



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Caracterización molecular y búsqueda de causas genéticas del cáncer colorrectal hereditario no polipósico

Fernando Bellido Molías



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – Compartir Igual 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – Compartir Igual 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0. Spain License.**



# **CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y BÚSQUEDA DE CAUSAS GENÉTICAS DEL CÁNCER COLORRECTAL HEREDITARIO NO POLIPÓSIKO**

Memoria presentada por  
**Fernando Bellido Molías**

Para optar al grado de  
**Doctor por la Universidad de Barcelona**

Tesis realizada bajo la dirección de la  
**Dra. Laura Valle Velasco**  
en el Instituto Catalán de Oncología del  
Instituto de Investigación Biomédica de Bellvitge  
**(ICO-IDIBELL)**

Tesis adscrita a la Facultad de Biología, Universidad de Barcelona (UB)  
Programa de Doctorado en Genética  
Tutor: **Daniel Raúl Grinberg Vaisman**

**Laura Valle Velasco    Daniel Raúl Grinberg Vaisman    Fernando Bellido Molías**

**Barcelona, 2015**



# ÍNDICE

---



<b>ABREVIATURAS</b>	<b>xi</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>1. El concepto del cáncer</b>	<b>3</b>
a. Definición y generalidades de cáncer.	3
b. El proceso de transformación tumoral	3
c. Fisiología y diversidad celular en el tumor.	4
d. Los cambios genéticos en la transición tumoral.	5
<b>2. Colon y recto:</b>	<b>8</b>
a. Concepto. Estructura y función.	8
b. Regulación molecular.	10
<b>3. El cáncer colorrectal</b>	<b>11</b>
a. Definición y epidemiología	11
b. Mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis colorrectal.	12
I. La inestabilidad cromosómica	13
II. La inestabilidad de microsatélites	15
III. El fenotipo metilador de islas CpG	15
c. Clasificación por estadios del CCR	16
d. Detección y tratamiento	17
<b>4. Factores de predisposición al cáncer colorrectal.</b>	<b>19</b>
a. Factores ambientales	19
b. Factores genéticos	19
I. Mutaciones de alta penetrancia.	20
II. Mutaciones y genes que confieren un riesgo moderado	22
III. Variantes que incrementan levemente el riesgo al CCR.	22
c. Herencia y agregación familiar en el CCR	24
<b>5. Síndromes del CCR hereditario polipósico</b>	<b>26</b>
a. Poliposis adenomatosa familiar causada por mutaciones en <i>APC</i> :	26
b. Poliposis asociada a <i>MUTYH</i>	26

c.	Síndrome asociado a la actividad reparadora de la polimerasa	28
d.	Poliposis hereditaria mixta.	29
e.	Poliposis hamartomatosas:	29
<b>6.</b>	<b>Síndromes de CCR hereditario no polipósico I: El síndrome de Lynch.</b>	<b>31</b>
a.	Características clínicas del SL	31
b.	Causas genéticas del Síndrome de Lynch:	32
c.	Criterios de selección y cribado molecular en el diagnóstico del SL	33
d.	Vigilancia y profilaxis en el SL:	35
e.	Modificadores de riesgo en el SL	36
I.	Eliminación de xenobióticos y metabolismo de micronutrientes:	36
II.	Control del ciclo celular:	36
III.	Reparación del ADN:	37
IV.	Función inmunológica	37
V.	Factores de crecimiento	37
VI.	Potenciales modificadores de riesgo en otros genes	37
VII.	Potenciales modificadores de riesgo procedentes de estudios de asociación.	37
<b>7.</b>	<b>Síndromes de CCR hereditario no polipósico II: El CCR familiar de tipo X.</b>	<b>39</b>
a.	Características clínicas del CCRFX	39
b.	Características moleculares del CCRFX	41
I.	Estudio de la IC y regiones implicadas	41
II.	Estudio del patrón mutacional en genes de interés:	42
III.	Estudio del patrón de metilación: Islas CpG y secuencias LINE.	44
c.	Comparativa molecular del cáncer CCRFX frente al CCR esporádico.	45
d.	Estado actual del conocimiento de las causas genéticas del CCRTX	45
I.	La secuenciación del exoma o del genoma completo:	46
II.	El estudio de genes candidatos:	46
e.	Vigilancia y profilaxis en el CCRFX:	47
<b>8.</b>	<b>Técnicas de identificación de genes causales en enfermedades mendelianas</b>	<b>48</b>
a.	Mapeo genético	48
I.	Mapeo genético por análisis de ligamiento	49
II.	Mapeo genético por cariotipado	49

III. Mapeo genético por variantes en el número de copia	49
IV. Mapeo genético por homocigosidad	49
b. Estudio de genes candidatos.	50
c. Secuenciación de exomas y genomas completos	51
<b>9. Telómeros, telomerasa y cáncer</b>	<b>58</b>
a. Longitud telomérica y telómeros en cáncer	58
b. La longitud telomérica y el riesgo de cáncer	59
c. La telomerasa y el riesgo a CCR.	59
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>63</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>67</b>
<b>RESULTADOS</b>	<b>71</b>
ARTÍCULO 1: “Una variante genética en el gen de la telomerasa modifica el riesgo de cáncer en el síndrome de Lynch	75
ARTÍCULO 2: “Caracterización molecular global de los tumores de cáncer colorrectal hereditario no polipósico sin fallos en el sistema reparador de bases desapareadas	83
ARTÍCULO 3: “Mutaciones en <i>POLE</i> y <i>POLD1</i> en 529 sujetos con cáncer colorrectal y/o poliposis, revisión de los casos identificados y recomendaciones para el análisis genético y el seguimiento clínico.”	101
ARTÍCULO 4: “Identificación mediante secuenciación exómica de mutaciones germinales en <i>BRF1</i> y <i>BARD1</i> como causas probables de cáncer colorrectal hereditario no polipósico”	129
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>165</b>
<b>A. MODIFICACION DEL RIESGO AL CANCER EN EL SÍNDROME DE LYNCH POR UNA VARIANTE EN EL GEN DE LA TELOMERASA</b>	<b>167</b>
A.1. La motivación y el enfoque del estudio	167
A.2. El estudio inicial	168
A.3. Estudio de validación en una serie independiente	169
A.4. El efecto del genotipo AA en <i>hTERT</i> rs2075786 en el CCR esporádico	170
A.5. Posibles mecanismos causales del incremento de riesgo asociado a <i>hTERT</i> rs2075786	170
A.6. Otras consideraciones	173
<b>B. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS TUMORES DESARROLLADOS EN EL CONTEXTO DEL CANCER COLORRECTAL FAMILIAR DE TIPO X.</b>	<b>175</b>
B.1. Contextualización y planteamiento del estudio	175



B.2. El análisis de número de copia	175
B.3. El patrón mutacional en <i>KRAS</i> , <i>BRAF</i> , <i>PI3KCA</i> y <i>TP53</i>	178
B.4. El fenotipo metilador de islas CpG	181
B.5. El perfil molecular de los tumores CCRFX	183
<b>C. EVALUACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DEL SÍNDROME DE CCR Y POLIPOSIS ASOCIADO A LA ACTIVIDAD REPARADORA DE LA POLIMERASA</b>	<b>185</b>
C.1. Contextualización y planteamiento del estudio	185
C.2. Variantes identificadas en <i>POLE</i> y <i>POLD1</i> y características fenotípicas de los portadores	187
C.3. Características fenotípicas del SAARP	187
C.4. Características moleculares de los tumores desarrollados en el contexto del SAARP	191
C.5. Recomendaciones para la selección de familias candidatas a estudio de <i>POLE</i> y <i>POLD1</i> y para el seguimiento en portadores	193
<b>D. BÚSQUEDA DE GENES CAUSALES DEL CCRFX MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE EXOMAS</b>	<b>195</b>
D.1. Selección de la familia y planteamiento del estudio	195
D.2. Selección de variantes candidatas	196
D.3. <i>BRF1</i>	197
D.4. <i>BARD1</i>	200
D.5. <i>CLCA1</i>	201
D.6. Mutaciones somáticas en <i>BRF1</i> , <i>BARD1</i> y <i>CLCA1</i> en cáncer	202
D.7. Otras variantes identificadas	202
D.8. La predisposición al CCR en la familia secuenciada	203
D.9. La susceptibilidad al CCR en el CCRFX	205
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>209</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>215</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>261</b>
<b>ANEXO I: OTRAS PUBLICACIONES</b>	<b>263</b>
<i>Telomere length and genetic anticipation in Lynch syndrome</i>	265
<i>Longer Telomeres Are Associated with Cancer Risk in MMR-Proficient Hereditary non-Polyposis colorectal Cancer</i>	277
<i>New insights into POLE and POLD1 germline mutations in familial colorectal cancer and polyposis</i>	283
<i>Exome sequencing identifies MUTYH mutations in a family with an atypical phenotype</i>	293
<b>ANEXO II: INFORMES DEL DIRECTOR</b>	<b>305</b>





# ABREVIATURAS

---



---

ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
ALT	<i>Alternative lengthening of telomeres</i> ; alargamiento alternativo de los telómeros
AR	ácido retinoico
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
ARNr	ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	ácido ribonucleico de transferencia
CCHNP	cáncer colorrectal hereditario no polipósico
CCR	cáncer colorrectal
CCRFX	cáncer colorrectal familiar de tipo X
cgLOH	<i>copy gain loss of heterozygosity</i> ; pérdida de heterocigosidad con incremento en el número de copia
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i> ; fenotipo metilador de islas CpG
cnLOH	<i>copy neutral loss of heterozygosity</i> ; pérdida de heterocigosidad sin cambios en el número de copia
CpG	dinucleótido citosina-guanina
dbSNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i>
EMS	estabilidad de microsatélites
ERAR	elementos de respuesta al ácido retinoico
ESP	<i>Exome Sequencing Project</i>
GWAS	<i>genome-wide association study</i> ; estudio de asociación de genoma completo
IC	inestabilidad cromosómica
IHQ	inmunohistoquímica
IMS	inestabilidad de microsatélites
LINE-1	<i>long interspersed nucleotide element-1</i> , elementos nucleares dispersos largos-1
LOH	<i>loss of heterozygosity</i> ; pérdida de heterocigosidad
MAF	<i>Minor allele frequency</i> ; frecuencia alélica menor
MMR	<i>mismatch repair</i> ; reparación de bases desapareadas
NGS	<i>next-generation sequencing</i> ; secuenciación de siguiente generación (secuenciación masiva en paralelo)
OR	<i>odds ratio</i> , razón de oportunidades
PAF	poliposis adenomatosa familiar
PAM	poliposis asociada a <i>MUTYH</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; reacción en cadena de la polimerasa
RAR	receptor de ácido retinoico
RR	riesgo relativo
RXRA	receptor X retinoide alfa

## ABREVIATURAS

---

SAARP	síndrome asociado a la actividad reparadora de la polimerasa
SL	síndrome de Lynch
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , polimorfismo de nucleótido único
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i> , El Atlas del Genoma del Cáncer

### **Genes**                      **Nomenclatura oficial completa en inglés**

<i>ADAMTS4</i>	<i>ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 4</i>
<i>AKR1C4</i>	<i>aldo-keto reductase family 1, member C4</i>
<i>AKT1</i>	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
<i>APC</i>	<i>adenomatous polyposis coli</i>
<i>ARHGAP12</i>	<i>Rho GTPase activating protein 12</i>
<i>ATM</i>	<i>ATM serine/threonine kinase</i>
<i>AURKA</i>	<i>aurora kinase A</i>
<i>AXIN1</i>	<i>axin 1</i>
<i>AXIN2</i>	<i>axin 2</i>
<i>BARD1</i>	<i>BRCA1 associated RING domain 1</i>
<i>BAX</i>	<i>BCL2-associated X protein</i>
<i>BCL-10</i>	<i>B-cell CLL/lymphoma 10</i>
<i>BMP4</i>	<i>bone morphogenetic protein 4</i>
<i>BMPR1A</i>	<i>bone morphogenetic protein receptor, type IA</i>
<i>BRAF</i>	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
<i>BRCA2</i>	<i>breast cancer 2, early onset</i>
<i>BRF1</i>	<i>BRF1, RNA polymerase III transcription initiation factor 90 kDa subunit</i>
<i>BUB1</i>	<i>BUB1 mitotic checkpoint serine/threonine kinase</i>
<i>BUB3</i>	<i>BUB3 mitotic checkpoint protein</i>
<i>CABLES1</i>	<i>Cdk5 and Abl enzyme substrate 1</i>
<i>CACNA1G</i>	<i>calcium channel, voltage-dependent, T type, alpha 1G subunit</i>
<i>CCDC18</i>	<i>coiled-coil domain containing 18</i>
<i>CCND1</i>	<i>cyclin D1</i>
<i>CDKN1B</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
<i>CDKN2A</i>	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>
<i>CENPE</i>	<i>centromere protein E, 312kDa</i>
<i>CHEK2</i>	<i>checkpoint kinase 2</i>
<i>CLCA1</i>	<i>chloride channel accessory 1</i>
<i>CRABP1</i>	<i>cellular retinoic acid binding protein 1</i>
<i>CYP1A1</i>	<i>cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1</i>
<i>CYTL1</i>	<i>cytokine-like 1</i>

---

<i>DCC</i>	<i>DCC netrin 1 receptor</i>
<i>DNMT3B</i>	<i>DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 beta</i>
<i>DONSON</i>	<i>downstream neighbor of SON</i>
<i>ENG</i>	<i>endoglin</i>
<i>EPCAM</i>	<i>epithelial cell adhesion molecule</i>
<i>EPHB2</i>	<i>EPH receptor B2</i>
<i>EPHX1</i>	<i>epoxide hydrolase 1, microsomal (xenobiotic)</i>
<i>FANCM</i>	<i>Fanconi anemia, complementation group M</i>
<i>FOCAD</i>	<i>focadhesin</i>
<i>GALNT12</i>	<i>polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12</i>
<i>GAST</i>	<i>gastrin</i>
<i>GNAS</i>	<i>GNAS complex locus</i>
<i>GREM1</i>	<i>gremlin 1, DAN family BMP antagonist</i>
<i>HFE</i>	<i>hemochromatosis</i>
<i>IGF-1</i>	<i>insulin-like growth factor 1</i>
<i>IGF2</i>	<i>insulin-like growth factor 2</i>
<i>KIF23</i>	<i>kinesin family member 23</i>
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog</i>
<i>LAMB4</i>	<i>laminin, beta 4</i>
<i>LAMC3</i>	<i>laminin, gamma 3</i>
<i>LIG4</i>	<i>ligase IV, DNA, ATP-dependent</i>
<i>MCC</i>	<i>mutated in colorectal cancers</i>
<i>MCTP2</i>	<i>multiple C2 domains, transmembrane 2</i>
<i>MIR578</i>	<i>microRNA 578</i>
<i>MLH1</i>	<i>mutL homolog 1</i>
<i>MRPL3</i>	<i>mitochondrial ribosomal protein L3</i>
<i>MSH2</i>	<i>mutS homolog 2</i>
<i>MSH3</i>	<i>mutS homolog 3</i>
<i>MSH6</i>	<i>mutS homolog 6</i>
<i>MTHFR</i>	<i>methylenetetrahydrofolate reductase (NAD(P)H)</i>
<i>MUTYH</i>	<i>mutY homolog</i>
<i>MXRA8</i>	<i>matrix-remodelling associated 8</i>
<i>NAT2</i>	<i>N-acetyltransferase 2 (arylamine N-acetyltransferase)</i>
<i>NCOA3</i>	<i>nuclear receptor coactivator 3</i>
<i>NEUROG1</i>	<i>neurogenin 1</i>
<i>NFKBIZ</i>	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta</i>
<i>NOTCH3</i>	<i>notch 3</i>



## ABREVIATURAS

---

<i>NUDT1</i>	<i>nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 1</i>
<i>NUDT7</i>	<i>nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 7</i>
<i>OGG1</i>	<i>8-oxoguanine DNA glycosylase</i>
<i>PIK3CA</i>	<i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha</i>
<i>PMS2</i>	<i>PMS2 postmeiotic segregation increased 2</i>
<i>POLD1</i>	<i>polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit</i>
<i>POLE</i>	<i>polymerase (DNA directed), epsilon, catalytic subunit</i>
<i>PPM1A</i>	<i>protein phosphatase, Mg<sup>2+</sup>/Mn<sup>2+</sup> dependent, 1A</i>
<i>PRADC1</i>	<i>protease-associated domain containing 1</i>
<i>PRSS37</i>	<i>protease, serine, 37</i>
<i>PSPH</i>	<i>phosphoserine phosphatase</i>
<i>PTCHD3</i>	<i>patched domain containing 3</i>
<i>PTEN</i>	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
<i>PTPRJ</i>	<i>protein tyrosine phosphatase, receptor type, J</i>
<i>RAD50</i>	<i>RAD50 homolog</i>
<i>RB1</i>	<i>retinoblastoma 1</i>
<i>ROS1</i>	<i>ROS proto-oncogene 1, receptor tyrosine kinase</i>
<i>RPS20</i>	<i>ribosomal protein S20</i>
<i>RUNX3</i>	<i>runt-related transcription factor 3</i>
<i>SCG5</i>	<i>secretogranin V</i>
<i>SEMA4A</i>	<i>sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4A</i>
<i>SFXN4</i>	<i>sideroflexin 4</i>
<i>SMAD4</i>	<i>SMAD family member 4</i>
<i>SMARCA4</i>	<i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4</i>
<i>SOCS1</i>	<i>suppressor of cytokine signaling 1</i>
<i>STK11</i>	<i>serine/threonine kinase 11</i>
<i>SYNE1</i>	<i>spectrin repeat containing, nuclear envelope 1</i>
<i>TERC</i>	<i>telomerase RNA component</i>
<i>TERT</i>	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
<i>TGFB2</i>	<i>transforming growth factor, beta 2</i>
<i>TGFβRII</i>	<i>transforming growth factor, beta receptor II</i>
<i>TNFRSF6B</i>	<i>tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6b, decoy</i>
<i>TOPI</i>	<i>topoisomerase (DNA) I</i>
<i>TP53</i>	<i>tumor protein p53</i>
<i>TREX2</i>	<i>three prime repair exonuclease 2</i>
<i>TWSG1</i>	<i>twisted gastrulation BMP signaling modulator 1</i>





# INTRODUCCIÓN

---



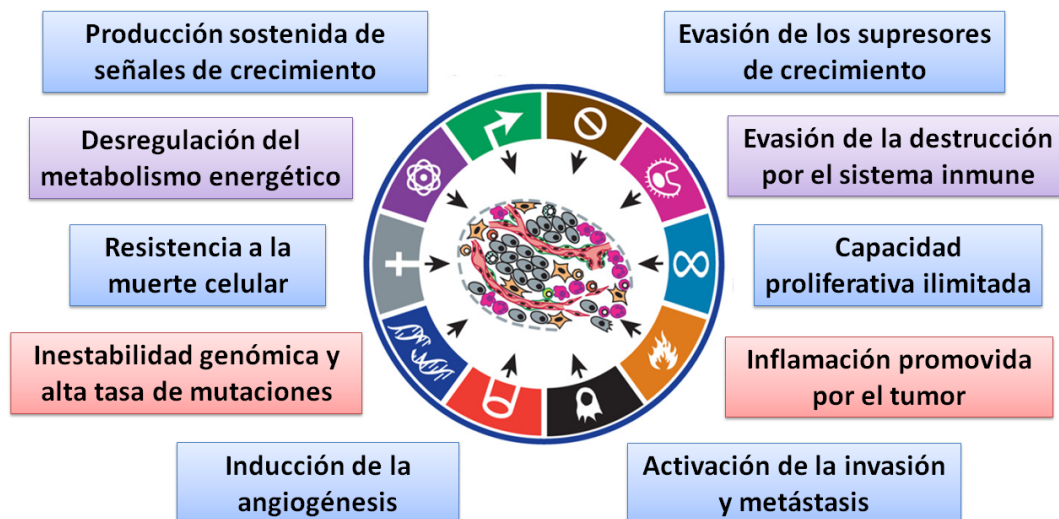
## 1. El concepto del cáncer

### a. Definición y generalidades de cáncer.

Bajo el concepto de cáncer englobamos a todas aquellas patologías en las que existe una proliferación celular excesiva debido a fallos en los mecanismos de control de crecimiento y muerte celular. Constituye un proceso dinámico, que comienza tras la alteración genética de una sola célula y que continúa con la adquisición de nuevas mutaciones ventajosas para el crecimiento celular. La fase final se alcanza cuando estas células alteradas son capaces de propagarse a través de los vasos sanguíneos o linfáticos e invadir órganos alejados del foco tumoral inicial. Existen más de 200 tipos de cáncer según el órgano y tejido de origen, incluyendo las formas no sólidas como la leucemia. La gravedad de las patologías cancerosas es altamente variable, en función de factores tales como la naturaleza del tumor, su localización o el grado de desarrollo del mismo. A día de hoy, el cáncer supone una de las enfermedades con mayor impacto en la salud pública mundial. Más de quince millones de nuevos casos son diagnosticados anualmente, siendo la segunda causa de mortalidad en el mundo sólo detrás de las enfermedades cardíacas.

### b. El proceso de transformación tumoral

El cáncer es un proceso dinámico en el que sucesivas mutaciones transforman progresivamente una célula normal en un tumor metastásico con capacidad invasiva. El número y la naturaleza de las mutaciones necesarias para que se dé esta transformación ha sido largamente debatido durante décadas. La observación microscópica de la anatomía de órganos afectados por alteraciones tumorales permitió discernir, a mediados del siglo pasado, entre diferentes etapas dentro del proceso de desarrollo del cáncer (Foulds, 1954). Décadas más tarde, Renan estimó entre cuatro y siete los cambios necesarios dicha transformación (Renan, 1993). Ya en el año 2000, Hanahan y Weinberg presentaron un modelo de progresión tumoral basado en seis competencias que una célula normal ha de adquirir a lo largo de su transformación en un tumor maligno: la capacidad de producción sostenida de señales de crecimiento, la resistencia a la muerte celular o apoptosis, la inducción y/o mantenimiento de la angiogénesis, la insensibilidad a los inhibidores o supresores de crecimiento, la capacidad proliferativa ilimitada y la movilidad extratumoral y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000). Debido al éxito conceptual del modelo, éste fue actualizado y ampliado por sus mismos autores una década después. La lista quedó completada con dos competencias adicionales consideradas “emergentes” y en proceso de aceptación: la capacidad de evadir la destrucción celular por parte del sistema inmune y la posibilidad de adaptar el metabolismo energético celular a los requerimientos propios del tumor. Además, se definieron dos rasgos como características propiamente tumorales: la existencia de una gran inestabilidad genómica en el ADN y la presencia de inflamación promovida por el propio tumor. Estas competencias y rasgos tumorales propuestos en el modelo completo se recogen en la Figura 1 (Hanahan y Weinberg, 2011).



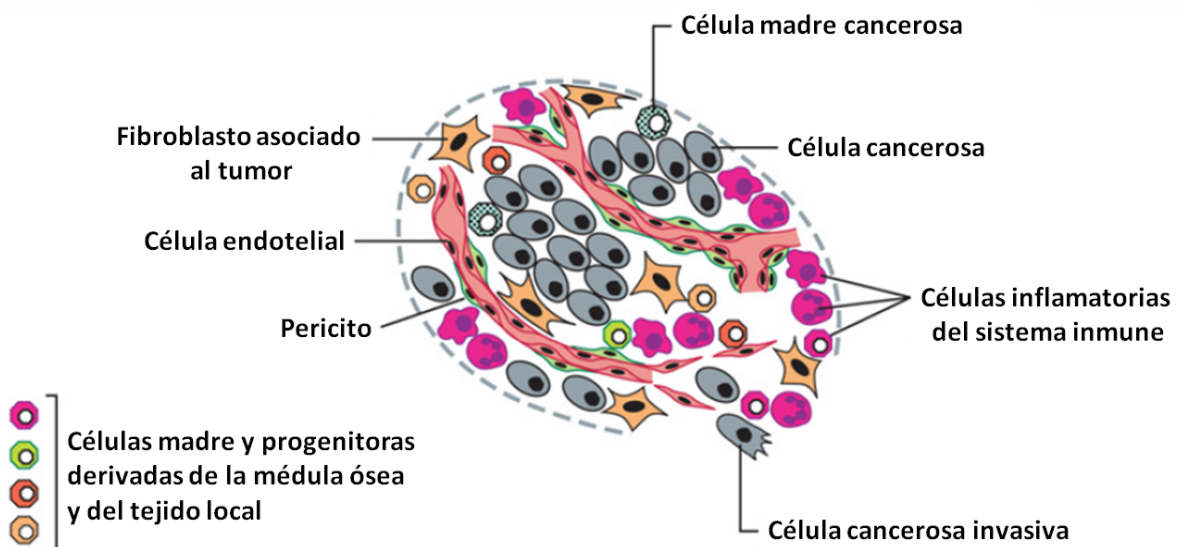
**Figura 1. Competencias y rasgos característicos de la progresión tumoral.** En azul se muestran las competencias originales, en rojo las emergentes, y en violeta los dos rasgos tumorales. Adaptado de Hanahan y Weinberg, 2011.

### c. Fisiología y diversidad celular en el tumor.

Además de proponer un modelo de progresión tumoral, Hanahan y Weinberg también realizaron una breve descripción del entorno tumoral. Según su planteamiento, el tumor debe concebirse como un sistema dinámico y complejo en el que participan diferentes tipos celulares con funciones diversas y complementarias. Una representación de este modelo puede verse en la figura 2.

El tipo celular más frecuente son las **células cancerosas**. Son las células que constituyen el grueso de la masa tumoral y que derivan de la célula desencadenante de la neoplasia. Homogéneas en la fase inicial del tumor, van divergiendo en base a la adquisición de nuevas competencias oncogénicas. Entre estas células tumorales mayoritarias, se encuentran en menor proporción otros tipos celulares. Las **células madre cancerosas** tienen un grado de diferenciación menor y son capaces no sólo de autopropagarse –como las células cancerosas normales– sino también de generar otros tipos de células tumorales (Singh et al., 2003; Al-Hajj et al., 2003; O'Brien et al., 2007; Plaks et al., 2015). Las **células endoteliales** forman los vasos sanguíneos presentes en el tumor. Tras una activación por alguna de las vías proangiogénicas, las células endoteliales pasan de un estado latente a desarrollar nuevos vasos que nutrirán a las células tumorales y permitirán la evacuación de desechos celulares. Algo parecido sucede con la formación de los **vasos linfáticos** (Tammela y Alitalo, 2010). Alrededor del endotelio se localizan los **pericitos**, células de naturaleza contráctil que ejercen funciones de apoyo al mismo. Además, numerosos tipos de células inflamatorias del sistema inmune se sitúan en el entorno tumoral. Las células incluidas en este grupo abarcan subtipos de **macrófagos, mastocitos, neutrófilos y los linfocitos T y B**. (Coffelt et al., 2010; DeNardo et al., 2010; Johansson et al., 2008; Murdoch et al., 2008; Xiao et al., 2014). Estas células logran una respuesta pro-inflamatoria, con efectos tales como: el soporte a la angiogénesis tumoral, la estimulación de la proliferación celular del tumor o la facilitación de la

invasión, y/o el establecimiento celular en un nuevo nicho para generar un nuevo tumor (metástasis). (Hatina et al., 2015; Criscitiello et al., 2015; Egeblad et al., 2010; Qian y Pollard, 2010). Por otro lado, los **fibroblastos asociados a tumor** contribuyen a la formación del estroma tumoral (Sukowati et al., 2015). En este estroma existen además **células madre y progenitoras del estroma tumoral**, que reponen los diferentes tipos celulares que localizan en esta región. (Bergfeld y DeClerck, 2010; Fang y Salven, 2011; Giaccia y Schipani, 2010).



**Figura 2. Modelo de la fisiología y organización celular en el tumor propuesto por Hanahan y Weinberg.** Adaptado de Hanahan y Weinberg, 2011.

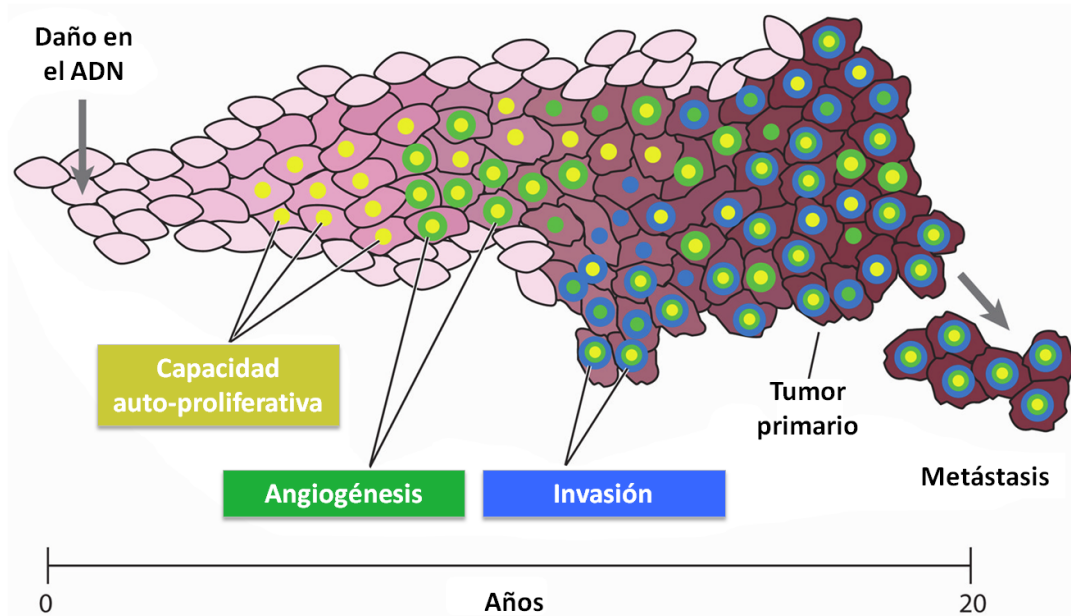
#### d. Los cambios genéticos en la transición tumoral.

Como se ha visto anteriormente, la progresión y malignización tumoral es consecuencia de la adquisición de cambios genéticos ligados a la obtención de competencias metabólicas: las mutaciones pro-crecimiento quedan fijadas en el tumor, ya que los clones que las portan se encontrarán sobrerrepresentados tras un tiempo de desarrollo tumoral. Este proceso se asemeja en cierta manera al proceso de la evolución de las especies (Salk et al., 2010). Así, según el modelo propuesto por Vogelstein cada mutación “con efecto pro-tumoral” incrementaría la tasa de crecimiento un 0,4% de media respecto al equilibrio neutro división/senescencia (Vogelstein et al., 2013; Bozic et al., 2010). La acumulación de múltiples de estas variantes pro-crecimiento y la ventaja proliferativa asociada a ellas generarán paulatinamente un tumor, el cual irá creciendo y malignizándose progresivamente (Figura 3).

Aunque los tumores en personas ancianas acarrean un número muy superior de mutaciones que las neoplasias infantiles (Tomasetti et al., 2013), en ambos casos se encuentran aquellas necesarias para generar un tumor. Esto indica que en realidad, son pocas las mutaciones necesarias para conducir el proceso tumoral –mutaciones “conductoras”– y que el resto, son meramente cambios “accidentales” que no juegan un papel relevante en el desarrollo neoplásico –mutaciones “pasajeras”–. En ausencia de



predisposición al cáncer, se requiere un gran periodo de tiempo para que las mutaciones conductoras necesarias para generar un tumor se produzcan simultáneamente en una célula. Esto explica la muy baja frecuencia de tumores esporádicos en niños.

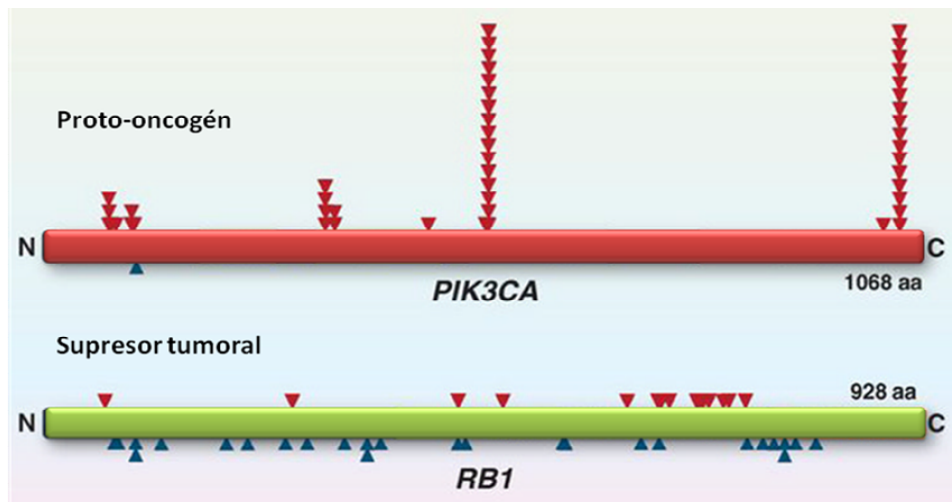


**Figura 3. Modelo de progresión tumoral propuesto por Salk.** Durante el desarrollo tumoral, algunas células adquieren competencias ligadas a la progresión tumoral, como la capacidad autoproliferativa, de invasión o de angiogénesis, entre otras. Como consecuencia de su mayor capacidad adaptativa y de proliferación, a largo plazo se produce una selección y sobrerrepresentación de las células que han adquirido un mayor número de competencias pro-tumorales. Adaptado de Salk et al., 2010.

Las mutaciones conductoras afectan generalmente a genes que juegan un papel clave en la regulación y mantenimiento de la integridad celular. Hasta ahora, sólo unos 140 (de 28.000 genes en todo el genoma humano) han sido identificados como genes portadores de mutaciones conductoras, los cuales además pueden clasificarse en dos categorías bien diferenciadas:

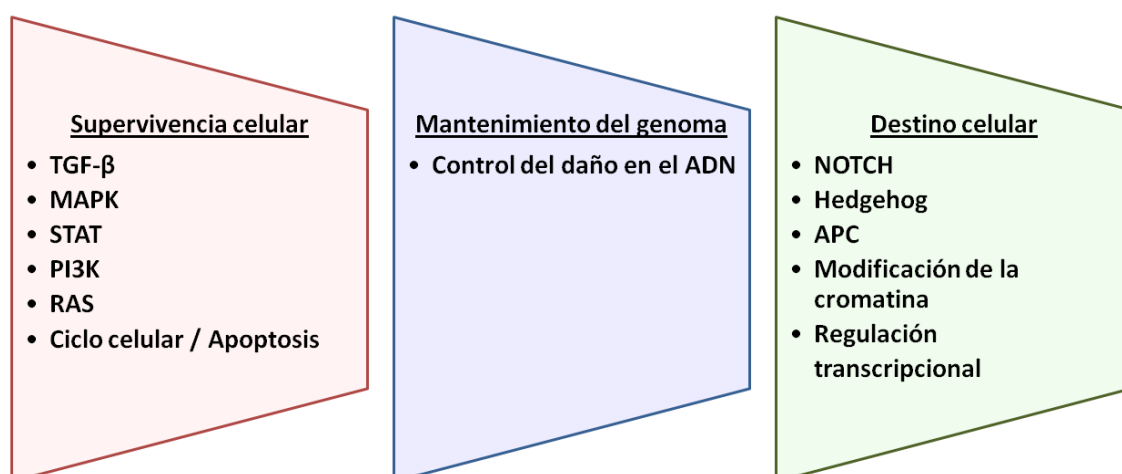
- **Proto-oncogenes:** Son genes que en su versión mutada sobre-activan vías que potencian el crecimiento y la división celular, lo cual deriva en una situación de exceso celular. A esta versión mutada del gen se le denomina *oncogén*. Las mutaciones activantes han de generar proteína igualmente activa y a su vez anormalmente regulada, por lo que generalmente se trata de cambios específicos en posiciones muy concretas (Figura 4).
- **Supresores tumorales:** Son genes con funciones de control y/o protección de la estabilidad celular. Por ejemplo, eliminan aquellas células con graves daños en el ADN y previenen la división celular excesiva. Esto se consigue mediante la inhibición de la progresión del ciclo celular o mediante la activación del programa de apoptosis. Determinadas mutaciones en los genes supresores tumorales provocarán una anulación de su función protectora frente al desarrollo tumoral. A diferencia de los proto-oncogenes, el espectro de mutaciones conductoras es mucho más amplio: cualquier cambio que comprometa su función (Figura 4).

Además, existe un tercer grupo de genes que, aún no teniendo un impacto directo sobre la viabilidad celular en caso de mutación, su supresión deriva en un incremento mutacional. Son aquellos genes denominados “*cuidadores*” o “*guardianes*” (también denominados “*caretakers*”, del inglés y con el mismo significado) y que codifican a diferentes familias de proteínas encargadas de detectar y reparar errores en el ADN, evitando así su fijación. A pesar de que la pérdida funcional de los genes cuidadores no implica de forma directa una ventaja para la proliferación celular, sí predispone a la pérdida de supresores tumorales o a la transformación oncogénica, facilitando así la transformación tumoral.



**Figura 4. Ejemplo de distribución típica de mutaciones somáticas en un proto-oncogén y en un supresor tumoral en tumores.** Las mutaciones que originan un cambio de sentido –*missense*– se indican con flechas rojas, mientras que las que generan un codón sin sentido –*nonsense*– se señalan con flechas azules. Datos extraídos de COSMIC. Abreviaturas: aa, aminoácidos. Adaptado de Vogelstein et al., 2013.

Cabe destacar que estos 140 genes portadores de mutaciones conductoras, además de representar una muy pequeña fracción del total de genes conocidos, se concentran dentro de doce vías de señalización que realizan tres funciones específicas: regular la supervivencia de las células, controlar el correcto mantenimiento del ADN y determinar el destino celular. (Figura 5)



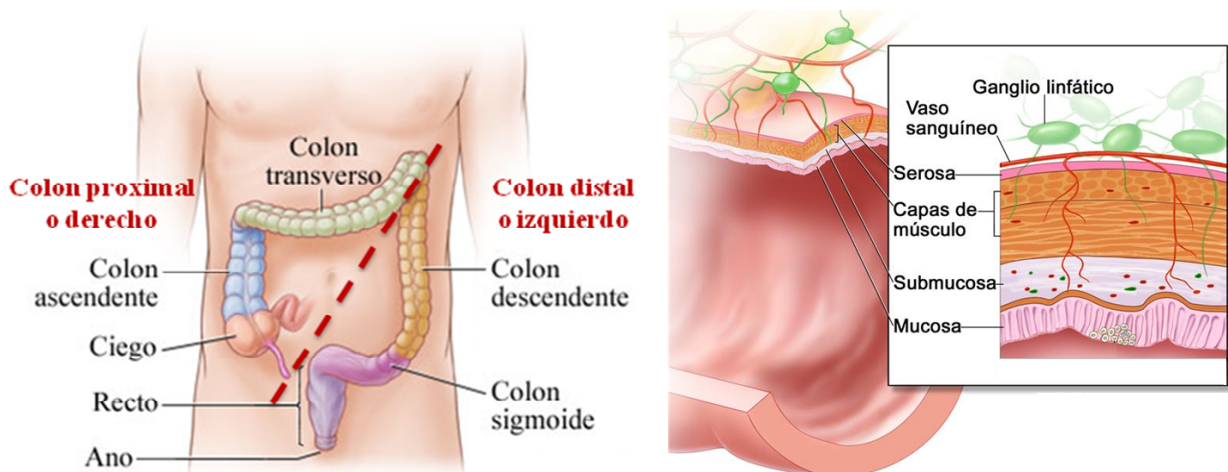
**Figura 5. Vías de señalización portadoras de mutaciones conductoras, agrupadas según función.** Adaptado de Vogelstein et al., 2013.

## 2. Colon y recto:

### a. Concepto. Estructura y función.

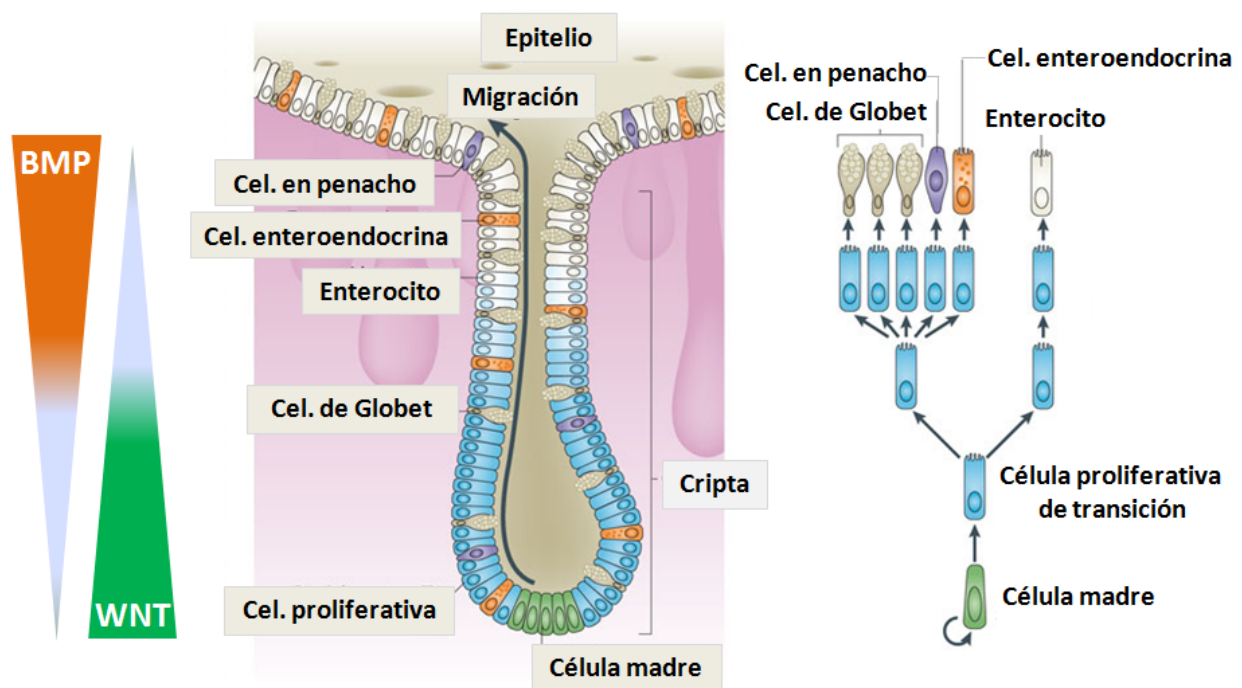
El colon y el recto constituyen la última porción del aparato digestivo, abarcando casi la totalidad del intestino grueso, a excepción del ciego. El colon es la parte más extensa de este conjunto, con una longitud media de 1,5 metros en adultos. Su función principal es la absorción de agua y electrolitos remanentes en el fluido digestivo, además de completar la absorción de algunos nutrientes como las vitaminas K y B12. Al mismo tiempo, los restos no absorbidos, junto a la fibra, el mucus secretado y parte de la flora bacteriana, son compactados para formar las heces. Éstas serán desplazadas hacia el recto por medio de movimientos peristálticos.

El colon puede dividirse macroscópicamente en base a criterios anatómicos e histológicos: Justo a continuación del intestino delgado se halla el colon ascendente, que continúa en el transversal. Estas dos partes forman el colon derecho o proximal. A continuación se encuentra el colon descendente para terminar finalmente el sigmoideo, que desemboca en el recto. Estas dos últimas partes constituyen el colon izquierdo o distal (Figura 6.a). Histológicamente, el tubo colónico consta de diferentes capas concéntricas: La más interna –en contacto con la luz del colon– es la mucosa, que está constituida por la repetición de multitud de unidades glandulares denominadas *criptas de Lieberkühn*. La capa mucosa se compone a su vez de células epiteliales, lámina propia y muscularis mucosa. Adyacente a la mucosa, sigue la submucosa, tras ella tres capas de músculo liso y circular constituyen la *muscularis propria* – responsable de los movimientos peristálticos del intestino–. Tras ella, y en la parte más externa se sitúan la subserosa y finalmente, la serosa (Figura 6.b).



