27(4):388.
- Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, Lee TY, Bodmer D, Hoenselaar E, Hendriks-Cornelissen SJ and others. 2009. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 41(1):112-7.
- Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, Haile R, Casey G, Baron J, Gallinger S, Bapat B, Aronson M, Hopper J and others. 2005. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *Jama* 293(16):1979-85.
- Lipton L, Halford SE, Johnson V, Novelli MR, Jones A, Cummings C, Barclay E, Sieber O, Sadat A, Bisgaard ML and others. 2003. Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. *Cancer Res* 63(22):7595-9.
- Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomaki P and others. 1996. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 2(2):169-74.
- Lo HS, Wang Z, Hu Y, Yang HH, Gere S, Buetow KH, Lee MP. 2003. Allelic variation in gene expression is common in the human genome. *Genome Res* 13(8):1855-62.
- Loeb KR, Loeb LA. 2000. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis* 21(3):379-85.
- Lowsky R, DeCoteau JF, Reitmair AH, Ichinohasama R, Dong WF, Xu Y, Mak TW, Kadin ME, Minden MD. 1997. Defects of the mismatch repair gene MSH2 are implicated in the development of murine and human lymphoblastic lymphomas and are associated with the aberrant expression of rhombotin-2 (Lmo-2) and Tal-1 (SCL). *Blood* 89(7):2276-82.
- Lynch HT, de la Chapelle A. 2003a. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348(10):919-32.
- Lynch HT, de la Chapelle A. 2003b. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348(10):919-32.
- Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM, Attard T. 2008. Hereditary colorectal cancer syndromes: molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. *Fam Cancer* 7(1):27-39.

M

- Matsumine A, Ogai A, Senda T, Okumura N, Satoh K, Baeg GH, Kawahara T, Kobayashi S, Okada M, Toyoshima K and others. 1996. Binding of APC to the human homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Science* 272(5264):1020-3.
- Mauillon JL, Michel P, Limacher JM, Latouche JB, Dechelotte P, Charbonnier F, Martin C, Moreau V, Metayer J, Paillot B and others. 1996. Identification of novel germline hMLH1 mutations including a 22 kb Alu-mediated deletion in patients with familial colorectal cancer. *Cancer Res* 56(24):5728-33.
- McCann J, Ames BN. 1976. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73(3):950-4.
- McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN. 1975. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72(12):5135-9.
- Meuller J, Kanter-Smoler G, Nygren AO, Errami A, Gronberg H, Holmberg E, Bjork J, Wahlstrom J, Nordling M. 2004. Identification of genomic deletions of the APC gene in familial adenomatous polyposis by two independent quantitative techniques. *Genet Test* 8(3):248-56.
- Mihalatos M, Apeessos A, Dauwerse H, Velissariou V, Psychias A, Koliopanos A, Petropoulos K, Triantafillidis JK, Danielidis I, Fountzilas G and others. 2005. Rare mutations predisposing to familial adenomatous polyposis in Greek FAP patients. *BMC Cancer* 5(1):40.
- Milani L, Gupta M, Andersen M, Dhar S, Fryknas M, Isaksson A, Larsson R, Syvanen AC. 2007. Allelic imbalance in gene expression as a guide to cis-acting regulatory single nucleotide polymorphisms in cancer cells. *Nucleic Acids Res* 35(5):e34.
- Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. 1992. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1(4):229-33.
- Montera M, Piaggio F, Marchese C, Gismondi V, Stella A, Resta N, Varesco L, Guanti G, Mareni C. 2001. A silent mutation in exon 14 of the APC gene is associated with exon skipping in a FAP family. *J Med Genet* 38(12):863-7.
- Morak M, Schackert HK, Rahner N, Betz B, Ebert M, Walldorf C, Royer-Pokora B, Schulmann K, von Knebel-Doerberitz M, Dietmaier W and others. 2008. Further evidence for heritability of an epimutation in one of 12 cases with MLH1 promoter methylation in blood cells clinically displaying HNPCC. *Eur J Hum Genet* 16(7):804-11.
- Munemitsu S, Souza B, Muller O, Albert I, Rubinfeld B, Polakis P. 1994. The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. *Cancer Res* 54(14):3676-81.

N

- Nagase H, Miyoshi Y, Horii A, Aoki T, Ogawa M, Utsunomiya J, Baba S, Sasazuki T, Nakamura Y. 1992. Correlation between the location of germ-line mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 52(14):4055-7.