**Figura 6. Representación esquemática de la anatomía (6.a, izquierda) e histología (6.b, derecha) del colon.** Modificado de <http://heathwise.org> (6.a) y de <http://cancer.gov> (6.b)

Las *Cripta de Lieberkühn*, unidades secretoras del colon, juegan un papel fundamental en la función y regeneración celular. En la parte más interna de estas criptas se encuentran las células madre intestinales, las cuales producen nuevas células indiferenciadas que ascenderán para situarse a una altura de aproximadamente un tercio de la longitud de la cripta. En este punto, se dividirán para generar los diferentes tipos celulares *maduros* del intestino, que comprenden: Las células *absorbentes* o enterocitos –la mayoría del total–, las células enteroendocrinas –que producen hormonas gastrointestinales y paracrinas–, las células calciformes o de Globet –secretoras de moco– y finalmente las células en penacho –de función desconocida–. El proceso de migración desde el fondo de la cripta hasta el lumen (donde finalmente la célula entrará en apoptosis y se desprenderá del epitelio) se produce en un periodo aproximado de una semana. (Figura 7)



**Figura 7.** Esquema de la estructura anatómica de una cripta colónica (centro), filogenia de los tipos celulares que la constituyen (derecha), y ejemplo de la concentración en gradiente de dos reguladores de crecimiento y diferenciación celular en las criptas (izquierda). Abreviaturas: cel, célula. Adaptado de Barker., 2014.

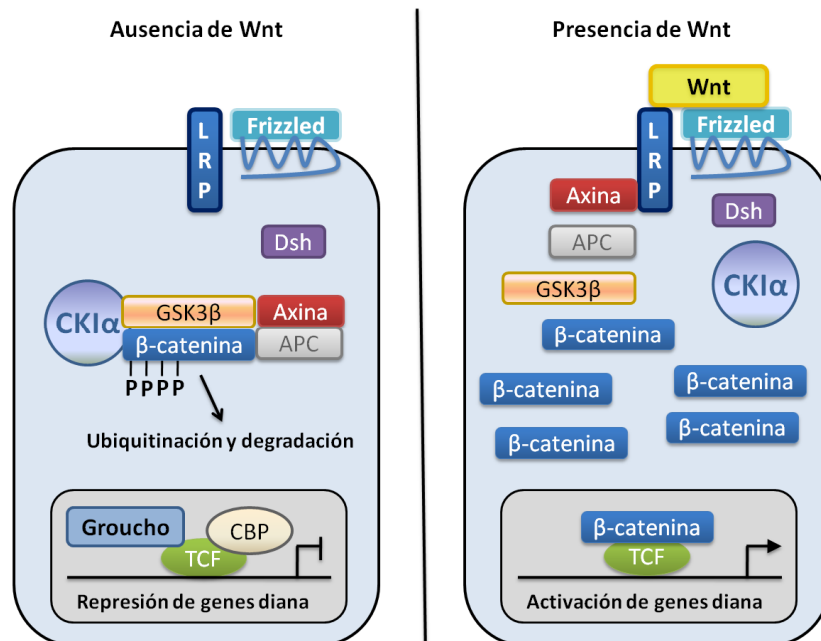
A continuación del colon se sitúa el recto, que constituye los últimos 12-15 centímetros del intestino grueso. Su función principal consiste en la recepción y el almacenamiento de las heces. Histológicamente, es semejante al colon, con menor número de criptas pero más profundas. Además, las paredes de la mucosa se pliegan y el músculo liso se engrosa para facilitar las funciones de almacenamiento y expulsión de las heces. El recto desemboca en el esfínter anal, constituido por músculo esquelético voluntario, en el que concluirá el proceso digestivo.

**b. Regulación molecular.**

La constante regeneración celular en colon se encuentra precisamente regulada mediante de una compleja vía molecular denominada vía Wnt que engloba a su vez tres diferentes sub-vías siendo la más importante la vía canónica de Wnt (revisado por Nusse, 2012) (Figura 8):

Las células del estroma localizadas en la zona basal de la cripta secretan la glicoproteína Wnt a la matriz extracelular, cuya consecuencia final es la potenciación de la proliferación celular. En este proceso interviene una molécula clave; la  $\beta$ -catenina. En ausencia del factor Wnt, la  $\beta$ -catenina se encuentra unida de manera natural a un complejo multimérico junto a las moléculas APC y axina. Las quinasas CKI y  $GSK3\beta$  reconocen este complejo y fosforilan la  $\beta$ -catenina. Esto conduce a su ubiquitinación y posterior destrucción en el proteosoma.

En presencia del factor Wnt, éste se une a los receptores de membrana Frizzled/LRP. Como consecuencia, se produce el secuestro en la membrana celular de algunos de los componentes del complejo que recluta a la  $\beta$ -catenina para su posterior fosforilación y destrucción. Esto favorece la acumulación de la  $\beta$ -catenina en el citoplasma, la cual acaba por acceder al núcleo, activando factores de transcripción de la familia Tcf/Lef. Esto desemboca en la expresión de numerosos genes desencadenantes del crecimiento y la división celular.



**Figura 8. Representación de los estados inactivado (izquierda) y activado (derecha) de la vía canónica de Wnt.** Adaptado de Korkaya y Wicha., 2010.

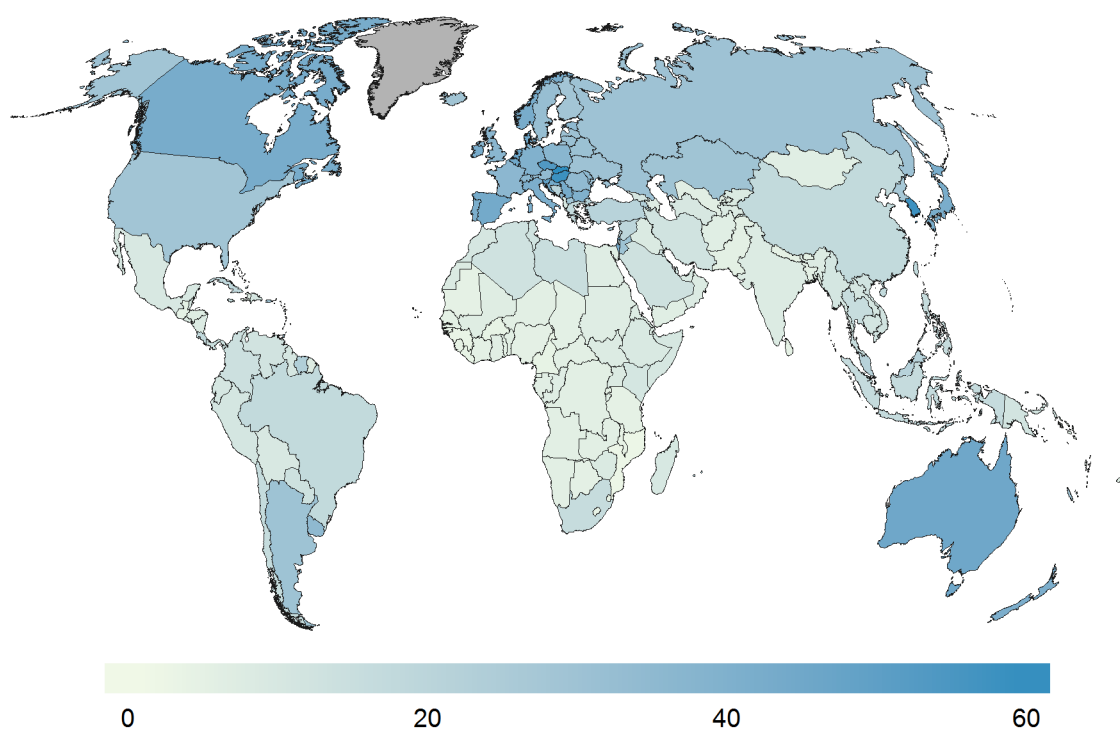
En situaciones fisiológicas normales, la producción de Wnt se concentra en la parte basal de las criptas, mientras que en la parte luminal, donde las células maduras están próximas a su extrusión, las células estromales disminuyen su producción para sustituirla por factores como BMP, encargados de desencadenar el proceso de diferenciación y especialización celular (Ver figura 7).

### 3. El cáncer colorrectal

#### a. Definición y epidemiología

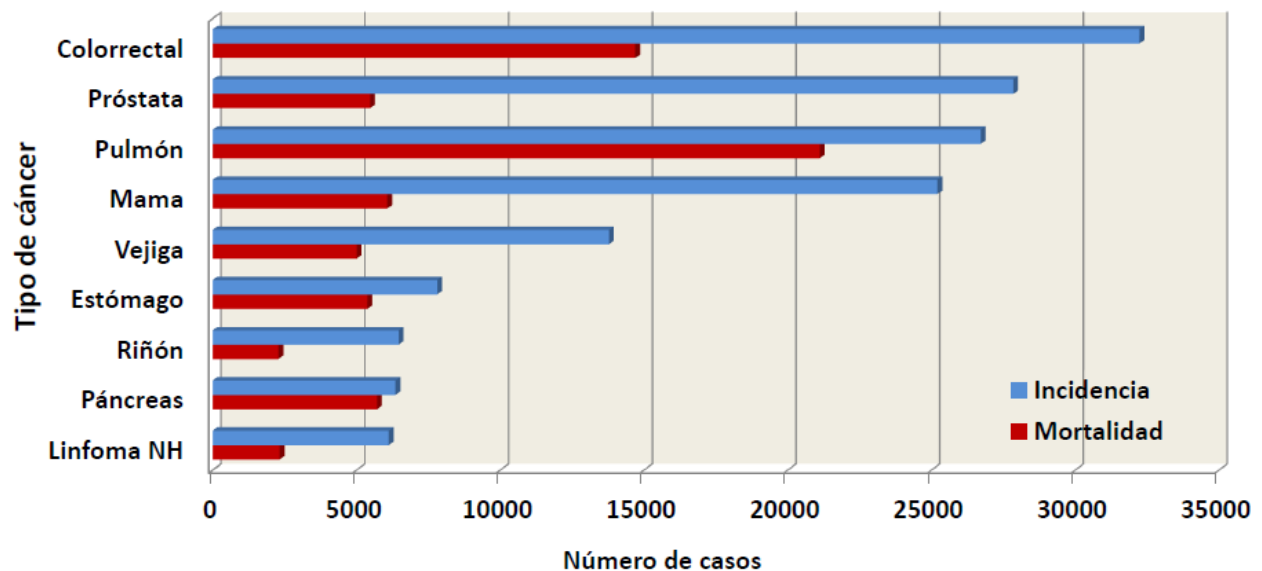
El cáncer colorrectal (CCR) abarca a todas aquellas neoplasias originadas en el colón y el recto. Según los últimos datos disponibles (Ferlay et al., 2013; Torre et al., 2015) en el año 2012 fueron diagnosticados más de 1.360.000 nuevos casos en el mundo, lo que representa un 9,7% del total de todos los cánceres. Esto lo convierte en la segunda neoplasia más frecuente en mujeres (9,2%) tras el cáncer de mama (25,2%), y la tercera en hombres (10%) tras el cáncer de pulmón (16,7%) y el de próstata (15%). Durante el mismo período, se contabilizaron unos 694.000 fallecimientos cuya causa estaba directamente relacionada con el CCR, lo que corresponde con un 8,5% del total de las muertes por cáncer.

Los mayores valores de incidencia de CCR se registran en los países más desarrollados (Australia/Nueva Zelanda, Europa y Norteamérica), mientras que en las regiones con menor desarrollo es donde se encuentra un menor número de casos (África central y occidental) (Figura 9). La mortalidad por CCR sigue un patrón semejante al de la incidencia, aunque sin embargo las diferencias entre regiones se acortan considerablemente. Esto se debe a que la mortalidad por CCR ha descendido en aquellos países con mayor incidencia, que son a su vez los más desarrollados, debido a la aplicación de campañas de concienciación y a su capacidad de acceder a mejores tratamientos y pruebas de detección precoz (Center et al., 2009a; Center et al., 2009b; Edwards et al., 2014).



**Figura 9. Mapa mundial de la incidencia de cáncer colorrectal por país en el año 2012.** La escala representa la estimación del número de casos diagnosticados por cada 100.000 habitantes durante el año 2012 tras ajustar por la variable edad. Imagen extraída de Globocan 2012, International Agency for Research on Cancer.

Considerando los datos disponibles para España, el cáncer colorrectal se sitúa como el tipo de carcinoma más frecuente (Figura 10). En 2012, se diagnosticaron más de 32.000 nuevos casos y fue la segunda causa de mortalidad por cáncer con 14.700 fallecidos. A pesar de que históricamente España ha mostrado bajos índices de incidencia de CCR, en los últimos años los registros se han igualado a los del conjunto de países más desarrollados (Center et al., 2009b).



**Figura 10. Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más frecuentemente diagnosticados en España (año 2012).** Datos tomados de Globocan 2012, International Agency for Research on Cancer. Abreviaturas: NH, no Hodgkin.

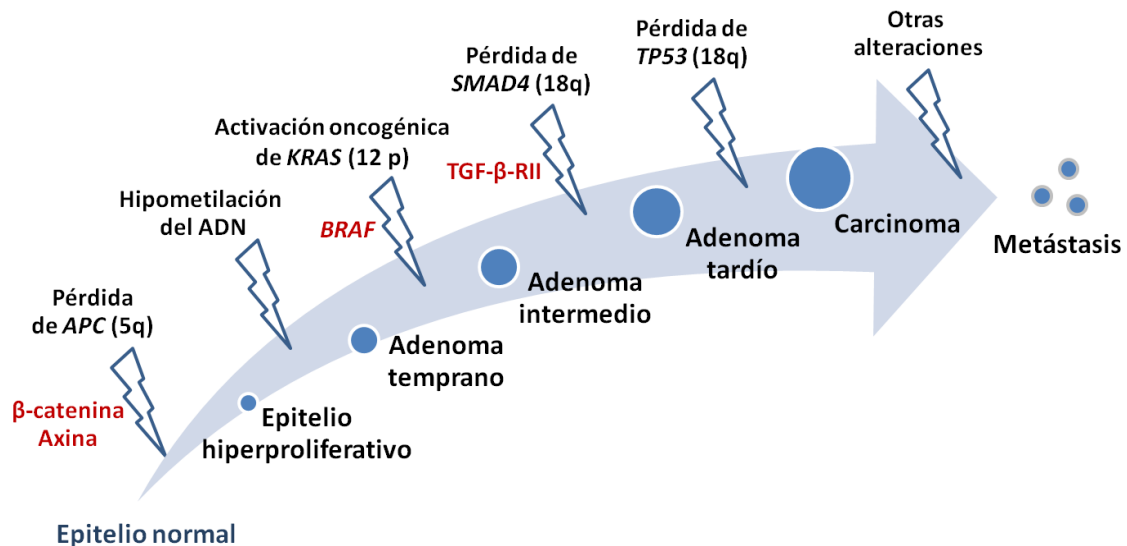
### b. Mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis colorrectal.

La denominación de CCR agrupa a todas aquellas neoplasias desarrolladas en el colon y recto sin considerar criterios más allá de localización anatómica. Sin embargo, a nivel molecular existen un gran número de vías implicadas en la aparición del CCR, pudiendo existir enormes diferencias entre tumores a pesar de desarrollarse en el mismo órgano y a partir de un mismo tipo celular.

El primer modelo que trató de explicar de forma global el proceso de formación del CCR fue descrito por Fearson y Vogelstein en 1990 (Fearon y Vogelstein, 1990) (Figura 11). El estudio de varios tumores de CCR identificó alteraciones recurrentes que parecían relacionarse con la progresión del epitelio normal al adenoma y finalmente al carcinoma. Según dicho modelo:

- El CCR aparece como resultado de la activación de oncogenes y sobre todo, por la inactivación de supresores tumorales.
- Es necesaria la presencia de mutaciones inactivantes en al menos cuatro o cinco genes clave para generar una neoplasia maligna.

- Aunque las alteraciones desencadenantes del proceso tumoral generalmente aparecen siguiendo una secuencia más o menos concreta, es la acumulación de las mismas, más que su orden, lo que determina la progresión del CCR.
- En algunos casos, la mutación heterocigota de un supresor tumoral puede ser suficiente para dotar a la célula de una ventaja selectiva.



**Figura 11. Secuencia adenoma-carcinoma en el cáncer colorrectal.** Las alteraciones indicadas en negro se asocian a etapas determinadas de la transformación del tumor colorrectal. En rojo, se indican algunos genes o proteínas que también aparecen alterados con frecuencia en esa etapa de transformación. Adaptado de Fearon y Vogelstein, 1990.

El estudio tumoral llevado a cabo durante más de dos décadas desde la formulación del modelo de Volgestein ha permitido acotar con mayor precisión los cambios generados en la transición epitelio-mesénquima. A día de hoy, se han descrito tres vías de adquisición de inestabilidad genómica implicadas en el desarrollo del CCR: la inestabilidad cromosómica, la inestabilidad de microsatélites y el fenotipo metilador de las islas CpG. Los tres mecanismos, que no son excluyentes, aumentan la tasa de mutación en el ADN celular, incrementando así la diversidad genética y favoreciendo la aparición de clones mejor adaptados al crecimiento. Esto, en última instancia, se traduce en una mayor capacidad de transformación y malignización tumoral. Estos tres mecanismos se describen a continuación:

#### I. La inestabilidad cromosómica

La inestabilidad cromosómica (IC) es el mecanismo más frecuente de adquisición de inestabilidad genómica en el CCR. En condiciones fisiológicas normales, la mitosis genera dos células hijas con el mismo número de cromosomas que la célula original. Sin embargo, algunas células genéticamente alteradas pueden llegar a dividirse realizando un reparto desigual de cromosomas. Como consecuencia, las células resultantes tendrán numerosas regiones cromosómicas perdidas, duplicadas o en pérdida de heterocigosidad (LOH, del inglés *loss of heterozygosity*), lo cual implicará la carencia y/o



sobrerrepresentación de multitud de genes (Pino y Chung, 2010). Aunque muchos de los nuevos cariotipos generados supondrán la inviabilidad celular, algunos podrán dotar a la célula de una ventaja selectiva. No es de extrañar por ello que tumores avanzados generados a partir de esta vía coincidan en la presencia de determinadas duplicaciones o pérdidas cromosómicas. Una descripción detallada de los cambios predominantes en diferentes tipos de CCR puede encontrarse en la sección 7.b.i. La inestabilidad cromosómica viene con frecuencia acompañada de mutaciones en genes supresores tumorales. A modo de actualización del modelo de Vogelstein, Al-Sohaily (Al-Sohaily et al., 2012) enumeró alguno de los cambios clave en el desarrollo de la transición epitelio-mesénquima en el CCR:

- **Mutaciones en el proto-oncogén KRAS:** Determinadas mutaciones en el proto-oncogén *KRAS*, principalmente en los codones 12 y 13, generan una versión activante de la proteína (Brink et al., 2003). Esto conduce a una sobreexpresión descontrolada de numerosos genes diana con funciones tales como la regulación del control celular, la diferenciación, supervivencia o motilidad celular (Pino y Chung., 2010). *KRAS* se encuentra mutado en un 30-60% de los CCR esporádicos y adenomas avanzados y se cree que es un paso de vital importancia en la transición adenoma-carcinoma (Wang et al., 2006; Pajkos et al., 2000; Knickelbein et al., 2015).
- **Pérdida del brazo cromosómico 5q:** Ocurre en el 20-50% de los CCR (Fearon et al., 1990). El brazo 5q contiene a *APC*, gen que ejerce de “guardián” de la proliferación celular en el colon. Como ya se ha explicado en la sección 2.b., la proteína APC tiene un papel clave en la vía canónica de Wnt, ya que regula la eliminación de la  $\beta$ -catenina mediante su unión a la misma. Mutaciones en *APC* se encuentran en un 60-80% de los casos de CCR y en una alta proporción de adenomas, por lo que parece ser un paso inicial en el desarrollo de la transformación tumoral (Powell et al., 1992). También localiza en este brazo el gen *MCC*, que activa vías de muerte celular ante daño en el ADN y es capaz de inhibir la vía Wnt de forma independiente a APC (Pangon et al., 2010; Fukuyama et al., 2008).
- **Pérdida del brazo cromosómico 8p:** Ocurre en más del 50% de los CCR (Chughtai et al., 1999). Esta pérdida se asocia con estadios avanzados de progresión tumoral y se cree que incrementa el potencial metastásico del tumor (Macartney-Coxson et al., 2008), aunque no se ha identificado ningún gen cuya pérdida de función pueda ser responsable de la malignización del CCR (Mourra et al., 2008).
- **Pérdida del brazo cromosómico 17p:** Ocurre en alrededor de un 75% de los CCR. Es un cambio de gran relevancia en la transformación tumoral, puesto que incluye al gen *TP53*, conocido como *el guardián del genoma*. La pérdida de este brazo cromosómico suele darse en estadios avanzados de progresión tumoral (Vogelstein et al., 1988) y suele suponer el segundo *evento* que anulará por completo la presencia celular de la proteína (Grady et al., 2002). *TP53* es un gen clave con funciones implicadas tanto en la protección de la estabilidad genómica, como en el desencadenamiento de senescencia celular cuando existe un daño severo en el ADN (Green et al., 2009). Por esta razón, la pérdida del brazo 17p suele verse como un paso importante en la progresión tumoral.
- **Pérdida del brazo cromosómico 18q:** El brazo 18q se encuentra en LOH en alrededor del 50-70% de todos los CCR. Incluye varios genes supresores de tumores tales como *CABLES1*, *DCC* y varios

genes de la familia *SMAD*. La pérdida de esta región es un marcador de pronóstico desfavorable en los estadios II y III de CCR (Lanza et al., 1998; Ogunbiyi et al., 1998; Wang et al., 2010a).

## II. La inestabilidad de microsatélites

Los microsatélites son secuencias de ADN de entre dos y cinco pares de bases que se repiten contiguamente un número determinado de veces. Los microsatélites se encuentran dispersos por todo el genoma, localizándose generalmente en regiones no codificantes. Debido a su naturaleza repetitiva, son zonas propensas a generar errores en el proceso de replicación mediante la incorporación o eliminación de repeticiones. El sistema de reparación de bases desapareadas (MMR, del inglés *mismatch repair*) es el encargado de localizar y reparar aquellas bases incorporadas incorrectamente. Este sistema se compone de los genes *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* y *PMS2*, entre otros (Boland et al., 2010). La inactivación de los dos alelos de uno de estos genes, bien por mutación o por silenciamiento debido a la metilación del promotor, conlleva un fallo de este sistema de reparación. Este fallo potenciará la aparición de mutaciones que, en el caso de afectar a supresores tumorales o de activar proto-oncogenes, desencadenarán el proceso de transformación tumoral. Algunos genes que contienen repeticiones microsatélites en regiones codificantes tales como *PTEN*, *RAD50*, *MSH3*, *MSH6*, *TGF $\beta$ RII*, *BAX*, *BCL-10*, entre otros, tienen un papel fundamental en el control de la homeostasis celular o la reparación del ADN (Iacopetta et al., 2010). El 90% de los tumores con inestabilidad de microsatélites (IMS) tienen mutaciones en el gen *TGF $\beta$ RII*, que participa en la regulación de la inhibición del crecimiento celular (Parsons et al., 1995). Otros rasgos moleculares que definen a los tumores IMS es su naturaleza generalmente diploide, con pocas regiones en LOH y su menor número de mutaciones en *KRAS* y *TP53* (Soreide et al., 2005). Además, la mutación V600E en *BRAF* se observa con mucha frecuencia en casos de CCR con IMS de tipo esporádico, pero no así en los familiares (Deng et al., 2004).

## III. El fenotipo metilador de islas CpG

Aproximadamente un 70% de los promotores que regulan la expresión génica en humanos contienen regiones ricas en el dinucleótido citosina-guanina (CpG). Estas regiones, denominadas islas CpG, tienen una longitud superior a 200 pares de bases y una presencia de CpG incrementada en más del 60% de lo que correspondería por azar. La metilación de las citosinas de los dímeros CpG de estas islas supone un efectivo mecanismo de silenciamiento génico que permite regular la expresión de un gen sin necesidad de alterar su secuencia original. La metilación de genes concretos es un fenómeno frecuente en CCR como segundo evento inactivante de la expresión génica, tal y como se ha visto para *APC*, *MCC* o *MLH1* (Toyota et al., 1999). Pero más allá de la metilación génica puntual, en algunos tumores de CCR se observa un patrón generalizado de metilación de islas CpG. Como consecuencia, multitud de genes son silenciados, incluyendo algunos que son clave para el mantenimiento homeostático de la célula. El fenotipo ligado a la metilación generalizada de estas islas se denomina CIMP (del inglés *CpG island methylator phenotype*: fenotipo metilador de islas CpG), pudiéndose observar en alrededor de un 15% de los CCR esporádicos. A nivel molecular, los tumores que muestran un patrón de alta metilación de islas CpG suelen tener IMS, y el gen *BRAF* mutado (Nosho et al., 2008a).

**c. Clasificación por estadios del CCR**

El grado de invasión es un buen testigo de la progresión tumoral, correlacionando con una menor supervivencia y condicionando el tratamiento de elección. Por ello, es necesaria la existencia de un sistema de clasificación que acote la progresión tumoral del CCR en diferentes etapas o estadios en base a criterios fisionómicos concretos. La primera clasificación fue creada por Dukes en 1932, considerando tres posibles estadios en función de si la masa tumoral alcanzaba sólo al epitelio –y quizá levemente a la capa muscular– (estadio A), ampliamente la capa muscular (estadio B) o si además invadía al menos un ganglio linfático (estadio C). Tras diferentes ampliaciones y modificaciones de este sistema, –algunas de amplio uso como la Astler y Coller en el año 1954–, la institución *American Joint Committee on Cancer* sugirió la unificación en un único sistema en 1986 (Hutter y Sobin, 1986). El sistema propuesto, con nombre TNM, describe el grado de invasión del CCR en base al desarrollo o afectación de: el propio tumor primario (pT), los nódulos linfáticos (pN) y la presencia o no de metástasis (pM) (Tabla 1). El sistema de clasificación se completa con la asignación de una categoría –de 4– que correlaciona con los estadios propuestos por Dukes (Tabla 2, Figura 12). Debido a la clara finalidad práctica de estos sistemas de clasificación, cada categoría va asociada a un pronóstico y por lo tanto, a un tratamiento determinado.

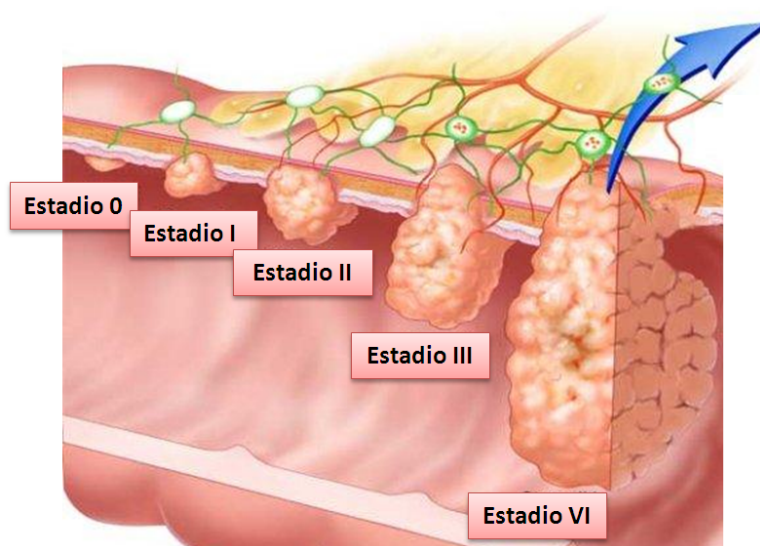
**Tabla 1. Categorías del sistema TNM para el cáncer colorrectal**

<b>Categoría T: Tejidos del colon o recto en los que localiza el tumor primario.</b>	
<b>Tx</b>	No ha sido posible realizar la evaluación de la extensión del tumor primario o no se dispone de ella.
<b>T0</b>	No existe evidencia de tumor primario.
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i> en el epitelio. Posible invasión de la lámina propia pero sin atravesar la mucosa.
<b>T1</b>	El tumor invade la submucosa.
<b>T2</b>	El tumor invade la muscular propia.
<b>T3</b>	El tumor ha atravesado la muscular propia e invade la subserosa pero no hay invasión de tejidos vecinos.
<b>T4</b>	El tumor invade o se adhiere a otros órganos y estructuras adyacentes.
<b>Categoría N: Afectación de nódulos linfáticos cercanos por parte del tumor primario.</b>	
<b>Nx</b>	No ha sido posible evaluar la afectación de nódulos linfáticos o no se dispone de dicha evaluación.
<b>N0</b>	No hay afectación de nódulos linfáticos por parte del tumor primario.
<b>N1</b>	De 1 a 3 ganglios linfáticos contienen células procedentes del tumor primario.
<b>N2</b>	Cuatro o más ganglios linfáticos contienen células procedentes del tumor primario.
<b>Categoría M: Presencia de invasión a distancia (metástasis)</b>	
<b>Mx</b>	No ha sido posible realizar la evaluación de la presencia de metástasis o no se dispone de ella.
<b>M0</b>	Ausencia de metástasis: No hay invasión a distancia de otros órganos.
<b>M1</b>	Metástasis: Órganos distantes contienen células del tumor inicial.

**Tabla 2. Correspondencia de los sistemas de clasificación de Dukes y Astler y Collier con el sistema TNM y supervivencia a 5 años para cada estadio.**

Sistema de clasificación TNM				Correspondencia		Supervivencia a 5 años*
Estadio	T	N	M	Dukes	Astler y Collier	
0	Tis	N0	M0	-	-	-
I	T1	N0	M0	A	A	92,5 - 93,9%
	T2	N0	M0		B1	
II	T3	N0	M0	B	B2	76,4 - 77,5%
	T4	N0	M0		B3	
III	T1/T2	N1/N2	M0	C	C1	47,1 - 48,3%
	T3/T4	N1/N2	M0		C2	
IV	T(is-4)	N(0-2)	M1	-	D	6,1 - 7,0%

\*Intervalo de confianza al 95% para los datos de supervivencia a 5 años al CCR en Inglaterra durante los años 1996-2002. Datos extraídos de <http://www.ncin.org.uk/>, National cancer Intelligence Network.



**Figura 12. Estadios tumorales en el cáncer colorrectal en base al sistema de clasificación TNM.** Modificado de <http://www.cancer.gov/>.

#### d. Detección y tratamiento

Debido a que la supervivencia al CCR es inversamente proporcional al grado de progresión tumoral, la detección precoz es fundamental para aumentar las posibilidades de curación del paciente. Existen una serie de manifestaciones poco específicas que pueden alertar sobre la posible incidencia de un CCR. Entre ellas se encuentran los vómitos, el cansancio extremo, los cambios en el tránsito intestinal o en el patrón de evacuación, la pérdida de peso sin una causa aparente o la identificación de sangre en heces.

El diagnóstico y/o estudio del CCR abarca varios tipos de pruebas. Las menos invasivas consisten en el **examen general del cuerpo**, el **test de sangre oculta en heces** o el **examen digital del recto**. La

**sigmoidoscopia** y la **colonoscopia** permiten la observación y la extracción de biopsias del recto y colon sigmoide o del recto y colon, respectivamente. Otras técnicas posibles son el **enema de bario** o la **colonoscopia virtual**, que permiten tener una visión más global de todo el colon. De todas ellas, la colonoscopia ofrece una mayor sensibilidad diagnóstica, aunque el grado de adhesión a programas preventivos basados en esta técnica es menor (Hassan et al., 2012; Salas et al., 2014; Stracci et al., 2014).

El tratamiento del cáncer colorrectal comprende diferentes estrategias que incluyen la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia. La **cirugía** se centra en la eliminación local del tumor primario y los tejidos adyacentes posiblemente afectados. Esto es suficiente en fases iniciales del tumor donde la extensión del mismo queda claramente delimitada. La **radioterapia** consiste en la aplicación de radiación ionizante (como los Rayos Gamma o X) o partículas  $\alpha$  sobre el tejido tumoral para destruirlo. Suele aplicarse tras la escisión de tumores adheridos a órganos en los que la cirugía ha podido dejar células tumorales remanentes. Por otro lado, la **quimioterapia** se basa en la aplicación de medicamentos antineoplásicos, bien de forma localizada o sistémica. El mecanismo de acción se basa en la destrucción de células de división rápida, por lo que además de las células cancerosas, aquellas células sanas con alta actividad mitótica también se verán afectadas. De acuerdo a los estadios del sistema TNM, las opciones de tratamiento más frecuentemente barajadas son:

**Estadio 0:** Debido a la localización epitelial del tumor, la cirugía es el tratamiento más eficaz. La polipectomía suele ser suficiente para solucionar la mayoría de los casos.

**Estadio 1:** El tumor localiza todavía dentro del colon o recto, por lo que sólo será necesaria la escisión de la parte del tejido afectado junto a los ganglios linfáticos adyacentes.

**Estadio 2:** El tumor ha podido invadir otros tejidos cercanos pero no ha pasado al sistema linfático. Por ello, la resección quirúrgica de las zonas afectadas suele ser suficiente. Sin embargo, en los casos donde se observa un fenotipo más agresivo (con mayor movilidad, transformación o afección tisular más severa), puede recomendarse quimioterapia y/o radioterapia en las zonas donde pueden haber quedado células tumorales.

**Estadio 3:** Debido a la presencia de tumor en los ganglios linfáticos, la escisión del tejido afectado siempre irá combinada de quimioterapia posterior. Igualmente, la radioterapia puede ser aplicada si han podido quedar células tumorales por extraer tras la colectomía.

**Estadio 4:** La presencia de células tumorales en órganos lejanos –frecuentemente el hígado, aunque también los pulmones o el peritoneo, entre otros– hace patente que la eliminación del tumor inicial no será capaz de eliminar el cáncer. Sin embargo, si la metástasis es pequeña la cirugía del tumor inicial combinada con quimioterapia puede acabar eliminando el cáncer. En estadios muy avanzados con metástasis generalizada, los tratamientos suelen ir más encaminados a aliviar los síntomas del paciente y a alargar su tiempo de vida, ya que existe una muy baja probabilidad de curación total.

#### **4. Factores de predisposición al cáncer colorrectal.**

El riesgo a desarrollar CCR, al igual que en la mayoría de cánceres, viene condicionado por la suma de factores tanto ambientales como genéticos. La combinación de todos ellos modulará el riesgo final de cada individuo a desarrollar CCR.

##### **a. Factores ambientales**

Los factores ambientales, en los que se engloba el estilo de vida o la exposición a carcinógenos, son un modulador crucial en el riesgo al CCR. Como parece lógico, la exposición continuada del intestino grueso a las sustancias resultantes del proceso digestivo hace que la alimentación sea un factor clave en el riesgo de padecer CCR: Las dietas ricas en carnes rojas y/o carne procesada, en especial cocinadas a altas temperaturas, incrementan el riesgo a padecer CCR. (Hammerling et al., 2014; Joshi et al., 2015) Por otro lado, algunos alimentos han sido descritos como “protectores”, ya que la incidencia del CCR en pacientes que siguen una dieta rica en estos elementos se ha demostrado menor. Entre ellos figuran las verduras, la fruta y las semillas de grano integral. Lo mismo sucede con moléculas como el folato, la Vitamina D o el calcio (Revisado por Pericleous et al., 2013; Song et al., 2015). Más allá de la alimentación, la práctica habitual de ejercicio se ha observado como un hábito protector (Johnson, 2013). Por el contrario, tienen un efecto negativo la obesidad (Baena y Salinas, 2015; Keimling et al., 2013), el tabaco (Cross et al., 2014) o la ingesta de alcohol (Ferrari, 2007; Durko y Malecka-Panas, 2014). Incluso se ha asociado el hecho de vivir en zonas industriales con un incremento de riesgo al CCR (Lopez-Abente, 2012). Uno de los factores de riesgo más relevantes es la edad, de forma que más del 90% de todos los casos de CCR son identificados en pacientes con más de 50 años.

##### **b. Factores genéticos**

Aproximadamente una de cada cinco personas que desarrollan CCR tienen algún familiar afectado por esta misma enfermedad. Visto de otro modo, el riesgo a desarrollar CCR es 2,25 veces superior si un paciente de primer grado ha sido diagnosticado con esta enfermedad, y hasta de 4,25 veces más alto si hay dos o más familiares de primer grado afectados (Johns et al., 2001). Aunque parte de esta agregación podría ser debida a compartir hábitos o efectos del entorno, se estima que la principal razón de la misma es que comparten variantes genéticas que les otorgan una susceptibilidad superior a padecer CCR. Esto variará en función de la naturaleza de los genes afectados y del tipo de alteración causada en la estructura y/o expresión de la proteína. Existen millones de variantes descritas en el genoma: mientras que el efecto de la mayoría de ellas se considera nulo o se desconoce, algunas han sido asociadas a un incremento de riesgo a desarrollar CCR de hasta el 100%. Su factor de discriminación más importante es su penetrancia, es decir, el porcentaje de portadores de esta variante (o de mutaciones en el gen correspondiente, focalizando en genes concretos) que finalmente acaba manifestando la enfermedad.

I. Mutaciones de alta penetrancia.

Mutaciones de efecto letal en determinados genes clave en la regulación celular y/o reparación del ADN en colon provocan un aumento de riesgo notorio a padecer CCR. Generalmente se trata de mutaciones que generan codones truncantes, afectan al proceso de corte y empalme (*splicing* en inglés), alteran el marco de lectura o provocan la delección o inserción de aminoácidos. También se incluyen mutaciones no sinónimas que conllevan una alteración grave o la anulación total de la función de la proteína –por ejemplo, que desestabilizan su estructura o que alteran el dominio de unión a un ligando–.

Este tipo de mutaciones son las causantes de los síndromes de CCR hereditario, ya que su notorio efecto hace que la enfermedad se manifieste en una alta proporción de los individuos portadores (Tabla 3). Los síndromes asociados a este tipo de mutaciones serán explicados más adelante. La frecuencia de estas mutaciones en población general es muy baja debido a la presión selectiva.

**Tabla 3. Descriptiva de los síndromes de CCR hereditario y los genes implicados.**

Gen(es)	Función o vía molecular	Síndrome	Herencia
<i>MLH1</i> <sup>1</sup> <i>MSH2</i> <i>MSH6</i> <i>PMS2</i> <i>EPCAM</i> <sup>2</sup>	Reparación de bases desapareadas	Síndrome de Lynch	AD
<i>APC</i>	Inhibición vía Wnt	Poliposis adenomatosa familiar (PAF)	AD <sup>3</sup>
<i>MUTYH</i>	Reparación por escisión de bases	Poliposis asociada a <i>MUTYH</i> (PAM)	AR
<i>SMAD4</i> <i>BMPR1A</i>	Vía TGF-Beta y BMP	Poliposis juvenil	AD
<i>GREM1</i>	Vía TGF-Beta y BMP	Poliposis hereditaria mixta	AD
<i>STK11 (LKB1)</i>	Serina-Treonin quinasa	Síndrome de Peutz–Jeghers	AD
<i>PTEN</i>	Inhibición de la vía AKT	Síndrome hamartoma-tumor por mutaciones en <i>PTEN</i>	AD
<i>TP53</i>	Respuesta a daño en el ADN	Síndrome de Li Fraumeni	AD
<i>POLE</i> <i>POLD1</i>	Corrección de errores de la polimerasa	Síndrome asociado a la actividad reparadora de la polimerasa	AD

Abreviaturas: AD, autosómica dominante; AR, autosómica recesiva.

1. La epimetilación constitutiva (hipermetilación del promotor) también es un mecanismo frecuente de inactivación de *MLH1*.
2. Se ha descrito asociación entre delecciones en la región *EPCAM* e hipermetilación del promotor de *MSH2*.
3. Mutaciones *de novo* en el 30% de los casos.

Mientras que la tabla anterior recoge únicamente aquellos genes ampliamente aceptados como causantes de formas sindrómicas de CCR, existen otros genes propuestos cuyo papel en el desarrollo del CCR hereditario todavía no está firmemente demostrado. Se requieren estudios de validación adicionales que apoyen su inclusión del grupo de genes de alta penetrancia para CCR.

Tal es el caso del gen **BUB1**. Un reciente estudio basado en arrays de número de copia detectó una microdelección en 2q13, donde localiza el gen **BUB1**, en un individuo con CCR a edad temprana (de Voer et al., 2011). Este gen codifica una quinasa que participa en el punto de control de la mitosis y el ensamblaje del huso mitótico. Su alteración se relaciona con una segregación desequilibrada de cromosomas (Hanks et al., 2005; Baker et al., 2005). Un estudio posterior del mismo grupo identificó variantes genéticas deletéreas, tanto en **BUB1** como en otro gen de la misma familia (**BUB3**), en otros pacientes con CCR familiar y /o de aparición temprana (de Voer et al., 2013).

Otros ejemplos son algunos genes identificados en estudios de secuenciación motivados por el interés de la función de los mismos (estudio dirigido a genes candidatos). Mediante esta técnica se relacionaron los genes **GALNT12** (que codifica para una glicosiltransferasa), **UNC5C** (con función proapoptótica), **NUDT1** y **OGG1** (ambos implicados en la reparación de ADN por escisión de bases), con un incremento de riesgo a CCR (Gylfe et al., 2010; Coissieux et al., 2011; Clarke et al., 2012; de Voer et al., 2013). Esto será explicado con más detalle en la sección 8.b.

Otros genes identificados en últimos años en relación con la predisposición al CCR son **AXIN1** y **AXIN2**, participantes en la vía de Wnt (Lammi et al., 2004; Mazzoni et al., 2014), **EPHB2** (Kokko et al., 2006; Zogopoulos et al., 2008), **ENG**, que codifica la proteína endoglina la cual interacciona con factores de crecimiento para formar vasos sanguíneos (Sweet et al., 2005; Howe et al., 2007; Ngeow et al., 2013), **BMP4** (Lubbe et al., 2011), **PTPRJ**, que se relaciona con silenciamiento germinal por hipermetilación del promotor (Venkatachalam et al., 2010) o **FOCAD**, una focadhesina (Weren et al., 2015).

La reciente llegada de la secuenciación masiva en paralelo (NGS, del inglés *next generation sequencing*) ha permitido secuenciar el exoma o el genoma completo de numerosos pacientes y familias con CCR familiar, generando varias variantes potencialmente implicadas en cada uno de estos casos secuenciados. Un resumen de los estudios más relevantes en el campo del CCR familiar y los genes identificados en cada uno puede verse en la Tabla 4. Los estudios centrados en el Cáncer colorrectal familiar de tipo X son recogidos en la sección 7.d.

**Tabla 4. Estudios de secuenciación de exomas completos en el campo del CCR familiar.** Los estudios de secuenciación de exomas completos en el CCRFX se explican en la sección 7.d.

Estudio	Muestras	Genes identificados
<b>Esteban-Jurado et al., 2015</b>	43 afectos de 29 familias con fuerte agregación de CCR	<i>CDKN1B, XRCC4, EPHX1, NFKBIZ, SMARCA4, y BARD1</i>
<b>Gylfe et al., 2013</b>	96 afectos con fuerte agregación de CCR	<i>UACA, SFXN4, TWSG1, PSPH, NUDT7, ZNF490, PRSS37, CCDC18, PRADC1, MRPL3 y AKR1C4</i>
<b>DeRycke et al., 2013</b>	40 afectos de 16 familias	26 genes, destacando <i>CENPE</i> y <i>KIF23</i>
<b>Smith et al., 2013</b>	50 afectos de CCR esporádico (18 diagnosticados antes de los 35 años)	<i>FANCM, LAMB4, LAMC3, PTCHD3, TREX2 y NOTCH3.</i>
<b>Tanskanen et al., 2015</b>	22 afectos de CCR diagnosticados antes de los 40 años	<i>ADAMTS4, CYTL1, SYNE1, MCTP2, ARHGAP12, ATM, DONSON, ROS1 y MCTP2</i>



II. Mutaciones y genes que confieren un riesgo moderado

Existen variantes en genes implicados en formas sindrómicas del CCR que provocan una reducción parcial en su capacidad de actuación (por ejemplo por disminuir su estabilidad o la afinidad por su ligando). Un ejemplo es la mutación I1307K en el gen APC (Laken et al., 1997). Estas variantes conllevan un incremento de riesgo moderado al CCR. Asimismo, mutaciones con un efecto funcional severo que afectan a genes de menor relevancia en la estabilidad de las células del intestino grueso pueden también suponer un incremento de riesgo de impacto moderado.

Una forma de identificar este tipo de variantes es la búsqueda directa en genes candidatos en cohortes de afectados de CCR. Variantes infrecuentes con efectos deletéreos *in silico* identificadas en casos con CCR familiar serán sospechosas de conllevar un incremento de riesgo a esta enfermedad. Un metaanálisis reciente (Ma et al., 2012) evaluó un total de 267 variantes en 150 genes candidatos las cuales habían sido previamente asociadas a incrementos de riesgo a CCR. Se encontró asociación positiva ( $p < 0.05$ ) en 62 de estas variantes localizadas en 50 genes incluyendo *APC*, *CHEK2*, *DNMT3B*, *MLH1*, *MUTYH* y *hTERT*.

III. Variantes que incrementan levemente el riesgo al CCR.

Los estudios de asociación de genoma completo (GWAS en inglés para *Genome-Wide Association Study*) han identificado numerosas variantes comunes sobrerrepresentadas en afectados de CCR. Hasta el día de hoy, 48 *loci* han sido asociados con un incremento de riesgo de desarrollar este tipo de cáncer, aportando razones de oportunidad (OR, del inglés *odds ratio*) que van desde 1,04 hasta 1,47 (<http://www.genome.gov/gwastudies>) (Tabla 5). Se ha observado que la acumulación de estas variantes incrementa el riesgo de sufrir adenomas y/o CCR de forma aditiva (Houlston et al., 2012; Cheng et al., 2015) (Figura 13). La proporción de predisposición genética que podría explicarse en base a estas variantes de riesgo se estima que es de, a lo sumo, un 10% del total. (Hemminki et al., 2008a; Hemminki et al., 2008b; Niittymäki et al., 2010; Dunlop et al., 2013)

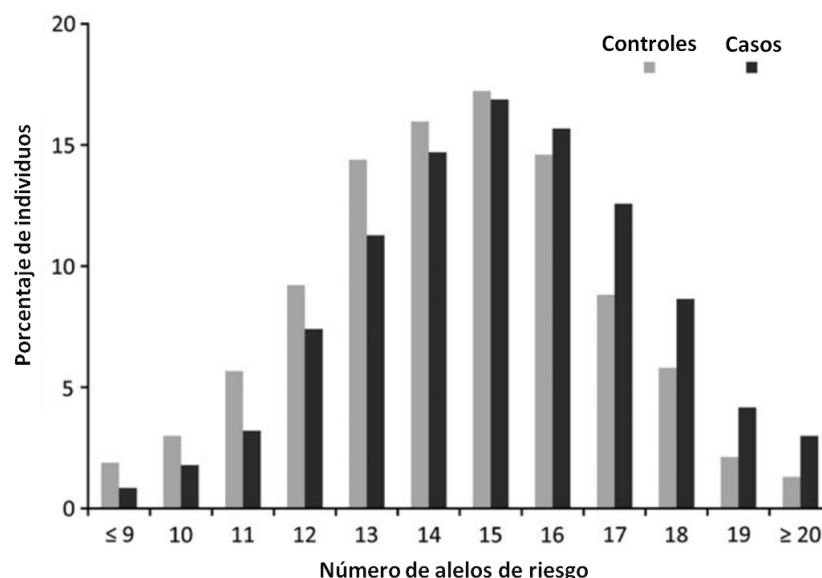


Figura 13. Distribución del número de alelos de riesgo en 14 polimorfismos de baja predisposición al CCR en afectados de este tipo de cáncer y en controles. Adaptado de Houlston et al., 2012.

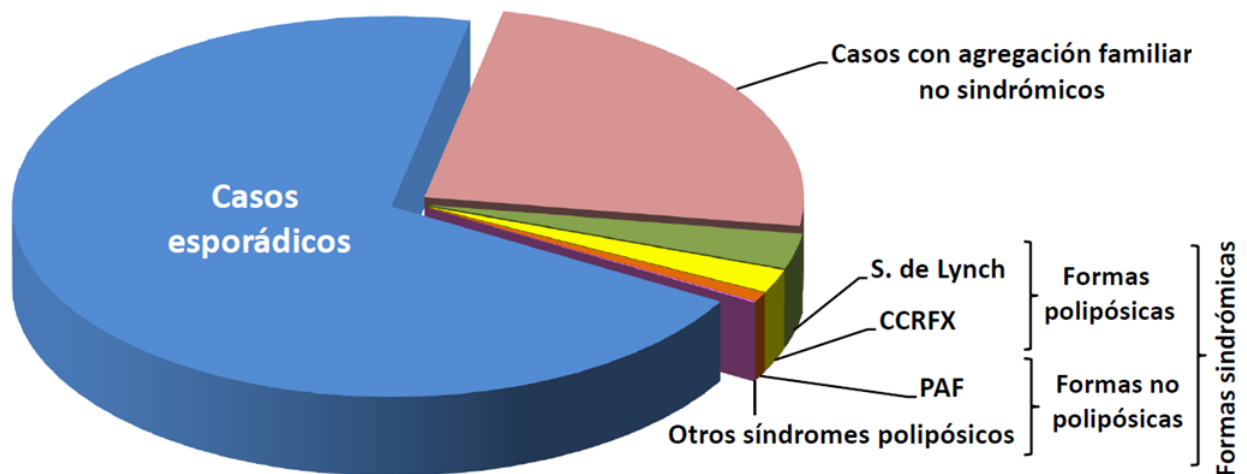
Tabla 5. Variantes identificadas en estudios GWAS asociadas a incrementos de riesgo al CCR. Se indican las asociaciones con valor de  $p < 1 \cdot 10^{-5}$  y efecto validado en al menos una serie caso-control independiente adicional.

Región	Genes o elementos testados	SNP	Odds Ratio	Estudio en el que se identificó
1q23.3	<i>C1orf110</i>	rs1912453	1,07	Peters et al, 2013
1q25.3	<i>LAMC1</i>	rs10911251	1,09	Peters et al, 2013
1q41	<i>DUSP10 - QRSL1P2</i>	rs6691170	1,06	Houlston et al., 2010
"	"	rs6687758	1,09	Houlston et al., 2010
2q32.3	<i>NABP1 - SDPR</i>	rs11903757	1,16	Peters et al, 2013
3p21.31	<i>KLHL18 - PTPN23</i>	rs8180040	1,28	Fernandez-Rozadilla et al., 2013
3p24.3	<i>SALL4P5 - RPL24P7</i>	rs4591517	1,06	Jiao et al., 2012
3q26.2	<i>MYNN</i>	rs10936599	1,04	Houlston et al., 2010
4q13.2	<i>RPS23P3 - CENPC</i>	rs17730929	1,47	Jiao et al., 2012
4q22.2	<i>ATOH1 - HMGB3P15</i>	rs13130787	1,09	Peters et al, 2013
5q21.3	<i>KRT18P42 - MAN2A1</i>	rs367615	1,35	Jiao et al., 2012
5q31.1	<i>C5orf66</i>	rs647161	1,11-1,17	Jia et al., 2013
6p21.2	<i>TRNAI25</i>	rs1321311	1,10	Dunlop et al., 2012
6q22.1	<i>DCBLD1</i>	rs2057314	1,08	Peters et al, 2013
6q25.3	<i>SLC22A3</i>	rs7758229	1,28	Cui et al., 2011
"	<i>SYNJ2</i>	rs9365723	1,27	Jiao et al., 2012
7p15.3	<i>SNRPCP19 - CYCS</i>	rs39453	1,28	Jiao et al., 2012
8p12	<i>DUSP4 - RPL17P33</i>	rs12548021	1,28	Fernandez-Rozadilla et al., 2013
8q22.1	<i>LOC100616530</i>	rs3104964	1,27	Fernandez-Rozadilla et al., 2013
8q23.3	<i>LINC00536 - EIF3H</i>	rs16892766	1,27	Tomlinson et al., 2008
"	"	"	1,24	Peters et al, 2012
8q24.21	<i>LOC101930033</i>	rs10505477	1,17	Zanke et al., 2007
"	"	rs7014346	1,19	Tenesa et al., 2008
"	<i>CCAT2; LOC101930033</i>	rs6983267	1,27	Tomlinson et al., 2007
"	"	"	1,24	Tomlinson et al., 2008
"	"	"	1,18	Cui et al., 2011
"	"	"	1,13	Peters et al, 2013
"	<i>GSDMC - FAM49B</i>	rs2128382	1,11	Peters et al, 2013
9q22.32	<i>MIR4291 - BARX1</i>	rs10114408	1,37	Jiao et al., 2012
10p14	<i>RNA5SP299 - LINC00709</i>	rs10795668	1,12	Tomlinson et al., 2008
10q25.3	<i>HSPA12A</i>	rs1665650	1,13	Jia et al., 2013
11q13.4	<i>POLD3</i>	rs3824999	1,08	Dunlop et al., 2012
11q23.1	<i>COLCA2; COLCA1</i>	rs3802842	1,11	Tenesa et al., 2008
"	"	"	1,14	Peters et al, 2012
"	"	"	1,11	Peters et al, 2013
12p13.32	<i>RPL18P9 - CCND2</i>	rs10774214	1,09-1,17	Jia et al., 2013
"	<i>CCND2</i>	rs3217810	1,20	Peters et al, 2013
"	"	rs3217901	1,10	Peters et al, 2013
12q13.12	<i>DIP2B - ATF1</i>	rs11169552	1,09	Houlston et al., 2010
12q21.1	<i>TPH2</i>	rs10879357	1,25	Jiao et al., 2012
12q24.21	<i>TBX3 - UBA52P7</i>	rs7315438	1,11	Peters et al, 2012
"	<i>TBX3</i>	rs59336	1,09	Peters et al, 2013
14q22.2	<i>RPS3AP46 - MIR5580</i>	rs4444235	1,11	Houlston et al., 2008
14q23.1	<i>DACT1 - RPL31P4</i>	rs17094983	1,13	Peters et al, 2013
15q13.3	<i>SCG5 - GREM1</i>	rs4779584	1,23	Tomlinson et al., 2008
"	"	"	1,18	Peters et al, 2012
"	"	"	1,12	Peters et al, 2013
16q22.1	<i>CDH1</i>	rs9929218	1,10	Houlston et al., 2008
18q21.1	<i>SMAD7</i>	rs4939827	1,16	Broderick et al., 2007
"	"	"	1,20	Tenesa et al., 2008
"	"	"	1,18	Tomlinson et al., 2008
"	"	"	1,14	Peters et al, 2012
"	"	"	1,12	Peters et al, 2013
"	"	rs7229639	1,22	Zhang et al., 2014
19q13.11	<i>RHPN2</i>	rs10411210	1,15	Houlston et al., 2008
20p12.3	<i>FGFR3P3 - CASC20</i>	rs961253	1,12	Houlston et al., 2008
"	<i>SRSF10P2</i>	rs2423279	1,10-1,14	Jia et al., 2013
"	<i>CASC20 - BMP2</i>	rs4813802	1,10	Peters et al, 2013
20q13.33	<i>LAMA5</i>	rs4925386	1,08	Houlston et al., 2010
Xp22.2	<i>GPR143 - SHROOM2</i>	rs5934683	1,07	Dunlop et al., 2012

**c. Herencia y agregación familiar en el CCR**

Más de dos tercios de los casos de CCR se dan en familias donde no existen antecedentes familiares de dicha enfermedad: A estos casos se les denomina CCR esporádicos. En este grupo, a la influencia de los factores genéticos se le atribuye un peso menor, mientras que es al efecto ambiental al que se asocia con la causa del CCR.

El CCR familiar implica la existencia de dos o más afectos en el núcleo familiar y suele ir ligado a la presencia de variantes que aportan un riesgo sustancial a desarrollar este tipo de cáncer. El CCR familiar representa un 20-35% de los casos totales de CCR (Lichtenstein et al., 2000), pero a día de hoy únicamente un 2-6% del total puede explicarse en base a mutaciones en genes de predisposición al CCR conocidos de alta penetrancia (Aaltonen et al., 2007; Valle et al., 2014a). Es decir, únicamente alrededor de un quinto de los casos de CCR familiar tienen una causa genética conocida. La fracción restante podría estar explicada en base a variantes de alta penetrancia todavía no identificadas, la acumulación de variantes de bajo y moderado riesgo, la influencia de factores ambientales y/o el azar, o la combinación de los factores anteriores. Por otro lado, la existencia de multitud de variantes que aportan variables incrementos de susceptibilidad al CCR hace que la frontera entre los tipos esporádico y familiar no pueda ser bien establecida desde el punto de vista genético. Sin embargo, en base a la agregación, fenotipo y causa genética conocida del CCR, éste se ha clasificado según se recoge en la Figura 14.



**Figura 14. Clasificación y frecuencia de los casos de CCR según la agregación familiar y/o pertenencia a una forma sindrómica.** Abreviaturas: S, síndrome; CCRFX, CCR familiar de tipo X; PAF, poliposis adenomatosa familiar.

Los casos de CCR hereditario se encuadran en su mayoría dentro de formas sindrómicas de cáncer con un fenotipo determinado y una causa genética identificada. Además, se ha definido la entidad del cáncer colorrectal familiar de tipo X (CCRFx), en la que agrupa a todos casos de CCR hereditario no polipósico

sin fallos germinales en el sistema de reparación de bases desapareadas y cuya causa genética de la predisposición al CCR es desconocida (ver capítulo 8).

Las formas sindrómicas o entidades en las que se engloba el CCR hereditario se clasifican inicialmente en base a su fenotipo polipósico o no polipósico:

**~ Formas polipósicas:**

- Poliposis adenomatosas:
  - Poliposis adenomatosa familiar.
  - Poliposis adenomatosa familiar atenuada.
- Poliposis asociada a *MUTYH*
- Síndrome asociado a la actividad reparadora de la polimerasa.
- Poliposis hereditaria mixta.
- Poliposis hamartomatosas:
  - Síndrome de Peutz-Jeghers.
  - Poliposis juvenil
  - Síndrome hamartoma-tumor por mutaciones en *PTEN*.

**~ Formas no polipósicas:**

- Síndrome de Lynch
- Cáncer colorrectal familiar de tipo X (Única entidad de CCR hereditario no sindrómica).

Una descripción detallada de cada entidad sindrómica puede encontrarse en las secciones 5 –Formas polipósicas–, 6 –Síndrome de Lynch– y 7 –CCR familiar tipo X–.

### 5. Síndromes del CCR hereditario polipósico

#### a. Poliposis adenomatosa familiar causada por mutaciones en *APC*:

La poliposis adenomatosa familiar (PAF) (MIM N°:175100) es una forma sindrómica hereditaria de CCR que conlleva la aparición de numerosos pólipos en el epitelio del intestino grueso a partir de la primera década de vida (Jasperson et al., 1998). Supone la segunda forma sindrómica hereditaria de CCR más frecuente tras el síndrome de Lynch (0,2 – 1% del total de CCR diagnosticados), con una prevalencia de 2,3-3,2 individuos afectados por 100.000. A pesar de que los pólipos generados son inicialmente benignos, su progresiva transformación hace inevitable que alguno de ellos malignice hasta generar un CCR. Para la década de los 40-50 años de edad, la penetrancia del CCR en pacientes con PAF que no han recibido intervenciones profilácticas es prácticamente total (Half et al., 2009).

La forma de PAF clásica se caracteriza por un fenotipo muy agresivo, en el que el número de pólipos desarrollados supera el centenar, llegando incluso hasta varios miles. Existe además una forma de PAF atenuada, en la que el número de pólipos es menor a 100 (generalmente en torno a 30) y apareciendo además de forma más tardía (de media los 44 años). Sin embargo, la malignización también es frecuente (generalmente 10-15 años después de la aparición de los pólipos), con un riesgo estimado de CCR a lo largo de la vida del 70%. Es importante destacar que el cuadro clínico de la PAF también incluye el potencial desarrollo de pólipos en el duodeno y en el estómago (con posibilidad de malignización posterior), de cáncer periampular o de hipertrofia del epitelio pigmentario de la retina, entre otros (Revisado por Valle, 2014a).

La causa genética de la PAF es la presencia de mutaciones germinales en uno de los alelos del gen *APC*, de manera que la formación del adenoma lo marcará una segunda mutación inactivante en el alelo salvaje del gen. Será en los años posteriores cuando la aparición de nuevas mutaciones en genes clave transforme progresivamente el adenoma en un carcinoma. Aproximadamente en el 80% de los pacientes que siguen una manifestación clínica de PAF clásica se identifican mutaciones truncantes en *APC*. Por el contrario, menos del 30% de los pacientes con fenotipo de PAF atenuada portan algún tipo de mutación en dicho gen (revisado por Pineda et al., 2010). Hasta el 15-20% de los casos de PAF tienen un origen mutacional considerado *de novo* (Bisgaard et al., 1994), y en uno de cada cinco de estos casos se ha observado mosaicismo, lo que indicaría un origen somático en fase primigenia (Hes et al., 2008).

#### b. Poliposis asociada a *MUTYH*.

La manifestación clínica más relevante de la poliposis asociada a *MUTYH* (PAM) consiste en la presencia de numerosos pólipos colónicos (10-100) que se manifiestan alrededor de la edad de 50 años (Farrington et al., 2005; Cleary et al., 2009; Nielsen et al., 2009a., Morak et al., 2010; Out et al., 2010). Esto implica un aumento de riesgo sustancial a desarrollar CCR que va desde el 43% hasta casi el 100% en ausencia de vigilancia (Sampson et al., 2003; Gismondi et al., 2004; Farrington et al.,

2005; Yamaguchi et al., 2014). Además, la PAM conlleva un riesgo del 4% de padecer cáncer duodenal, incrementos más moderados de sufrir otras neoplasias y otras complicaciones adicionales (Sieber et al., 2003; Ponti et al., 2005; Aretz et al., 2006; Nielsen et al., 2006; Vogt et al., 2009).

La poliposis asociada a *MUTYH* es el único síndrome polipósico que sigue un patrón de herencia recesivo, manifestándose generalmente en una única generación de la familia afectada. Por ello, alrededor de dos tercios de los pacientes conocen su condición de PAM tras padecer un CCR sin haber accedido a un programa de seguimiento preventivo (Nielsen et al., 2011; Grover et al., 2012). La clínica de la PAM es muy heterogénea y presenta numerosos puntos en común con otros síndromes polipósicos. Esto también dificulta la identificación de las familias portadoras. Los criterios para considerar a un paciente como sospechoso de padecer PAM, de cara a realizar un análisis genético se describen en la Tabla 6.

**Tabla 6. Condiciones clínicas para el estudio genético de *MUTYH*.** Sólo es necesario el cumplimiento de una de las condiciones. Extraído de Genereviewers (Brand et al., 2012)

- a) Uno a diez adenomas desarrollados antes de los 40 años de edad.
- b) Presencia de 10 a cientos de adenomas colónicos y/o pólipos hiperplásicos.
- c) Poliposis colónica sin mutaciones germinales en *APC*.
- d) CCR con mutación somática en *KRAS* en la posición c.34G>T
- e) Historia familiar de CCR compatible con un patrón de herencia recesivo.

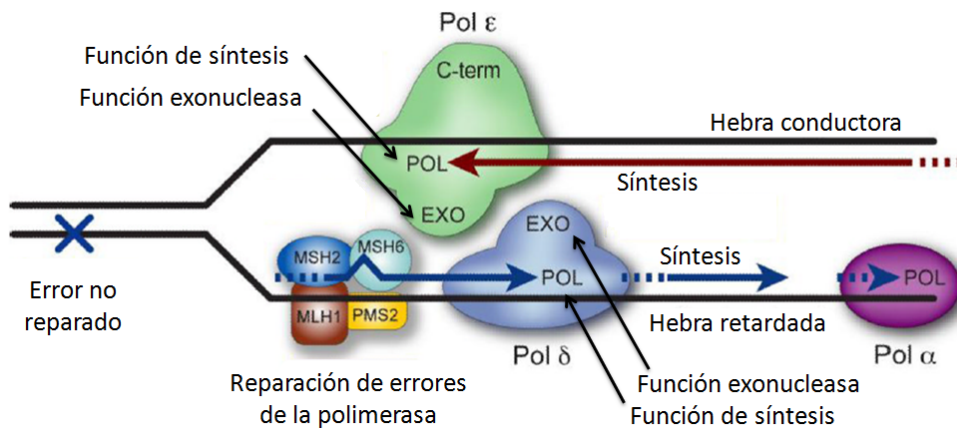
La causa genética de este síndrome es la presencia de mutaciones bialélicas en el gen *MUTYH*, el cual codifica la enzima glicosilasa MYH. En condiciones fisiológicas normales, el oxígeno es capaz de alterar químicamente a la guanina, provocando que ésta pueda emparejarse erróneamente con la adenina y no con la citosina. La glicosilasa MYH corrige estos errores mediante el sistema de escisión de bases, evitando su fijación. La ausencia de esta enzima conlleva inevitablemente a un aumento de transversiones G:C a T:A. El aumento de la tasa mutacional ligado a este síndrome eleva notoriamente la probabilidad de alterar genes que puedan desencadenar el inicio de la progresión tumoral. Por ejemplo, es muy típica la transversión c.34G>T en el codón 12 de *KRAS*, que se encuentra en el 64% de los CCR analizados y que supone la transformación oncogénica del gen (Nielsen et al., 2009a).

Es importante destacar que la mayoría de los casos de PAM identificados en Europa occidental están causados por dos mutaciones recurrentes concretas: c.536A>G (p.Tyr179Cys) en el exón 7 y c.1187G>A (p.Gly396Asp) en el exón 13. Estas mutaciones pueden encontrarse bien de forma individual o combinada en un 1-2% de la población general (Al-Tassan et al., 2002; Cleary et al., 2009; Nielsen et al., 2009b). Del mismo modo, múltiples variantes deletéreas recurrentes *propias* han sido identificadas en otras regiones geográficas del mundo (Lejbkovicz et al., 2012; Pin et al., 2013; Aretz et al., 2014). Por ejemplo, en España y otros países mediterráneos, el cambio c.1227\_1228dup (p.Glu410Glyfs\*43) ha sido identificado en varias familias afectas de PAM (Gomez-Fernandez et al., 2009; Abdelmaksoud-Dammak et al., 2012).

**c. Síndrome asociado a la actividad reparadora de la polimerasa.**

El síndrome asociado a la actividad reparadora de la polimerasa (SAARP) conlleva un incremento de riesgo a padecer CCR y pólipos adenomatosos. Existe una gran variabilidad en la manifestación de este síndrome a nivel colorrectal: algunos casos muestran un número variable de pólipos que recuerdan a la PAF atenuada o a la PAM, mientras que en otras ocasiones hay CCR a edades tempranas en ausencia de poliposis, asemejándose al fenotipo propio del síndrome de Lynch. Además, las portadoras de mutaciones en *POLD1* tienen un riesgo adicional de desarrollar cáncer de endometrio. Otros tipos de cáncer han sido identificados ocasionalmente en portadores, aunque no existen evidencias que puedan relacionarlos de forma directa con el SAARP (Palles et al., 2013; Valle et al., 2014b; Elsayed et al., 2014; Spier et al., 2014). El reciente descubrimiento del impacto de estas mutaciones en la susceptibilidad al CCR hace que no exista un criterio bien definido que resuma una serie de fenotipos asociados a la presencia de estas variantes. Si bien la presencia de numerosos pólipos en familias sin mutaciones germinales en *APC*, *MUTYH* o los genes MMR pueden sugerir un grupo candidato a padecer SAARP –y también si hay casos de cáncer de endometrio en la familia, indicativo de una sospecha de mutaciones en *POLD1*–, todavía es necesaria la identificación de más familias afectas por esta mutación para a poder establecer con más claridad un fenotipo común.

La causa de la SAARP es la presencia de mutaciones en el dominio exonucleasa de los genes *POLE* y *POLD1*, los cuales codifican las subunidades catalíticas de las polimerasas  $\epsilon$  y  $\delta$  (Pol  $\epsilon$  y Pol  $\delta$ ). Las polimerasas  $\alpha$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$  llevan a cabo de manera mayoritaria la replicación del ADN nuclear (Figura 15). Pol  $\alpha$  genera un pequeño fragmento de unos 20 nucleótidos que Pol  $\epsilon$  y Pol  $\delta$  utilizan para continuar la síntesis de la cadena principal y retardada respectivamente (Byrnes et al., 1976; Shcherbakova et al., 1996; Syvaoja et al., 1990; Shcherbakova et al., 2003; Pursell et al., 2007). Pol  $\epsilon$  y Pol  $\delta$  poseen capacidad exonucleasa, de manera que son capaces de reconocer y corregir aquellas bases incorporadas erróneamente tras el proceso de elongación. Esto permite reducir su tasa de error cien veces, hasta únicamente  $\sim 10^{-9}$  fallos por nucleótido (Reha-Krantz et al., 2010). Además, la región c-terminal de Pol  $\epsilon$  ejerce una función de “punto de control” antes de comenzar la anafase (Edwards et al., 2003).



**Figura 15. Mecanismo de amplificación del ADN y reparación de errores asociados a fallos de la polimerasa.** Modificado de Preston et al., 2010.

Hasta la fecha, las mutaciones *POLE* p.Leu424Val, *POLD1* p.Ser478Asn y *POLD1* p.Leu474Pro, –todas ellas en situadas en el dominio exonucleasa– han sido identificadas como causa de SAARP. (Palles et al., 2013; Valle et al., 2014b; Elsayed et al., 2014; Spier et al., 2014). Otras mutaciones en estos genes encontradas en pacientes con poliposis y/o CCR y también situadas en este dominio o en posiciones cercanas han sido sugeridas como potencial causa de SAARP.

Por otro lado, el análisis genético de los tumores desarrollados en este contexto muestra una alta hipermutabilidad, con alrededor de 5000 sustituciones de base en zona codificante por genoma, destacando la presencia de transversiones A:T>C:G y G:C>T:A. También se han identificado algunos casos –con mutación germinal en *POLE* Leu424Val– que muestran IMS además de la hipermutabilidad, como consecuencia de la inactivación por mutaciones somáticas de un gen del sistema reparador de errores de la polimerasa (Elsayed et al., 2014; Briggs y Tomlinson., 2013).

#### **d. Poliposis hereditaria mixta.**

La poliposis hereditaria mixta (Nº MIM 601228) constituye una forma sindrómica de penetrancia variable en la que se incluye el desarrollo de pólipos de diferente naturaleza: pólipos hiperplásticos, de tipo Peutz-Jeghers, serrados, juveniles y también adenomas. El CCR ocurre además en una alta proporción de familias afectas (Jaeger et al., 2012; Whitelaw et al., 1997).

Varios estudios han intentado identificar la causa genética de este síndrome, aunque por ahora sólo algunas familias han podido explicarse en base a mutaciones concretas. Estudios de número de copia identificaron en la región 15q13.3 la duplicación de un fragmento de unos 40 Kb que cosegregaba con la enfermedad (Tomlinson et al., 1999; Jaeger et al., 2003; Jaeger et al., 2008; Jaeger et al., 2012). Esta duplicación situada entre los genes *SCG5* y *GREM1* era responsable de un incremento en la transcripción del gen *GREM1* (Jaeger et al., 2012). El gen *GREM1* tiene funciones inhibitorias sobre proteínas de tipo BMP, cuya consecuencia final es la producción de factores que favorecen el crecimiento celular (Sneddon et al., 2006). A pesar de lo revelador del descubrimiento, ninguna familia no Askenazi afecta de poliposis hereditaria mixta ha podido ser descrita portando esta duplicación.

#### **e. Poliposis hamartomatosas:**

Bajo el concepto de poliposis hamartomatosas se incluyen un conjunto de síndromes de herencia dominante y muy infrecuentes, en los que existe predisposición a desarrollar pólipos hamartomatosos en el tracto gastrointestinal. Además, existen otras manifestaciones clínicas como la presencia de rasgos dismórficos o un mayor riesgo de sufrir cánceres extra-intestinales. La gran variabilidad de rasgos clínicos existentes en el grupo y la relativa frecuencia de casos causados por mutaciones *de novo* hacen que el diagnóstico sea a veces complicado. Los síndromes clínicos incluidos en este grupo son:



♦ **La poliposis juvenil** (Nº MIM 174900) es la forma sindrómica más frecuente dentro del grupo, con una incidencia estimada de 1 caso por cada 100.000-160.000 individuos (Latchford et al., 2012). Suele conllevar la aparición de 1 a 100 pólipos juveniles en el tracto gastrointestinal (principalmente intestino grueso, también en intestino delgado y estómago) y los síntomas aparecen generalmente en la primera o segunda década de vida (Manfredi et al., 2010). El riesgo de cáncer se sitúa alrededor del 38% para el CCR y 21% para el cáncer de tracto gastrointestinal superior (Howe et al., 1998; Brosens et al., 2007). Algunos casos de cáncer de páncreas e intestino delgado también han sido identificados y asociados con esta etiología (Howe et al., 1998; Walpole et al., 1989, Gatalica et al., 2008). Entre los pacientes que cumplen los criterios clínicos de la enfermedad (Jass et al., 1988) en un 20-30% pueden detectarse mutaciones en *BMPR1A*, y en una proporción similar en *SMAD4*. Ambos genes participan en la vía de señalización de TGF- $\beta$  (Sayed et al., 2002; Howe et al., 2004).

♦ **El síndrome de Peutz-Jeghers** (Nº MIM 175200), con una frecuencia de 1 caso cada 8.300-200.000 individuos (van Lier et al., 2010) se caracteriza por la presencia de poliposis hamartomatosa gastrointestinal y zonas de pigmentación oscura alrededor de la boca. Además, conlleva un aumento de riesgo de cáncer que afecta no sólo a tejidos del tracto digestivo como el colon, estómago o intestino delgado, sino también a otros como el útero, ovario, testículos o mama, entre otros (Boardman et al., 1988; Choi et al., 2000; Lim et al., 2004; Hearle et al., 2006). El 100% de los pacientes afectados por este síndrome son portadores de mutaciones identificables en el gen *STK11*, que codifica para una serina-treonina quinasa (Hemminki et al., 1998; Jenne et al., 1998; Krusse et al., 1999; Aretz et al., 2005).

♦ **El Síndrome hamartoma-tumor por mutaciones en *PTEN*** (Nº MIM 601728), comprende a su vez los síndromes clínicos de Cowden, Bannayan-Riley-Ruvalcaba, Proteus y Proteus-like. Este conjunto de síndromes conllevan manifestaciones clínicas diversas, en ocasiones solapantes, incluyendo la macrocefalia, retraso en el crecimiento, múltiples neoplasias (Mester et al., 2013), o incluso autismo (Goffin et al., 2001; Herman et al., 2007; Orrico et al., 2009; Varga et al., 2009). Los síndromes de Cowden y Bannayan-Riley-Ruvalcaba se asocian a mutaciones germinales en *PTEN*, –pudiéndose identificar en un 60-80% de casos (Uppal et al., 2007; Marsh et al., 1998a; Marsh et al., 1998b)–, mientras que las formas Proteus y Proteus-like se han relacionado además con alteraciones en *AKT1* (Lindhurst et al., 2011; Jelsig et al., 2014). De manera general, se han establecido riesgos a desarrollar diferentes tipos de cáncer para pacientes con mutaciones germinales en *PTEN* que se sitúan en un 85,2% en mama para mujeres, 35,2% en tiroides (OR de 199,5 en hombres y 43,2 en mujeres), 33,6% en riñón, 28,2% en endometrio, 9% en colon y recto, además de un 6% de riesgo de padecer melanoma (Tan et al., 2012, Bubien et al., 2013). No existe realmente una correlación clara entre el fenotipo-genotipo (Tan et al., 2011), siendo incluso la variabilidad intrafamiliar muy acentuada (Lachlan et al., 2007).

## 6. Síndromes de CCR hereditario no polipósico I: El síndrome de Lynch.

El síndrome de Lynch (SL) (Nº MIM 120435) es el síndrome hereditario de susceptibilidad al cáncer colorrectal con mayor incidencia, explicando en torno a un 2-3% de todos los casos de CCR (Hampel et al., 2008). El SL incrementa además el riesgo a desarrollar otros tipos de cáncer extracolónicos (Umar et al., 2004; Win et al., 2012), y de padecer cáncer CCR sincrónico y metacrónico (Win et al., 2013a; Parry et al., 2011). Sin embargo, a diferencia de los síndromes de CCR anteriormente expuestos, en el SL no existe un riesgo adicional a desarrollar poliposis. La causa molecular del SL es el incorrecto funcionamiento del sistema de reparación de bases desapareadas (MMR, del inglés *mismatch repair*) debido a alteraciones en los genes que llevan a cabo esta función. Esto acarrea la incapacidad de corregir muchos de los errores que se producen en el ADN nuclear. Al igual que sucede en otros síndromes de susceptibilidad por fallos en la reparación del ADN, la acumulación de mutaciones no corregidas aumentará notablemente la probabilidad de alterar genes supresores de tumores o de activar oncogenes, favoreciéndose así el desarrollo de cáncer. El patrón de herencia del SL es autosómico dominante, con una penetrancia altamente variable para el CCR.

### a. Características clínicas del SL

Las manifestaciones clínicas del SL son diversas, solapándose con rasgos también presentes en cánceres esporádicos u otras formas sindrómicas (Watson et al., 2008; Barrow et al., 2009; Koornstra et al., 2009; Lynch et al., 2009). Las características clínicas más relevantes asociadas al SL pueden verse en la Tabla 7 (Adaptado de Lynch et al., 2009)

**Tabla 7. Características clínicas de mayor relevancia asociadas al síndrome de Lynch.** Adaptado de Lynch et al., 2009.

1. Elevado riesgo de desarrollar CCR: Incidencia hasta del 70% a los 70 años y del 80% a los 85 años.
2. Patrón de herencia dominante
3. Edad temprana de aparición de CCR: Edad media de 45 años frente a 69 en población general.
4. Mayor frecuencia (70%) de desarrollar CCR en el colon proximal.
5. Carcinogénesis acelerada: La transformación epitelio-mesénquima suele darse en 2-3 años (frente a 8-10 años en la población general).
6. Elevado riesgo de CCR adicionales (sincrónicos o metacrónicos): 25-30% de reincidencia de CCR a los diez años.
7. Riesgo incrementado de tumores extracolónicos: endometrio (27-71%), ovario (3-15%), estómago (2-30%), intestino delgado (2-8%), tracto hepatobiliar y páncreas (2-18%), tracto urinario (1-28%), cerebro (1-4%), piel (4%) y otros adenomas.
8. Los tumores de CCR suelen ser poco diferenciados, presentar exceso de células mucosas y en anillo, además de darse con frecuencia la reacción linfoide de tipo Crohn.
9. Mayor supervivencia al CCR respecto a los casos esporádicos.

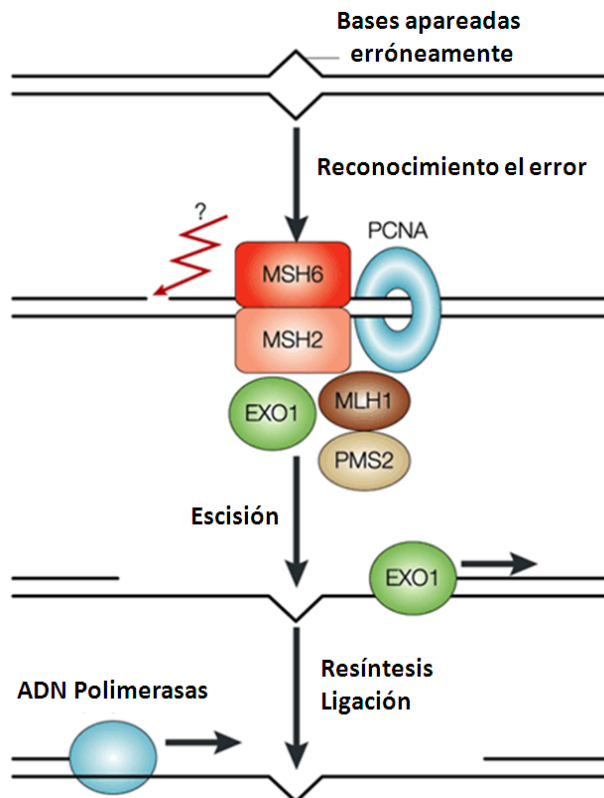
Mientras que la Tabla 7 recoge los rasgos fenotípicos generales del SL, se han definido además dos variantes clínicas de este síndrome en base a particularidades fenotípicas y/o genotípicas de ciertos pacientes:

- ♦ El **síndrome Muir-Torre** (Nº MIM 158320) se caracteriza por el desarrollo de tumores sebáceos, incluyendo adenomas, epitelomas y carcinomas. Los carcinomas más frecuentes en este grupo de pacientes son el CCR y los tumores genitourinarios (Schwartz y Torre, 1995; Bhaijee et al., 2014)

- ♦ El **síndrome de Turcot tipo 1** (Nº MIM 276300), en inglés *Mismatch Repair Deficiency syndrome*, agrupa a todos los casos en los que existe un defecto heredado en ambos alelos de los genes responsables del SL *general* (en el que sólo un alelo se encuentra alterado de forma germinal). Su fenotipo es muy agresivo; el CCR aparece a edades muy tempranas y la incidencia de tumores cerebrales es muy elevada. Además, se dan manifestaciones propias de la neurofibromatosis tipo I como manchas *café con leche*, nódulos de Lisch en los ojos y neurofibromas, entre otras. (Turcot et al., 1959, Hamilton et al., 1995, Ostergaard et al., 2005; Wimmer et al., 2008; Wimmer et al., 2014).

**b. Causas genéticas del Síndrome de Lynch:**

La característica molecular que define a todos los pacientes con SL es el fallo germinal en alguno de los siguientes genes implicados en el sistema MMR: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*. El funcionamiento del sistema MMR se explica en la Figura 16.



**Figura 16. Mecanismo de reparación del sistema MMR.** El sistema MMR se compone de diversas proteínas con funciones complementarias. Algunas de estas proteínas se combinan formando diferentes heterodímeros que realizan funciones específicas: Las proteínas implicadas en el SL, MSH2 y MSH6 se unen a emparejamientos erróneos de una sola base formando un complejo, al que posteriormente se suman MLH1 y PMS2 junto a la exonucleasa EXO1. Esta exonucleasa elimina el cambio erróneo y la región colindante. Finalmente la proteína PCNA facilita la actuación de la ADN polimerasa en la hebra corregida para sintetizar la región suprimida. Modificado de Martin y Scharff, 2002.

El sistema de reparación MMR es un mecanismo celular encargado de reconocer y reparar determinados errores en el ADN, incluyendo inserciones, deleciones e incorporaciones erróneas de base. Estos cambios pueden surgir como consecuencia de daño en el ADN, producto de la recombinación o por no haber sido reparado por los sistemas de reconocimiento de errores de las polimerasas durante la replicación (Iyer et al., 2006; Larrea et al., 2010).

La mayoría de los casos de SL se deben a mutaciones en los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* que alteran el correcto funcionamiento de las proteínas. En alrededor de la mitad de los casos de SL, el gen mutado de forma germinal es *MSH2*, mientras que en el 30-40% lo es *MLH1*. *MSH6* concentra un 7-10% de las mutaciones y *PMS2* una proporción inferior al 5% del total. En estos dos últimos casos, la penetrancia del cáncer es menor y la edad de aparición de la enfermedad es más tardía (Miyaki et al., 1997; Senter et al., 2008; Ten Broeke et al., 2015). Estas frecuencias varían según la zona geográfica en función de las mutaciones fundadoras propias de cada región (revisado por Ponti et al., 2014). Es importante destacar además, la presencia de variantes hipomórficas, las cuales reducen parcialmente la actividad de la proteína generada sin llegar a anular por completo su función (Renkonen et al., 2003). La aparición de mutaciones *de novo* también se ha reportado como mecanismo causal de SL, existiendo también mutaciones fundadoras y/o recurrentes (Desai et al., 2000).

Existe también una proporción de casos cercana al 1-3% en el que determinadas deleciones afectando al gen *EPCAM* conllevan un silenciamiento epigenético de *MSH2* en tejidos donde el gen *EPCAM* se expresa de forma constitutiva (Niessen et al., 2009; Tutlewska et al., 2013, Kuiper et al., 2011). Por último, la hipermetilación constitutiva de las islas CpG de *MLH1*, también se ha descrito como mecanismo causal de SL, ya que provoca la pérdida de expresión de la proteína, en este caso sin ninguna mutación genética identificable asociada (Valle et al., 2007a; Hitchins et al., 2013; Ward et al., 2013).

Es importante destacar que la pérdida alélica germinal propia del SL no es causa de la pérdida de función del sistema MMR. Sin embargo, de acuerdo a la hipótesis de Knudson, es la causa de predisposición a esa misma pérdida (Knudson, 1971), puesto que sólo restará un evento inactivante en el alelo salvaje para provocar dicha incapacidad.

### **c. Criterios de selección y cribado molecular en el diagnóstico del SL**

Debido a la alta penetrancia del SL, la identificación de familias afectas es clave de cara a aplicar un protocolo de vigilancia preventivo (Järvinen et al., 2009; Palomaki et al., 2009; Stupart et al., 2009). Sin embargo, el amplio espectro clínico del SL dificulta la capacidad de discriminación entre dicho síndrome y otras formas de cáncer. Con la intención de establecer una serie de pautas que permitiesen identificar a aquellas familias susceptibles de padecer SL, un grupo internacional de expertos en el estudio del cáncer hereditario no polipósico establecieron en 1990 los denominados "Criterios de Amsterdam",

centrados en el CCR como criterio de selección (Vasen et al., 1991) (Tabla 9). Debido al incremento de riesgo a cáncer que el SL también implica en determinados tejidos extracolónicos, estos criterios fueron revisados para incluir dicha predisposición –Criterios de Amsterdam II– (Park et al., 1999) (Tabla 8). La baja sensibilidad obtenida con este sistema (Hampel et al., 2005; Sjursen et al., 2010), motivó la creación de un nuevo criterio de selección que se recogió en las guías de Bethesda (La forma revisada de este nuevo sistema (Umar et al., 2004) puede verse en la Tabla 9) Mediante la aplicación estas guías, se estima que más del 90% de las familias con SL pueden ser identificadas como tal, aunque a costa de disminuir notoriamente la especificidad (Laghi et al., 2004).

**Tabla 8. Criterios de Amsterdam I y II.** Todos los requerimientos deben cumplirse.

<b>CRITERIOS DE AMSTERDAM I</b>	
1.	Tres o más miembros de la familia han sido diagnosticados con CCR.
2.	Al menos uno de los afectos debe ser pariente de primer grado de los otros dos.
3.	Al menos dos generaciones deben estar afectadas.
4.	Al menos uno de los pacientes debe haber sido diagnosticado de CCR antes de los 50 años.
5.	Las poliposis adenomatosas familiares deben de ser descartadas.
<b>CRITERIOS DE AMSTERDAM II</b>	
1.	Tres o más miembros de la familia han sido diagnosticados con un cáncer asociado al CCHNP.
2.	Al menos uno de los afectos debe ser pariente de primer grado de los otros dos.
3.	Al menos dos generaciones deben estar afectadas.
4.	Al menos uno de los pacientes debe haber sido diagnosticado de CCR antes de los 50 años.
5.	Las poliposis adenomatosas familiares deben de ser descartadas.

Cáncer asociado a CCHNP: colon, recto, endometrio, intestino delgado, uréter o pelvis renal.  
Abreviaturas: CCHNP, CCR hereditario no polipósico.

**Tabla 9. Criterios de Bethesda revisados.** Debe cumplirse al menos uno de los siguientes requerimientos.

<b>CRITERIOS DE BETHESDA (REVISADOS)</b>	
1.	CCR diagnosticado antes de los 50 años de edad.
2.	El diagnóstico de cáncer sincrónico o metacrónico de cánceres asociado al CCHNP.
3.	CCR con IMS diagnosticado antes de los 60 años de edad.
4.	Diagnóstico de CCR cuando existe al menos un familiar diagnosticado de CCR u otro tipo de cáncer asociado al CCHNP antes de los 50 años de edad.
5.	Diagnóstico de CCR cuando existen dos o más familiares de primer o segundo grado que han sido diagnosticados de CCR u otro cáncer asociado al CCHNP.

Cáncer asociado a CCHNP: colon, recto, endometrio, intestino delgado, uréter o pelvis renal.  
Abreviaturas: CCHNP, CCR hereditario no polipósico.