- Nagy M, Balazs M, Adam Z, Petko Z, Timar B, Szereday Z, Laszlo T, Warnke RA, Matolcsy A. 2000. Genetic instability is associated with histological transformation of follicle center lymphoma. *Leukemia* 14(12):2142-8.
- Nakagawa H, Hampel H, de la Chapelle A. 2003. Identification and characterization of genomic rearrangements of MSH2 and MLH1 in Lynch syndrome (HNPCC) by novel techniques. *Hum Mutat* 22(3):258.
- Nathke IS. 2004. The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:337-66.
- Nielsen M, Bik E, Hes FJ, Breuning MH, Vasen HF, Bakker E, Tops CM, Weiss MM. 2007a. Genotype-phenotype correlations in 19 Dutch cases with APC gene deletions and a literature review. *Eur J Hum Genet* 15(10):1034-42.
- Nielsen M, Hes FJ, Nagengast FM, Weiss MM, Mathus-Vliegen EM, Morreau H, Breuning MH, Wijnen JT, Tops CM, Vasen HF. 2007b. Germline mutations in APC and MUTYH are responsible for the majority of families with attenuated familial adenomatous polyposis. *Clin Genet* 71(5):427-33.
- Nieuwenhuis MH, Vasen HF. 2007. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol* 61(2):153-61.
- Norat T, Lukanova A, Ferrari P, Riboli E. 2002. Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer* 98(2):241-56.
- Nowell PC. 2002. Tumor progression: a brief historical perspective. *Semin Cancer Biol* 12(4):261-6.

P

- Pagenstecher C, Gadzicki D, Stienen D, Uhlhaas S, Mangold E, Rahner N, Arslan-Kirchner M, Propping P, Friedl W, Aretz S. 2007. A complex rearrangement in the APC gene uncovered by multiplex ligation-dependent probe amplification. *J Mol Diagn* 9(1):122-6.
- Papaemmanuil E, Carvajal-Carmona L, Sellick GS, Kemp Z, Webb E, Spain S, Sullivan K, Barclay E, Lubbe S, Jaeger E and others. 2008. Deciphering the genetics of hereditary non-syndromic colorectal cancer. *Eur J Hum Genet* 16(12):1477-86.
- Perrin-Vidoz L, Sinilnikova OM, Stoppa-Lyonnet D, Lenoir GM, Mazoyer S. 2002. The nonsense-mediated mRNA decay pathway triggers degradation of most BRCA1 mRNAs bearing premature termination codons. *Hum Mol Genet* 11(23):2805-14.
- Plasilova M, Zhang J, Okhowat R, Marra G, Mettler M, Mueller H, Heinimann K. 2006. A de novo MLH1 germ line mutation in a 31-year-old colorectal cancer patient. *Genes Chromosomes Cancer* 45(12):1106-10.
- Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. 1993. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 329(27):1982-7.
- Preston SL, Wong WM, Chan AO, Poulson R, Jeffery R, Goodlad RA, Mandir N, Elia G, Novelli M, Bodmer WF and others. 2003. Bottom-up histogenesis of colorectal adenomas: origin in the monocryptal adenoma and initial expansion by crypt fission. *Cancer Res* 63(13):3819-25.
- Pros E, Larriba S, Lopez E, Ravella A, Gili ML, Kruyer H, Valls J, Serra E, Lazaro C. 2006. NF1 mutation rather than individual genetic variability is the main determinant of the NF1-transcriptional profile of mutations affecting splicing. *Hum Mutat* 27(11):1104-14.

Q

Qian J, Sarnaik AA, Bonney TM, Keirse J, Combs KA, Steigerwald K, Acharya S, Behbehani GK, Barton MC, Lowy AM and others. 2008. The APC tumor suppressor inhibits DNA replication by directly binding to DNA via its carboxyl terminus. *Gastroenterology* 135(1):152-62.

R

Radtke F, Clevers H. 2005. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science* 307(5717):1904-9.

Renkonen E, Zhang Y, Lohi H, Salovaara R, Abdel-Rahman WM, Nilbert M, Aittomaki K, Jarvinen HJ, Mecklin JP, Lindblom A and others. 2003. Altered expression of MLH1, MSH2, and MSH6 in predisposition to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 21(19):3629-37.

Renkonen ET, Nieminen P, Abdel-Rahman WM, Moisio AL, Jarvela I, Arte S, Jarvinen HJ, Peltomaki P. 2005. Adenomatous polyposis families that screen APC mutation-negative by conventional methods are genetically heterogeneous. *J Clin Oncol* 23(24):5651-9.

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L and others. 1997. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 89(23):1758-62.