De manera clásica, el análisis de la capacidad MMR es la primera prueba que debe realizarse ante la sospecha de SL (Boland et al., 1998), para lo cual se realiza una amplificación mediante PCR de varios marcadores de microsatélites. El resultado positivo del análisis para la IMS es indicativo de la incapacidad reparadora. Tras ello, debe realizarse una reacción de inmunohistoquímica (IHQ) para analizar la expresión de las proteínas MMR. Un resultado negativo para el dímero MLH1-PMS2, puede complementarse además con un test de metilación para el promotor de *MLH1* (o de la mutación V600E para *BRAF*, ligada a este fenotipo) (Parsons et al., 2012). Así se podrán acotar aquellos casos no ligados a mutaciones germinales en *MLH1*. La ausencia de proteína sin metilación en *MLH1* conduce al test genético de secuenciación de los genes *MLH1* y *MSH2*. Por otro lado, la IHQ negativa para el dímero MSH2-MSH6 conduce directamente a la secuenciación los dos genes que las codifican. Según el resultado de la secuenciación, se diagnosticará al paciente como Lynch (mutación patogénica localizada) o Lynch-like (sin mutación patogénica localizada) (Rodríguez-Soler et al., 2013). La forma Lynch-like comparte características clínicas y tumorales prácticamente idénticas a las del SL, aunque el riesgo de padecer un cáncer asociado a SL es menor. (Revisado por Carethers et al., 2014).

La mayor accesibilidad actual a los medios de diagnóstico hace que actualmente se esté promoviendo el análisis universal de todos aquellos tumores asociados a SL dados en pacientes no testados previamente para el SL (Mange et al., 2014; Mills et al., 2014; Teutsch, 2009; Moline et al., 2013). La aplicación de esta estrategia supone numerosos beneficios a nivel clínico y también en la investigación. Sin embargo, también aumenta el número de pacientes en los que no se encuentre la causa genética que explique la pérdida la capacidad MMR (Hampel et al., 2008; Resnick et al., 2009; de la Chapelle et al., 2009; Moreira et al., 2012; Heald et al., 2013; Ward et al., 2013b). Un meta-análisis reciente ha calculado en que alrededor de un 52-59% de los tumores de colon y endometrio con IMS acaban por clasificarse como Lynch-Like (Buchanan et al., 2014; Rodríguez-Soler et al., 2013).

#### **d. Vigilancia y profilaxis en el SL:**

La identificación de familias con SL tiene como objetivo poder dotar a los individuos en riesgo de medidas preventivas que minimicen la probabilidad de desarrollar tumores malignos. El seguimiento preventivo se basa en la aplicación periódica de pruebas diagnósticas adecuadas al riesgo de cada paciente. Debido al temprano desarrollo del CCR en el SL y a su rápida progresión, la estrategia generalizada incluye colonoscopias anuales o bi-anuales a partir de los 25 años de edad (Vasen et al., 2013; Lindor et al., 2006; Stupart et al., 2009), o diez años antes de la edad del primer cáncer desarrollado en la familia. Sin embargo, debido al fenotipo menos agresivo de los pacientes portadores de mutaciones en *MSH6* y *PMS2*, se ha propuesto retrasar la edad de inicio de las colonoscopias hasta los 30 años (Bonadona et al., 2011; Senter et al., 2008).

Este sistema ha demostrado un elevado aumento en las tasas de supervivencia de los pacientes con SL (Stupart et al., 2009; Javirnen et al., 2009). Las estrategias de seguimiento en tejidos extracolónicos están poco definidas y apenas son aplicadas. En el caso del riesgo a cáncer de endometrio, las

pacientes afectas de SL deben prestar atención a la aparición de dolor y sangrados uterinos anómalos. Existe la propuesta de realizar biopsias endometriales anualmente a partir de los 30-35 años (o 5-10 años antes del primer caso en la familia) (Lindor et al., 2006; Lu et al., 2013).

La cirugía como medida profiláctica o preventiva es la otra gran estrategia de minimización de riesgos en el SL. La colectomía total o parcial es una alternativa frecuentemente hace unas décadas. Sin embargo, es cada vez menos aplicada debido a la disminución en la calidad de vida que lleva asociada. (Haanstra et al., 2012; Rodriguez-Bigas et al., 2013). La extirpación del útero y los ovarios, por otro lado, es una medida totalmente recomendada para pacientes con SL que ya han completado su vida reproductiva (Schmeler et al., 2006).

### **e. Modificadores de riesgo en el SL**

A pesar de que existe un rasgo común definido en el SL: el fallo germinal heterocigoto en uno de los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* del sistema MMR, el riesgo estimado de padecer un cáncer asociado al SL varía desde el 20% hasta el 80% según estudios (Dunlop et al., 1997; Aaltonen et al., 1998; DeFrancisco et al., 2003; Quehenberger et al., 2005; Jenkins et al., 2006; Alarcon et al., 2007; Choi et al., 2009; Bonadona et al., 2011). Parte de la variabilidad puede deberse, inequívocamente a la presencia de cuatro genes diferentes implicados en el SL, o a la diversidad del impacto causado por cada mutación. Sin embargo, también existen grandes diferencias en la manifestación de la enfermedad entre individuos pertenecientes a una misma familia, y también entre familias diferentes que son portadoras de una misma mutación germinal causante del SL (Lynch et al., 1993; Scott et al., 2001; Rebbeck et al., 2004). Esta variabilidad se explicaría en base al conjunto de variantes genómicas del paciente, a todas las circunstancias ambientales que lo rodean, y a su vez a la interacción de todas ellas. A día de hoy, los estudios disponibles sobre la modificación de riesgo en el SL se centran en el estudio de variantes en aquellos genes que por función, o por haber sido asociados previamente con riesgo a desarrollar un cáncer asociado a SL, pueden resultar de interés (revisado por Talseth-Palmer et al., 2013). Éstos pueden englobarse en diferentes funciones celulares:

#### **I. Eliminación de xenobióticos y metabolismo de micronutrientes:**

La correcta eliminación de carcinógenos es un proceso clave que evita la generación y acumulación de mutaciones a largo plazo. Algunos estudios realizados con polimorfismos presentes en los genes *NAT2*, *GAST* y *CYP1A1* han mostrado correlaciones con mayor riesgo de cáncer en SL (Heinimann et al., 1999; Frazier et al., 2001, Campbell et al., 2007; Felix et al., 2006; Talseth et al., 2006a Shin et al., 2003). Sin embargo, estudios posteriores han sido incapaces de obtener resultados significativos.

#### **II. Control del ciclo celular:**

Los genes implicados en el control del ciclo celular juegan un papel vital en la correcta división y mantenimiento de la integridad genómica celular. Diferentes estudios han evaluado el papel de polimorfismos en algunos de estos genes como *TP53*, *AURKA*, *CCND1* y *ATM*. A pesar de la obtención

de algunos estudios positivos (Jones et al., 2004; Kruger et al., 2006; Talseth et al., 2006b), ninguna asociación concluyente ha podido validarse de forma consistente en varias cohortes (Talseth et al., 2006b; Talseth et al., 2008; Sotamaa et al., 2005; Bala et al., 2001).

### III. Reparación del ADN:

Al igual que los genes de control del ciclo celular, los genes reparadores del ADN son de gran interés, más aún considerando la etiología del SL. Sin embargo, estudios considerando variantes en los genes *MSH3*, *OGG1*, *XRCC1*, *XRCC2*, *XRCC3*, *BRCA2* y *LIG4* no han encontrado ninguna correlación de las mismas y el riesgo de cáncer en el SL (Reeves et al., 2012).

### IV. Función inmunológica

El sistema inmune y la capacidad de inflamación tienen un papel vital en el desarrollo de cáncer, tal y como describieron Hanahan y Weinberg en su modelo de progresión tumoral (Hanahan y Weinberg; 2011) Sin embargo, un único estudio analizando varios polimorfismos en genes que codifican varias citoquinas no pudo encontrar ninguna asociación entre dichas variantes e incrementos a cáncer en el SL (Talseth et al., 2007).

### V. Factores de crecimiento

Numerosos factores de crecimiento tienen variantes polimórficas (Gebhardt et al., 1999), y algunas de ellas han sido relacionadas con una gran variedad de enfermedades (Sugaya et al., 2002; Xue et al., 2000; Giovannucci et al., 2001; Reeves et al., 2006). Un polimorfismo en el gen *IGF-1* ha sido extensivamente estudiado, asociándose con una mayor expresión génica y por tanto, conllevando un mayor efecto pro-crecimiento (Rosen et al., 1998). La presencia de este polimorfismo fue relacionada con una edad de aparición de cáncer más temprana en el SL en una cohorte de pacientes de Estados Unidos (Zecevic et al., 2006). Esta asociación ha podido ser confirmada en dos estudios posteriores con poblaciones de Australia (Reeves et al., 2006) y Polonia (Reeves et al., 2008a).

### VI. Potenciales modificadores de riesgo en otros genes

Polimorfismos en tres genes no pertenecientes a las categorías anteriores parecen mostrar una asociación positiva con un efecto sobre el riesgo en el SL. Las variantes C677T y A1298C en el gen de la enzima metileno-tetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) ejercen un papel protector cuando se heredan de forma conjunta en *trans* (Pande et al., 2007; Reeves et al., 2009). Por otro lado, se ha observado que la variante 163C>G (H63D) el gen de la proteína humana de la hemocromatosis (*HFE*) provoca una aparición más temprana de CCR en pacientes con SL respecto al genotipo heterocigoto o salvaje (Shi et al., 2009). Este mismo efecto se ha observado para el polimorfismo -149C>T en el gen de la metiltransferasa *DNMT3B* (Jones et al., 2006), aunque un estudio de validación posterior no pudo demostrar tal asociación (Reeves et al., 2008b).

### VII. Potenciales modificadores de riesgo procedentes de estudios de asociación.

Los polimorfismos identificados en los estudios de asociación (Ver sección 4.b.III) son unos buenos candidatos para su estudio como potenciales modificadores de riesgo en el SL, ya que se sabe que



aumentan el riesgo de CCR en la población general. Dos de estos SNPs rs16892766 (8q23.3) y rs3802842 (11q23.1) se asociaron con un incremento de riesgo de CCR en una serie multinacional, aunque únicamente en portadores de mutaciones en *MLH1* (Wijnen et al., 2009 Talseth-Palmer et al., 2011). Sin embargo, dos estudios adicionales con pacientes franceses (Houlle et al., 2011) y de diversas nacionalidades (Win et al., 2013b) no pudieron corroborar esta asociación.

Todavía queda mucho por conocer en el campo de los modificadores de riesgo en el SL. Una de las alternativas propuestas, al menos para cubrir una mayor parte de la variabilidad causada por factores genéticos, es la realización de estudios GWAS incluyendo únicamente portadores de SL (tanto afectados como no afectados). De esta manera, se podrán identificar las variantes asociadas a una mayor penetrancia o a una temprana aparición de cáncer en base a la proporción de variantes presentes entre afectados (considerando además la edad) y sanos (Antoniou et al., 2010).

## 7. Síndromes de CCR hereditario no polipósico II: El CCR familiar de tipo X.

Históricamente, el término “cáncer colorrectal hereditario no polipósico” (CCHNP) ha sido utilizado para agrupar los casos de CCR hereditario sin poliposis causados por fallos en el sistema MMR (MMR+) (un equivalente al Síndrome de Lynch). Sin embargo, la caracterización de de las familias incluidas en este grupo demostró que éstos no son dos términos sinónimos (Jass et al., 2006): Considerando los Criterios de Amsterdam I (los más conservadores para determinar la heredabilidad en el CCHNP) entre un 35 y un 50% de todas las familias que cumplen estos requisitos no presentan mutaciones en germinales en los genes del sistema MMR. Es decir, existe una importante fracción de casos dentro del cáncer colorrectal hereditario no polipósico que no pueden englobarse bajo la clasificación del SL.

El término “cáncer colorrectal familiar de tipo X” (CCRFx) –X, por el desconocimiento de su causa–ha sido propuesto para denominar a este grupo de familias con alta agregación familiar de CCHNP con el sistema MMR intacto (Vasen et al., 1991; Lindor et al., 2005, Lynch y de la Chapelle, 2003; Renkonen et al., 2003; Schieman et al., 2004; Lindor et al., 2009; Dominguez-Valentin et al., 2014). A día de hoy, se desconoce el número y la naturaleza de las causas responsables de la agregación de CCR propia de esa entidad, aunque los datos disponibles sugieren una gran heterogeneidad causal. Desde su primera descripción en 1995 (Jass et al., 1995) hasta hoy, la búsqueda de las causas genéticas del CCRFx ha sido una de las prioridades en el campo de la investigación del CCR familiar.

### a. Características clínicas del CCRFx

Debido a que el CCRFx es una entidad basada en criterios moleculares y de agregación de CCR, el patrón de herencia dominante, la ausencia de fallos en el sistema MMR y la alta predisposición a desarrollar CCR son características intrínsecas a la propia definición del grupo. La edad media de aparición del CCR se sitúa entre los 50-60 años, sin existir un riesgo adicional relevante a desarrollar tumores más allá del colon y el recto (Lindor et al., 2005).

De manera frecuente, la definición de las características clínicas de los tumores desarrollados en el contexto del CCRFx es referida en base a la de los tumores del SL. Varios estudios han establecido comparaciones entre ambos grupos para numerosas variables. (Schieman et al, 2004; Lindor et al, 2005; Llor et al, 2005; Mueller–Koch et al, 2005; Dove-Edwin et al, 2006; Valle et al., 2007b; Chen et al., 2008; Koh et al., 2011; Klarskov et al., 2012; Francisco et al., 2011; Abdel-Rahman et al., 2005; Woods et al., 2005; Yamaguchi et al., 2015). Comparando el CCRFx frente al SL, las diferencias más relevantes se encuentran en el menor riesgo de CCR (ratios de riesgo estándar de 2.3 vs. 6.1 respectivamente) y su aparición más tardía (alrededor de una década después), la localización más frecuente en el colon distal, y la menor tasa de CCRs sincrónicos o metacrónicos. En función de la histopatología, los pacientes CCRFx tienen tumores con una histología más heterogénea, un patrón de crecimiento con mayor carácter tubular, una menor frecuencia de histología mucinosa y también menor infiltración linfocítica en los mismos. Un resumen de los estudios realizados puede encontrarse en la Tabla 10.

**Tabla 10. Descripción de los estudios publicados que establecen comparaciones clínicas e histopatológicas entre tumores de CCR desarrollados en los contextos del CCRFX y el SL. Adaptado de Shiovitz et al., 2014**

Estudio	Origen de la población [Evaluación] Criterios de selección	Evaluación de la EMS y capacidad MMR del tumor <sup>b</sup>	Número de familias CCRFX / Individuos	Número de familias Lynch / Individuos	Resultado de la comparaciones <sup>c</sup> (CCRFX vs. Lynch)		Comparaciones histopatológicas (%) (CCRFX vs. Lynch)		
					Edad media CCR (años)	Localización tumoral distal (%)	Histología mucinosa	Escasa diferenciación tumoral (%)	ILT
<i>Schiemann et al., 2004</i>	Alemania [C] A-I ó B	IMS-10 MLH1, MSH2, MSH6	23 / nd	2 / nd	49.8 vs. 40.5	80 vs. 50			
<i>Lindor et al., 2005</i>	Internacional (CCFR) [P+C] A-I	IMS-10 MLH1, MSH2, MSH6	71 / 1567	90 / 1855	60.7 vs. 48.7				
<i>Llor et al., 2005</i>	España [P] A-I/II	IMS-5 MLH1, MSH2, MSH6	15 / 15	10 / 10	<b>60 vs. 54*</b>	<b>87 vs. 56*</b>	14 vs. 0	25 vs. 22	0 vs. 50
<i>Abdel-Rahman et al., 2005</i>	Finlandia [P] A-I/II ó B	IMS-11 MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2	19 / 24	nd / 31	53.7 vs. 45.2	59 vs. nd		"Diferencias no significativas"	
<i>Mueller-Koch et al., 2005</i>	Alemania [P] A-I/II	IMS-11 MLH1, MSH2	16 / 71	25 / 106	<b>55 vs. 41*</b>	<b>86 vs. 68*</b>			
<i>Woods et al., 2005</i>	Canadá [P] A-I/II	IMS-10 MLH1, MSH2, MSH6	15 / 15	24 / 24	50.5 vs. 52.3	<b>93 vs. 38*</b>			
<i>Chen et al., 2005</i>	Taiwan [C] A-II	MLH1, MSH2, MSH6, PMS2	nd / 25	nd / 58	<b>≥40 años: 96% vs. 60%*</b>	<b>72 vs. 33*</b>		8 vs. 26	
<i>Dove-Edwin et al., 2006</i>	Reino Unido [C], Países Bajos [P] A-I/II	IMS-1 MLH1, MSH2, MSH6 (IHC solo para [P])	68 / 197	29 / 91	54 vs. 44	52 vs. 48			
<i>Valle et al., 2007</i>	España [C] A-I	IMS-5 MLH1, MSH2, MSH6	26 / 26	38 / 38	<b>53 vs. 41*</b>	<b>79 vs. 29*</b>	<b>13 vs. 40*</b>	4 vs. 3	
<i>Francisco et al., 2011</i>	Portugal [C] A-I/II	nd	15 / 69	nd / 52	50 vs. nd	62 vs. nd		5 vs. nd	
<i>Koh et al., 2011</i>	EE.UU. [C] A-I/II	IMS-10	21 / 21	Ninguna	48	70		30	30
<i>Klarskov et al., 2011, 2012</i>	Dinamarca [P] A-I	IMS-1 MLH1, MSH2, MSH6	58 / 121	nd / 125	<b>60 vs. 54*</b>	<b>82 vs. 34*</b>	5 vs. 9	<b>16 vs. 48*</b>	<b>3 vs. 36*</b>
<i>Yamaguchi et al., 2015</i>	Japón [C] A-I	MLH1, MSH2, MSH6	25/25	69/69	48 vs. 45	44 vs 38		25 vs. 24	

<sup>a</sup> Evaluación: P=Serie poblacional, C=Serie clínica, P+C=Ambas; Criterios de selección: Ámsterdam-I (A-I), Ámsterdam-II (A-II), ambos (C-I/II), y/o Criterios de Bethesda (B)

<sup>b</sup> Metodología utilizada para definir la capacidad MMR del tumor: IMS-#= Número de marcadores utilizados para determinar el estado de la EMS; Proteínas MMR analizadas por Inmunohistoquímica.

<sup>c</sup> Localización distal = colon descendiente, sigmoide y/o primario rectal.

Abreviaturas: CCFR, Registro "Colon Cancer Family Registry"; ILT, Infiltración linfocítica en el tumor; nd, datos no aportados en el artículo original.

\* Estadísticamente significativo (p<0.05).

Un reciente estudio se centró en comparar las características de los tumores esporádicos de CCR (sin discriminar por el estatus MMR tumoral) frente a las del CCRFX (Shiovitz et al., 2014). Únicamente el menor grado de diferenciación en los tumores CCRFX fue hallado como diferencia estadísticamente significativa, mientras que la edad de aparición (3 años más temprana en los casos CCRFX) alcanzó valores cercanos a la significación. Estos resultados demostraron una gran similitud entre los tumores CCRFX y de CCR esporádicos, mucho más allá de la descrita entre los tumores CCRFX y los CCR desarrollados en el SL.

## **b. Características moleculares del CCRFX**

La propia definición del CCRFX descarta la IMS como mecanismo de inestabilidad genética desencadenante del CCR, restando la inestabilidad cromosómica (IC) y el fenotipo CIMP como potenciales vías participantes en su desarrollo. El estudio del cariotipo, del estado de metilación de las islas CpG (fenotipo CIMP) y del patrón mutacional en genes comúnmente alterados en CCR esporádico se han planteado como buenas estrategias para perfilar los mecanismos moleculares implicados en el CCRFX.

### **I. Estudio de la IC y regiones implicadas**

Varios estudios han utilizado *arrays* de número de copia para analizar el patrón cromosómico de los tumores CCRFX o de CCR familiar con estabilidad de microsatélites (EMS). En estos estudios, una alta proporción de los tumores mostraron al menos una (69-90%) o cinco (44-70%) alteraciones cromosómicas de gran tamaño (5,9 - 7,5 grandes alteraciones por tumor de media) (Middeldorp et al., 2012; Abdel-Rahman et al., 2005). Chen y colaboradores identificaron pequeñas regiones con número de copia alterado en todos los tumores analizados, aunque con grandes variaciones (7 a 969 cambios) (Chen et al., 2013). A pesar de las diferencias entre estudios –debidas principalmente a la diversidad de técnicas y criterios utilizados– la identificación de regiones recurrentemente alteradas apoya la existencia de determinados cambios que tienden a conservarse en la progresión tumoral. De manera general, las regiones 7p, 13q, 19p, 20p y 20q aparecen frecuentemente ganadas, mientras que 8p, 15q, 17p 18p y 18q son las regiones más asiduamente perdidas (Tabla 11).

Es en estas regiones donde se esperarían encontrar aquellos genes que facilitan (regiones ganadas) o frenan/impiden (regiones perdidas) la transformación del tumor. El estudio de Middeldorp y colaboradores identificó además una media de 3,5 regiones cromosómicas con LOH de número de copia neutro por tumor, representando el 32% de todos los reordenamientos totales encontrados (Middeldorp et al., 2013). Este fenómeno también se observó con una frecuencia elevada en el estudio de Chen y colaboradores (Chen et al., 2013).

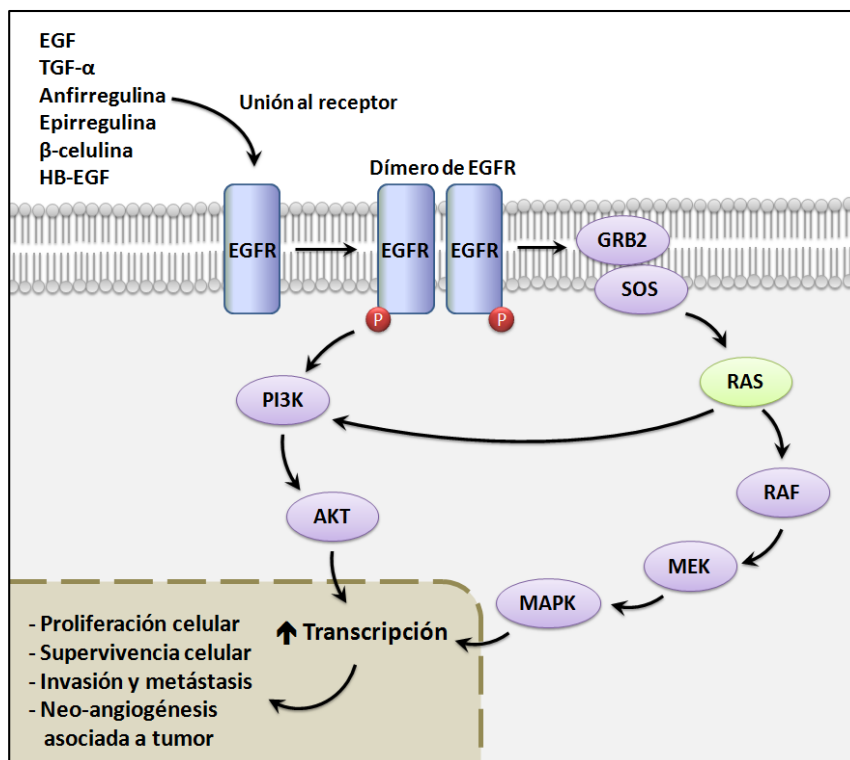
**Tabla 11. Estudios del patrón de inestabilidad genómica realizados en tumores de CCR familiar sin fallos en el sistema MMR y/o de CCRFX y regiones identificadas como ganadas o perdidas.**

ESTUDIO	MUESTRAS	METODOLOGÍA	REGIONES GANADAS	REGIONES PERDIDAS
Middeldorp et al., 2012	30 tumores (15 familias) CCR familiar MMR+	<i>Illumina Beadarrays</i> y panel de ligamiento	7p (40%), 7q (33%), 8q (30%), 13q (57%), 20p (37%) 20q (77%)	17p (37%), 18p (37%) 18q (53%)
Abdel-Rahman et al., 2005	16 tumores (13 familias) CCR familiar MMR+	CGH clásico	19p (25%), 20p (31%), 20q (44%)	5q (25%), 18q (56%)
Chen et al., 2013	20 tumores (20 familias) CCR familiar MMR+	<i>Genome-Wide Human CytoScan HD Array</i> (Affymetrix)	7p, 8q, 13q, y 20q (frecuencia no indicada)	8p, 15q, 17p y 18q (frecuencia no indicada)
Therkildsen et al., 2013	23 tumores CCRFX	32k <i>BAC arrays</i>	17 (26%), 19 (39%) y 20q (65%)	8p (17%), 15q (22%) y 18 (39%)

Abreviaturas: CGH, Hibridación Genómica Comparada, del inglés *Comparative Genomic Hybridization*. BAC: cromosoma artificial bacteriano, del inglés *Bacterial Artificial Chromosome*.

II. Estudio del patrón mutacional en genes de interés:

Las vías de activación de las MAP quinastas y m-TOR juegan un importante papel regulador del crecimiento celular. La activación del receptor de membrana EGF por la unión a ligandos pro-crecimiento activa las cascadas RAS-RAF-MAPK y PI3K-AKT-mTOR, las cuales promueven la proliferación, invasión, migración y vascularización tumoral (Ciardello y Tortora, 2008). Mutaciones específicas en proto-oncogenes de esta vía como *KRAS*, *BRAF* o *PIK3CA* conducen a una expresión constitutiva independiente de la activación de EGF que provoca el crecimiento celular sostenido (Figura 17).



**Figura 17. Representación esquemática de las vías de señalización RAS-RAF-MAPK y PI3K-AKT. Adaptado de Shankaran et al., 2010.**

Diferentes estudios citan una frecuencia mutacional en CCR del 32-45% para *KRAS*, del 6-17% para *BRAF* y del 3-21% para *PIK3CA*. La inmensa mayoría de estas mutaciones se encuentran en *hotspots*: los codones 12 y 13 de *KRAS*, el cambio V600E de *BRAF* y los exones 9 y 20 de *PIK3CA* (Samowitz et al., 2000; Brink et al., 2003; Samowitz et al., 2005a; Noshu et al., 2008b; Baldus et al., 2010; Ling et al., 2012). La identificación de estas mutaciones en tumores tiene además un gran valor diagnóstico, puesto que revela las vías alteradas y acota las dianas más efectivas en las que centrar el tratamiento (Van Cutsem et al., 2011; Allegra et al., 2009; Therkildsen et al., 2014).

Por otro lado, el estudio de mutaciones en *TP53* es también de gran interés debido a las funciones del gen como supresor tumoral: interviene en la capacidad de detención del ciclo celular, la regulación de la entrada en senescencia o apoptosis o la activación de la reparación del ADN, entre otras (Levine et al., 2009; Pflaum et al., 2014). Alrededor del 40-55% de los CCRs presentan mutaciones en este gen (Iacopetta, 2003; Lopez et al., 2012; Li et al., 2015). Debido a la naturaleza de supresor tumoral de *p53*, y a diferencia de *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA*, las mutaciones *conductoras* se distribuyen a lo largo de todo el gen, aunque también existen *puntos calientes* con frecuencia mutacional incrementada (UMD p53 database; Souissi et al., 2006; Hjortsberg y Soussi, 2008).

La Tabla 12 resume los principales estudios realizados interrogando el patrón mutacional de *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* o *TP53* en tumores de CCR familiar/CCRFx. La diversidad de técnicas utilizadas así como la variabilidad en la zona cubierta en cada estudio, hace difícil poder establecer un porcentaje de mutación para cada gen en este grupo de tumores. Sin embargo, *KRAS* parece encontrarse mutado en al menos un cuarto de los casos analizados, mientras que para *BRAF* la frecuencia se muestra claramente inferior (0-13%).

**Tabla 12. Estudios del patrón mutacional de los genes *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* o *TP53* realizados en tumores de CCR familiar sin fallos germinales en el sistema MMR y/o de CCRFX**

ESTUDIO	MUESTRAS	METODOLOGÍA	% TUMORES MUTADOS
Sánchez de Abajo et al., 2007	57 tumores (37 familias) CCR familiar MMR+	Sec. Sanger: Exón 2 de <i>KRAS</i> , Exón 15 de <i>BRAF</i>	40,3% <i>KRAS</i> ; 3,5% <i>BRAF</i>
Middeldorp et al., 2011	30 tumores (15 familias) CCR familiar MMR+	Sec. Sanger: Ex. 1 y 2 de <i>KRAS</i> , Ex. 15 de <i>BRAF</i> , Ex. 9 y 20 de <i>PIK3CA</i> .	37% <i>KRAS</i> ; 12% <i>BRAF</i> ; 0% <i>PIK3CA</i>
Abdel-Rahman et al., 2005	23 tumores (17 familias) CCR familiar MMR+	SSCP con sec. Sanger para patrones anómalos: Codones 12-13 de <i>KRAS</i> , Exón 15 de <i>BRAF</i> , Exones 5 a 7 de <i>TP53</i> . Sec. Sanger: Exon 8 de <i>TP53</i>	17% <i>KRAS</i> ; 4% <i>BRAF</i> ; 26% <i>TP53</i>
Goel et al., 2010	22 tumores (19 familias) CCRFx	Posición V600E de <i>BRAF</i> , codones 12-13 de <i>KRAS</i>	0% <i>BRAF</i> , 32% <i>KRAS</i>
Sánchez-Tomé et al., 2014	23 tumores (17 familias) CCRFx	Análisis de curvas de fusión a alta resolución ( <i>High resolution melting</i> ): Exón 2 de <i>KRAS</i> , Exón 15 de <i>BRAF</i>	40,9% <i>KRAS</i> ; 13% <i>BRAF</i>

Abreviaturas: sec. Sanger = secuenciación Sanger

### III. Estudio del patrón de metilación: Islas CpG y secuencias LINE.

El fenotipo metilador de islas CpG (CIMP, del inglés *CpG island methylator phenotype*), ha sido propuesto como uno de los mecanismos implicados en el desarrollo del CCR, tal y como se explicó en el apartado 3.b.III. Sin embargo, a día de hoy, las causas de este fenómeno se desconocen (Toyota et al., 1999; Teodoridis et al., 2008; Hughes et al., 2012). Existen algunos rasgos tumorales asociados al fenotipo de alta metilación de islas CpG (CIMP+): desarrollo de CCR a edad tardía, con mayor frecuencia en mujeres, localización proximal (Nosho et al., 2008a; Sanchez et al., 2009; Weisenberger et al., 2015), baja diferenciación tumoral, ausencia de mutaciones en *TP53* y *APC* (Samowitz et al., 2005b; Samowitz et al., 2007) y bajos niveles de IC (Ogino et al., 2007; Goel et al., 2007; Cheng et al., 2008; Kozłowska et al., 2012). A nivel pronóstico, estudios recientes lo asocian a una peor prognosis (Juo et al., 2014; Kang et al., 2015, Li et al., 2014; Phipps et al., 2015).

Un patrón de alta metilación de estas islas se asocia con la mutación V600E de *BRAF* y con IMS (ya que se produce la metilación del promotor del gen *MLH1*) (Samowitz et al., 2005b; Weisenberger et al., 2006; Nosho et al., 2008a, Wong et al., 2011). Se ha descrito además un fenotipo más suave (denominado *de baja metilación de islas CpG*) asociado a mutaciones en *KRAS* (Ogino et al., 2006; Shen et al., 2007; Imamura et al., 2014).

En base a los rasgos moleculares descritos en los tumores CCRFX como son su baja tasa de mutaciones en *BRAF* y su alto patrón de IC, se intuye un fenotipo de baja o nula metilación de islas CpG para esta entidad. Los datos aportados por Goel y colaboradores mostraron ausencia de patrones de alta metilación CIMP en su serie de 22 tumores CCRFX en consonancia con lo esperado, aunque se observó un nivel basal constante de metilación en las islas CpG analizadas (Goel et al., 2010). Un estudio más reciente de 22 tumores CCRFX identificó sin embargo una amplia diversidad fenotípica para el estatus CIMP: mientras que 15 tumores (68,2%) mostraron un patrón CIMP- o de baja-CIMP, los 7 tumores restantes (31,8% del total) revelaron  $\geq 5/8$  genes metilados en sus islas CpG, siendo clasificados como CIMP+ (Sánchez-Tomé et al., 2014).

Por otro lado, el estado de metilación general del genoma también ha sido estudiado como marcador pronóstico a través del estudio de los elementos LINE-1 (del inglés *long interspersed nucleotide element-1*) (Kitkumthorn et al., 2012; Yang et al., 2004). La hipometilación de estos elementos se asocia con una peor prognosis en el CCR (Ahn et al., 2011; Rhee et al., 2012; Ogino et al., 2008), con IC (Baba et al., 2010; Ogino et al., 2009), y además con historia familiar y aparición temprana de CCR (Antelo et al., 2012; Ogino et al., 2013), mientras que se correlaciona inversamente con la IMS (Estecio et al., 2007). Tal y como se esperaría por las características moleculares de los tumores CCRFX, la hipometilación de LINE-1 se ha identificado como rasgo frecuente en esta entidad (Pavicic et al., 2012; Goel et al., 2010).

### c. Comparativa molecular del cáncer CCRFX frente al CCR esporádico.

Las descriptivas y comparativas realizadas hasta la fecha para el CCRFX y el CCR esporádico sin fallos germinales en el sistema MMR muestran una enorme similitud a nivel tanto molecular como clínico entre ambos grupos. Considerando estos datos, es lógico pensar que ambas formas de CCR podrían estar siguiendo las mismas vías moleculares de progresión tumoral. En base a ello, la comparativa de ambos grupos podría ser una buena estrategia para identificar rasgos moleculares específicos del CCRFX que podrían estar ligados a la(s) causa(s) de la agregación de CCR propia de esta entidad.

Las comparativas del patrón cromosómico propio del CCRFX, del SL y del CCR esporádico (con el sistema MMR intacto y afecto) revelaron la presencia de dos patrones diferenciados en función del estatus del sistema de reparación MMR (Lengauer et al., 1997; Abdel-Rahman et al., 2001). Considerando únicamente los tumores sin fallos en el sistema MMR (CCRFx y esporádicos), la ganancia de la región 20q fue identificada como un evento significativamente más recurrente en el CCRFX. Esta región contiene genes como *NCOA3*, *TOPI*, *AURKA*, *ZNF217*, *TNFRSF6B* y *GNAS*, cuya sobreexpresión podría favorecer la transformación tumoral. La frecuencia de regiones en LOH también se ha descrito como un fenómeno con capacidad discriminatoria: mientras este tipo de alteración se observó que representaba el 31% de las aberraciones cromosómicas en el CCRFX, sólo lo hizo en un 14% de las mismas en el CCR esporádico (independientemente de su estatus MMR). (Middeldorp et al., 2012).

Un estudio reciente comparando el perfil de expresión génica de cuatro grupos de tumores: CCRFX, SL, esporádicos MMR+ y esporádicos MMR-, demostró asimismo una alta similitud entre los grupos en función del estado del sistema reparador MMR. Este estudio mostró una sobreexpresión en 1059 genes en el grupo de tumores CCRFX, varios de ellos en la vía de señalización por el receptor acoplado a proteína G. Uno de los genes identificados fue *GNAS*, localizado en el cromosoma 20q, región altamente ganada en CCRFX (Dominguez-Valentin et al., 2013).

Por otro lado, los datos relativos a la frecuencia mutacional en los genes *KRAS*, *BRAF*, *TP53* y *PiK3CA* en el CCRFX no han mostrado una variación significativa respecto a los datos presentes en la literatura para el CCR esporádico, aunque los datos disponibles son escasos y provienen de estudios con gran variabilidad tanto en las técnicas de análisis como en las regiones génicas analizadas (Goel et al., 2010; Sánchez-Tomé et al., 2014; Bennani et al., 2010; Vasovcak et al., 2011; Shen et al., 2013).

### d. Estado actual del conocimiento de las causas genéticas del CCRTX

Numerosos estudios han intentado acotar las causas genéticas del CCRFX desde el momento de la propia definición del grupo, identificándose mutaciones en varios genes capaces de explicar una pequeña parte de estas familias. Para ello se ha recurrido a diferentes estrategias que incluyen la secuenciación completa del exoma o del genoma y la secuenciación de genes candidatos.



### I. La secuenciación del exoma o del genoma completo:

La mayor accesibilidad a la secuenciación masiva derivada de la caída de su coste ha hecho que varios grupos hayan optado por ésta como técnica de aproximación a las causas del CCRFX. Nieminen y colaboradores centraron su estudio en una gran familia CCRFX con nueve casos de CCR y cuatro generaciones afectadas. La secuenciación exómica de cuatro familiares afectados de CCR identificó una mutación truncante en el gen **RPS20** como posible causa de su alta incidencia de CCR familiar. Este gen, que codifica uno de los componentes de la subunidad ribosómica R20, se sitúa en la región 8p11-8q12, la cual ya había sido previamente acotada en la familia mediante análisis de ligamiento. La variante mostró cosegregación con otros familiares afectados, pero no así con los no afectados y además no se identificó entre más de 6500 controles sanos. (Nieminen et al., 2014). Una estrategia parecida siguieron Schulz y colaboradores, derivando en la identificación de una mutación en el gen **SEMA4A** como causa de la agregación de CCR en la familia estudiada. Dos familias CCRFX adicionales fueron identificadas con mutaciones *missense* en este gen. (Schulz et al., 2014). Por otro lado, varios estudios centrados en la secuenciación de casos de CCR familiar (descritos en la sección 4.b.I) han identificado numerosos genes potencialmente ligados a la aparición de CCR y que podrían explicar parte de las familias CCRFX (Esteban-Jurado et al., 2015; Gylfe et al., 2013; DeRycke et al., 2013; Smith et al., 2013; Tanskanen et al., 2015)

### II. El estudio de genes candidatos:

La secuenciación enfocada a genes relacionados previamente con un aumento a la susceptibilidad de CCR, ha sido una estrategia utilizada en el estudio de las causas del CCRFX. La secuenciación de **BMPR1A**, gen relacionado con la poliposis juvenil, identificó mutaciones en dos familias CCRFX. (Nieminen et al., 2011). Además, variantes en **MUTYH** (responsable de la poliposis asociada a **MUTYH**) han sido identificadas en familias CCRFX como causa de su agregación de CCR (Garre et al., 2011; Segui et al., 2014a).

Del mismo modo, la secuenciación de genes pertenecientes a vías ligadas al desarrollo de cáncer ha resultado ser una buena estrategia a seguir. Esto será desarrollado en la sección 8.b. El estudio de genes de la vía de reparación del ADN por **MUTYH** logró identificar mutaciones en **OGG1** y **NUDT1** como potenciales responsables la agregación de varias familias X (Garre et al., 2011). También, los resultados obtenidos en la secuenciación en familias CCRFX de **BRCA2**, ligado al incremento de riesgo del cáncer de mama, sugieren una potencial implicación del gen en esta entidad de CCR hereditario (Garre et al., 2014). Sin embargo otros estudios no han encontrado un incremento de riesgo a CCR en portadoras de alteraciones en este gen (Sopik et al., 2015)

Existen además otros genes recientemente identificados como alterados en varias familias con CCR familiar, tales como **UNC5C** y **GALNT12** (genes participantes en la vía de reparación de ADN por escisión de bases) (Coissieux et al., 2011; Guda et al., 2009; Clarke et al., 2012) o **BUB1** y **BUB3** (con función serina/treonina quinasa de punto de control mitótico) (deVoer et al., 2013) podrían explicar a su

vez una pequeña parte de las familias CCRFX. Sin embargo, los estudios realizados hasta la fecha en *UNC5C* y *GALNT12* descartarían un papel preponderante de estos genes en la predisposición al CCR hereditario (Segui et al., 2014b; Kury et al., 2014).

La ausencia de genes identificados que expliquen una porción importante de familias CCRFX sugiere la presencia de una enorme heterogeneidad causal dentro de esta entidad. Por ello, se cree que modelos más allá de la herencia mendeliana deberían ser considerados. Una posibilidad es que múltiples variantes de bajo riesgo puedan concentrarse en determinadas familias aportando en conjunto un incremento moderado de riesgo al CCR. Esto sería suficiente como para que en algunas familias –quizá en combinación con factores ambientales– puedan cumplirse los Criterios de Amsterdam. (Middeldorp et al., 2009; Niittymäki et al., 2010; Middeldorp et al., 2010). Por otro lado, también hay que tener en cuenta un hecho importante: El propio criterio de inclusión del CCRFX hace pensar que una proporción variable de la agregación de las familias pueda estar causada por factores ambientales compartidos dentro del mismo ámbito familiar (alimentación, exposición a factores carcinógenos, hábitos comunes...), y que otra proporción de familias CCRFX podría deberse a la agregación de casos de CCR por mero azar.

#### **e. Vigilancia y profilaxis en el CCRFX:**

La ausencia de genes identificados ligados al riesgo de CCR propio del CCRFX, así como de un fenotipo exclusivo, implica que los primeros CCR en la familia no serán asociados a ninguna forma de CCR hereditario hasta que se alcance el cumplimiento de los criterios de Amsterdam. Además, una vez clasificada la familia como CCRFX, el desconocimiento de las causas moleculares de la agregación de CCR hace que no pueda aplicarse una prueba de identificación de los familiares en riesgo. Debido a la menor penetrancia y aparición más tardía del CCR respecto al SL y a la ausencia de incremento de riesgo de cáncer extracolónico, los protocolos de seguimiento en el CCRFX son más relajados que en el SL. En base a las guías propuestas por la Sociedad americana de oncología clínica (ASCO del inglés *American Society of Clinical Oncology*), se recomienda la realización de colonoscopias a partir de una edad 5-10 años anterior al diagnóstico del CCR más temprano en la familia. La periodicidad propuesta para esta prueba se sitúa en torno a los 3-5 años (Stoffel et al., 2015)

## 8. Técnicas de identificación de genes causales en enfermedades mendelianas

Muchas de las enfermedades conocidas son causadas por la presencia de mutaciones en un solo gen, bien de forma hetero u homocigota: son las enfermedades mendelianas. Las estrategias clásicas para la identificación de los genes causantes de este tipo de enfermedades se han centrado históricamente en distintos métodos de mapeo genético para acotar regiones candidatas, las cuales son posteriormente secuenciadas con la intención de identificar la mutación causal. El drástico abaratamiento de la secuenciación exómica/genómica acaecido durante los últimos años ha supuesto una revolución en el modo de plantear la investigación de estas enfermedades. Un resumen de la progresión histórica en este campo puede verse en la Tabla 13.

**Tabla 13. Principales hitos en la historia del estudio de las enfermedades mendelianas.** Adaptado de Rabbani et al., 2012.

Año	Hito	Ref.
1953	Se describe la estructura doble-hélice del ADN por Watson y Crick.	Watson y Crick, 1953
1977	Se secuencian el genoma completo: el del virus bacteriófago $\phi$ X174.	Sanger et al., 1977
1977	Los primeros métodos de secuenciación de ADN son desarrollados por Sanger, Maxam y Gilbert .	Sanger et al., 1977; Maxam y Gilbert, 1977.
1980	Se elabora el primer mapa de ligamiento basado en polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción.	Botstein et al., 1980
1983	Primer locus asociado a una enfermedad identificado por análisis de ligamiento.	Gusella et al., 1983
1987	Primer mapeo de homocigosidad, por Lander y Botstein.	Lander y Botstein, 1987
1995	Primera secuenciación del genoma de un organismo ( <i>Hemophilus influenza</i> ).	Fleischmann et al., 1995
1999	Primera secuenciación de un cromosoma humano completo.	Dunham et al., 1999
2000	Secuenciación de la mosca de la fruta.	Adams et al., 2000
2001	Primer borrador de la secuencia del genoma humano.	Venter et al., 2001; Lander et al., 2001.
2003	La secuencia del genoma humano se completa.	Collins et al., 2014
2004	Se desarrollan plataformas de secuenciación paralela masiva, dando lugar a la secuenciación de última generación (NGS).	<a href="http://www.genome.gov/12513210">http://www.genome.gov/12513210</a>
2005	El primer modelo de instrumento de NGS se pone a la venta.	Margulies et al., 2005
2007	Venter publica el primer genoma humano diploide completo.	Levy et al., 2007
2008	Primer genoma secuenciado con NGS.	Wheeler et al., 2008
2010	Se logra por primera vez identificar un gen responsable de una enfermedad mendeliana rara gracias a la secuenciación genómica.	Ng et al., 2010
2014	Illumina lanza al mercado la primera tecnología NGS capaz de secuenciar un genoma completo por un precio aproximado de 1000 dólares americanos.	<a href="http://www.illumina.com/systems/hiseq-x-sequencing-system.html">http://www.illumina.com/systems/hiseq-x-sequencing-system.html</a>

A continuación se describen las técnicas utilizadas con mayor frecuencia en la búsqueda de genes causales responsables de enfermedades mendelianas.

### a. Mapeo genético

Consiste en la búsqueda de la alteración genética causante de una patología por acotación: la identificación de elementos genéticos comunes en los individuos afectados permite delimitar regiones

cromosómicas candidatas a contener la causa genética de la patología. Las cuatro formas más frecuentes de mapeo genético se detallan a continuación:

#### I. Mapeo genético por análisis de ligamiento

La técnica del análisis de ligamiento estudia marcadores informativos como microsatélites o polimorfismos de base única (SNP, del inglés, *single nucleotide polymorphism*), repartidos por todo el genoma. Aquellas variantes que cosegregan con los individuos afectados de una misma familia son sospechosas de localizar cerca de las variantes causales, en base al desequilibrio de ligamiento. Esta técnica ha permitido identificar con éxito los genes causales de muchas enfermedades (Slatkin, 2008), incluyendo la mayoría de los ligados a síndromes hereditarios de CCR. Sin embargo, debido a que la técnica requiere la existencia de grandes familias afectas y una alta penetrabilidad de la variante, los resultados resultan inconcluyentes en numerosas ocasiones. Estudios de ligamiento realizados en familias con CCRFX o CCR familiar han acotado las regiones 3q21-q24, 7q31, 9q22.2-31.2, 11q23.2-24, 11q13.4, 14q24.2 y 22q12.1 (Kemp et al., 2006; Neklason et al., 2008; Wiesner et al., 2003; Gray-McGuire et al., 2010; Djureinovic et al., 2006; Rudkjøbing et al., 2015), aunque las variantes genéticas asociadas a la predisposición de estas familias estudiadas todavía no han podido identificarse.

#### II. Mapeo genético por cariotipado

Consiste en comparar el cariotipo de uno o varios afectados de una enfermedad con el de controles no afectados. La identificación de aberraciones coincidentes en los cariotipos de los individuos enfermos permitirá acotar la zona donde se sitúa la causa de la patología. A pesar de que es una técnica fácil de realizar y de no requerir la presencia de múltiples afectados por familia, sólo es aplicable para el estudio de enfermedades causadas por grandes deleciones, translocaciones o duplicaciones cromosómicas.

#### III. Mapeo genético por variantes en el número de copia

Mediante un *array* de número de copia y tomando un control sano como referencia, es posible detectar aquellas regiones perdidas o sobrerrepresentadas en un determinado grupo de pacientes. Regiones identificadas como alteradas en varios afectados (preferiblemente no relacionados) serán candidatas a albergar la causa genética de la enfermedad. Una de las ventajas del mapeo por búsqueda de variantes en el número de copia es que permite la detección de pequeñas pérdidas y ganancias que pueden pasar desapercibidas en la secuenciación masiva. Sin embargo, no es capaz de identificar cambios equilibrados, ni tampoco mutaciones en las bases de la secuencia. Mediante esta técnica fue posible la detección microdeleciones en *BUB1*, *PTPRJ*, *GREM1* o *FOCAD* en pacientes afectados de CCR temprano, asociándose los fallos en estos genes con predisposición al CCR (de Voer et al., 2011; Venkatachalam et al., 2010; Venkatachalam et al., 2011; Weren et al., 2015).

#### IV. Mapeo genético por homocigosidad

La técnica, especialmente útil para detectar genes implicados en enfermedades recesivas, se basa en el uso de *arrays* que genotipan numerosos SNP distribuidos por todo el genoma. En afectados procedentes

de familias consanguíneas, los individuos afectados de una enfermedad recesiva (o dominante manifestando un fenotipo mucho más agresivo) habrán heredado con alta probabilidad la misma variante causal de cada uno de sus padres. Las regiones identificadas en homocigosis serán candidatas a albergar la mutación responsable de la enfermedad. Comparando los resultados obtenidos en diferentes familias afectas consanguíneas, será posible acotar regiones específicas donde se espera que localice el gen causal de la enfermedad sometida a estudio.

**b. Estudio de genes candidatos.**

Mientras que en el mapeo genético el punto de partida es la totalidad del genoma, otra posibilidad consiste en centrar el estudio directamente en genes participantes y/o reguladores de vías metabólicas implicadas en la enfermedad de interés. Además, si ya se han relacionado genes con las causas de dicha patología, existe cierta posibilidad de que otros genes de la misma vía puedan explicar una parte adicional de los casos cuya etiología se desconoce. A pesar de la efectividad demostrada de esta estrategia, su campo de actuación es muy limitado, siendo además incapaz de desvelar nuevos mecanismos causales alejados del conocimiento disponible de la enfermedad. En el ámbito del CCR familiar varios genes han sido estudiados mediante este planteamiento, sugiriéndose su influencia en la enfermedad para *GALNT12*, *UNC5C*, *NUDT1* y *OGG1*. (Tabla 14).

**Tabla 14. Estudios de secuenciación génica realizados en el ámbito del CCR familiar mediante la estrategia de selección de genes candidatos.**

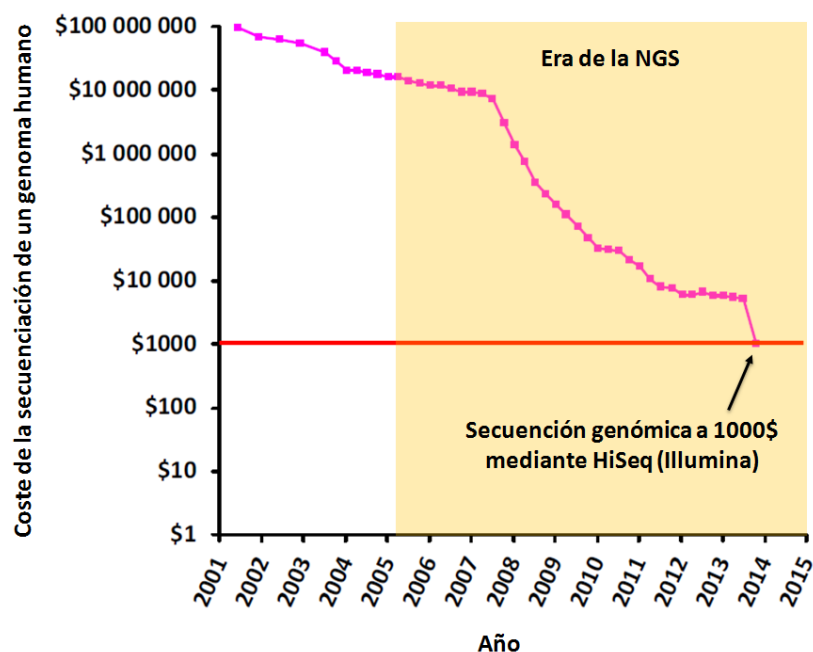
Gen	Razón de la selección para su estudio	Estudio(s)
<b><i>GALNT12</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Pertenece a la familia de glicosiltransferasas. Un gen de esta familia había sido relacionado con riesgo a cáncer de mama.</li> <li>✓ La glicosilación aberrante tiene efectos sobre el crecimiento celular, la diferenciación, la transformación y la metástasis.</li> <li>✓ La glicosilación aberrante es un rasgo presente en muchos tipos de cáncer, siendo muy frecuente en el CCR.</li> <li>✓ Expresión diferencial en tejido normal y tumoral.</li> <li>✓ Localización en 9q21-33, cerca del pico de asociación 9q22-31 identificado en estudios de ligamiento para CCR familiar.</li> </ul>	Guda et al., 2009; Clarke et al., 2012.
<b><i>UNC5C</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Actividad pro-apoptótica.</li> <li>✓ Mutaciones o infra-expresión del ligando al que une (netrin-1) se han asociado con riesgo de cáncer intestinal.</li> <li>✓ Su inactivación se asocia a progresión tumoral en ratones.</li> </ul>	Coissieux et al., 2011
<b><i>NUDT1</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Participa en la vía de reparación de ADN por escisión de bases.</li> </ul>	Garre et al., 2011
<b><i>OGG1</i></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Participa en la vía de reparación de ADN por escisión de bases.</li> </ul>	Garre et al., 2011

A modo de validación, series adicionales de CCR familiar han sido secuenciadas para *GALNT12* y para regiones de *UNC5C* (Segui et al., 2014b; Kury et al., 2014), sin identificarse nuevas mutaciones capaces de explicar la susceptibilidad al CCR de los casos analizados. El estudio de series adicionales de CCR familiar en estos dos genes, así como para *NUDT1* y *OGG1*, quedarían pendientes para delimitar su impacto en este tipo de cáncer.

### c. Secuenciación de exomas y genomas completos

Mientras que en las estrategias anteriormente expuestas sólo se baraja la secuenciación de las regiones delimitadas por mapeo genético o por selección bibliográfica, otra posibilidad consiste en obtener la secuencia del exoma o del genoma completo como punto de partida y acotar las variantes de interés mediante sucesivas etapas de cribado.

La secuenciación del primer genoma humano completo se realizó mediante el uso de la **secuenciación automática directa o Sanger** (Venter et al., 2001; Lander et al., 2001), la cual ha sido utilizada desde 1975 como método de secuenciación de rutina, tanto en investigación como en diagnóstico clínico. La secuenciación de este primer genoma implicó 13 años de trabajo y un presupuesto de 3000 millones de dólares. Esto puso en evidencia la necesidad de desarrollar nuevas estrategias que permitiesen optimizar el coste temporal y económico del proceso de secuenciación a gran escala. Como respuesta a esta demanda se desarrollaron los sistemas de NGS, disponibles comercialmente desde del año 2005. Esta nueva tecnología permite paralelizar mediante diversas técnicas multitud de reacciones de secuenciación independientes cubriendo así grandes regiones del genoma en una sola carrera. Esto ha desembocado en un abaratamiento radical de los costes de la secuenciación, haciendo accesible su utilización para la investigación de numerosas enfermedades (Figura 18).



**Figura 18. Progresión histórica del coste de la secuenciación de un genoma completo.** Precio en dólares americanos. Adaptado de van Dijk et al., 2014.

A la hora de plantear un estudio de secuenciación de exomas o genomas completos es importante considerar las ventajas e inconvenientes de ambas opciones (Tabla 15). A día de hoy, la secuenciación exómica suele ser la opción prioritaria. Se calcula que alrededor del 85% de las mutaciones causantes de enfermedades se encuentran en regiones codificantes (Botstein et al., 2003; Majewski et al., 2011; Gilissen et al., 2012), las cuales representan menos de un 2% de todo el genoma humano (Elgar et al.,

2008). De esta forma, la secuenciación exómica permite centrar la búsqueda en este área concreta, abaratando costes y facilitando enormemente el análisis de los datos generados. Sin embargo, dejará por secuenciar el 98-99% del genoma correspondiente a las regiones no codificantes, razón que esgrimen los defensores de la secuenciación genómica para decantarse por este procedimiento.

**Tabla 15. Comparativa de las estrategias de secuenciación de genomas y exomas completos.**

	<b>Secuenciación de genomas completos</b>	<b>Secuenciación de exomas completos</b>
<b>Pros</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Detección de todas las posibles variantes en el genoma</li> <li>✓ Variantes estructurales y de número de copia se detectan con más facilidad</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Coste inferior</li> <li>✓ Mayor número de lecturas por fragmento.</li> <li>✓ Análisis de datos más sencillo</li> </ul>
<b>Contras</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Coste superior</li> <li>✓ Generalmente tiene menores lecturas por fragmento</li> <li>✓ Alto volumen de datos generados y análisis complejo de los mismos.</li> <li>✓ Interpretación compleja de variantes no codificantes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Dificultad en la detección de variantes estructurales y de número de copia</li> <li>✓ Sólo se detectan variantes exónicas o en regiones colindantes a exones</li> </ul>

A pesar de la reciente aparición de la NGS, a día de hoy, varias casas comerciales ofertan opciones de secuenciación masiva basadas en tecnologías diferentes y con variaciones notorias en la duración, coste y capacidad de cada carrera. Un resumen de algunos de los sistemas NGS más frecuentemente utilizados actualmente se recoge en la Tabla 16.

**Tabla 16. Características de los principales sistemas de NGS actualizados actualmente.** Adaptado de Buermans et al., 2014.

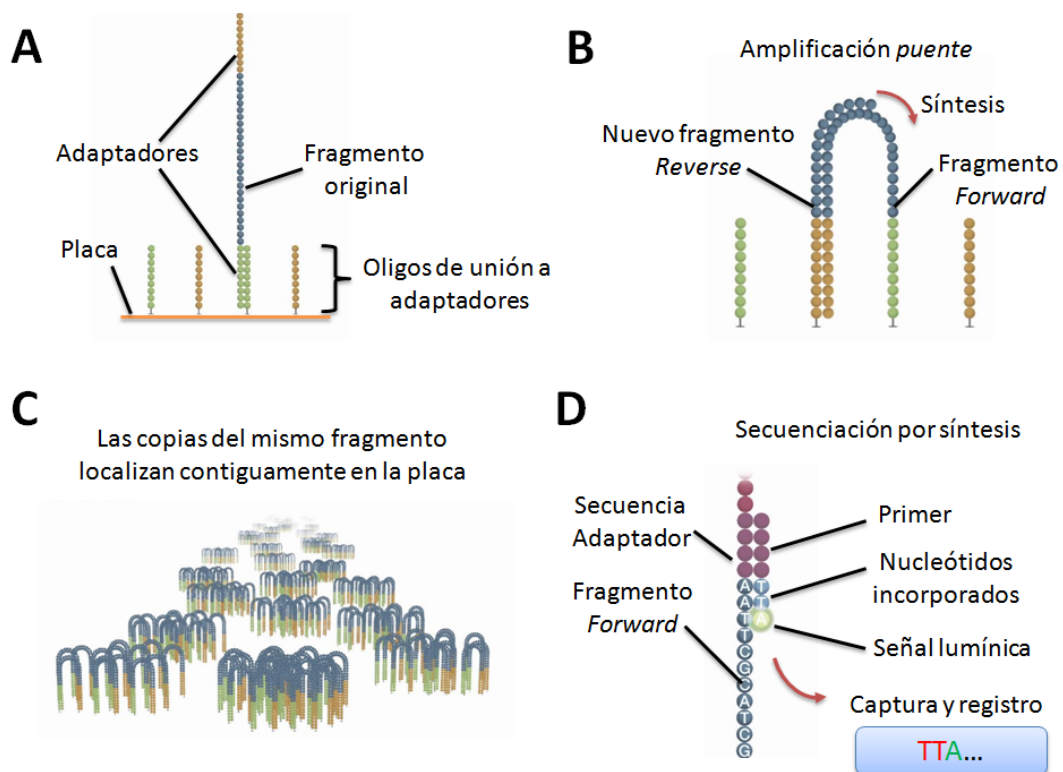
<b>Casa comercial</b>	<b>Aparato</b>	<b>Sistema de detección</b>	<b>Duración / carrera</b>	<b>Longitud de lectura</b>	<b># lecturas /carrera</b>	<b>Rendimiento</b>
<b>Roche</b>	GS FLX Titanium XL+	Pirofosfato	23 h	700 pb	1 mill.	700 Mb
	GS Junior System	Pirofosfato	10 h	400 pb	0,1 mill.	40 Mb
<b>Life Tech.</b>	Ion torrent	Liberación de protones	4 h	200–400 pb	4 mill.	1,5–2 Gb
	Proton	Liberación de protones	4 h	125 pb	60–80 mill.	8–10 Gb
	ABI SOLiD	Fluorescencia/Ligación	10 días	75 pb + 35 pb	2700 mill.	300 Gb
<b>Illumina</b>	HiSeq2000/2500	Fluorescencia	12 días	2 × 100 pb	3000 mill.	600 Gb
	MiSeq	Fluorescencia	65 h	2 × 300 pb	25 mill.	15 Gb
<b>Pacific biosciences</b>	RSII	Fluorescencia	2 días	50% lecturas > 10 Kb	0,8 mill.	5 Gb
<b>Helicos</b>	Heliscope	Fluorescencia	10 días	~ 30 pb	500 mill.	15 Gb

Abreviaturas: #, número de; h, horas; pb, pares de bases; mill, millones; Mb, megabases, Gb, gigabases; Kb, kilobases.

El proceso de NGS requiere de diferentes etapas que combinan la selección y preparación del ADN a secuenciar, la propia secuenciación y el análisis informático de los datos generados.

En primer lugar, es necesario comenzar con la **generación de librerías** a partir del ADN muestral, que contendrán únicamente las regiones genómicas que interesa secuenciar. Su preparación comienza con la rotura del ADN genómico del paciente en pequeños fragmentos a los que, tras igualarles los extremos, se les unen unos adaptadores que permitirán su amplificación posterior. A continuación, los fragmentos que contienen regiones de interés (por ejemplo, exones con regiones colindantes en la secuenciación de exomas) son hibridados a sondas unidas a un sistema de selección, como pueden ser bolitas magnéticas. Esto permite su aislamiento posterior del resto de ADN no deseado mediante el uso de un imán. Tras la eliminación de las sondas de selección, sólo resta la librería con el ADN de interés.

A continuación, se realiza el proceso de **secuenciación**. En la mayoría de técnicas de NGS la secuencia es inferida a través de la replicación del ADN muestral, proceso en el cual se libera algún tipo de señal indicativa de las bases añadidas. A esta estrategia se le denomina secuenciación por síntesis. Únicamente el sistema ABI SOLiD de Life Technologies basa su detección en el proceso de ligación en lugar de en la replicación. Como ejemplo de un sistema de NGS, se describirá la estrategia de secuenciación del HiSeq de Illumina (Figura 19).



**Figura 19. Representación del proceso de secuenciación utilizado en la tecnología Hi Seq de Illumina.** Adaptado de <http://www.illumina.com/>



En la **secuenciación HiSeq**, los fragmentos de ADN (con adaptadores a ambos lados) de la librería son cargados en un *chip* en cuya superficie hay oligonucleótidos de secuencia complementaria a los adaptadores (Figura 18.a). Mediante ciclos de temperatura, cada fragmento es replicado sucesivamente, generando nuevas copias que quedarán unidas a los oligonucleótidos más cercanos de la placa. A este proceso se le denomina “replicación puente” (figura 18.b). De esta manera, los millones de fragmentos de la secuencia original habrán generado áreas específicas repletas de copias idénticas (Figura 18.c). Tras la eliminación de las copias en dirección reversa, se procede a la replicación de los fragmentos unidos a la placa, pero esta vez utilizando nucleótidos marcados específicamente para cada base. Esta síntesis emite señales fluorescentes indicativas del nuevo fragmento sintetizado, representativas de la secuencia original (Figura 18.d). Posteriormente, este paso es repetido del mismo modo con los fragmentos en dirección reversa. Este proceso de síntesis lumínica sucede paralelamente con los millones de fragmentos del ADN original replicados en diversas regiones a lo largo de todo el chip, lo que posibilita secuenciar en cada carrera hasta un volumen de 600 Gb.

El proceso de secuenciación concluye con la obtención de una enorme sucesión de pequeñas secuencias solapantes (de 30 pares de bases hasta una kilobase dependiendo de la técnica). A partir de aquí comienza el **análisis informático** de los datos obtenidos. En primer lugar, es necesario ordenar los millones de fragmentos de secuencia generados para obtener la secuencia completa original. Para ello, dichos fragmentos son alineados con una secuencia referencia como GRCh38 por medio de herramientas informáticas como el alineador *Burrows–Wheeler* (Li et al., 2009).

Tras la obtención de la secuencia *de interés*, se procede a la detección de variantes. Herramientas como ANNOVAR (Wang et al., 2010b) enumeran las variantes identificadas, adjuntando una descriptiva completa que incluye:

- ▶ Efecto de las variantes sobre la secuencia proteica, indicándose los aminoácidos afectados.
- ▶ Contextualización de las variantes, aportando datos sobre la región donde localizan: el grado de conservación entre especies, la posible unión a factores de transcripción, la identificación de asociación con enfermedades en estudios de GWAS, entre muchas otras características.
- ▶ Identificación de aquellos cambios presentes en bases de datos como dbSNP o el proyecto *1000 Genome*, indicando además la frecuencia poblacional. También se incluye la predicción de impacto de las variantes sobre la función de proteína mediante programas *in silico* como SIFT – *sorting intolerant from tolerant*– (Kumar et al., 2009) o Polyphen –*polymorphism phenotyping*– (Adzhubei et al., 2010; Adzhubei et al., 2013). Del mismo modo, también evalúa el potencial efecto de las variantes intergénicas en base al programa *GERP++*.
- ▶ Es además capaz de ofrecer una lista de genes candidatos a causar una enfermedad mendeliana en base a los resultados obtenidos en la secuenciación de diferentes pacientes.

El listado inicial de variantes deberá filtrarse en base el modelo de herencia –propuesto o conocido– de la enfermedad. Por ejemplo, en el caso del CCRFX donde existen varias generaciones afectadas, se espera un modelo de herencia dominante. También es muy importante adaptar el cribado mutacional a la penetrancia esperada (o a hipotéticos modelos de penetrancia), además de considerar la posible presencia de fenocopias entre los afectos. Por ejemplo, cuando se espera penetrancia completa prima la cosegregación óptima entre los individuos portadores e incluso las variantes intrónicas o sinónimas serán consideradas. Cuando la penetrancia es incompleta o hay alta frecuencia de fenocopias en la enfermedad, es posible que no existan variantes comunes y exclusivas de los individuos afectos, por lo que será necesario aplicar un filtrado más liberal.

Es importante destacar que únicamente un 5% de las variantes inidentificadas –por término medio– no se encuentran recogidas en bases de datos (Bamshad et al., 2011). Ser demasiado conservador, eliminando aquellas que se encuentran incluso en una frecuencia muy baja, puede suponer la pérdida de variantes potencialmente causales: por ejemplo, las mutaciones más frecuentes causantes de la poliposis asociada a *MUTYH* se encuentran en frecuencias superiores al 1% en población general (Al-Tassan et al., 2002; Cleary et al., 2009). A modo ilustrativo, la Tabla 17 recoge el número medio de variantes de diferente naturaleza identificadas por término medio en la secuenciación exómica de individuos de origen afroamericano y europeo.

**Tabla 17. Numero medio de variantes identificadas en la secuenciación exómica de individuos afroamericanos o americanos de origen europeo en función del tipo de alteración causada y la novedad de la variante.** Adaptado de Bamshad et al., 2011.

Tipo de variante	Nº medio de variantes ( $\pm$ ds) en Afroamericanos	Nº medio de variantes ( $\pm$ ds) en Americanos de origen europeo
<b>Variantes nuevas</b>		
Cambio de sentido ( <i>missense</i> )	303 ( $\pm$ 32)	192 ( $\pm$ 21)
Generación de codón stop ( <i>nonsense</i> )	5 ( $\pm$ 2)	5 ( $\pm$ 2)
Sinónimas	209 ( $\pm$ 26)	109 ( $\pm$ 16)
Rotura de sitios de <i>splicing</i>	2 ( $\pm$ 1)	2 ( $\pm$ 1)
Total	520 ( $\pm$ 53)	307 ( $\pm$ 33)
<b>Variantes ya identificadas</b>		
Cambio de sentido ( <i>missense</i> )	10,828 ( $\pm$ 342)	9,319 ( $\pm$ 233)
Generación de codón STOP ( <i>nonsense</i> )	98 ( $\pm$ 8)	89 ( $\pm$ 6)
Sinónimas	12,567 ( $\pm$ 416)	10,536 ( $\pm$ 280)
Rotura de sitios de <i>splicing</i>	36 ( $\pm$ 4)	32 ( $\pm$ 3)
Total	23,529 ( $\pm$ 751)	19,976 ( $\pm$ 505)
<b>Variantes totales</b>		
Cambio de sentido ( <i>missense</i> )	11,131 ( $\pm$ 364)	9,511 ( $\pm$ 244)
Generación de codón STOP ( <i>nonsense</i> )	103 ( $\pm$ 8)	93 ( $\pm$ 6)
Sinónimas	12,776 ( $\pm$ 434)	10,645 ( $\pm$ 286)
Rotura de sitios de <i>splicing</i>	38 ( $\pm$ 5)	34 ( $\pm$ 4)
Total	24,049 ( $\pm$ 791)	20,283 ( $\pm$ 523)

El filtrado de variantes concluye con la obtención de un número variable de mutaciones candidatas a explicar la enfermedad a estudio, y que requerirán pruebas adicionales para demostrar dicha implicación.

Si el número de mutaciones continúa siendo alto, se deberán seleccionar aquellas que reúnan más indicios de causar un impacto funcional en la proteína o que alteren genes participantes en vías relevantes para el desarrollo de la enfermedad. Algunos puntos que pueden considerarse en este cribado pueden ser:

- Revisión bibliográfica de la función del gen y su posible implicación en enfermedades, por ejemplo en Gene ([www.ncbi.nlm.nih.gov/gene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene)) y PubMed ([www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)).
- Expresión del gen en el tejido de interés en condiciones normales y en cáncer. Puede consultarse por ejemplo en Oncomine (<https://www.oncomine.org/>).
- Presencia de mutaciones somáticas en el gen en tejido tumoral. Puede consultarse por ejemplo en COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/>).
- Predicción *in silico* del impacto de las mutaciones sobre regiones reguladoras del *splicing* (proceso de corte y empalme en el procesamiento del ARN mensajero). Puede utilizarse el programa *Human Splicing Finder* ([www.umd.be/HSF3/](http://www.umd.be/HSF3/)).
- Etc.

Una vez acotada(s) la(s) variante(s) de mayor interés, **estudios posteriores** deberán confirmar el impacto en la enfermedad de la(s) misma(s). Algunas de las pruebas más frecuentemente utilizadas para resolver esta cuestión son:

- Cosegregación de la mutación con la enfermedad: Si la mutación identificada es la causa de la enfermedad, ésta deberá encontrarse en todos los individuos afectados (o la mayoría, considerando fenocopias) de la misma familia. Asimismo, si se sospecha una penetrancia total/elevada, se esperará una ausencia de esta variante en familiares sanos de edad avanzada. La técnica a utilizar dependerá del tipo de mutación.

- Análisis de *splicing*: Para aquellos cambios que supongan posibles afectaciones del *splicing* (bien por situarse cerca de un lugar donador o aceptor de *splicing*, o por romper una región reguladora del mismo), su efecto deberá comprobarse mediante la amplificación de la región implicada en el ADNc del paciente (generalmente varios exones a cada lado de la variante), seguido a continuación de una electroforesis en gel de agarosa y secuenciación del producto de amplificación.

- Modelización proteica: La disponibilidad de modelos tridimensionales de la estructura proteica, o de programas de predicción *in silico* capaces de modelizar regiones concretas hace posible realizar predicciones de estabilidad de la proteína en base a cambios específicos. Programas como CUPSAT (<http://cupsat.tu-bs.de>) (Parthiban et al., 2006), I-Mutant 2.0 (<http://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html>) (Capriotti et al., 2005), ERIS (<http://troll.med.unc.edu/eris/>) (Yin et al., 2007) y PoPMuSiC (<http://dezyme.com>) (Dehouck et al., 2011; Gonelli et al., 2012) son capaces de evaluar el efecto de dichos cambios en la estabilidad estructural de la proteína.

- Búsqueda de un segundo evento inactivante en tumor: La presencia de un evento inactivante del alelo salvaje en tumor puede ser indicativo del papel del gen como supresor tumoral. Es importante destacar que algunos supresores tumorales pueden actuar por haploinsuficiencia, por lo que la incapacidad de detectar este segundo evento no es motivo para descartar el papel del gen en la enfermedad. Para conocer si existe inactivación alélica en tumor, se deben tener en cuenta los diferentes modos de inactivación, pudiéndose realizar los siguientes estudios:

- Secuenciación completa del gen: Identifica mutaciones somáticas al comparar la secuencia del gen en el tejido tumoral frente a la obtenida en la secuenciación exómic.
- Estudio de LOH: La comparativa de marcadores, generalmente microsatélites, en tejido normal y tumoral es capaz de identificar alteraciones en el ratio alélico en tumor.
- Estudio de metilación del promotor: El estudio de las islas CpG del promotor del gen revela si existe metilación somática que podría estar reprimiendo su expresión.
- Estudio del ARN mensajero: La cuantificación del nivel de ARN mensajero del gen, por ejemplo por medio de una RT-qPCR, es indicativa del nivel de transcripción génica existente.
- Inmunohistoquímica: Es una prueba de gran utilidad ya que permite visualizar la presencia o ausencia de la proteína en el propio tumor. Sin embargo, no siempre es una prueba definitiva: el ruido de fondo, la falta de especificidad de algunos anticuerpos o la potencial presencia de proteína con afinidad por el anticuerpo pero sin capacidad activa puede generar dificultades en la interpretación.

- Búsqueda de casos adicionales: La secuenciación del gen candidato en una serie de afectos no relacionados informa sobre el impacto del gen en el riesgo a la enfermedad. La identificación de mutaciones severas en múltiples casos adicionales, pero no así en controles, apoya la existencia de una causalidad gen-enfermedad.

- Estudios funcionales: El paso clave para demostrar el impacto de la variante en la enfermedad es corroborar su impacto funcional experimentalmente. El tipo de estudio funcional dependerá de la función de la proteína implicada. Por ejemplo, si se trata de un gen reparador de bases desapareadas, puede testarse su capacidad correctora de nucleótidos desapareados en plásmidos.

Mediante la NGS, el cribado de variantes y los estudios posteriores de confirmación se han propuesto varios genes de riesgo al CCR familiar, tal y como se describió en la sección 4.b.I, también para el CCRFX (Sección 7.d).

## 9. Telómeros, telomerasa y cáncer

Los telómeros son secuencias de ADN repetitivo no codificante (5' TTAGGG 3') que se sitúan en el extremo de los cromosomas, protegiéndolos y evitando que se fusionen entre sí (Blackburn et al., 1991; Blackburn et al., 2006). En condiciones normales, los telómeros se acortan con cada división celular (Harley et al., 1990), de manera que al llegar a un punto de longitud crítica se desencadena el mecanismo de apoptosis (Harley, 1991; Londono-Vallejo, 2008). La proteína TP53 juega un papel muy importante en el control y regulación de este proceso (Cosme-Blanco et al., 2007). Cuando estos mecanismos de control fallan, la célula continúa dividiéndose, pudiéndose originar fusiones cromosómicas que derivarán en inestabilidad cromosómica (Hackett et al., 2001) (Figura 20).

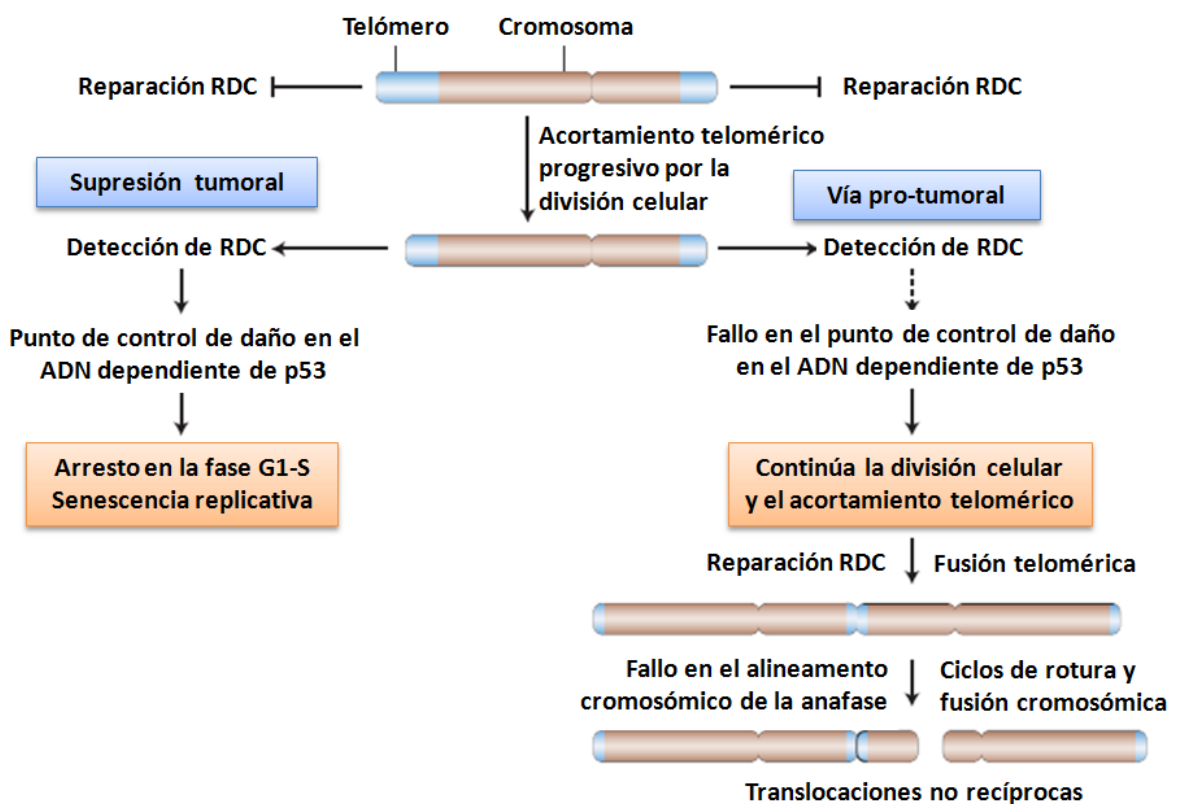


Figura 20. Representación de las vías normal o pro-apoptótica (izquierda) y pro-tumoral (derecha) en las que puede derivar una célula que ha alcanzado la longitud telomérica crítica. Abreviaturas: RDC: rotura de doble cadena. Extraído de Baird et al., 2010.

### a. Longitud telomérica y telómeros en cáncer

Alteraciones en la longitud telomérica son frecuentemente identificadas en las fases iniciales de la progresión tumoral (Meeker et al., 2004; Bisoffi et al., 2006; Raynaud et al., 2008). La inestabilidad cromosómica derivada de este acortamiento telomérico puede ser un factor favorable para la iniciación tumoral, ya que contribuye a generar diversidad genética. Sin embargo, la alta tasa de replicación celular en tumores requiere un mecanismo capaz de evitar el constante acortamiento cromosómico. En la

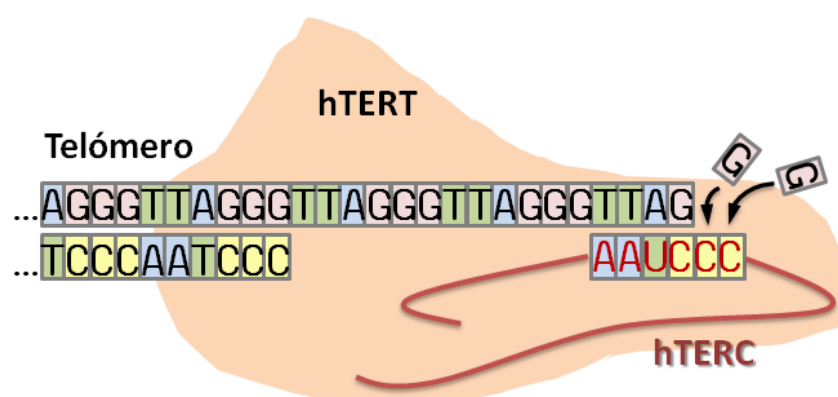
mayoría de casos, esto se consigue mediante la activación de la telomerasa, inactiva en la mayoría de células somáticas. Esta enzima es capaz de añadir repeticiones teloméricas en los extremos cromosómicos, manteniendo así una longitud constante (Kim et al., 1994). Más de un 90% de los tumores malignos tienen una expresión activa de esta enzima (Engelhardt et al., 1997; Kolquist et al., 1998). Existe un segundo mecanismo de alargamiento telomérico en tumores basado en la recombinación homóloga e independiente de la telomerasa. Se denomina “alargamiento alternativo de los telómeros” (ALT, del inglés *alternative lengthening of telomeres*) y es el mecanismo de elongación utilizado en el ~10% de los tumores que no siguen la vía de la activación de la telomerasa (Bryan et al., 1997; Conomos et al., 2013).

### b. La longitud telomérica y el riesgo de cáncer

Numerosos estudios han relacionado variaciones en la longitud de los telómeros en células normales con un incremento de riesgo a padecer diferentes tipos de cáncer. En algunos casos como el cáncer familiar de ovario, mama y tiroides se han encontrado asociaciones claras (Martínez-Delgado et al., 2012; Martínez-Delgado et al., 2013; Capestzone et al., 2008). Sin embargo, los estudios centrados en el CCR han encontrado resultados diversos, en muchas ocasiones contradictorios: tanto la presencia de telómeros cortos y largos ha sido asociada con riesgo a CCR, mientras que otros estudios no encontraron diferencias significativas. (Qin et al., 2014; Pellatt et al., 2012; Cui et al., 2012; Jones et al., 2012; Maxwell et al., 2011; Bozzao et al., 2011; Pooley et al., 2010; Lee et al., 2010; Zee et al., 2009; Segui et al., 2013; Segui et al., 2014c).

### c. La telomerasa y el riesgo a CCR.

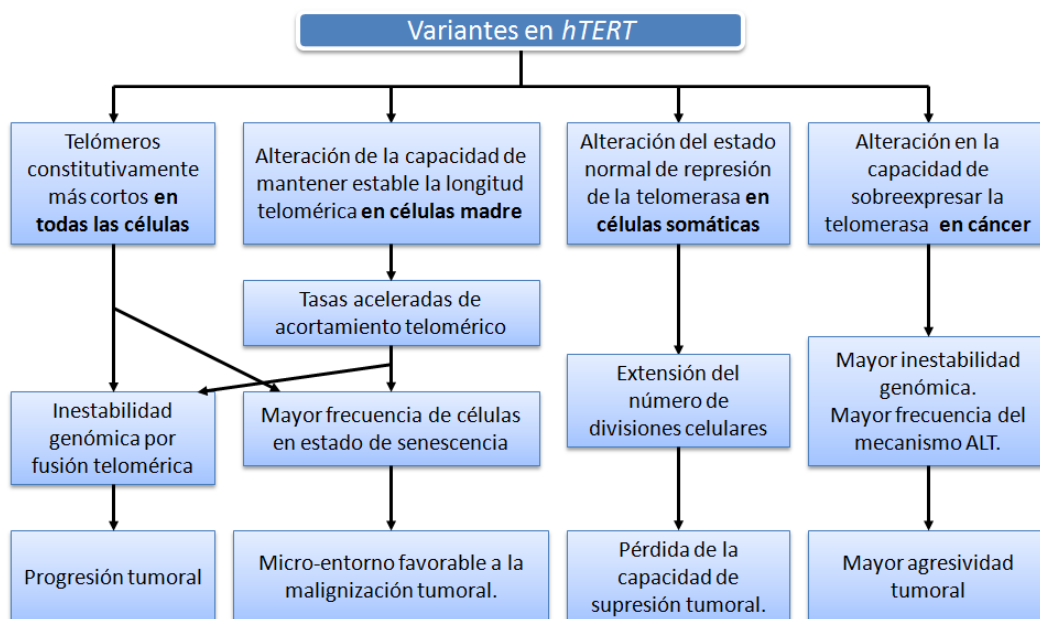
La enzima de la telomerasa es un complejo ribonucleoproteico compuesto por una molécula de ARN molde (hTERC) y la proteína con actividad catalítica TERT (hTERT en humanos), la cual lleva a cabo la elongación telomérica (Greider et al., 1985; Nakamura et al., 1997) (Figura 21)



**Figura 21. Representación esquemática del complejo telomerasa.** El componente protéico y catalítico es hTERT, utilizándose el ARN hTERC como molde para alargar la hebra saliente del telómero.

El gen *TERT* se encuentra altamente conservado entre especies (Nakamura et al., 1997), de manera que en humanos *hTERT* contiene una baja densidad de polimorfismos no sinónimos en comparación con otros genes (Savage et al., 2005). Esto sugiere que pequeños cambios en la estructura de la proteína puedan conllevar alteraciones notorias en su funcionamiento. Mutaciones severas tanto en el gen *hTERT* como en otros componentes que intervienen en el complejo telomérico causan disqueratosis congénita (Kirwan et al., 2009). Además de numerosas complicaciones, esta enfermedad lleva asociada una probabilidad once veces superior a desarrollar cáncer respecto a la población general. Este riesgo se incrementa notoriamente para cánceres originados en tejidos con alta división celular, como son el cáncer de lengua o la leucemia mieloide aguda. (Killela et al., 2013; Alter et al., 2009).

Considerando los estudios de GWAS, diferentes polimorfismos en el gen que *hTERT* han sido asociados a incrementos de riesgo a desarrollar diferentes tipos de cáncer, incluyendo cáncer de vejiga (Rothman et al., 2010), mama (Haiman et al., 2011; Bojesen et al., 2013), pulmón (Hosgood et al., 2009; Van Dyke et al., 2009; Landi et al., 2009; Jin et al., 2009), ovario (Beesley et al., 2011), páncreas (Petersen et al., 2010), próstata (Kote-Jarai et al., 2011; Wu et al., 2015), glioma (Shete et al., 2009), melanoma (Rafnar et al., 2009), piel no melanómico (Stacey et al., 2009; Yang et al., 2013a), y de células germinales testiculares (Turnbull et al., 2010). En el ámbito del CCR, las variantes rs2736100 y rs2853668, con moderado desequilibrio de ligamiento entre ellas ( $r^2=0,15$ ), mostraron asociación con incrementos de riesgo a padecer este tipo de cáncer (Kinnersley et al., 2012; Peters et al., 2012). Es plausible pensar que estas variaciones puedan causar ciertas alteraciones en el correcto funcionamiento o la expresión de la proteína, con sus correspondientes consecuencias (Figura 22). Por ejemplo, diversas variantes en *hTERT*, incluyendo algunos asociados con incrementos de riesgo a cáncer, se han correlacionado con cambios en la longitud telomérica en linfocitos (Melin et al., 2012). También el cambio rs10936599, próximo al gen *TERC* ha sido asociado a incrementos de riesgo de sufrir CCR (Jones et al., 2012).



**Figura 22. Posibles consecuencias derivadas de la alteración estructural de la telomerasa por la presencia de polimorfismos.** Adaptado de Baird et al., 2010.







# HIPÓTESIS

---



**1)** Existe una gran variabilidad en la penetrancia y la edad de aparición de cáncer en el síndrome de Lynch, incluso entre familias que comparten una misma mutación causal o entre individuos pertenecientes a una misma familia. Se estima que una parte de esta variabilidad podría estar causada por factores genéticos, pero a día de hoy sólo una pequeña fracción de la misma puede explicarse en base al efecto de variantes conocidas. Debido a la importancia del papel de los telómeros en el desarrollo y el riesgo de cáncer, planteamos la posible influencia de la variante rs2075786, situada en el gen de la telomerasa (*hTERT*) y ya previamente relacionada con incrementos de riesgo a otros tipos de cáncer, como modulador del riesgo de cáncer asociado al síndrome de Lynch.

**2)** Alrededor del 40% de las familias que cumplen los criterios de agregación más estrictos para el cáncer colorrectal (CCR) hereditario –los criterios de Ámsterdam– no presentan defectos en el sistema de reparación de bases desapareadas. Para la mayoría de estas familias, agrupadas bajo la denominación de cáncer colorrectal familiar de tipo X (CCRFx), se desconoce la causa genética responsable de su predisposición al CCR. Consideramos que el estudio en profundidad del CCRFx podrá acercarnos a las razones de dicha predisposición. Para ello planteamos dos estrategias diferentes:

- La caracterización molecular de tumores desarrollados en el contexto del CCRFx aportará a un mayor conocimiento y comprensión de la naturaleza de esta entidad. La comparación de las características del CCRFx frente a las del CCR esporádico sin fallos en el sistema de reparación de bases desapareadas revelará aquellos rasgos específicos de los tumores CCRFx potencialmente ligados a la predisposición familiar al CCR.
- Planteamos la secuenciación de exomas completos de tres afectos de CCR pertenecientes a una familia CCRFx. Mediante el cribado de variantes comunes a los tres afectos y el estudio en profundidad de los cambios de mayor impacto funcional y/o en genes relevantes, esperamos identificar las mutaciones ligadas al CCRFx en la familia estudiada.

**3)** Recientemente se ha asociado la presencia de mutaciones germinales en los dominios exonucleasa de los genes *POLE* y *POLD1* con un riesgo incrementado a desarrollar CCR y poliposis. El fenotipo asociado se ha denominado síndrome asociado a la actividad reparadora de la polimerasa (SAARP). Debido a su reciente descripción, el número de casos descritos es escaso y el fenotipo asociado a este síndrome se encuentra vagamente definido. Hipotetizamos que el estudio del dominio exonucleasa de *POLE* y *POLD1* en una serie amplia de pacientes con cáncer colorrectal familiar o poliposis permitirá identificar nuevos casos ligados al SAARP. Considerando los nuevos portadores identificados junto a los ya descritos en la literatura, podremos establecer unas pautas para la selección de familias candidatas al análisis genético de *POLE* y *POLD1*, así como para el seguimiento clínico de portadores.