Romero-Gimenez J, Dopeso H, Blanco I, Guerra-Moreno A, Gonzalez S, Vogt S, Aretz S, Schwartz S, Jr., Capella G, Arango D. 2008. Germline hypermethylation of the APC promoter is not a frequent cause of familial adenomatous polyposis in APC/MUTYH mutation negative families. *Int J Cancer* 122(6):1422-5.

Rosin-Arbesfeld R, Cliffe A, Brabletz T, Bienz M. 2003. Nuclear export of the APC tumour suppressor controls beta-catenin function in transcription. *Embo J* 22(5):1101-13.

Rosty C, Briere J, Cellier C, Delabesse E, Carnot F, Barbier JP, Laurent-Puig P. 2000. Association of a duodenal follicular lymphoma and hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Mod Pathol* 13(5):586-90.

Rowan AJ, Lamlum H, Ilyas M, Wheeler J, Straub J, Papadopoulou A, Bicknell D, Bodmer WF, Tomlinson IP. 2000. APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7):3352-7.

Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Munemitsu S, Polakis P. 1995. The APC protein and E-cadherin form similar but independent complexes with alpha-catenin, beta-catenin, and plakoglobin. *J Biol Chem* 270(10):5549-55.

Rustgi AK. 1994. Hereditary gastrointestinal polyposis and nonpolyposis syndromes. *N Engl J Med* 331(25):1694-702.

S

- Sancho E, Batlle E, Clevers H. 2004. Signaling pathways in intestinal development and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:695-723.
- Santarosa M, Ashworth A. 2004. Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way. *Biochim Biophys Acta* 1654(2):105-22.
- Scott RH, Homfray T, Huxter NL, Mitton SG, Nash R, Potter MN, Lancaster D, Rahman N. 2007. Familial T-cell non-Hodgkin lymphoma caused by biallelic MSH2 mutations. *J Med Genet* 44(7):e83.
- Schneikert J, Behrens J. 2007. The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development. *Gut* 56(3):417-25.
- Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. 2002. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30(12):e57.
- Seeling JM, Miller JR, Gil R, Moon RT, White R, Virshup DM. 1999. Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science* 283(5410):2089-91.
- Senda T, Iizuka-Kogo A, Onouchi T, Shimomura A. 2007. Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia. *Med Mol Morphol* 40(2):68-81.
- Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, Hampel H, Green J, Potter JD, Lindblom A, Lagerstedt K, Thibodeau SN, Lindor NM and others. 2008. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology* 135(2):419-28.
- Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, Hernandez NS, Chen X, Ahmed S, Konishi K and others. 2007. Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(47):18654-9.
- Shia J. 2008. 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* 10(4):293-300.
- Shih IM, Wang TL, Traverso G, Romans K, Hamilton SR, Ben-Sasson S, Kinzler KW, Vogelstein B. 2001. Top-down morphogenesis of colorectal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5):2640-5.
- Sieber OM, Lamlum H, Crabtree MD, Rowan AJ, Barclay E, Lipton L, Hodgson S, Thomas HJ, Neale K, Phillips RK and others. 2002a. Whole-gene APC deletions cause classical familial adenomatous polyposis, but not attenuated polyposis or "multiple" colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5):2954-8.
- Sieber OM, Lamlum H, Crabtree MD, Rowan AJ, Barclay E, Lipton L, Hodgson S, Thomas HJ, Neale K, Phillips RK and others. 2002b. Whole-gene APC deletions cause classical familial adenomatous polyposis, but not attenuated polyposis or "multiple" colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(5):2954-8.
- Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinemann K, Fidalgo P, Phillips RK, Bisgaard ML, Orntoft TF, Aaltonen LA, Hodgson SV and others. 2003. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* 348(9):791-9.
- Sieber OM, Segditsas S, Knudsen AL, Zhang J, Luz J, Rowan AJ, Spain SL, Thirlwell C, Howarth KM, Jaeger EE and others. 2006. Disease severity and genetic pathways in attenuated familial adenomatous polyposis vary greatly but depend on the site of the germline mutation. *Gut* 55(10):1440-1448.

- Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, Barber TD, Mandelker D, Leary RJ, Ptak J, Silliman N and others. 2006. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. *Science* 314(5797):268-74.
- Soravia C, Berk T, Madlensky L, Mitri A, Cheng H, Gallinger S, Cohen Z, Bapat B. 1998. Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet* 62(6):1290-301.
- Soravia C, van der Klift H, Brundler MA, Blouin JL, Wijnen J, Hutter P, Fodde R, Delozier-Blanchet C. 2003. Prostate cancer is part of the hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) tumor spectrum. *Am J Med Genet A* 121A(2):159-62.
- Spirio L, Olschwang S, Groden J, Robertson M, Samowitz W, Joslyn G, Gelbert L, Thliveris A, Carlson M, Otterud B and others. 1993. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 75(5):951-7.
- Starostik P, Greiner A, Schwarz S, Patzner J, Schultz A, Muller-Hermelink HK. 2000. The role of microsatellite instability in gastric low- and high-grade lymphoma development. *Am J Pathol* 157(4):1129-36.
- Stekrova J, Sulova M, Kebrdlova V, Zidkova K, Kotlas J, Ilencikova D, Vesela K, Kohoutova M. 2007. Novel APC mutations in Czech and Slovak FAP families: clinical and genetic aspects. *BMC Med Genet* 8:16.
- Su LK, Burrell M, Hill DE, Gyuris J, Brent R, Wiltshire R, Trent J, Vogelstein B, Kinzler KW. 1995. APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res* 55(14):2972-7.
- Su LK, Kohlmann W, Ward PA, Lynch PM. 2002. Different familial adenomatous polyposis phenotypes resulting from deletions of the entire APC exon 15. *Hum Genet* 111(1):88-95.
- Su LK, Steinbach G, Sawyer JC, Hindi M, Ward PA, Lynch PM. 2000. Genomic rearrangements of the APC tumor-suppressor gene in familial adenomatous polyposis. *Hum Genet* 106(1):101-7.
- Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. 1993. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262(5140):1734-7.

T

- Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, Ohi M, Nojiri S, Sakamaki S, Kato J, Kogawa K, Miyake H, Niitsu Y. 1998. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med* 339(18):1277-84.
- Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, Sato Y, Niitsu Y. 2006. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol* 41(3):185-92.
- Taylor CF, Charlton RS, Burn J, Sheridan E, Taylor GR. 2003. Genomic deletions in MSH2 or MLH1 are a frequent cause of hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of novel and recurrent deletions by MLPA. *Hum Mutat* 22(6):428-33.
- Tenesa A, Farrington SM, Prendergast JG, Porteous ME, Walker M, Haq N, Barnetson RA, Theodoratou E, Cetnarskyj R, Cartwright N and others. 2008. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21. *Nat Genet* 40(5):631-7.
- Tomlinson I, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Kemp Z, Spain S, Penegar S, Chandler I, Gorman M, Wood W and others. 2007. A genome-wide association scan of tag SNPs identifies a susceptibility variant for colorectal cancer at 8q24.21. *Nat Genet* 39(8):984-8.
- Tomlinson IP, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Howarth K, Pittman AM, Spain S, Lubbe S, Walther A, Sullivan K and others. 2008. A genome-wide

- association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3. *Nat Genet* 40(5):623-30.
- Tournier I, Paillerets BB, Sobol H, Stoppa-Lyonnet D, Lidereau R, Barrois M, Mazoyer S, Coulet F, Hardouin A, Chompret A and others. 2004a. Significant contribution of germline BRCA2 rearrangements in male breast cancer families. *Cancer Res* 64(22):8143-7.
- Tournier I, Raux G, Di Fiore F, Marechal I, Leclerc C, Martin C, Wang Q, Buisine MP, Stoppa-Lyonnet D, Olschwang S and others. 2004b. Analysis of the allele-specific expression of the mismatch repair gene MLH1 using a simple DHPLC-Based Method. *Hum Mutat* 23(4):379-84.
- Trock B, Lanza E, Greenwald P. 1990. Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. *J Natl Cancer Inst* 82(8):650-61.

U

- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R and others. 2004. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 96(4):261-8.

V

- Valle L, Serena-Acedo T, Liyanarachchi S, Hampel H, Comeras I, Li Z, Zeng Q, Zhang HT, Pennison MJ, Sadim M and others. 2008. Germline allele-specific expression of TGFBR1 confers an increased risk of colorectal cancer. *Science* 321(5894):1361-5.
- van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP and others. 2002. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111(2):241-50.
- van der Klift H, Wijnen J, Wagner A, Verkuilen P, Tops C, Otway R, Kohonen-Corish M, Vasen H, Oliani C, Barana D and others. 2005. Molecular characterization of the spectrum of genomic deletions in the mismatch repair genes MSH2, MLH1, MSH6, and PMS2 responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Genes Chromosomes Cancer* 44(2):123-38.
- van der Luijt RB, Khan PM, Vasen HF, Tops CM, van Leeuwen-Cornelisse IS, Wijnen JT, van der Klift HM, Plug RJ, Griffioen G, Fodde R. 1997. Molecular analysis of the APC gene in 105 Dutch kindreds with familial adenomatous polyposis: 67 germline mutations identified by DGGE, PTT, and southern analysis. *Hum Mutat* 9(1):7-16.
- Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. 1991. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 34(5):424-5.
- Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Aretz S, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, Bulow S, Burn J, Capella G and others. 2008. Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP). *Gut* 57(5):704-13.

- Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, Burn J, Capella G, Engel C, Frayling I and others. 2007. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet* 44(6):353-62.
- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. 1999. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116(6):1453-6.
- Venesio T, Balsamo A, Rondo-Spaudo M, Varesco L, Risio M, Ranzani GN. 2003. APC haploinsufficiency, but not CTNNB1 or CDH1 gene mutations, accounts for a fraction of familial adenomatous polyposis patients without APC truncating mutations. *Lab Invest* 83(12):1859-66.
- Viel A, Petronzelli F, Della Puppa L, Lucci-Cordisco E, Fornasarig M, Pucciarelli S, Rovella V, Quايا M, Ponz de Leon M, Boiocchi M and others. 2002. Different molecular mechanisms underlie genomic deletions in the MLH1 Gene. *Hum Mutat* 20(5):368-74.
- Vogelstein B, Kinzler KW. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 10(8):789-99.

W

- Wang Y, Friedl W, Lamberti C, Jungck M, Mathiak M, Pagenstecher C, Propping P, Mangold E. 2003. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes. *Int J Cancer* 103(5):636-41.
- Wehner M, Mangold E, Sengteller M, Friedrichs N, Aretz S, Friedl W, Propping P, Pagenstecher C. 2005. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: pitfalls in deletion screening in MSH2 and MLH1 genes. *Eur J Hum Genet* 13(8):983-6.
- Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D and others. 2006. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 38(7):787-93.
- Westenend PJ, Schutte R, Hoogmans MM, Wagner A, Dinjens WN. 2005. Breast cancer in an MSH2 gene mutation carrier. *Hum Pathol* 36(12):1322-6.
- Wijnen J, van der Klift H, Vasen H, Khan PM, Menko F, Tops C, Meijers Heijboer H, Lindhout D, Moller P, Fodde R. 1998. MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC. *Nat Genet* 20(4):326-8.
- Wijnen JT, Brohet RM, van Eijk R, Jagmohan-Changur S, Middeldorp A, Tops CM, van Puijenbroek M, Ausems MG, Gomez Garcia E, Hes FJ and others. 2009. Chromosome 8q23.3 and 11q23.1 variants modify colorectal cancer risk in Lynch syndrome. *Gastroenterology* 136(1):131-7.
- Wimmer K, Etzler J. 2008. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg? *Hum Genet* 124(2):105-22.
- Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, Ganiats T, Levin T, Woolf S, Johnson D and others. 2003. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 124(2):544-60.
- Winawer SJ, Fletcher RH, Miller L, Godlee F, Stolar MH, Mulrow CD, Woolf SH, Glick SN, Ganiats TG, Bond JH and others. 1997. Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 112(2):594-642.

Y

- Yan H, Dobbie Z, Gruber SB, Markowitz S, Romans K, Giardiello FM, Kinzler KW, Vogelstein B. 2002a. Small changes in expression affect predisposition to tumorigenesis. *Nat Genet* 30(1):25-6.
- Yan H, Yuan W, Velculescu VE, Vogelstein B, Kinzler KW. 2002b. Allelic variation in human gene expression. *Science* 297(5584):1143.

Z

- Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, Kustra R, Tenesa A, Farrington SM, Prendergast J, Olschwang S, Chiang T, Crowdy E and others. 2007. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24. *Nat Genet* 39(8):989-94.
- Zhang F, White RL, Neufeld KL. 2000. Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(23):12577-82.
- Zhang J, Lindroos A, Ollila S, Russell A, Marra G, Mueller H, Peltomaki P, Plasilova M, Heinimann K. 2006. Gene conversion is a frequent mechanism of inactivation of the wild-type allele in cancers from MLH1/MSH2 deletion carriers. *Cancer Res* 66(2):659-64.
- Zhang Y, Wang D, Johnson AD, Papp AC, Sadee W. 2005. Allelic expression imbalance of human mu opioid receptor (OPRM1) caused by variant A118G. *J Biol Chem* 280(38):32618-24.
- Zhu M, Li J, Zhang X, Liu X, Friedl W, Zhang Y, Wu X, Propping P, Wang Y. 2005. Large genomic aberrations in MSH2 and MLH1 genes are frequent in Chinese colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet* 160(1):61-7.