# OBJETIVOS

---



El **objetivo general** de esta tesis es la profundización en el conocimiento de varias formas de CCR hereditario. Esto incluye la caracterización molecular y fenotípica, la investigación de las causas genéticas, o la identificación de modificadores genéticos de riesgo en el síndrome de Lynch, el cáncer colorrectal familiar de tipo X y el síndrome asociado a la actividad reparadora de la polimerasa.

Los **objetivos específicos** de esta tesis son:

- ❖ Evaluar el papel de la variante rs2075786 situada en el gen de la telomerasa (*hTERT*) como modificador de riesgo de cáncer en el SL.
- ❖ Caracterizar molecularmente los tumores desarrollados en el contexto del CCRFX. Identificar y estudiar las diferencias moleculares existentes entre estos tumores y el CCR esporádico sin fallos en el sistema de reparación de bases desapareadas.
- ❖ Definir el fenotipo asociado al SAARP mediante la identificación de portadores de mutaciones en el dominio exonucleasa de *POLE* y *POLD1*. Evaluar el impacto de estos genes en las poliposis colónicas y en el CCR hereditario no polipósico. Considerando los casos identificados en nuestro estudio junto a los descritos en la literatura, establecer recomendaciones para la selección de familias candidatas al análisis genético de *POLE* y *POLD1*, así como para el seguimiento clínico de portadores.
- ❖ Identificar el/los gen(es) responsable(s) de la agregación de casos de CCR en una familia CCRFX mediante la secuenciación de los exomas completos de los individuos afectos de CCR. Evaluar el impacto de dicho(s) gen(es) en el conjunto del CCR familiar.





# RESULTADOS

---



Los resultados obtenidos en los diferentes proyectos abarcados en la presente tesis doctoral han sido recopilados para su publicación a través de artículos científicos. A fecha del depósito de esta tesis, tres de los artículos se encuentran publicados y/o aceptados para su inminente publicación, mientras que los resultados generados en un cuarto proyecto se encuentran en la fase final de su preparación para su próximo envío a publicación.

Dichos artículos se incluyen a continuación junto a la lista de autores participantes y un breve resumen de su contenido.

#### **Artículo 1**

Una variante genética en el gen de la telomerasa modifica el riesgo de cáncer en el síndrome de Lynch.

#### **Artículo 2**

Caracterización molecular global de los tumores de cáncer colorrectal hereditario no polipósico sin fallos en el sistema reparador de bases desapareadas.

#### **Artículo 3**

Mutaciones en *POLE* y *POLD1* en 529 sujetos con cáncer colorrectal y/o poliposis, revisión de los casos identificados y recomendaciones para el análisis genético y el seguimiento clínico.

#### **Artículo 4**

Identificación mediante secuenciación exómica de mutaciones germinales en *BRF1* y *BARD1* como causas probables de cáncer colorrectal hereditario no polipósico.



## **ARTÍCULO 1**

### **Genetic variant in the telomerase gene modifies cancer risk in Lynch syndrome**

**Fernando Bellido**, Elisabet Guinó, Shantie Jagmohan-Changur, Nuria Seguí, Marta Pineda, Matilde Navarro, Conxi Lázaro, Ignacio Blanco, Hans FA Vasen, Victor Moreno, Gabriel Capellá, Juul T Wijnen y Laura Valle.

European Journal of Human Genetics 21(5):511-6; 2013. doi: 10.1038/ejhg.2012.204.

#### **Resumen:**

El síndrome de Lynch (SL) es una condición hereditaria de predisposición al cáncer causada por mutaciones germinales en genes del sistema de reparación de bases desapareadas (MMR, del inglés *mismatch repair*). La alta variabilidad en el riesgo de cáncer observada entre los pacientes con SL sugiere la existencia de factores modificadores de dicho riesgo. La identificación de modificadores de riesgo genéticos podría ayudar a desarrollar programas de seguimiento personalizados basados en predicciones riesgos de cáncer individualizadas. En el presente estudio, evaluamos el papel del SNP rs2075786 localizado en el gen de la telomerasa (*hTERT*), como modificador de riesgo en el SL, mediante el estudio de 255 y 675 portadores de mutaciones ligadas al SL procedentes de España y Holanda respectivamente. El estudio de la serie española reveló que el alelo más infrecuente (A) confiere un incremento de riesgo a desarrollar cáncer a edades tempranas. El análisis de la serie holandesa confirmó dicha asociación para el alelo A en homocigosis, con incrementos de riesgo en portadores menores de 45 años (riesgo relativo SLca $\leq$ 45\_AA=2,90; intervalo de confianza al 95%=1,02–8,26). El polimorfismo rs2075786 sin embargo no ha sido asociado con incrementos de riesgo a CCR en la población general ni a CCR familiar no ligado al SL. Estudios *in silico* predijeron la rotura de un sitio regulador de la transcripción en el que se produce la unión a un receptor de retinoides, el receptor de retinoides X alfa. Posiblemente este cambio lleva asociada una activación temprana de la telomerasa y consecuentemente, una aceleración de la carcinogénesis. De hecho, los pacientes con SL afectados de cáncer portadores del genotipo rs2075786 AA mostraron telómeros más cortos que aquellos con el genotipo GG. En conclusión, los portadores de mutaciones en los genes MMR y con genotipo AA para el SNP *hTERT* rs2075786 se encuentran en mayor riesgo de desarrollar un tumor ligado al SL a una edad temprana. Medidas preventivas de cáncer y la aplicación de programas de seguimiento más estrictos a edades tempranas podrán ayudar a prevenir o detectar con mayor antelación el cáncer en estos portadores.



ARTICLE

# Genetic variant in the telomerase gene modifies cancer risk in Lynch syndrome

Fernando Bellido<sup>1,7</sup>, Elisabet Guinó<sup>2,7</sup>, Shantie Jagmohan-Changur<sup>3</sup>, Nuria Seguí<sup>1</sup>, Marta Pineda<sup>1</sup>, Matilde Navarro<sup>1</sup>, Conxi Lázaro<sup>1</sup>, Ignacio Blanco<sup>1</sup>, Hans FA Vasen<sup>4</sup>, Victor Moreno<sup>2,5</sup>, Gabriel Capellá<sup>1</sup>, Juul T Wijnen<sup>3,6</sup> and Laura Valle<sup>\*,1</sup>

Lynch syndrome (LS) is an inherited cancer-predisposing disorder caused by germline mutations in the mismatch repair (*MMR*) genes. The high variability in individual cancer risk observed among LS patients suggests the existence of modifying factors. Identifying genetic modifiers of risk could help implement personalized surveillance programs based on predicted cancer risks. Here we evaluate the role of the telomerase (*hTERT*) rs2075786 SNP as a cancer-risk modifier in LS, studying 255 and 675 *MMR* gene mutation carriers from Spain and the Netherlands, respectively. The study of the Spanish sample revealed that the minor allele (A) confers increased cancer risk at an early age. The analysis of the Dutch sample confirmed the association of the A allele, especially in homozygosity, with increased cancer risk in mutation carriers under the age of 45 (relative risk<sub>LSca<45\_AA</sub> = 2.90; 95% confidence interval = 1.02–8.26). Rs2075786 is associated with colorectal cancer (CRC) risk neither in the general population nor in non-Lynch CRC families. *In silico* studies predicted that the SNP causes the disruption of a transcription binding site for a retinoid receptor, retinoid X receptor alpha, probably causing early telomerase activation and therefore accelerated carcinogenesis. Notably, cancer-affected LS patients with the AA genotype have shorter telomeres than those with GG. In conclusion, *MMR* gene mutation carriers with *hTERT* rs2075786 are at high risk to develop a LS-related tumor at an early age. Cancer-preventive measures and stricter cancer surveillance at early ages might help prevent or early detect cancer in these mutation carriers.

*European Journal of Human Genetics* (2013) 21, 511–516; doi:10.1038/ejhg.2012.204; published online 5 September 2012

**Keywords:** Lynch syndrome; hereditary non-polyposis colorectal cancer; cancer-risk modifier; *hTERT*; telomerase; rs2075786

## INTRODUCTION

Lynch syndrome (LS) (MIM 120435) is an autosomal-dominant inherited disorder caused by germline mutations in the DNA mismatch repair (*MMR*) genes. It is characterized by early-onset colorectal cancer (CRC) and an increased risk of upper gastrointestinal, urologic and gynecologic cancers.<sup>1</sup> Several studies have estimated the cancer risks associated with mutations in the *MMR* genes, but these estimates vary substantially across the studies (20–80% lifetime risk).<sup>2–9</sup>

There is a considerable variation in LS expression and no obvious gene-specific genotype/phenotype correlations have been demonstrated nor does there appear to be any relationship between the location of a mutation and type of disease. In addition to environmental factors, there is evidence suggesting the existence of genetic factors that somehow explain the variability in individual cancer risk.<sup>10</sup> Identifying the genetic modifiers of risk can lead to an efficient stratification of mutation carriers based on their predicted risk, implying thus, a more appropriate clinical management based on personalized surveillance programs.

Most of the attempts to identify cancer-risk modifiers in LS have been based on the study of candidate genes and most of them have

not been validated when tested in larger sample sizes.<sup>11</sup> In contrast, two genetic variants previously identified in CRC genome-wide association studies (GWAS), rs16892766 and rs3802842, might modify cancer risk in LS families.<sup>12–14</sup>

Telomeres are located at the end of chromosomes and protect the chromosome ends from nucleolytic degradation, end-to-end fusions and irregular recombination, being thus critical for genome stability and integrity. Telomeres progressively shorten with each cell replication cycle. Telomere length anomaly appears to be one of the earliest and most prevalent genetic alterations in the multistep process of malignant transformation.<sup>15,16</sup> Telomerase catalyzes the *de novo* addition of telomeric repeat sequences onto chromosome ends and it is usually inactive in normal somatic cells, whereas its expression has been linked to increased susceptibility to tumorigenesis.<sup>17–19</sup> Genetic variants located in genes involved in telomere maintenance, and in particular in *hTERT* (MIM 187270), the gene encoding the catalytic subunit of telomerase, have been associated with increased risk to cancer.<sup>20–27</sup> Among the better characterized cancer variants, the *hTERT* rs2075786 (c.2654 + 269G/A) SNP has been associated with lung cancer risk.<sup>28,29</sup> However, no studies have reported any

<sup>1</sup>Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, L'Hospitalet de Llobregat, Spain; <sup>2</sup>Unit of Biomarkers and Susceptibility, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL and CIBERESP, L'Hospitalet de Llobregat, Spain; <sup>3</sup>Department of Human Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands; <sup>4</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Leiden University Medical Center, The Netherlands Foundation for the Detection of Hereditary Tumors, Leiden, The Netherlands; <sup>5</sup>Department of Clinical Sciences, Faculty of Medicine, University of Barcelona, L'Hospitalet de Llobregat, Spain; <sup>6</sup>Department of Clinical Genetics, Leiden University Medical Center, Leiden, The Netherlands

<sup>7</sup>These authors contributed equally to this work.

\*Correspondence: Dr L Valle, Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, Av. Gran Via 199-203, L'Hospitalet de Llobregat, 08908 Barcelona, Spain. Tel: +34 93 2607145; Fax: +34 93 2607466; E-mail: lvalle@iconcologia.net

Received 7 June 2012; revised 2 August 2012; accepted 7 August 2012; published online 5 September 2012



**Table 1** Characteristics of the *MMR* mutation carriers included in the study

		Spain			The Netherlands		
		Affected n (%)	Unaffected n (%)	Total n (Fam)	Affected n (%)	Unaffected n (%)	Total n (Fam)
No. of <i>MMR</i> carriers	LS cancer	147	108	255 (101)	201	474	675 (127)
	CRC	134	121		146	529	
<i>Gene</i>							
<i>MLH1</i>	LS cancer	82 (55.8)	69 (63.9)	151 (54)	73 (36.3)	175 (36.9)	248 (43)
	CRC	77 (57.5)	74 (61.2)		62 (42.5)	186 (35.2)	
<i>MSH2</i>	LS cancer	49 (33.3)	30 (27.8)	79 (34)	85 (42.3)	166 (35.0)	251 (57)
	CRC	43 (32.1)	36 (29.8)		61 (41.8)	190 (35.9)	
<i>MSH6</i>	LS cancer	11 (7.5)	9 (8.3)	20 (9)	42 (20.9)	133 (28.1)	175 (26)
	CRC	9 (6.7)	11 (9.1)		22 (15.1)	153 (28.9)	
<i>PMS2</i>	LS cancer	5 (3.4)	0 (0.0)	5 (4)	1 (0.5)	0 (0.0)	1 (1)
	CRC	5 (3.7)	0 (0.0)		1 (0.7)	0 (0.0)	
<i>Gender</i>							
Male	LS cancer	75 (50.3)	43 (41.7)	118	87 (43.3)	213 (44.9)	300
	CRC	73 (54.5)	45 (37.9)		79 (54.1)	221 (41.8)	
Female	LS cancer	73 (49.7)	64 (58.3)	137	114 (56.7)	261 (55.1)	375
	CRC	61 (45.5)	76 (62.1)		67 (45.9)	308 (58.2)	
Age <sup>a</sup> (average ± SD)	LS cancer	44.6 ± 12.0	36.8 ± 13.1		45.1 ± 10.8	46.2 ± 13.6	
	CRC	44.4 ± 12.3	39.1 ± 14.4		44.8 ± 11.5	47.6 ± 14.1	
Polypectomy	LS cancer	NA	NA		71 (42.8)	95 (57.2)	166
	CRC				58 (34.9)	108 (65.1)	101

Abbreviations: CRC, colorectal cancer; Fam, number of families; LS cancer, colon, rectum, endometrium, stomach, ovary, urinary tract and small intestine; *MMR*, mismatch repair; NA, not available information.

<sup>a</sup>Age at diagnosis for cancer-affected subjects, or age at last follow-up or at death for unaffected subjects.

association between variants located at the *hTERT* locus and the risk of CRC.

Here we evaluate *hTERT* rs2075786 as a modifier of cancer in LS patients in 255 *MMR* gene mutation carriers from Spain. Also, 675 mutation carriers from the Netherlands were analyzed. We also assessed its role as cancer-risk factor in a population-based case-control series and in non-LS familial cases.

## MATERIALS AND METHODS

### Subjects

**Spanish sample.** A total of 255 individuals from 101 LS families whose mutation carrier statuses were known were included in the study. They were assessed through the Hereditary Cancer Program of the Catalan Institute of Oncology from 1998 to 2010. All families were of Caucasian origin. Informed consent was obtained from all individuals. *MMR* mutation analysis was performed on genomic DNA extracted from peripheral blood lymphocytes. Large genomic alterations were studied using multiplex ligation-dependent probe amplification (SALSA MLPA Kits, MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Mutation screening was performed by direct sequencing after PCR amplification (primers and conditions available upon request). In all, 147 (57.6%) *MMR* gene mutation carriers had been diagnosed with a LS-related tumor, of whom 134 with CRC. The clinical characteristics of the subjects are detailed in Table 1.

Also, DNA from 277 sporadic CRC cases and 280 controls were obtained from a hospital-based case-control study (Bellvitge Colorectal Cancer Study). Cases were consecutive patients with a first diagnosis of colorectal adenocarcinoma attending the Bellvitge University Hospital in Barcelona. For the group of patients, the male/female ratio is 1.2 and the mean age is 66.7 (range: 23–91), and for the controls, 1.1 and 65.5 (range: 24–92), respectively. Details about the study population were published elsewhere.<sup>30</sup>

**Dutch sample.** A total of 675 *MMR* gene mutation carriers from 127 different families from the Dutch LS Registry were studied. Detailed description of the registry, individuals and DNA extraction method was published before.<sup>12</sup>

Information on the subjects has been recently updated and thus, follow-up data added. In all, 201 (29.8%) *MMR* gene mutation carriers had been diagnosed with a LS-related tumor, of whom 146 are with CRC. Table 1 summarizes the updated clinical characteristics of the subjects.

The Dutch case-control series consists of 324 CRC cases and 785 controls. Cases are probands assessed through a familial cancer clinic; therefore, they are suspected of genetic CRC susceptibility but with no germline mutations identified in the *MMR* genes. Regarding controls, 475 are healthy blood donors and 310 are healthy spouses of *MMR* gene mutation carriers.

*MMR* gene mutation carriers are derived from multiple-case families selected for genetic counseling and testing. In this situation, the disease status clearly affects the likelihood of testing, causing an overrepresentation of affected individuals. This observation is evident in the Spanish but not in the Dutch sample. The Dutch registry has been running longer (it was established in 1985) and follows large and complete LS families, whereas the Spanish series comes from a cancer hospital-based genetic counseling unit established in 1998, where a clear ascertainment bias towards the assessment of cancer-affected family members exists. Because of the differences in affected vs unaffected ratios, the studies were performed independently for the Spanish and Dutch samples.

### Genotyping

The rs2075786 SNP was genotyped using the commercially available TaqMan assay C\_15824034\_10 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Reactions were performed in duplicate in the LightCycler 480 real-time PCR detection system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Genotype calling was performed automatically by the LightCycler 480 II software (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Genotyping failed in 78 of the 2596 (3%) samples included in the study.

### In silico analyses

Public genome browsers (Ensembl, NCBI and USCS genome browsers) were checked out to investigate the existence of transcription of noncoding RNAs from the region where rs2075786 is located. The presence

of microRNA-binding sites was studied using the microRNA target-prediction algorithms provided by <http://www.microrna.org>. The strength of the pseudoexon splice sites was analyzed using three different prediction programs: [www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html), [http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan\\_scoreseq.html](http://genes.mit.edu/burgelab/maxent/Xmaxentscan_scoreseq.html) and <http://ast.bioinfo.tau.ac.il/SpliceSiteFrame.html>, as previously described.<sup>31</sup> Putative binding sites for transcription factors were identified using PROMO 3.0, a web-based program that employs the TRANSFAC database version 8.3 to construct specific binding-site weight matrices for prediction of transcription factor-binding sites.<sup>32,33</sup>

### Relative telomere length assessment

Telomere length quantification was performed using a monochrome multiplex quantitative PCR method, as described by Cawthon with slight modifications (available upon request).<sup>34</sup>

### Statistical analyses

Evaluation of the deviation of rs2075786 from the expected Hardy–Weinberg equilibrium was performed in controls from each population. The SNP was in Hardy–Weinberg equilibrium in controls from both populations ( $P_{\text{Spanish}} = 0.48$ ;  $P_{\text{Dutch}} = 0.93$ ).

The association between genotypes and risk of CRC or LS-related tumors was evaluated using conditional logistic regression adjusting for familial clustering. The end points considered were: age at diagnosis of the LS-related cancer or CRC for affected individuals and age of last follow-up for unaffected individuals. Likelihood ratio tests were applied to assess statistical significance. In general, relative risks (RRs), 95% confidence intervals (CIs) and associated *P*-values were estimated for different models of inheritance and the best model was selected using the Akaike information criterion. The interaction of genotypes with age stratified at 45 years was assessed to identify anticipation effects. For case–control studies, odds ratios (ORs) and 95% CI were calculated using logistic regression adjusted for gender. Kruskal–Wallis rank-based test was used to compare telomere length among rs2075786 genotype groups, adjusting for age and gender. Statistical analyses were performed using R.

## RESULTS

### Spanish study

No differences in rs2075786 genotype distributions were observed when comparing *MMR* gene mutation carriers affected with cancer, either LS-related or only CRC, and unaffected mutation carriers (Supplementary Table S1).

We further analyzed rs2075786 genotype distributions within two age intervals in the cancer group. For this aim, we established a cut off of 45 years of age based on the median age of all individuals included

in the study. *MMR* gene mutation carriers diagnosed with cancer before 45 years of age were compared with those diagnosed after 45 years of age and those who were cancer-free after 45 years of age. Under this condition, the A allele conferred an increased risk of cancer in LS carriers under the age of 45 compared with those diagnosed with cancer or cancer-free after the age of 45 (Table 2).

Although borderline and not fulfilling the required standards for declaring an association, the results obtained in the Spanish sample led us to analyze another series (Dutch study) in a more comprehensive manner, thanks to the larger sample size and the availability of follow-up and polypectomy information.

### Dutch study

A total of 675 *MMR* gene mutation carriers from the Dutch hereditary CRC registry were included in the analysis. As previously observed for the Spanish *MMR* gene mutation carriers, no effect was detected on the general risk of cancer between cancer-affected and unaffected individuals (Supplementary Table S2).

To study the effect on cancer risk related with age intervals, cancer-affected vs unaffected *MMR* gene mutation carriers were compared within the groups under 45 years and within the groups  $\geq 45$ . For this purpose, the two age groups were created as: group age  $< 45$ , *MMR* gene mutation carriers diagnosed with cancer under the age of 45 and unaffected *MMR* gene mutation carriers under age 45 and group age  $\geq 45$ , cancer-affected and unaffected *MMR* gene mutation carriers  $> 45$ . Because of the larger sample size and the fact that unaffected carriers had a similar or even higher average age than cancer-affected carriers (Table 1), this type of distribution in age groups could be performed for the Dutch *MMR* gene mutation carriers.

In this series, the AA genotype confers an increased risk of LS-related cancers in individuals  $< 45$  years of age (RR = 2.76; 95% CI = 1.02–7.50). When only CRC was considered, an RR of 2.46 (96% CI = 0.78–7.82) was found for the AA homozygotes, but this observation was not statistically significant, probably because of the effect on the risk of all LS-related tumors. No association of rs2075786 with cancer risk was observed in the  $\geq 45$  groups (Table 3).

*MMR* gene mutation carriers are usually under strict clinical surveillance and undergo colonoscopies on a routine basis, implying that whenever detected, polyps are removed. As polypectomy affects subsequent CRC risk, we included this information in the analysis. Within the group age  $< 45$ , all unaffected subjects with a polypectomy were excluded. Moreover, within the group age  $\geq 45$ , all cancer-affected subjects with a polypectomy were performed under the age of 45 and all unaffected individuals with polypectomies were excluded from the analysis. A total of 100 individuals were removed. In this scenario, the increased cancer risk conferred by AA in the  $< 45$  group is maintained or even increased (RR<sub>LSca < 45\_AA</sub> = 2.90; 95% CI = 1.02–8.26) (Table 4). Slight random differences from the previous analysis dependent on the genotype of the cases excluded were observed.

No effect of gender on cancer risks was observed (data not shown). Regarding the *MMR* gene affected, the analysis was performed considering *MLH1* and *MSH2* separately (Supplementary Table S3). Although differences did not reach significance and larger series should be studied to draw definitive conclusions, the results suggest that the effect of rs2075786 on cancer risk occurs for both *MLH1* and *MSH2* mutation carriers under the age of 45 (RR<sub>MLH1 < 45\_AA</sub> = 3.86; 95% CI = 0.70–21.33 and RR<sub>MSH2 < 45\_AA</sub> = 2.36; 95% CI = 0.42–13.39).

**Table 2** Genotype distributions within age intervals in Spanish *MMR* mutation carriers

Genotype	LS ca. < 45 n (%)	LS ca. $\geq 45$ n (%)	RR (95% CI) <sup>a</sup>	P
GG	31 (38.3)	43 (50.0)		
GA	43 (53.1)	29 (33.7)	4.69 (0.92–23.88)	0.062
AA	7 (8.6)	14 (16.3)	3.76 (0.41–34.31)	0.241
LRT (2 df)				0.126
GA + AA	50 (61.7)	43 (50.0)	4.66 (0.92–23.71)	0.064
LRT (1 df)				0.044
Per allele			1.98 (0.70–5.65)	0.199
LRT (1 df)				0.192

Abbreviations: CI, confidence interval; df, degrees of freedom; LRT, likelihood ratio test; LS ca., colon, rectum, endometrium, stomach, ovary, urinary tract or small intestine cancer; *MMR*, mismatch repair; RR, relative risk.

Young cancer-affected *MMR* mutation carriers (cancer diagnosed before 45 years of age) are compared with *MMR* mutation carriers who developed a LS-associated tumor after 45 years of age or who are cancer-free after 45 years of age.

<sup>a</sup>RRs were estimated using conditional logistic regression adjusting for familial clustering.

**Table 3 Risk of cancer associated with *hTERT* rs2075786 in Dutch MMR mutation carriers within age intervals (<45 and ≥45 years)**

Genotype	LS ca. n (%)	LS ca.-free n (%)	RR (95% CI) <sup>a</sup>	P	CRC n (%)	CRC-free n (%)	RR (95% CI) <sup>a</sup>	P
<i>Group age &lt; 45</i>								
GG	32 (36.8)	112 (47.1)	1		27 (40.3)	113 (46.7)	1	
GA	41 (47.1)	109 (45.8)	1.12 (0.59–2.12)	0.735	30 (44.8)	112 (46.3)	0.92 (0.45–1.91)	0.829
AA	14 (16.1)	17 (7.1)	2.76 (1.02–7.50)	0.046	10 (14.9)	17 (7%)	2.46 (0.78–7.82)	0.126
<i>Group age ≥ 45</i>								
GG	53 (48.6)	94 (42.3)	1		37 (48.7)	114 (42.1)	1	
GA	41 (37.6)	102 (45.9)	0.86 (0.46–1.61)	0.644	30 (39.5)	121 (44.6)	0.93 (0.47–1.83)	0.830
AA	15 (13.8)	26 (11.7)	0.67 (0.27–1.69)	0.398	9 (11.8)	36 (13.3)	0.50 (0.17–1.45)	0.201
LRT (5 df)				0.259				0.397
Interaction with age ( $\chi^2$ test)				0.112				0.088
<i>Per allele</i>								
Age < 45			1.46 (0.92–2.31)	0.109			1.31 (0.76–2.23)	0.328
Age ≥ 45			0.84 (0.54–1.28)	0.413			0.76 (0.47–1.22)	0.260
LRT (3 df)				0.163				0.445
Interaction with age ( $\chi^2$ test)				0.070				0.120

Abbreviations: CI, confidence interval; df, degrees of freedom; LRT, likelihood ratio test; LS ca., colon, rectum, endometrium, stomach, ovary, urinary tract or small intestine cancer; MMR, mismatch repair; RR: relative risk.

<sup>a</sup>RRs were estimated using a conditional logistic regression adjusting for familial clustering.

**Table 4 Risk of cancer associated with *hTERT* rs2075786 in Dutch MMR mutation carriers within age intervals (<45 and ≥45 years) considering polypectomies**

Genotype	LS ca. n (%)	LS ca.-free n (%)	RR (95% CI) <sup>a</sup>	P	CRC n (%)	CRC-free n (%)	RR (95% CI) <sup>a</sup>	P
<i>Group age &lt; 45</i>								
GG	32 (36.8)	104 (48.6)	1		27 (40.3)	105 (48.4)	1	
GA	41 (47.1)	94 (43.9)	1.19 (0.61–2.34)	0.604	30 (44.8)	96 (44.2)	1.03 (0.48–2.20)	0.938
AA	14 (16.1)	16 (7.5)	2.90 (1.02–8.26)	0.047	10 (14.9)	16 (7.4)	2.28 (0.70–7.40)	0.170
<i>Group age ≥ 45</i>								
GG	50 (48.1)	64 (41.3)	1		35 (48.6)	79 (41.1)	1	
GA	40 (38.5)	74 (47.7)	0.96 (0.45–1.91)	0.898	29 (40.3)	89 (46.4)	1.05 (0.49–2.25)	0.898
AA	14 (13.5)	17 (11.0)	0.52 (0.18–1.54)	0.239	8 (11.1)	24 (12.5)	0.33 (0.10–1.10)	0.070
LRT (5 df)				0.038				0.098
Interaction with age ( $\chi^2$ test)				0.082				0.040
<i>Per allele</i>								
Age < 45			1.51 (0.93–2.44)	0.096			1.34 (0.77–2.30)	0.298
Age ≥ 45			0.79 (0.48–1.30)	0.354			0.68 (0.40–1.16)	0.155
LRT (3 df)				0.017				0.118
Interaction with age ( $\chi^2$ test)				0.064				0.071

Abbreviations: CI, confidence interval; df, degrees of freedom; LRT, likelihood ratio test; LS ca., colon, rectum, endometrium, stomach, ovary, urinary tract or small intestine cancer; MMR, mismatch repair; RR: relative risk.

<sup>a</sup>RRs were estimated using a conditional logistic regression adjusting for familial clustering.

### Rs2075786 and CRC risk in the general population and in non-Lynch CRC families

To evaluate whether rs2075786 is associated with CRC risk in the general population and in non-Lynch familial CRC cases, we performed an association study in a case-control series from Spain and in non-Lynch CRC familial cases from the Netherlands. Rs2075786 was in Hardy-Weinberg equilibrium in both the Spanish ( $P=0.59$ ) and Dutch ( $P=0.88$ ) controls. No statistically significant association between rs2074786 and CRC was detected in any of the two situations, with ORs close to 1 (Supplementary Table S4).

Also, when separating by age groups (<45 and ≥45) in the non-Lynch familial CRC study (The Netherlands), no statistically

significant differences were identified in either group (Supplementary Table S5). The age stratification could not be performed for the sporadic case-control series (Spain) because of the scarcity of sporadic CRC patients with <45 years of age present.

### *In silico* studies to unravel rs2075786 functionality

We performed an *in silico* search of potential effects of the variant on gene splicing, transcription factor or microRNA binding, as well as of noncoding RNAs being transcribed from that genomic region. Public databases showed inexistence of noncoding RNAs, and microRNA target-prediction algorithms found no microRNA-binding sites when either allele (A or G) was present. Likewise, gene splicing was not

affected. *In silico* search for putative binding sites of transcription factors revealed that when the rare allele (A) of rs2075786 is present, the elimination of a binding site for retinoid X receptor alpha (RXR- $\alpha$ ) is predicted.

### Rs2075786 and telomere length

To test the hypothesis that telomere length is compromised by the presence of the A allele of rs2075786, we measured the relative telomere length in blood DNA of the cancer-affected LS patients from Spain. Individuals with the AA genotype have shorter telomeres than individuals with the GG ( $P=0.011$ ) and GA ( $P=0.058$ ) genotypes (Figure 1). No association of relative telomere length with rs2075786 genotypes was found in sporadic CRC patients (Supplementary Figure S1).

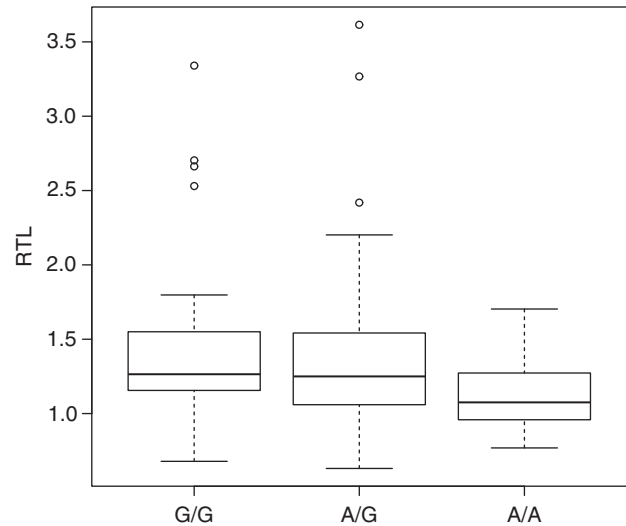
### DISCUSSION

There remains a considerable variability in LS disease expression that cannot be readily explained by genetic variance occurring solely within the *MMR* genes. Several studies have tried to determine whether there are any genetic modifying factors that could be associated with an increased likelihood of developing cancer. In this study, we show that the AA genotype of the variant rs2075786 of the telomerase gene (*hTERT*) is associated with an increased risk of LS-related cancers in *MMR* gene mutation carriers under 45 years of age, indicating anticipation in the age of onset of cancer. Moreover, when information about polypectomies, a therapeutic intervention that affects CRC risk and might lead to false negatives, was incorporated to the analyses, the results obtained improved, strengthening the observation ( $RR_{<45\_AA}=2.90$ ; 95% CI = 1.02–8.26).

The field of cancer-risk modifiers of LS is very active and has provided in the recent years controversial results. First, candidate genes that have some plausible biological role in the disease were evaluated. Except for rare exceptions, the initial findings identified in small-sized samples were not validated in larger series.<sup>11</sup> More recently, some polymorphisms identified through GWAS of unselected CRC patients and controls have been shown to modify cancer risk in LS families. Wijnen *et al*<sup>12</sup> first studied six GWAS CRC susceptibility SNPs in 675 *MMR* gene mutation carriers from 127 LS families. They found that two of them, at 8q23.3 and 11q23.1, were associated with CRC risk in mutation carriers, particularly in females.<sup>12</sup> These results were partly confirmed in a cohort of Australian and Polish *MMR* mutation carriers, but were not replicated in a French cohort.<sup>13,14</sup>

We selected the *hTERT* variant rs2075786 by somehow combining candidate gene and GWAS-based approaches. First, *hTERT* has an important role at very early stages of carcinogenesis, its expression has been linked to increased susceptibility to tumorigenesis, and rs2075786 has been associated with cancer risk.<sup>15,16,18,19,28,29</sup> And second, through GWAS, genetic variants located in genes involved in telomere maintenance, and in particular in *hTERT*, were also associated with increased risk to cancer.<sup>20–27</sup> In contrast to previous studies examining the role of modifier genes,<sup>11</sup> our study includes two independent series of *MMR* gene mutation carriers, of 255 and 675 individuals, the latest being among the largest series used to study genetic modifiers of LS. In view of our results with rs2075786, it may be relevant to study the role of other *hTERT* polymorphisms as cancer-risk modifiers in LS, in particular those variants with functional implications and/or with strong levels of evidence of being associated with cancer risk.<sup>35</sup>

In order to unravel the functional effect of rs2075786, *in silico* analysis predicted that when the minor allele (A) is present, a binding



**Figure 1** Blood relative telomere length (RTL) in 146 cancer-affected LS patients according to rs2075786 genotype distribution ( $n_{GG}=66$ ,  $n_{AG}=64$  and  $n_{AA}=16$ ). The boxes represent the interquartile range of distributions (25th–75th percentile); the horizontal lines within the boxes, the medians; and the vertical lines, the 5th and 95th percentiles.

site for RXR- $\alpha$  is eliminated. Already existent evidence indicates that retinoids, through retinoid receptors, inhibit telomerase activity and downregulate *hTERT* expression.<sup>36,37</sup> These observations suggest that in the presence of the rs2075786 minor allele A, where a binding site for retinoid receptors is absent, natural retinoids cannot efficiently restrain *hTERT* expression, causing accelerated tumor cell growth.

It is nevertheless intriguing that rs2075786 does not influence CRC risk in sporadic or in other non-Lynch familial cases. It is well known that the carcinogenic pathway of *MMR*-deficient tumors clearly differs from that involved in most sporadic and non-LS familial CRC. It has been observed that *MMR*-deficient cell lines and colon tumors show high mutation frequencies at telomere ends, leading to accelerated telomere shortening.<sup>38–41</sup> The effect of an increased telomere-shortening rate is likely to require early activation of telomerase in such tumors. As hypothesized above, the presence of the A allele of rs2075786 might imply even earlier activation of telomerase. Although the effect might be very subtle to have an impact in *MMR*-proficient cells, it could trigger important consequences in a *MMR*-deficient context, such as in LS tumors. In this line of research, it may be interesting to evaluate the role of rs2075786 as a risk allele for sporadic CRC with microsatellite instability.

A possible explanation for the rs2075786 acting as modifier of cancer risk at early ages but not later in life might be that the effect the variant has on telomere shortening (Figure 1) is not efficient at late ages where telomeres are already physiologically shortened due to the aging process.<sup>42</sup> Nevertheless, further functional assays are required to provide experimental evidence about this matter.

When assessing small variations in cancer risk, the issue of personalizing follow-up immediately arises. A potential applicability of rs2075786 genotyping in genetic counseling for clinical management of LS patients can be envisioned. Based on our results, young *MMR* gene mutation carriers with the rs2075786 AA genotype might benefit from an even more intensive clinical surveillance of CRC and other LS-related tumors than the one suggested by the standard LS surveillance protocols. Validation of our observation in additional series is warranted prior to translation to routine clinical practice.

Nevertheless, both *MMR* gene mutation carriers and clinicians should be conscious of the higher risk that rs2075786 carriers have at early ages, observing or even increasing the screening frequency for colorectal, endometrial and other LS-related tumors. Also, lifestyle changes that affect environmental modifier risk factors might help reduce the risk of developing cancer. Likewise, the recent promising results of aspirin-based chemoprevention obtained in LS patients suggest that *MMR* gene mutation carriers with the rs2075786 AA genotype might benefit from this chemopreventive treatment starting at early age.<sup>42</sup>

In conclusion, we observe an association that might help identify *MMR* gene mutation carriers with higher risk to prematurely develop a LS-associated tumor. Rs2075786 adds up to the already known LS modifiers, increasing thus the opportunity to incorporate the information of modifier factors into clinical practice.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the people responsible for genetic counseling and genetic testing in hereditary cancer at both Catalan Institute of Oncology and Leiden University Medical Center, and Gemma Aiza for technical support. This work was partly funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (grant BFU2009-10281 and Ramón y Cajal contract, both to LV; and fellowship to FB), the Scientific Foundation of Asociación Española Contra el Cáncer, the Carlos III Health Institute (ISCIIIRETIC: RD06/0020/1051 and RD06/0020/1050; FIS PI08/1635, FIS PI08/1359 and FIS PS09-01037; and fellowship to NS), the Catalan Health Institute and the Autonomous Government of Catalonia (2009SGR290, 2009SGR1489), and CIBERESP (CB07/02/2005).

- 1 Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR: Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medico-legal ramifications. *Clin Genet* 2009; **76**: 1–18.
- 2 Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD *et al*: Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* 1997; **6**: 105–110.
- 3 Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P *et al*: Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998; **338**: 1481–1487.
- 4 DeFrancisco J, Grady WM: Diagnosis and management of hereditary non-polyposis colon cancer. *Gastrointest Endosc* 2003; **58**: 390–408.
- 5 Quehenberger F, Vasen HF, van Houtwelingen HC: Risk of colorectal and endometrial cancer for carriers of mutations of the hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment. *J Med Genet* 2005; **42**: 491–496.
- 6 Jenkins MA, Baglietto L, Dowty JG *et al*: Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2006; **4**: 489–498.
- 7 Alarcon F, Lasset C, Carayol J *et al*: Estimating cancer risk in HNPCC by the GRL method. *Eur J Hum Genet* 2007; **15**: 831–836.
- 8 Choi YH, Cotterchio M, McKeown-Eyssen G *et al*: Penetrance of colorectal cancer among MLH1/MSH2 carriers participating in the colorectal cancer familial registry in Ontario. *Hered Cancer Clin Pract* 2009; **7**: 14.
- 9 Bonadona V, Bonaiti B, Olschwang S *et al*: Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome. *JAMA* 2011; **305**: 2304–2310.
- 10 Antoniou AC, Chenevix-Trench G: Common genetic variants and cancer risk in Mendelian cancer syndromes. *Curr Opin Genet Dev* 2010; **20**: 299–307.
- 11 Scott RJ, Lubinski J: Genetic epidemiology studies in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Methods Mol Biol* 2009; **472**: 89–102.
- 12 Wijnen JT, Brohet RM, van Eijk R *et al*: Chromosome 8q23.3 and 11q23.1 variants modify colorectal cancer risk in Lynch syndrome. *Gastroenterology* 2009; **136**: 131–137.
- 13 Talseth-Palmer BA, Brenne IS, Ashton KA *et al*: Colorectal cancer susceptibility loci on chromosome 8q23.3 and 11q23.1 as modifiers for disease expression in Lynch syndrome. *J Med Genet* 2010; **48**: 279–284.

- 14 Houlle S, Charbonnier F, Houivet E *et al*: Evaluation of Lynch syndrome modifier genes in 748 *MMR* mutation carriers. *Eur J Hum Genet* 2011; **19**: 887–892.
- 15 Londono-Vallejo JA: Telomere length heterogeneity and chromosome instability. *Cancer Lett* 2004; **212**: 135–144.
- 16 Meeker AK, Hicks JL, Iacobuzio-Donahue CA *et al*: Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 3317–3326.
- 17 Collins K, Mitchell JR: Telomerase in the human organism. *Oncogene* 2002; **21**: 564–579.
- 18 Blasco MA, Lee HW, Hande MP *et al*: Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997; **91**: 25–34.
- 19 Calado RT, Chen J: Telomerase: not just for the elongation of telomeres. *Bioessays* 2006; **28**: 109–112.
- 20 McKay JD, Hung RJ, Gaborieau V *et al*: Lung cancer susceptibility locus at 5p15.33. *Nat Genet* 2008; **40**: 1404–1406.
- 21 Shete S, Hosking FJ, Robertson LB *et al*: Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma. *Nat Genet* 2009; **41**: 899–904.
- 22 Wrensch M, Jenkins RB, Chang JS *et al*: Variants in the *CDKN2B* and *RTEL1* regions are associated with high-grade glioma susceptibility. *Nat Genet* 2009; **41**: 905–908.
- 23 Jin G, Xu L, Shu Y *et al*: Common genetic variants on 5p15.33 contribute to risk of lung adenocarcinoma in a Chinese population. *Carcinogenesis* 2009; **30**: 987–990.
- 24 Landi MT, Chatterjee N, Yu K *et al*: A genome-wide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma. *Am J Hum Genet* 2009; **85**: 679–691.
- 25 Rafnar T, Sulem P, Stacey SN *et al*: Sequence variants at the *TERT-CLPTM1L* locus associate with many cancer types. *Nat Genet* 2009; **41**: 221–227.
- 26 Petersen GM, Amundadottir L, Fuchs CS *et al*: A genome-wide association study identifies pancreatic cancer susceptibility loci on chromosomes 13q22.1, 1q32.1 and 5p15.33. *Nat Genet* 2010; **42**: 224–228.
- 27 Hofer P, Baierl A, Feik E *et al*: *MNS16A* tandem repeats minisatellite of human telomerase gene: a risk factor for colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2011; **32**: 866–871.
- 28 Hosgood 3rd HD, Cawthon R, He X, Chanock S, Lan Q: Genetic variation in telomere maintenance genes, telomere length, and lung cancer susceptibility. *Lung Cancer* 2009; **66**: 157–161.
- 29 Van Dyke AL, Cote ML, Wenzlaff AS *et al*: Chromosome 5p Region SNPs Are Associated with Risk of NSCLC among Women. *J Cancer Epidemiol* 2009; **2009**: 242151.
- 30 Moreno V, Gemignani F, Landi S *et al*: Polymorphisms in genes of nucleotide and base excision repair: risk and prognosis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 2101–2108.
- 31 Pros E, Gomez C, Martin T, Fabregas P, Serra E, Lazaro C: Nature and mRNA effect of 282 different *NF1* point mutations: focus on splicing alterations. *Hum Mutat* 2008; **29**: E173–E193.
- 32 Messeguer X, Escudero R, Farre D, Nunez O, Martinez J, Alba MM: PROMO: detection of known transcription regulatory elements using species-tailored searches. *Bioinformatics* 2002; **18**: 333–334.
- 33 Farre D, Roset R, Huerta M *et al*: Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MALGEN. *Nucleic Acids Res* 2003; **31**: 3651–3653.
- 34 Cawthon RM: Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res* 2009; **37**: e21.
- 35 Moccillini S, Verdi D, Pooley KA *et al*: Telomerase reverse transcriptase locus polymorphisms and cancer risk: a field synopsis and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2012; **104**: 840–854.
- 36 Ding Z, Green AG, Yang X, Chernenko G, Tang SC, Pater A: Retinoic acid inhibits telomerase activity and downregulates expression but does not affect splicing of *hTERT*: correlation with cell growth rate inhibition in an *in vitro* cervical carcinogenesis/multidrug-resistance model. *Exp Cell Res* 2002; **272**: 185–191.
- 37 Pendino F, Dudognon C, Delhommeau F *et al*: Retinoic acid receptor alpha and retinoid-X receptor-specific agonists synergistically target telomerase expression and induce tumor cell death. *Oncogene* 2003; **22**: 9142–9150.
- 38 Pickett HA, Baird DM, Hoff-Olsen P *et al*: Telomere instability detected in sporadic colon cancers, some showing mutations in a mismatch repair gene. *Oncogene* 2004; **23**: 3434–3443.
- 39 Mendez-Bermudez A, Hills M, Pickett HA *et al*: Human telomeres that contain (CTAGGG)*n* repeats show replication dependent instability in somatic cells and the male germline. *Nucleic Acids Res* 2009; **37**: 6225–6238.
- 40 Rampazzo E, Bertorelle R, Serra L *et al*: Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers. *Br J Cancer* 2010; **102**: 1300–1305.
- 41 Mendez-Bermudez A, Royle NJ: Deficiency in DNA mismatch repair increases the rate of telomere shortening in normal human cells. *Hum Mutat* 2011; **32**: 939–946.
- 42 Djojicubroto MW, Choi YS, Lee HW, Rudolph KL: Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer. *Mol Cells* 2003; **15**: 164–175.
- 43 Burn J, Gerdes AM, Macrae F *et al*: Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *Lancet* 2011; **378**: 2081–2087.

Supplementary Information accompanies the paper on European Journal of Human Genetics website (<http://www.nature.com/ejhg>)

## **ARTÍCULO 2**

### **Comprehensive molecular characterisation of hereditary non-polyposis colorectal tumours with mismatch repair proficiency**

**Fernando Bellido**, Marta Pineda, Rebeca Sanz-Pamplona, Matilde Navarro, Marga Nadal, Conxi Lázaro, Ignacio Blanco, Víctor Moreno, Gabriel Capellá, Laura Valle

European Journal of Cancer (2014) 50, 1964–1972. doi: 10.1016/j.ejca.2014.04.022.

#### **Resumen:**

**Contextualización del estudio:** Casi la mitad de los casos de cáncer colorrectal (CCR) hereditario no polipósico no presentan fallos germinales en el sistema de reparación de bases desapareadas (MMR, del inglés *mismatch repair*), siendo su(s) causa(s) genética(s) desconocidas. Nuestro objetivo es la identificación de las características moleculares discordantes entre este grupo de tumores (desarrollados en un contexto hereditario) respecto al CCR de tipo esporádico sin fallos en el sistema MMR.

**Metodología:** Las alteraciones genómicas presentes en 16 tumores pertenecientes a 14 familias Ámsterdam I-II fueron estudiadas utilizando el *microarray* de número de copia OncoScan FFPE, capaz de detectar ganancias y pérdidas cromosómicas a lo largo de todo el genoma. Los puntos calientes para mutaciones somáticas en *BRAF*, *KRAS*, *PIK3CA* y *TP53* fueron analizados en 37 tumores colorrectales pertenecientes a 26 familias Ámsterdam I-II y en 99 CCR esporádicos sin fallos en el sistema MMR, utilizando secuenciación directa automatizada y sondas de genotipado KASPar. El índice de metilación CpG (fenotipo CIMP) fue estudiado en 25 tumores pertenecientes a 19 familias Ámsterdam I-II por medio del sistema de amplificación múltiple de sondas dependientes de ligación específicas para metilación (MS-MLPA, del inglés *methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification*).

**Resultados:** Los tumores hereditarios sin fallos en el sistema MMR mostraron un perfil genómico solapante con el propio de los tumores esporádicos: en ambos casos se observó la presencia de elevada inestabilidad cromosómica y ausencia de metilación positiva de las islas CpG analizadas. Sin embargo, identificamos un incremento significativo en la frecuencia de ganancias para 2p y 2q y de la pérdida de 10q en las familias Ámsterdam I. Además, en estos tumores se identificó una baja frecuencia de regiones >2 Mb en pérdida de heterocigosidad con número de copia neutro o incrementado. No se detectaron diferencias significativas entre ambos grupos en la frecuencia mutacional de *BRAF*, *KRAS*, *PIK3CA* y *TP53* o en el patrón de las mutaciones observadas.





# Comprehensive molecular characterisation of hereditary non-polyposis colorectal tumours with mismatch repair proficiency



Fernando Bellido<sup>a</sup>, Marta Pineda<sup>a</sup>, Rebeca Sanz-Pamplona<sup>b</sup>, Matilde Navarro<sup>a</sup>, Marga Nadal<sup>c</sup>, Conxi Lázaro<sup>a</sup>, Ignacio Blanco<sup>a</sup>, Victor Moreno<sup>b,d</sup>, Gabriel Capellá<sup>a</sup>, Laura Valle<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Spain

<sup>b</sup> Unit of Biomarkers and Susceptibility, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL and CIBERESP, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

<sup>c</sup> Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Spain

<sup>d</sup> Department of Clinical Sciences, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

Received 14 November 2013; received in revised form 12 March 2014; accepted 23 April 2014

Available online 16 May 2014

## KEYWORDS

Familial colorectal cancer  
type X  
Amsterdam criteria  
MMR-proficient colorectal cancer  
Tumour characterisation  
Copy number alterations  
Somatic mutations  
CpG island methylation

**Abstract Background:** Hereditary non-polyposis colorectal cancer (CRC) without mismatch repair (MMR) defects occurs in almost half of high-risk CRC families, but its genetic cause(s) is(are) still unknown. We aimed to identify unique molecular features that differentiate hereditary from sporadic MMR-proficient colorectal tumours.

**Methods:** Genomic alterations in 16 tumours from 14 Amsterdam I–II families were studied using the genome-wide copy number OncoScan™ FFPE microarray. Somatic mutation hotspots in *BRAF*, *KRAS*, *PIK3CA* and *TP53* were analysed in 37 colorectal tumours from 26 families and in 99 sporadic MMR-proficient CRCs, using direct automated sequencing and KASPar genotyping assays. CpG methylation index was studied in 25 tumours from 19 families by methylation-specific multiplex ligation-dependent probe amplification (MS-MLPA).

**Results:** Our findings indicate that hereditary MMR-proficient tumours have overlapping genomic profiles to those obtained in sporadic cases, both suggestive of high chromosomal instability, and no high CpG methylation index. Nevertheless, we identified a significant increase in the frequency of chromosome 2p and 2q gains, and of 10q loss in Amsterdam I families, as well as low frequency of >2 Mb copy-neutral or -gained loss of heterozygosity (LOH). No statistically significant differences in the frequency of *BRAF*, *KRAS*, *PIK3CA* and *TP53* mutations or in the gene mutation patterns were observed. However, *TP53* mutations appeared almost twice more frequently in sporadic tumours.

\* Corresponding author: Address: Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, Av. Gran Via 199-203, 08908 Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 2607145; fax: +34 93 2607466.

E-mail address: [lvalle@iconcologia.net](mailto:lvalle@iconcologia.net) (L. Valle).



**Conclusions:** Overall, hereditary MMR-proficient CRCs display similar molecular characteristics than their sporadic counterparts. However, the differences identified, such as the chromosome 2 gain, 10q loss, or the under-representation of TP53 mutations, if validated in larger series, might be of relevance in the clinical setting and/or in the identification of germline defects underlying some of these familial cases.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

Hereditary non-polyposis colorectal cancer (CRC) is the most common form of hereditary cancer and it has been clinically defined by the Amsterdam criteria, which consider type of cancer, family history and age at cancer onset [1]. Approximately 60% of the families that fulfil the stringent Amsterdam criteria carry germline mutations or epimutations in the mismatch repair (MMR) genes (Lynch syndrome, LS). The remaining 40% do not show a MMR defect and due to its unknown genetic basis, these families have been grouped as familial colorectal cancer type X (FCCTX) [2]. Enormous efforts are being made to elucidate the genetic causes of FCCTX, both by linkage and/or whole-exome/genome sequencing analyses [3]. The evidence gathered so far suggests that FCCTX is, genetically, a highly heterogeneous group, where even shared environmental factors combined with low-penetrance alleles might play a role in the cancer aggregation occurring in some type X families.

Compared to MMR-deficient hereditary cases, i.e. LS, FCCTX shows drastic clinical and molecular differences [4–12]. However, the differences between hereditary MMR-pro (FCCTX) and sporadic MMR-pro tumours, which might be more relevant to unravel causal genes/pathways specifically involved in FCCTX carcinogenesis, are not well defined and previous reports produced conflicting results. Among the most consistent alterations found are the high frequency of 20q gain (65–77%), which occurred less frequently in sporadic cases, and the lower frequency of chromosome 18 loss [12,13]. Regarding the presence of mutations in driver genes of colorectal carcinogenesis, familial cases might have different mutation patterns in *TP53* and *KRAS* than sporadic CRC [6,10].

Here we performed a comprehensive molecular characterisation of FCCTX tumours including genome-wide copy number analysis, screening of *BRAF*, *KRAS*, *TP53* and *PIK3CA* mutations, and study of the CpG island methylation index, and compared the results with those obtained in sporadic MMR-pro colorectal tumours.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Study sample

A total of 40 cancer-affected individuals (one tumour per patient) from 27 Amsterdam-I and II MMR-pro families were included in the study. All patients

(Caucasian origin) were assessed through the Hereditary Cancer Program of the Catalan Institute of Oncology, ICO-IDIBELL (Barcelona, Spain), from 1998 to 2012. Tumours were subjected to immunohistochemical MMR protein staining and microsatellite instability (MSI) analysis. Written informed consent was obtained from all subjects. The study received the approval of IDIBELL Ethics Committee. A detailed description of the cases included in the study is shown in Table 1.

Copy number array data from 328 MMR-pro sporadic tumours from The Cancer Genome Atlas (TCGA) were used. All patients were of Caucasian origin with a male/female ratio of 0.53 and a median age at cancer diagnosis of 72 years (range: 36–90).

Ninety-nine MMR-pro sporadic colorectal tumours were also screened for mutations in *BRAF*, *KRAS*, *TP53* and *PIK3CA*. These samples were obtained from a hospital-based case-control study (Bellvitge University Hospital, CSUB-IDIBELL, Barcelona, Spain) and consisted of untreated stage II colon tumours diagnosed at a median age of 71 years (range 43–87), with a male/female ratio of 2.63.

DNA extraction procedure is described in Suppl. Material.

### 2.2. Copy number microarray

Genome-wide copy number (CN) and allelic ratio analyses were performed in 16 FCCTX tumours using the molecular inversion probe (MIP)-based OncoScan™ FFPE microarray (Affymetrix, Santa Clara, CA). Hybridisations were carried out by the Affymetrix® Copy Number Services (Santa Clara, CA). All 16 FCCTX tumour samples passed the quality control established by Affymetrix for hybridisation on the OncoScan™ microarray. Results were visualised and analysed with the Nexus Copy Number software (BioDiscovery, El Segundo, CA), following the MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) guidelines. The variable quality and dispersion of the data, together with the different fractions of non-tumour DNA present in the tissues, required individualised data processing.

Normal colon tissue ( $n = 10$ ) from sporadic CRC patients and blood DNA from seven FCCTX patients whose tumour DNAs were hybridised, were included in the study and used for normalisation and identification of germline events and technical artefacts.

Table 1

Characteristics of the familial colorectal cancer type X (FCCTX) cases included in each study.

	Copy number (CN) array	<i>BRAF</i> , <i>KRAS</i> , <i>TP53</i> and <i>PIK3CA</i> mutations	CpG methylation	Total
<i>N</i> (No. families)	16 (14 fam)	37 (26 fam)	25 (19 fam)	40 (27 fam)
Amsterdam; <i>n</i> (%)				
I	14 (87.5%)	33 (89.2%)	22 (88.0%)	36 (90.0%)
II	2 (12.5%)	4 (10.8%)	3 (12.2%)	4 (10.0%)
Age at diagnosis; median $\pm$ SD	48.5 $\pm$ 10.74	48 $\pm$ 13.56	49 $\pm$ 14.38	48.5 $\pm$ 13.38
Cancer location; <i>n</i> (%)				
Left colon	8 (50.0%)	19 (51.4%)	14 (56.0%)	21 (52.5%)
Right colon	4 (25.0%)	7 (18.9%)	4 (16.0%)	8 (20.0%)
Rectum	4 (25.0%)	11 (29.7%)	7 (28.0%)	11 (27.5%)
Tumour stage; <i>n</i> (%)				
0–I	4 (25.0%)	7 (18.9%)	8 (32.0%)	9 (22.5%)
II	4 (25.0%)	12 (32.4%)	7 (28.0%)	12 (30.0%)
III	7 (43.8%)	13 (35.1%)	6 (24.0%)	14 (35.0%)
IV	0 (0.0%)	4 (10.8%)	3 (12.0%)	4 (10.0%)
NA	1 (6.2)	1 (2.7%)	1 (4.0%)	1 (2.5%)
Gender; <i>n</i> (%)				
Male	6 (37.5%)	15 (40.5%)	7 (28.0%)	17 (42.5%)
Female	10 (62.5%)	22 (59.5%)	18 (72.0%)	23 (57.5%)
Control group; <i>n</i> (source)	328 (TCGA)	99 (CSUB-IDIBELL)	–	

Abbreviations: Fam, families; SD, standard deviation; NA, not available; TCGA, The Cancer Genome Atlas.

The Affymetrix genome-wide human SNP array 6.0 had been used to study the 328 TCGA MMR-pro sporadic tumours, using DNA extracted from frozen tissue. Publicly available data were downloaded and visualised with the Nexus Copy Number software (BioDiscovery, El Segundo, CA).

### 2.3. *BRAF*, *KRAS*, *TP53* and *PIK3CA* mutational screening

Mutation hotspots for CRC in *BRAF*, *KRAS*, *TP53* and *PIK3CA* were identified through the catalogue of somatic mutations in cancer (COSMIC) from the Wellcome Trust Sanger Institute. KASPar genotyping assays (KASP-By-Design, LGC group, Teddington, United Kingdom (UK)) on the Fluidigm genotyping platform (48.48 Dynamic Array™ IFG, Fluidigm, San Francisco, CA), were used to genotype 18 mutation hotspots in *TP53*, nine in *PIK3CA*, *KRAS* c.436G>A (p.A146T) and *BRAF* c.1799T>A (p.V600E) (Suppl. Table 1). Each genotyping assay was previously validated and optimised on the Light-Cycler 480 real-time PCR detection system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). For FFPE tumour samples, deviations from the wild-type cluster were validated by direct automated (Sanger) sequencing. Mutations in codons 12 and 13 of *KRAS* were interrogated by sequencing.

### 2.4. CpG island methylation index

CpG island methylation index was analysed with the ME042-B1 CIMP MS-MLPA probe mix (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Detailed description of the procedure and analysis is shown in Suppl. Material.

### 2.5. Statistical analyses

The frequencies of mutations and of gains/losses of chromosomes arms between FCCTX and sporadic tumours were compared by using Fisher's exact test. All tests were two-sided and *p*-values below 0.05 were considered statistically significant. The analyses were performed using R statistical software.

## 3. Results

### 3.1. Copy number alterations

Fig. 1 represents the CN alterations identified in each FCCTX tumour. Most FCCTX tumours (15/16) showed at least five chromosomes affected with large CN gains and/or losses, suggesting the presence of high chromosome instability (CIN). Three tumours, T10, T13 and T15, showed a milder pattern of the most frequent alterations found in the other FCCTX cases, suggesting either high normal DNA content, or that the aberrant pattern was present in a small subpopulation of tumour cells. Only one tumour, T04, showed a chromosome stable phenotype, with only one gain in 18p and the loss of 22q. Technical validation was performed by FFPE FISH with four probes located in gained, lost and non-altered regions hybridised in three randomly chosen FCCTX tumours (Suppl. Material). The concordance rate between the two techniques exceeded 85% (6/7) (Suppl. Table 2).

Fig. 2 summarises the CN alterations identified in the 16 FCCTX tumours and in 328 MMR-pro sporadic colorectal tumours from TCGA. As shown in Fig. 3 for FCCTX tumours, gains of whole chromosome arms (>75% of the arm length) identified in more than one

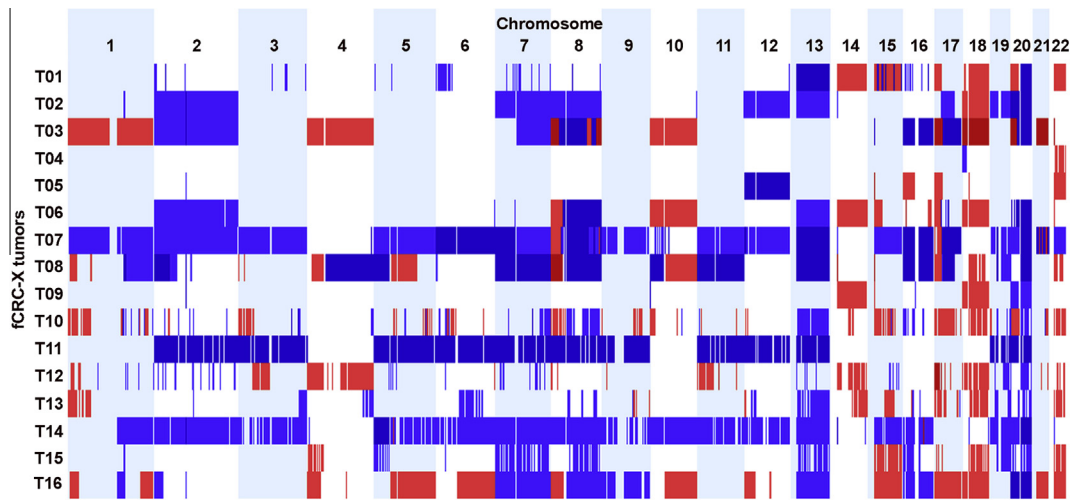


Fig. 1. Genome-wide copy number (CN) gains (blue) and losses (red) in 16 familial colorectal cancer type X (FCCTX) tumours. Darker blue and red colours indicate  $\geq 2n$  gains and  $2n$  losses, respectively.

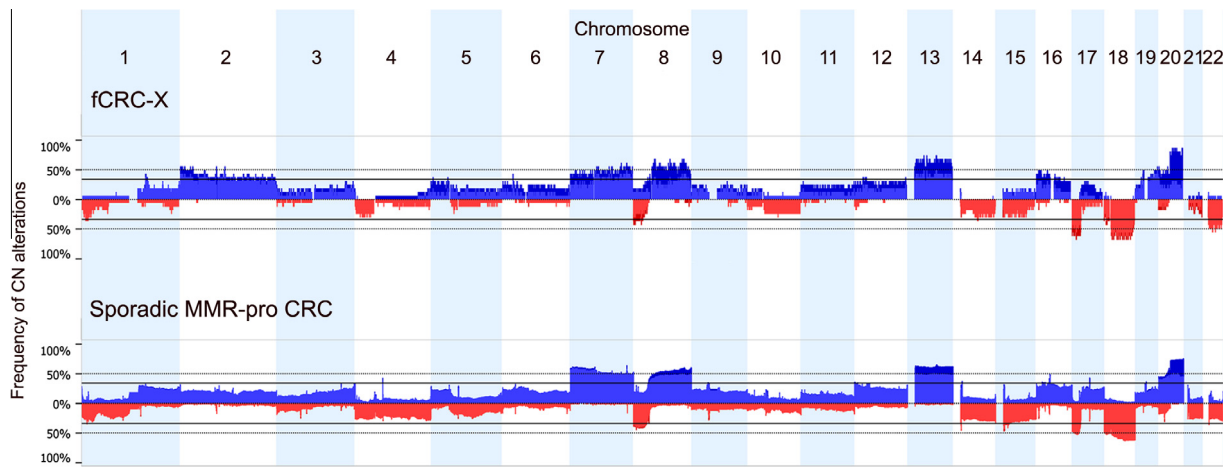


Fig. 2. Genomic profiles of familial colorectal cancer type X (FCCTX) ( $n = 16$ ) and sporadic mismatch repair (MMR)-pro ( $n = 328$ , source: The Cancer Genome Atlas (TCGA)) tumours. Gains are represented in blue and losses in red; darker blue and red colours indicating  $\geq 2n$  gains and homozygous losses, respectively. For visualisation purposes and based on copy number (CN) array density and data quality, small CN gained or lost regions ( $< 100$  Kb) were eliminated in the group of sporadic tumours. [Suppl. Fig. 1](#) shows the unprocessed data for both groups.

third of the samples, involved chromosomes 2, 7, 8q, 12q, 13q, 16, 19q and 20, while losses affected chromosomes 18, 17p and 22q. When compared to sporadic cases, statistically significant differences were identified in the frequency of 2p ( $p = 0.024$ ) and 2q ( $p = 0.038$ ) gains, which occurred more frequently in FCCTX tumours. Likewise, chromosome arm 10q tended to be more frequently lost in FCCTX tumours, although the difference did not reach statistical significance ( $p = 0.055$ ). When Amsterdam II cases ( $n = 2$ ) were excluded from the analysis, the statistically significant difference in the frequency of 2p gains ( $p = 0.039$ ) was maintained, whereas for 2q, the difference observed did not reach statistical significance ( $p = 0.069$ ). Moreover, the difference in the frequency of 10q loss became statistically significant ( $p = 0.036$ ) ([Suppl. Fig. 2](#)).

### 3.2. Copy-neutral and copy-gained LOH (cn/gLOH)

Copy-neutral loss of heterozygosity (cnLOH) consists in the presence of homozygosity in a non-copy-number-altered region. If one of these copies gets amplified, a copy-gained LOH (cgLOH) is created.

Blood DNA from seven FCCTX patients was analysed with OncoScan, allowing the identification and removal of germline cnLOH events from their corresponding tumour samples. Due to the variable dispersion of the data generated from FFPE DNA, a conservative  $p$  value of  $5 \times 10^{-8}$  and a minimum cn/gLOH size of 2 Mb were established as thresholds. Of the seven normalised samples and under the established conditions, four tumours showed no somatic cn/gLOH. The other three cases showed 1, 5 and

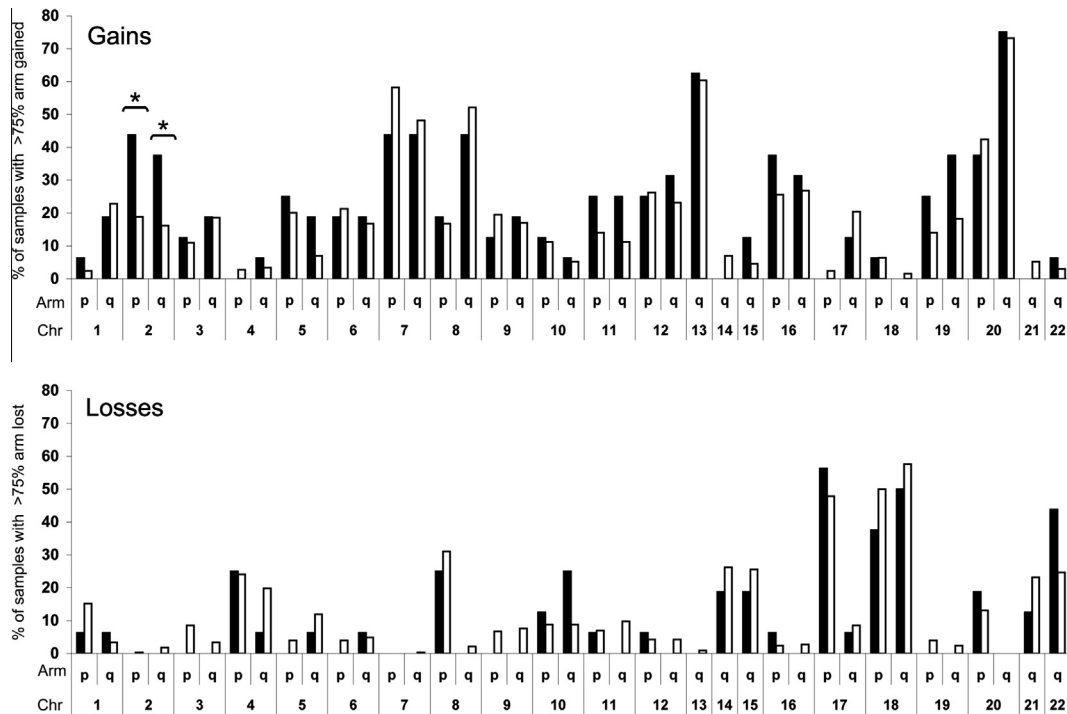


Fig. 3. Copy number (CN) alterations affecting whole chromosome arms in familial colorectal cancer type X (FCCTX) tumours (Ams I and II) compared with sporadic mismatch repair (MMR)-pro colorectal tumours. The bars indicate the percentage of 16 FCCTX tumours (black bars) and 328 sporadic MMR-pro colorectal cancer (CRC) (white bars) with gains (upper panel) and losses (lower panel) affecting whole (>75%) chromosome arms. Statistically significant differences between sporadic and hereditary cases were identified in the frequency of 2p and 2q gains. When excluding Ams II cases, the difference observed in the frequency of 10q loss becomes statistically significant (Suppl. Fig 2).

6 cn/gLOH events, respectively, with lengths ranging from 2.1 Mb to whole chromosome arms. The location and length of the cn/gLOH regions are shown in Table 2.

3.3. BRAF, KRAS, TP53 and PIK3CA mutations

A total of 29 mutation hotspots in BRAF, KRAS, PIK3CA and TP53 were screened using KASP

genotyping assays in the Fluidigm platform, in 37 FCCTX and 99 sporadic MMR-pro colon tumours. Codons 12-13 of KRAS were sequenced in 29 FCCTX and 42 sporadic MMR-pro CRC (Suppl. Table 1). The frequency of mutations identified in each gene for FCCTX and sporadic MMR-pro tumours is shown in Table 3. No statistically significant differences in the frequency of BRAF, KRAS and PIK3CA mutations were observed between FCCTX and sporadic MMR-pro

Table 2  
Somatic copy-neutral and copy-gained LOH (cn/gLOH) events (>2 Mb) identified in seven familial colorectal cancer type X (FCCTX) tumours normalised with their corresponding peripheral blood profiles.

Tumour	Chromosome	cn/gLOH	Cytoband	Region	Length (Mb)
T04	–	–	–	–	–
T10	–	–	–	–	–
T11	Chr 2	cn/gLOH	q22.2–q22.3	142 309 013-144 743 221	2.43
	Chr 6	cgLOH	p25.3–p12.1	0-55 147 049	55.15
	Chr 14	cnLOH	q11.1–q32.33	18 675 413-107 349 540	88.67
	Chr 17	cnLOH	p13.3–q25.3	0-78 615 226	78.62
	Chr 18	cnLOH	p11.32–p11.21	0-14 377 414	14.38
T12	Chr 7	cnLOH	q34	138 397 744-140 790 409	2.39
T13	–	–	–	–	–
T15	–	–	–	–	–
T16	Chr 1	cgLOH	q23.3	161 402 620-163 867 490	2.46
	Chr 1	cnLOH	q31.3–q32.1	197 523 068-199 641 374	2.12
	Chr 5	cnLOH	p15.33–p12	0-43 529 780	43.53
	Chr 19	cnLOH	p13.3	0-2 410 753	2.41
	Chr 19	cnLOH	p13.3–p13.2	4 231 286-7 120 228	2.89
	Chr 19	cnLOH	q13.2–q13.31	40 923 643-44 865 302	3.94

Table 3  
Frequency of mutations in *BRAF*, *KRAS*, *PIK3CA* and *TP53* in hereditary and sporadic mismatch repair (MMR)-pro tumours.

	<i>BRAF</i> n (%)	<i>KRAS</i> n (%)	<i>PIK3CA</i> n (%)	<i>TP53</i> n (%)
Familial colorectal cancer type X (FCCTX)	1/37 (2.7%)	11/29 (37.9%)	2/37 (5.4%)	5/37 (13.5%)
Sporadic	3/99 (3%)	16/42 (38.1%)	4/99 (4%)	23/99 (23.2%)
<i>p</i> -Value	<i>p</i> = 1	<i>p</i> = 1	<i>p</i> = 0.663	<i>p</i> = 0.243

tumours. Nevertheless *TP53* mutations occurred almost twice (1.7-fold) more frequently in sporadic than in FCCTX tumours, although this difference was not statistically significant ( $p = 0.243$ ). When excluding Amsterdam II cases ( $n = 4$ ) from the analysis, similar results were obtained (Suppl. Table 3). A detailed list of somatic mutations identified in FCCTX is shown in Suppl. Table 4.

Regarding the mutation pattern of each gene, no statistically significant differences were observed between hereditary and sporadic tumours. Nevertheless, while *KRAS* c.35G>T (p.G12V) was absent in all FCCTX tumours (0/29), it occurred in 11.9% (5/42) of sporadic MMR-pro cases ( $p = 0.074$ ). Likewise, *TP53* c.844C>T (p.R282W), absent in FCCTX (0/37), was identified in 6.1% (6/99) of sporadic tumours ( $p = 0.189$ ).

### 3.4. CpG island methylation index

CpG island methylation of eight different genes frequently methylated in tumours with CIMP, was studied in 25 FCCTX tumours. Twenty-two tumours (88.0%) showed promoter methylation in  $\leq 3$  genes, two (8.0%) in four to five genes, and the remaining sample (4%) could not be evaluated (Suppl. Table 3).

## 4. Discussion

Our results indicate that FCCTX tumours show similar molecular characteristics than sporadic MMR-pro colorectal tumours, identifying only a statistically significant increase in the frequency of CN alterations in chromosome arms 2p, 2q and 10q.

Regarding CN alterations, Middeldorp et al. and Therkildsen et al. identified differences in the frequency of chromosome 20q gain [12,13]. They found 20q gained in 77% and 65% of the familial MMR-pro tumours analysed, respectively; similar frequency to our series, where 75% of the tumours showed this alteration. However, they compared this frequency to small series of sporadic MMR-pro tumours, which provided 20q gain frequencies between 30% and 50%. Other studies have identified similar 20q gain frequencies (70–85%) in MMR-pro familial CRC [14,15]. Currently, thanks to The Cancer Genome Atlas (TCGA) project, researchers have access to high-quality genomic data from many types of tumours, including SNP array data from MMR-pro colorectal tumours ( $n = 328$ ), which can be

analysed with the analytical tools used by the researcher, in our case the Nexus software. In this large series, as in others previously published [16–18], the 20q gain was identified in over 75% of sporadic cases, as occurs in the familial MMR-pro cases, either Amsterdam-positive or -negative.

We found that chromosome arms 2p and 2q were gained (>75% of the arm length) in 43.75% and 37.5% of all FCCTX tumours, respectively, compared to 18.9% and 16.2% of sporadic tumours. Gain of chromosome 2 had not been previously reported as a frequent event in familial MMR-pro CRC [6,12–15]. Due to the sample size limitations of our study, additional CN studies in MMR-pro CRC tumours of Amsterdam-positive families are needed to validate this finding and provide further evidence on the role of chromosome 2 in FCCTX-specific carcinogenesis. Currently it is difficult to interpret the meaning of the increased frequency of gains of chromosome 2 arms in FCCTX tumours. One interpretation to this finding might be that hereditary MMR-pro colorectal tumours require additional copies of chromosome 2 to reach growth advantage. However, this feature, chromosome 2 gain, might as well be a consequence of a main driver carcinogenic event occurring in these tumours.

On the other hand, we have identified an increased frequency of 10q losses in Amsterdam I families. This chromosome arm harbours very relevant tumour suppressor genes involved in hereditary, polyposis and non-polyposis cases. These include *BMPRIA* (juvenile polyposis) [19], *PTEN* (hamartomatous polyposis) [20], and *BUB3*, a gene recently associated with increased risk to CRC at young age [21].

Classically, CRC has been classified as having microsatellite instability (MSI) or chromosomal instability (CIN), being mutually exclusive. However it has been observed that not all MMR-pro tumours are aneuploid, being the MSI-negative CIN-negative phenotype more frequently observed among early-onset CRC patients, suggesting that there might be a significant hereditary component within the specific subgroup of young-onset MSI-negative CIN-negative CRC [22]. Here we show that this is not the rule for FCCTX, where over 90% of tumours showed high level of CIN. Previous reports that included MMR-pro tumours from CRC families that fulfilled less stringent criteria, i.e. Amsterdam-negative, also found high frequency of chromosome gains and losses in their tumours [12,13,15], as occurs in MMR-pro sporadic CRC.

Little is known about the presence of somatic cnLOH events in FCCTX tumours. Middeldorp et al. reported higher frequency of cnLOH, to the detriment of physical losses, in familial MMR-pro tumours when compared to sporadic cases [13]. Little can be deduced from the seven FCCTX tumours that we analysed, where no somatic >2 Mb cn/gLOH events were identified in four of them and in the remaining three, only 1–6 alterations were detected. Nevertheless, these results suggest that cn/gLOHs are infrequent in FCCTX tumours, at least when they expand large regions (>2 Mb). Moreover, our CN results suggest that physical losses may be as frequent in FCCTX tumours as in sporadic cases, in contrast to the observations from Middeldorp et al. [13].

No statistically significant differences in mutation frequencies in *BRAF*, *KRAS*, *TP53* and *PIK3CA* genes were observed between hereditary and sporadic MMR-pro tumours. Previous reports had already identified no differences in the frequency of *KRAS* and *BRAF* mutations between both groups [8,10]. On the other hand, *TP53* mutations might be less frequent in FCCTX tumours. However, the limited sample size precluded confirmation of this observation. Of note, these differences had been previously observed by Abdel-Rahman et al., although their results compared familial and sporadic series where *TP53* had been screened using different methodologies for mutation detection and where different regions of *TP53* had been covered [6]. With regard to the presence of specific mutation hotspots, *KRAS* c.34G>T (p.G12C), the second most frequent mutation in *KRAS* after c.35G>A (p.G12D) in sporadic tumours (present in 11.4% of the sporadic tumours and capturing 31.3% of *KRAS* mutations in these tumours), was absent in FCCTX. A similar situation occurred with *TP53* c.844C>T (p.R282W), the most frequent mutation in sporadic tumours (present in 6.1% of the sporadic tumours and capturing 27.3% of *TP53* mutations in these tumours), which was not detected in FCCTX cases. Validation of these results in larger FCCTX series is needed to confirm or discard these differences between hereditary and sporadic MMR-pro tumours.

The CpG island methylation phenotype (CIMP) is observed in approximately 15–20% of all CRCs. CIMP is associated with MMR-deficiency, *BRAF* V600E, proximal localisation of the tumour and older onset of the disease [23]. As expected and previously observed [10], we found that CIMP is not a common feature of FCCTX. However, and in concordance to Goel et al. [10] we observed some degree of promoter methylation in most FCCTX tumours (data not shown). Our results in 25 FCCTX tumours and those obtained in other 22 FCCTX tumours where no high methylation index was identified [10], indicate that CIMP is inexistent, or at least rare, among FCCTX. On the contrary, 5–25% of sporadic MMR-pro tumours show CIMP [24–28], suggesting a different aetiology – possibly linked to

environmental mutagens [29,30] – for this group of CIMP-positive cases. Indeed, a different epigenetic mechanism might be acting in hereditary cases: the presence of low global methylation in the tumours, reflected in a low LINE-1 methylation level [10,31].

In all, our results indicate that FCCTX carcinogenesis largely resembles that occurring in sporadic MMR-pro CRC. From a clinical perspective this suggests that hereditary MMR-pro tumours are likely to show similar clinical characteristics, such as prognosis and response to treatments, than sporadic MMR-pro tumours, depending on the presence of specific molecular markers, such as *BRAF* V600E, *KRAS* mutation, 18q loss, etc. Also, these similarities might indicate that no major FCCTX-specific pathways exist, thus agreeing with the conjecture that FCCTX most probably comprises a genetically heterogeneous group of families. It could be speculated that most type X families are at increased risk to develop ‘sporadic tumours’ by being more susceptible to environmental carcinogenic factors. This hypothesis would fit into a multifactorial disease model proposed for polygenic diseases, and could explain the failure of gene-identification approaches to identify causal high-penetrance mutations (monogenic model). Nevertheless, germline mutations in several genes such as *UNC5C*, *BUB1*, *BUB3*, *OGGI* or *NUDT1* among others, have recently been linked to familial colorectal cancer [21,32–34]. These might explain a small fraction of cases so far included within the FCCTX group, and therefore even some families included in this study.

In summary, some molecular differences between FCCTX and sporadic MMR-pro tumours have been detected, such as the higher frequency of chromosome 2 gains and 10q losses or the lower frequency of *TP53* mutations in FCCTX tumours. If validated in larger series, these might become relevant to help unravel the causes of the familial aggregation of cancer in FCCTX; either of specific high-penetrance genes, or of shared polygenic features leading to increased CRC risk in families.

#### Conflict of interest statement

None declared.

#### Acknowledgements

We thank all the people responsible for genetic counselling and genetic testing at the Hereditary Cancer Program ICO-IDIBELL, Olga Campos for technical support, and Mireia Gausachs and Jesús del Valle for technical advise.

This work was funded by the Spanish Ministry of Economy (State Secretariat for Research, Development and Innovation) (Grants SAF2012-38885 to L.V. and

SAF2012-33636 to G.C.; Ramón y Cajal contract to L.V., and fellowship to F.B.); L'Oréal-UNESCO 'For Women in Science'; the Scientific Foundation Asociación Española Contra el Cáncer; and the Catalan Government (Grant 2009SGR290).

The study sponsors had no involvement in the study design, in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to submit the manuscript for publication.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2014.04.022>.

## References

- [1] Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116(6):1453–6.
- [2] Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet* 2009;76(1):1–18.
- [3] Ku CS, Cooper DN, Wu M, Roukos DH, Pawitan Y, Soong R, et al. Gene discovery in familial cancer syndromes by exome sequencing: prospects for the elucidation of familial colorectal cancer type X. *Mod Pathol* 2012;25(8):1055–68.
- [4] Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, Haile R, Casey G, Baron J, et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 2005;293(16):1979–85.
- [5] Valle L, Perea J, Carbonell P, Fernandez V, Dotor AM, Benitez J, et al. Clinicopathologic and pedigree differences in amsterdam I-positive hereditary nonpolyposis colorectal cancer families according to tumor microsatellite instability status. *J Clin Oncol* 2007;25(7):781–6.
- [6] Abdel-Rahman WM, Ollikainen M, Kariola R, Jarvinen HJ, Mecklin JP, Nystrom-Lahti M, et al. Comprehensive characterization of HNPCC-related colorectal cancers reveals striking molecular features in families with no germline mismatch repair gene mutations. *Oncogene* 2005;24(9):1542–51.
- [7] Llor X, Pons E, Xicola RM, Castells A, Alenda C, Pinol V, et al. Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam criteria without involvement of the mutator pathway. *Clin Cancer Res* 2005;11(20):7304–10.
- [8] Sanchez-de-Abajo A, de la Hoya M, van Puijenbroek M, Tosar A, Lopez-Asenjo JA, Diaz-Rubio E, et al. Molecular analysis of colorectal cancer tumors from patients with mismatch repair proficient hereditary nonpolyposis colorectal cancer suggests novel carcinogenic pathways. *Clin Cancer Res* 2007;13(19):5729–35.
- [9] Joensuu EI, Abdel-Rahman WM, Ollikainen M, Ruosaari S, Knuutila S, Peltomaki P. Epigenetic signatures of familial cancer are characteristic of tumor type and family category. *Cancer Res* 2008;68(12):4597–605.
- [10] Goel A, Xicola RM, Nguyen TP, Doyle BJ, Sohn VR, Bandipalliam P, et al. Aberrant DNA methylation in hereditary nonpolyposis colorectal cancer without mismatch repair deficiency. *Gastroenterology* 2010;138(5):1854–62.
- [11] Klarskov L, Holck S, Bernstein I, Nilbert M. Hereditary colorectal cancer diagnostics: morphological features of familial colorectal cancer type X versus Lynch syndrome. *J Clin Pathol* 2012;65(4):352–6.
- [12] Therkildsen C, Jonsson G, Dominguez-Valentin M, Nissen A, Rambech E, Halvarsson B, et al. Gain of chromosomal region 20q and loss of 18 discriminates between Lynch syndrome and familial colorectal cancer. *Eur J Cancer* 2013;49(6):1226–35.
- [13] Middeldorp A, van Eijk R, Oosting J, Forte GI, van Puijenbroek M, van Nieuwenhuizen M, et al. Increased frequency of 20q gain and copy-neutral loss of heterozygosity in mismatch repair proficient familial colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 2012;130(4):837–46.
- [14] Laiho P, Hienonen T, Karhu A, Lipton L, Aalto Y, Thomas HJ, et al. Genome-wide allelotyping of 104 Finnish colorectal cancers reveals an excess of allelic imbalance in chromosome 20q in familial cases. *Oncogene* 2003;22(14):2206–14.
- [15] Chen W, Yuan L, Cai Y, Chen X, Chi Y, Wei P, et al. Identification of chromosomal copy number variations and novel candidate loci in hereditary nonpolyposis colorectal cancer with mismatch repair proficiency. *Genomics* 2013;102(1):27–34.
- [16] Leslie A, Pratt NR, Gillespie K, Sales M, Kernohan NM, Smith G, et al. Mutations of APC, K-ras, and p53 are associated with specific chromosomal aberrations in colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res* 2003;63(15):4656–61.
- [17] Trautmann K, Terdiman JP, French AJ, Roydasgupta R, Sein N, Kakar S, et al. Chromosomal instability in microsatellite-unstable and stable colon cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12(21):6379–85.
- [18] Dyrso T, Li J, Wang K, Lindebjerg J, Kolvraa S, Bolund L, et al. Identification of chromosome aberrations in sporadic microsatellite stable and unstable colorectal cancers using array comparative genomic hybridization. *Cancer Genet* 2011;204(2):84–95.
- [19] Howe JR, Sayed MG, Ahmed AF, Ringold J, Larsen-Haidle J, Merg A, et al. The prevalence of MADH4 and BMPR1A mutations in juvenile polyposis and absence of BMPR2, BMPR1B, and ACVR1 mutations. *J Med Genet* 2004;41(7):484–91.
- [20] Mester J, Eng C. When overgrowth bumps into cancer: the PTENopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2013;163C(2):114–21.
- [21] de Voer RM, van Kessel AGeurts, Weren RD, Ligtenberg MJ, Smeets D, Fu L, et al. Germline mutations in the spindle assembly checkpoint genes BUB1 and BUB3 are risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterology* 2013;145(3):544–7.
- [22] Boardman LA, Johnson RA, Petersen GM, Oberg AL, Kabat BF, Slusser JP, et al. Higher frequency of diploidy in young-onset microsatellite-stable colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13(8):2323–8.
- [23] Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38(7):787–93.
- [24] Samowitz WS, Albertsen H, Herrick J, Levin TR, Sweeney C, Murtaugh MA, et al. Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer. *Gastroenterology* 2005;129(3):837–45.
- [25] Noshro K, Irahara N, Shima K, Kure S, Kirkner GJ, Scherhammer ES, et al. Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample. *PLoS One* 2008;3(11):e3698.
- [26] Ogino S, Goel A. Molecular classification and correlates in colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2008;10(1):13–27.
- [27] Barault L, Charon-Barra C, Jooste V, de la Vega MF, Martin L, Roignant P, et al. Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases. *Cancer Res* 2008;68(20):8541–6.

- [28] Jover R, Nguyen TP, Perez-Carbonell L, Zapater P, Paya A, Alenda C, et al. 5-Fluorouracil adjuvant chemotherapy does not increase survival in patients with CpG island methylator phenotype colorectal cancer. *Gastroenterology* 2011;140(4):1174–81.
- [29] Samowitz WS, Albertsen H, Sweeney C, Herrick J, Caan BJ, Anderson KE, et al. Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer. *J Natl Cancer Inst* 2006;98(23):1731–8.
- [30] Wallace K, Grau MV, Ahnen D, Snover DC, Robertson DJ, Mahnke D, et al. The association of lifestyle and dietary factors with the risk for serrated polyps of the colorectum. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009;18(8):2310–7.
- [31] Ogino S, Nishihara R, Lochhead P, Imamura Y, Kuchiba A, Morikawa T, et al. Prospective study of family history and colorectal cancer risk by tumor LINE-1 methylation level. *J Natl Cancer Inst* 2013;105(2):130–40.
- [32] Gylfe AE, Sirkia J, Ahlsten M, Jarvinen H, Mecklin JP, Karhu A, et al. Somatic mutations and germline sequence variants in patients with familial colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010;127(12):2974–80.
- [33] Coissieux MM, Tomsic J, Castets M, Hampel H, Tuupanen S, Andrieu N, et al. Variants in the netrin-1 receptor UNC5C prevent apoptosis and increase risk of familial colorectal cancer. *Gastroenterology* 2011;141(6):2039–46.
- [34] Garre P, Briceno V, Xicola RM, Doyle BJ, de la Hoya M, Sanz J, et al. Analysis of the oxidative damage repair genes NUDT1, OGG1, and MUTYH in patients from mismatch repair proficient HNPCC families (MSS-HNPCC). *Clin Cancer Res* 2011;17(7):1701–12.



## **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

### ***DNA extraction***

Genomic DNA was extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. Tumor enrichment (>70% tumor cells) was performed manually, guided by a hematoxylin-eosin stained slide. After deparaffinization with xylene, the tissue was incubated with sodium thiocyanate (NaSCN) to remove crosslinks, and then digested with Proteinase K before phenol-chloroform purification. DNA from peripheral blood was extracted using the FlexiGene DNA kit (Qiagen, Valencia, CA). DNA quantity and quality were evaluated using Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA), Picogreen (Life Technologies, Carlsbad, CA), PCRs of different length amplicons and 1% agarose gels.

### ***Fluorescence in situ hybridization on FFPE tissue sections***

Four gained, lost and non-altered regions identified by Oncoscan were validated by FFPE FISH. Hybridizations were performed on 4µm deparaffinized tissue sections using the following bacterial artificial chromosomes (BACs) and plasmids: BACs 2026N22 (Chr 7), 293A21 (Chr 4), 419H24 (Chr 15), and plasmid D3Z1 (Chr 3). Probes were labeled by standard nick translation reactions (CGH Nick Translation Kit, Abbott Molecular, Des Plaines, IL), hybridized in pairs, and detected using standard protocols. The analysis was performed under an Olympus BX60 fluorescence microscope equipped with an adequate filter set.

### ***CpG island methylation index***

CpG island methylation index was analyzed with the ME042-B1 CIMP MS-MLPA probe mix (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), which detects the methylation status of promoter regions of 8 different genes: *CACNA1G*, *CDKN2A*, *CRABP1*, *IGF2*, *MLH1*, *NEUROG1*, *RUNX3* and *SOCS1*, using 31 probes (3-6 probes per gene). These promoter regions are frequently methylated in tumors with CpG Island Methylator Phenotype (CIMP). Blood-derived DNA of a healthy individual, assayed twice, and tumor DNA from a carrier of a germline mutation in a *MMR* gene (Lynch syndrome) were included as CIMP-negative controls, and as positive controls, the RKO colorectal cancer cell (CIMP-positive) and 4 tumors with *MLH1* promoter hypermethylation.

Data obtained with the ME042-B1 CIMP MS-MLPA assay were normalized by subtracting the mean of the values obtained in the methylation-negative controls for each particular probe. Normalized values were considered positive when the methylation value exceeded 30%. To classify a gene promoter as methylated, at least half of the probes had to show methylation according to the established criterion. Using these conditions, all controls were correctly categorized: negative controls showed no methylated genes, *MLH1* methylation was identified in all *MLH1* methylation controls, and RKO, as CIMP-positive control, showed 7 out of 8 gene promoters methylated.

**Suppl. Table 1.** Analyzed mutation hotspots in *BRAF*, *KRAS*, *PIK3CA* and *TP53*, screening methods and mutation frequency reported in public databases.

<b>Gene</b>	<b>Base (Aminoacid) change</b>	<b>Screening method<sup>1</sup></b>	<b>Frequency in CRC<sup>2</sup></b>
<i>BRAF</i>	c.1799T>A (p.V600E)	Genotyping	97.53%
<i>KRAS</i>	c.35G>C (p.G12A)	Sequencing	6.18%
	c.34G>T (p.G12C)	Sequencing	8.14%
	c.35G>A (p.G12D)	Sequencing	34.50%
	c.34G>C (p.G12R)	Sequencing	1.21%
	c.34G>A (p.G12S)	Sequencing	5.83%
	c.35G>T (p.G12V)	Sequencing	22.03%
	c.38G>A (p.G13D)	Sequencing	19.38%
	c.37G>T (p.G13C)	Sequencing	0.54%
	c.37G>C (p.G13R)	Sequencing	0.24%
	c.436G>A (p.A146T)	Genotyping	0.39%
<i>PIK3CA</i>	c.1624G>A (p.E542K)	Genotyping	14.31%
	c.1633G>A (p.E545K)	Genotyping	24.02%
	c.1634A>G (p.E545G)	Genotyping	2.18%
	c.1635G>T (p.E545D)	Genotyping	0.60%
	c.1636C>A (p.Q546K)	Genotyping	4.22%
	c.3129G>T (p.M1043I)	Genotyping	2.71%
	c.3140A>G (p.H1047R)	Genotyping	19.05%
	c.3140A>T (p.H1047L)	Genotyping	3.09%
	c.3139C>T (p.H1047Y)	Genotyping	1.51%
<i>TP53</i>	c.473G>A (p.R158H)	Genotyping	0.67%
	c.524G>A (p.R175H)	Genotyping	11.24%
	c.527G>T (p.C176F)	Genotyping	0.70%
	c.527G>A (p.C176Y)	Genotyping	0.46%
	c.536A>G (p.H179R)	Genotyping	0.35%
	c.535C>T (p.H179Y)	Genotyping	0.39%
	c.586C>T (p.R196*)	Genotyping	1.76%
	c.637C>T (p.R213*)	Genotyping	2.54%
	c.659A>G (p.Y220C)	Genotyping	0.74%
	c.722C>T (p.S241F)	Genotyping	0.46%
	c.733G>A (p.G245S)	Genotyping	3.80%
	c.734G>A (p.G245D)	Genotyping	0.85%
	c.743G>A (p.R248Q)	Genotyping	5.60%
	c.818G>A (p.R273H)	Genotyping	4.86%
	c.817C>T (p.R273C)	Genotyping	4.23%
	c.833C>T (p.P278L)	Genotyping	0.35%
	c.832C>T (p.P278S)	Genotyping	0.25%
c.844C>T (p.R282W)	Genotyping	5.32%	

1. Genotyping was assayed using KASPar genotyping assays in the Fluidigm genotyping platform.

2. Frequencies reported by the Wellcome Trust Sanger Institute COSMIC.

**Suppl. Table 2.** Comparison between copy number (CN) results identified by Oncoscan™ array and FFPE FISH in four genomic regions.

Tumor	Probe	Location	FFPE FISH	Oncoscan™	Concordance
T01	D3Z1	Chr3: Centromeric	2n	2n	yes
	RP11-293A21	Chr4:26,861,431-26,861,866	Loss	2n	no
T03	D3Z1	Chr3: Centromeric	2n	2n	yes
	RP11-293A21	Chr4:26,861,431-26,861,866	Loss	Loss	yes
T14	D3Z1	Chr3: Centromeric	Gain	Gain	yes
	CTD-2026N22	Chr7:55,122,051-55,122,460	Gain	Gain	yes
	RP11-419H24	Chr15:74,999,543-74,999,897	Gain	Gain	yes

Abbreviations: FFPE, formalin-fixed paraffin-embedded; FISH, fluorescent in situ hybridization; CN, copy number; Chr, chromosome.

**Suppl. Table 3.** Frequency of mutations in *BRAF*, *KRAS*, *PIK3CA* and *TP53* in hereditary and sporadic MMR-pro tumors, excluding Amsterdam II cases.

	<i>BRAF</i> n (%)	<i>KRAS</i> n (%)	<i>PIK3CA</i> n (%)	<i>TP53</i> n (%)
FCCTX	1/33 (3.0%)	10/26 (38.5%)	2/33 (6.1%)	5/33 (15.2%)
Sporadic	3/99 (3.0%)	16/42 (38.1%)	4/99 (4%)	23/99 (23.2%)
p-value	p=1	p=1	p=0.640	p=0.462

**Suppl. Table 4.** Characteristics of each fCRC-X tumor studied including demographic and clinical features, studies performed, CpG methylation index results, and somatic mutations identified in *BRAF*, *KRAS*, *PIK3CA* and *TP53*.

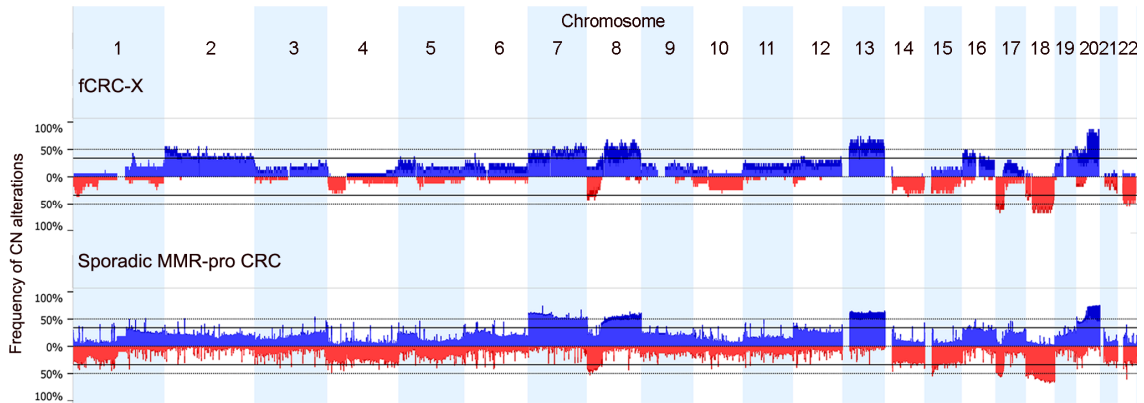
Tumor	Family	Gender	Criteria	Tumor location	Age at dx	Tumor stage	Studies performed	CpG methylation <sup>3</sup>	Identified mutations
T01	F1	F	Ams I	Left colon	55	I	CN, CIMP, mut	2/8	None
T02	F2	F	Ams I	Right colon	73	NA	CN, CIMP, mut <sup>2</sup>	1/8	None
T03	F3	F	Ams I	Left colon	49	I	CN, CIMP	2/8	NP
T04 <sup>1</sup>	F4	M	Ams I	Right colon	37	II	CN, mut	NP	<i>TP53</i> (R273C)
T05	F5	F	Ams I	Rectum	69	I	CN, CIMP, mut	1/8	<i>KRAS</i> (A146T) <i>hom</i>
T06	F5	F	Ams I	Rectum	48	II	CN, CIMP, mut <sup>2</sup>	1/8	None
T07	F6	F	Ams II	Left colon	49	III	CN, CIMP, mut	1/8	<i>KRAS</i> (G12D)
T08	F7	M	Ams I	Right colon	47	III	CN, CIMP	0/8	NP
T09	F8	M	Ams II	Left colon	42	III	CN, CIMP, mut	0/8	None
T10 <sup>1</sup>	F9	F	Ams I	Left colon	59	III	CN, CIMP, mut <sup>2</sup>	0/8	<i>TP53</i> (R213)
T11 <sup>1</sup>	F10	F	Ams I	Left colon	51	II	CN, CIMP, mut	4/8	<i>KRAS</i> (G12C)
T12 <sup>1</sup>	F11	F	Ams I	Rectum	43	III	CN, mut	NP	None
T13 <sup>1</sup>	F12	M	Ams I	Rectum	45	II	CN, CIMP, mut	0/8	None
T14	F13	M	Ams I	Right colon	68	III	CN, CIMP, mut	2/8	<i>KRAS</i> (G12D); <i>PIK3CA</i> (E542K)
T15 <sup>1</sup>	F14	F	Ams I	Left colon	42	III	CN, CIMP, mut <sup>2</sup>	3/8	None
T16 <sup>1</sup>	F3	M	Ams I	Left colon	43	I	CN, CIMP, mut <sup>2</sup>	0/8	None
T17	F15	F	Ams I	Rectum	37	II	CIMP, mut	2/8	<i>BRAF</i> (V600E); <i>KRAS</i> (G12C)
T18	F16	F	Ams I	Left colon	78	II	CIMP, mut	0/8	<i>KRAS</i> (G12D)
T19	F17	F	Ams II	Left colon	19	II	CIMP, mut <sup>2</sup>	DC failed	None
T20	F18	F	Ams I	Right colon	42	IV	CIMP, mut	5/8	<i>KRAS</i> (G13D) <i>hom</i>
T21	F19	F	Ams I	Left colon	37	0	CIMP, mut	1/8	<i>KRAS</i> (G13C)
T22	F19	F	Ams I	Left colon	37	I	CIMP, mut <sup>2</sup>	0/8	None
T23	F19	M	Ams I	Left colon	69	I	CIMP	2/8	NP
T24	F20	M	Ams I	Rectum	49	I	CIMP, mut	2/8	None
T25	F20	F	Ams I	Rectum	71	II	CIMP, mut	1/8	<i>KRAS</i> (G12D)
T26	F21	F	Ams I	Left colon	65	IV	CIMP, mut <sup>2</sup>	0/8	None
T27	F21	F	Ams I	Rectum	39	IV	CIMP, mut	1/8	<i>KRAS</i> (G12C); <i>TP53</i> (R273H)
T28	F2	F	Ams I	Left colon	50	III	mut	NP	None
T29	F22	F	Ams I	Left colon	38	IV	mut	NP	None
T30	F23	F	Ams I	Left colon	42	III	mut	NP	None
T31	F24	M	Ams I	Right colon	47	II	mut	NP	<i>TP53</i> (R175H)
T32	F24	F	Ams I	Right colon	53	II	mut	NP	<i>KRAS</i> (G12D)
T33	F25	M	Ams I	Left colon	49	II	mut	NP	<i>TP53</i> (R213)
T34	F22	M	Ams I	Right colon	77	III	mut	NP	None
T35	F26	M	Ams I	Left colon	62	I	mut	NP	None
T36	F13	M	Ams I	Left colon	62	III	mut	NP	<i>PIK3CA</i> (Q546K)
T37	F27	M	Ams II	Left colon	38	III	mut	NP	None
T38	F26	M	Ams I	Rectum	40	II	mut	NP	None
T39	F26	M	Ams I	Rectum	65	III	mut	NP	None
T40	F13	M	Ams I	Rectum	42	III	mut	NP	None

Abbreviations: M, male; F, female; Ams, Amsterdam criteria; dx, diagnosis; CN, copy number array; CIMP, CpG island methylator phenotype; mut, screening of mutation hotspots in *BRAF*, *KRAS*, *PIK3CA* and *TP53*; *hom*, homozygous mutation; NA, not available information; NP, not performed; DC, digestion control.

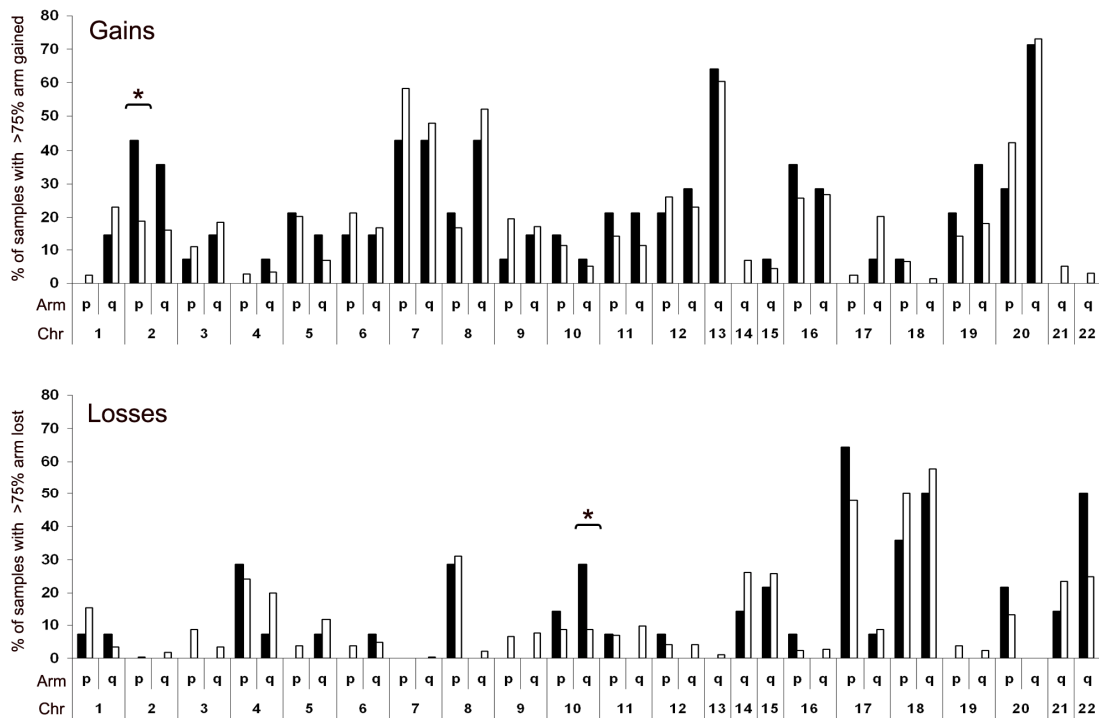
1. Cases in which CN alterations were also studied in blood DNA.

2. Codons 12 and 13 of *KRAS* were not sequenced due to DNA unavailability.

3. Number of methylated gene promoters.



**Suppl. Figure 1.** Genomic profiles of fCRC-X (n=16) and sporadic MMR-proficient (n=328, source: TCGA) tumors. Gains are represented in blue and losses in red. CN, copy number; fCRC-X, familial colorectal cancer type X; CRC, colorectal cancer; MMR-pro, mismatch repair proficiency.



**Suppl. Figure 2.** CN alterations affecting whole chromosome arms in FCCTX tumors (Ams I) compared with sporadic MMR-pro colorectal tumors. The bars indicate the percentage of 14 FCCTX tumors (black bars) and 328 sporadic MMR-pro CRC (white bars) with gains (upper panel) and losses (lower panel) affecting whole (>75%) chromosome arms. Statistically significant differences between sporadic and hereditary cases were identified in the frequency of 2p gains and 10q losses.



### **ARTÍCULO 3**

#### ***POLE* and *POLD1* mutations in 529 kindreds with familial colorectal cancer and/or polyposis, review of reported cases and recommendations for genetic testing and surveillance**

**Fernando Bellido**, Marta Pineda, Gemma Aiza, Rafael Valdés-Mas, Matilde Navarro, Diana A. Puente, Tirso Pons, Sara González, Silvia Iglesias, Esther Darder, Virginia Piñol, José Luís Soto, Alfonso Valencia, Ignacio Blanco, Miguel Urioste, Joan Brunet, Conxi Lázaro, Gabriel Capellá, Xose S. Puente, Laura Valle.

Artículo aceptado en *Genetics in medicine*, pendiente de publicación.

#### **Resumen:**

**Objetivo:** Determinadas mutaciones germinales en los dominios exonucleasa de *POLE* y *POLD1* han sido recientemente asociadas con predisposición a poliposis y al cáncer colorrectal (CCR). Nuestro objetivo es aumentar el conocimiento disponible acerca de las características fenotípicas de este síndrome con la intención de poder establecer criterios específicos para la selección de familias candidatas al análisis genético de *POLE* y *POLD1*, así como para poder ayudar a definir unas pautas de seguimiento en pacientes portadores.

**Metodología:** Los dominios exonucleasa de *POLE* y *POLD1* fueron analizados en 529 sujetos, 441 con CCR familiar no polipósico y 88 con poliposis, mediante el uso de las técnicas de la amplificación del ADN en pools y de la secuenciación masiva en paralelo.

**Resultados:** De forma adicional a la mutación recurrente *POLE* p.L424V encontrada en un paciente con poliposis, CCR y oligodendroglioma (ya identificada en un estudio previo), seis variantes en *POLD1* nuevas o raras –cuatro de ellas, p.D316H, p.D316G, p.R409W y p.L474P con fuertes evidencias de patogenicidad– fueron identificadas en familias con CCR no polipósico. Los datos fenotípicos relativos a estos y otros portadores de mutaciones en los dominios exonucleasa de *POLE* y *POLD1* descritos en la literatura apuntan hacia un fenotipo caracterizado por poliposis atenuada u oligopoliposis colorrectal adenomatosa, CCR y probablemente la presencia de tumores cerebrales. Además, las mutaciones en *POLD1* predisponen a tumores endometriales y de mama.

**Conclusión:** Nuestros resultados amplían el espectro fenotípico del síndrome asociado a *POLE/POLD1* e identifican nuevas variantes patogénicas. Proponemos una serie de guías para el testado genético de *POLE* y *POLD1* así como unas recomendaciones de seguimiento en portadores.





***POLE* and *POLD1* mutations in 529 kindreds with familial colorectal cancer and/or polyposis, review of reported cases and recommendations for genetic testing and surveillance**

**Running title:** Polymerase proofreading-associated syndrome

<sup>1\*</sup>Fernando Bellido, <sup>1\*</sup>Marta Pineda, <sup>1</sup>Gemma Aiza, <sup>2</sup>Rafael Valdés-Mas, <sup>1</sup>Matilde Navarro, <sup>2</sup>Diana A. Puente, <sup>3</sup>Tirso Pons, <sup>1</sup>Sara González, <sup>1</sup>Silvia Iglesias, <sup>4</sup>Esther Darder, <sup>5,6</sup>Virginia Piñol, <sup>7</sup>José Luís Soto, <sup>3</sup>Alfonso Valencia, <sup>1</sup>Ignacio Blanco, <sup>8</sup>Miguel Urioste, <sup>4,6</sup>Joan Brunet, <sup>1</sup>Conxi Lázaro, <sup>1</sup>Gabriel Capellá, <sup>2</sup>Xose S. Puente, <sup>1</sup>Laura Valle.

\*These authors contributed equally to this work

1. Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Spain
2. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain
3. Structural Biology and Biocomputing Program, Spanish National Cancer Research Center (CNIO), Madrid, Spain
4. Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBGi, Girona, Spain
5. Gastroenterology Department, Hospital Dr. Josep Trueta, Girona, Spain
6. Medical Science Department, School of Medicine, University of Girona, Girona, Spain
7. Molecular Genetics Laboratory, Elche University Hospital, Elche, Spain

8. Familial Cancer Clinical Unit, Human Cancer Genetics Program, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO) and Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Madrid, Spain

**Correspondence to:**

Laura Valle

Hereditary Cancer Program

Catalan Institute of Oncology, IDIBELL

Av. Gran Vía 199-203

08908 Hospitalet de Llobregat

Barcelona, Spain

Tel: +34 932607145

Fax: +34 932607466

Email: [lvalle@iconcologia.net](mailto:lvalle@iconcologia.net)

## **ABSTRACT**

**Purpose:** Germline mutations in the exonuclease domains of *POLE* and *POLD1* have been recently associated with polyposis and colorectal cancer (CRC) predisposition. Here we aim to better understand the phenotypic characteristics of this syndrome in order to establish specific criteria for *POLE* and *POLD1* mutation screening and to help define the clinical management of mutation carriers.

**Methods:** The exonuclease domains of *POLE* and *POLD1* were studied in 529 kindreds, 441 with familial non-polyposis CRC and 88 with polyposis, by using pooled DNA amplification and massively parallel sequencing.

**Results:** A total of 7 novel or rare genetic variants were identified. In addition to the *POLE* p.L424V recurrent mutation in a patient with polyposis, CRC and oligodendroglioma, six novel or rare *POLD1* variants -four of them, p.D316H, p.D316G, p.R409W and p.L474P, with strong evidence for pathogenicity-, were identified in non-polyposis CRC families. Phenotypic data from these and previously reported *POLE/POLD1* carriers point to an associated phenotype characterized by attenuated or oligo- adenomatous colorectal polyposis, CRC and probably brain tumors. In addition, *POLD1* mutations predispose to endometrial and breast tumors.

**Conclusion:** Our results widen the phenotypic spectrum of the *POLE/POLD1*-associated syndrome and identify novel pathogenic variants. We propose guidelines for genetic testing and surveillance recommendations.

**Keywords:** *POLE*; *POLD1*; polymerase proofreading-associated polyposis; genetic testing; hereditary non-polyposis colorectal cancer; adenomatous polyposis.

## INTRODUCTION

Germline mutations in the exonuclease (proofreading) domain of DNA polymerases Pol  $\delta$  and Pol  $\epsilon$ , have been associated with a dominantly inherited syndrome that confers increased risk to colorectal cancer (CRC) and polyposis.<sup>1</sup> Two recurrent pathogenic variants, *POLE* p.L424V and *POLD1* p.S478N have been identified in 21 and 3 families respectively.<sup>1,2,3,4</sup> A novel mutation in *POLD1*, p.L474P, was found in a hereditary non-polyposis colorectal cancer family.<sup>2</sup>

Patients carrying *POLE* and *POLD1* exonuclease domain mutations show variable phenotypes including multiple adenomas and CRC, and endometrial cancer in the case of female *POLD1* mutation carriers.<sup>1,2,3,4</sup> A better characterization of the syndrome is currently required in order to establish specific criteria for *POLE* and *POLD1* exonuclease mutation screening and to help define the clinical management of mutation carriers. To fulfill this aim, here we study the complete exonuclease domains of *POLE* and *POLD1* in 529 independent families characterized by the presence of familial or early onset mismatch repair proficient CRC and/or *APC*-negative and *MUTYH*-negative polyposes.

## MATERIALS AND METHODS

### Study Sample

A total of 544 colorectal cancer cases belonging to 529 families were included in the study: 456 familial colorectal cancer cases from 441 uncharacterized MMR-proficient families, including 60 Amsterdam-positive families, and 88 polyposis cases. Most of them, 526 cases (511 families), were previously genotyped for *POLE* p.L424V and

*POLD1* p.S478N (included in Series no.1 in Valle et al.).<sup>2</sup> All of them were referred to the Genetic Counseling Units of the Catalan Institute of Oncology in the Spanish region of Catalonia between 1999 and 2012. Referral was based on family history of CRC or polyps, presence of early onset CRC and/or personal history of polyposis. Eighteen additional CRC patients belonging to unrelated Amsterdam-I mismatch repair-proficient families were included in the study. These were recruited through the Human Genetics Program of the Spanish National Cancer Research Center (CNIO).

Among the 456 MMR-proficient cases (441 families), 49 (10.7%) fulfilled Amsterdam I, 11 (2.4%) Amsterdam II, and 390 (85.5%) the Bethesda criteria. No specific information on family history was available for 6 patients. The mean age at cancer diagnosis was 48.98 (standard deviation 12.54) for the tested individuals. Non-polyposis cases were mismatch repair proficient, i.e. their tumors showed microsatellite stability and expression of the mismatch repair proteins MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2.

Clinical features of polyposis cases, which included adenomatous polyposis (17.0%), attenuated adenomatous polyposis (47.7%) and non-adenomatous polyposis (15.9%) are detailed in Valle et al..<sup>2</sup> For these cases, screening of *MUTYH* and *APC* mutations was performed as previously described.<sup>2</sup>

Informed consent was obtained from all subjects and the study received the approval of IDIBELL Ethics Committee (PR073/12).

### **Germline Mutation Identification In Pooled Samples**

Mutation screening of the exonuclease coding regions of *POLE* and *POLD1* was performed by using a combination of pooled samples, PCR amplification (*POLE* exons 9-14 and *POLD1* exons 6-12) and high-throughput sequencing, as previously described.<sup>5</sup> Amplification of the DNA pools was performed using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and custom-designed primers covering the exons and intron-exon boundaries (Supplementary Table 1). Next generation sequencing was carried out on a HiSeq-2000 at the Centro Nacional de Análisis Genómico (CNAG, Barcelona, Spain).

### **Direct Automated Sequencing**

Direct automated (Sanger) sequencing was used to validate the results obtained by massive parallel sequencing, to identify the mutated cases within pools, and to perform the co-segregation studies. Sequencing was performed on an ABI Sequencer 3730 using a standard protocol. Data was analyzed using Mutation Surveyor v.3.10. The primers used were the same as those used for germline mutation identification in pooled samples (Supplementary Table 1).

### ***In Silico* Prediction Analysis**

Protein damage prediction of missense genetic variants was performed by using the *in silico* algorithms PolyPhen-2, SIFT, Condel and Mutation Taster.<sup>6-9</sup> dbNSFP v.2.8 was used to obtain the evolutionary conservation PhyloP scores.<sup>10</sup> Possible alterations of the splice sites were evaluated using NNSplice0.9.<sup>11</sup>

### **Structural Analysis**

The human 3D model of *POLD1* was obtained from ModBase (<http://modbase.compbio.ucsf.edu/>) and improved by the RepairPDB and Optimize commands of FoldX (<http://foldx.crg.es>). This model was calculated using as template the crystallographic structure of the homologous yeast protein Pol3 (PDB ID: 3iay, chain A), which shares 51% sequence identity with the human *POLD1*.<sup>12</sup> Based on this model and domain annotations from the yeast protein Pol3, the exonuclease domain of *POLD1* comprises amino acids R311-L526. For the identified variants, protein stability calculations were performed using CUPSAT (<http://cupsat.tu-bs.de>), I-Mutant 2.0 (<http://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html>), ERIS (<http://troll.med.unc.edu/eris/>) and PoPMuSiC (<http://dezyme.com>).

### **Loss Of Heterozygosity (LOH)**

Six microsatellite flanking *POLD1* and spanning 2.06Mb, three centromeric (D19S867, D19S585, D19S904) and three telomeric (D19S246, D19S907 and D19S601), were used to assess LOH in DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue. Also, SNaPshot targeting the corresponding *POLD1* mutation was used to assess LOH and to discriminate wildtype and mutated alleles. LOH was scored if the intensity of any allele was reduced by  $\geq 50\%$  relative to the other allele after taking account of the relative allelic intensities in paired constitutional DNA. Primers and conditions are shown in Supplementary Table 1.

## **RESULTS AND DISCUSSION**

### **Germline Mutations in the Exonuclease Domain of *POLE* and *POLD1* in a Series of Familial CRC and/or Polyposis**



In a previous study, we analyzed by targeted genotyping the recurrent mutations *POLE* p.L424V and *POLD1* p.S478N in a Spanish familial CRC series, which included 438 MMR-proficient familial non-polyposis (423 families) and 88 unrelated polyposis CRC patients, among others (Series no.1)<sup>2</sup>. We identified a *de novo* *POLE* p.L424V in a CRC and polyposis patient, recently diagnosed with anaplastic oligodendroglioma at age 30.

Here, we extended the analysis by sequencing the complete exonuclease domains of *POLE* and *POLD1* in the above mentioned patients, adding 18 additional MMR-proficient Amsterdam I-positive families, thus making a total of 456 MMR-proficient familial non-polyposis CRC cases (441 families) and 88 polyposes. It corresponds to the largest series of hereditary non-polyposis CRC where the complete exonuclease domains of *POLE* and *POLD1* have been studied.

While no additional mutations were identified in *POLE*, six novel or rare non-synonymous variants were detected in *POLD1*, five of them in previously genotyped patients. In silico predictions, evolutionary conservation, absence in control populations, functional effects on yeast,<sup>13,14</sup> and/or affectation of an exonuclease catalytic residue, strongly support the pathogenic effect of four of the six identified variants: *POLD1* p.D316H, p.D316G, p.R409W and p.L474P (Table 1). Localization within the exonuclease domain of the amino acids affected by these mutations is shown in Supplementary Figure 1. CRC was diagnosed in 62.5% (5/8) of mutation carriers, and both endometrial and breast cancers in 33.3% (2/6) of female carriers, one diagnosed of two primary breast tumors (see complete tumor spectrum of mutated families in Figure 1 and Supplementary Table 2). Only one *POLD1* mutation carrier (1/8; 12.5%) was diagnosed with more than 5 colonic adenomas (cumulative resection of 11 adenomas

until age 67), suggesting that *POLD1* mutations do not show strong association with polyposis and agreeing with the findings observed in mice.<sup>15</sup>

Not so evident are the functional effects of *POLD1* p.V295M and p.R521Q (MAFs $\leq$ 0.035%), being thus classified as variants of unknown significance (Table 1). However, p.V295M, outside but close to the exonuclease domain (Supplementary Figure 2), occurs in two independent affected families (Figure 1). In one of them, p.V295M is found *in trans* with p.D316G (catalytic residue) (individual Fam-2, II.2). The patient was diagnosed with endometrial cancer and two metachronous breast tumors. To date, no biallelic mutations in *POLE* or *POLD1* have been reported. Considering the likely pathogenic variants identified in this study, *POLD1* exonuclease mutations account for 1% (4/411) of MMR-proficient familial/early-onset non-polyposis CRC cases, including 1.7% (1/60) of Amsterdam-positive cases (familial CRC type X).

### **Review of the Phenotypic Data from the Reported Carriers of *POLE* and *POLD1* Exonuclease Pathogenic Mutations**

Phenotypic data from the 69 carriers (29 families) of *POLE/POLD1* exonuclease pathogenic mutations reported to date,<sup>1,2,3,4</sup> and present study are recapitulated in Tables 2 (*POLE*) and 3 (*POLD1*), and summarized according to the mutated gene in Table 4. Altogether, available information point to an associated phenotype characterized by attenuated or oligo- adenomatous colorectal polyposis (>80% of *POLE* and >60% of *POLD1* mutation carriers were diagnosed with  $\geq$ 2 adenomas; on average, 16 adenomas), CRC (60-64% of carriers) and probably brain tumors (5.8%). Gastroduodenal (mostly duodenal) adenomas were detected in 57.1% of carriers who

underwent gastroduodenoscopies (only 14 *POLE* exonuclease mutation carriers evaluated).<sup>4</sup> Moreover, the *POLD1* phenotypic spectrum includes endometrial (57.1% of female carriers) and breast tumors (14.3% of female carriers). All 21 *POLE/POLD1* mutation carriers without cancer underwent resection of colorectal adenomas, indicating complete or very high expressivity of the associated phenotype (associated carcinomas and/or adenomas), but precluding any conclusion about CRC penetrance.

Ascertainment bias due to the inclusion of CRC and/or polyposis families in the studies, may have led to over- or underrepresentation of the *POLE/POLD1*-associated tumors. In particular, the high prevalence of endometrial cancer in *POLD1* families might be biased due to the inclusion of families fulfilling the Amsterdam or Bethesda criteria. However, the fact that endometrial cancer is extremely rare among female *POLE* mutation carriers (1/26 compared to 8/14 female *POLD1* carriers), supports its relevance in the *POLD1*-associated phenotype.

### **Recommendations for Genetic Testing and Clinical Surveillance**

Clinical suspicion of the polymerase proofreading-associated syndrome may arise when the clinical characteristics depicted in Table 4 (left column) are fulfilled. Due to the current need of genetic testing guidelines for *POLE/POLD1*, we attempt to define the first preliminary recommendations for their use in the routine practice. Based on the overlapping phenotypes of this entity with Lynch syndrome and attenuated adenomatous polyposis (*APC/MUTYH*),<sup>16</sup> we took as a model the criteria for hereditary non-polyposis CRC (revised Bethesda), adapted them to the attenuated or oligo-polyposis scenario, and took into consideration additional specific *POLE/POLD1* characteristics. The resulting recommendations are shown in Table 4 (right column).

Although preliminary, they will help guide in routine genetic testing and counseling until larger series of mutation carriers are described and standardized guidelines defined.

The implementation in routine genetic testing of targeted next generation sequencing using multi-gene panels will help alleviate the issue of overlapping phenotypes among familial CRC and polyposis syndromes. In this context, the proposed guidelines may be used for prioritization purposes in the analysis of data.

More extensive phenotypic data from mutation carriers are needed to establish standardized surveillance recommendations. In the meantime, based on the clinical features of *POLE* and *POLD1* mutation carriers (Table 4) and the guidelines recommended for Lynch syndrome and attenuated adenomatous polyposis,<sup>17</sup> whose features largely overlap with those observed in the polymerase proofreading-associated syndrome, we recommend colonoscopies every 1-2 years and gastroduodenoscopies every 3 years, starting at age 20-25 (reevaluate periodicity according to the findings), adding endometrial cancer screening beginning at age 40 for *POLD1* female carriers. The predisposition to breast tumors may eventually influence the age to start and the frequency of mammogram screenings. For both *POLE* and *POLD1* mutation carriers, the possibly increased susceptibility to brain tumors may be taken into consideration.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (State Secretariat for Research, Development and Innovation) (SAF2012-38885 and SAF2010-21165, Ramón y Cajal contract to LV, fellowship to FB, and RTICC

networks RD12/0036/0031, RD12/0036/0008 and RD12/0036/0067); the Scientific Foundation Asociación Española Contra el Cáncer; the Government of Catalonia (2014SGR-338); and the EU FP7 project ASSET (grant agreement 259348 to AV).

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no conflict of interest.

## **REFERENCES**

1. Palles C, Cazier JB, Howarth KM, et al. Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet.* 2013;45:136-144.
2. Valle L, Hernandez-Illan E, Bellido F, et al. New insights into POLE and POLD1 germline mutations in familial colorectal cancer and polyposis. *Hum Mol Genet.* 2014;23:3506-3512.
3. Elsayed FA, Kets CM, Ruano D, et al. Germline variants in POLE are associated with early onset mismatch repair deficient colorectal cancer. *Eur J Hum Genet.* 2014.
4. Spier I, Holzapfel S, Altmuller J, et al. Frequency and phenotypic spectrum of germline mutations in POLE and seven other polymerase genes in 266 patients with colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer.* 2014.
5. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature.* 2011;475:101-105.
6. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods.* 2010;7:248-249.
7. Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc.* 2009;4:1073-

1081.

8. Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N. Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel. *Am J Hum Genet.* 2011;88:440-449.
9. Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014;11:361-362.
10. Liu X, Jian X, Boerwinkle E. dbNSFP v.2.0: A database of human nonsynonymous SNVs and their functional predictions and annotations. *Hum Mutat.* 2013;34:2393-402.
11. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, Haussler D. Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol.* 1997;4:311-323.
12. Swan MK, Johnson RE, Prakash L, Prakash S, Aggarwal AK. Structural basis of high-fidelity DNA synthesis by yeast DNA polymerase delta. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16:979-986.
13. Kokoska RJ, Stefanovic L, DeMai J, Petes TD. Increased rates of genomic deletions generated by mutations in the yeast gene encoding DNA polymerase delta or by decreases in the cellular levels of DNA polymerase delta. *Mol Cell Biol.* 2000;20:7490-7504.
14. Murphy K, Darmawan H, Schultz A, Fidalgo da Silva E, Reha-Krantz LJ. A method to select for mutator DNA polymerase deltas in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome.* 2006;49:403-410.
15. Albertson TM, Ogawa M, Bugni JM, et al. DNA polymerase epsilon and delta proofreading suppress discrete mutator and cancer phenotypes in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:17101-17104.
16. Hampel H, Bennett RL, Buchanan A, Pearlman R, Wiesner GL. A practice guideline

from the American College of Medical Genetics and Genomics and the National Society of Genetic Counselors: referral indications for cancer predisposition assessment. *Genet Med.* 2015;17: 70-87.

17. Stoffel EM, Mangu PB, Gruber SB, et al. Hereditary colorectal cancer syndromes: american society of clinical oncology clinical practice guideline endorsement of the familial risk-colorectal cancer: European society for medical oncology clinical practice guidelines. *J Clin Oncol.* 2014;33:209-217.
18. Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet.* 2011;44:47-52.

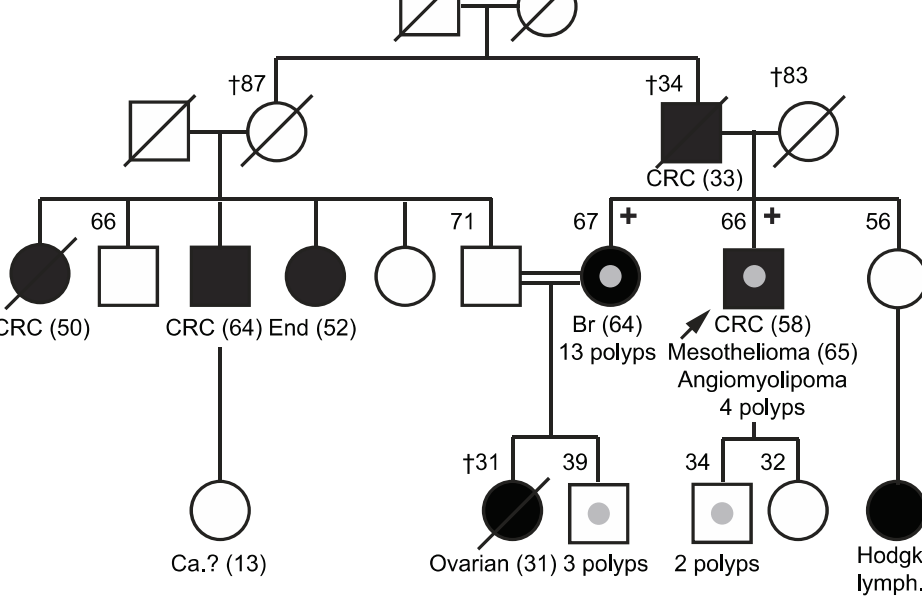
## FIGURE LEGENDS

**Figure 1.** Pedigrees of the families with germline *POLD1* variants. Demonstrated pathogenic variants are indicated in bold, and variants of unknown significance in regular case. Filled symbol, cancer; Centered gray circle, presence of  $\geq 2$  polyps (adenomatous or hyperplastic); +, mutation carrier; -, wild-type. Ages at information gathering or at death (†), when available, are indicated on the top-right corner. Probands are depicted by an arrow. Abbreviations: End, endometrial cancer; Br, breast cancer; Lymph, lymphoma.

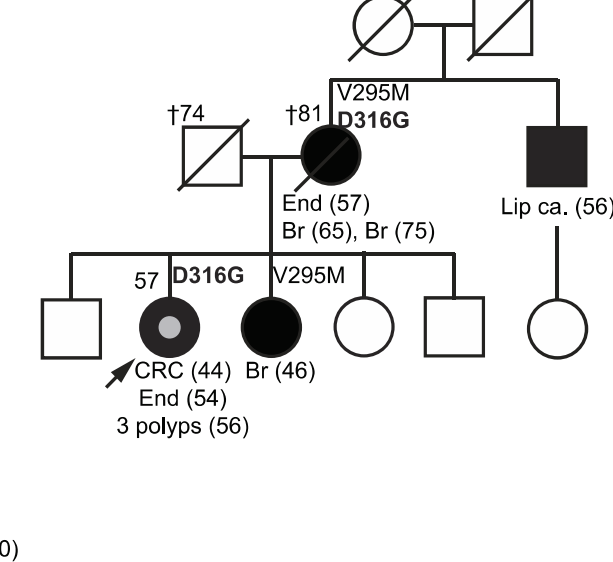


Figure 1

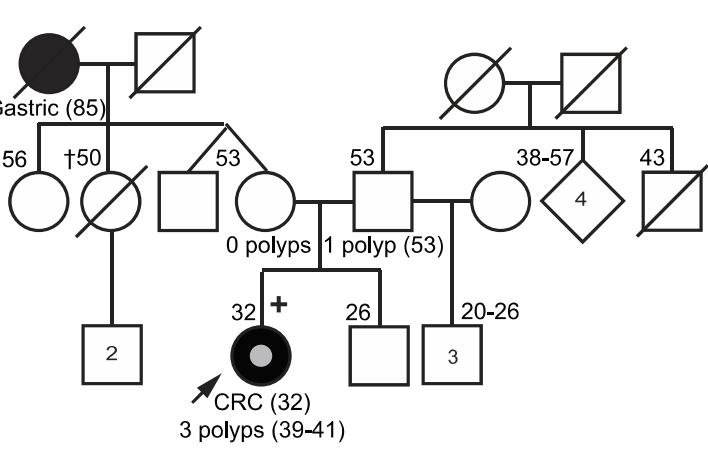
**Fam-1**  
c.946G>C; p.D316H



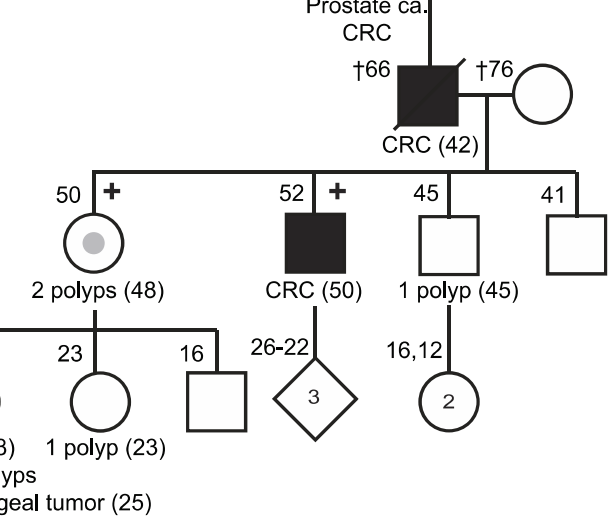
**Fam-2**  
c.883G>A; p.V295M  
c.947A>G; p.D316G



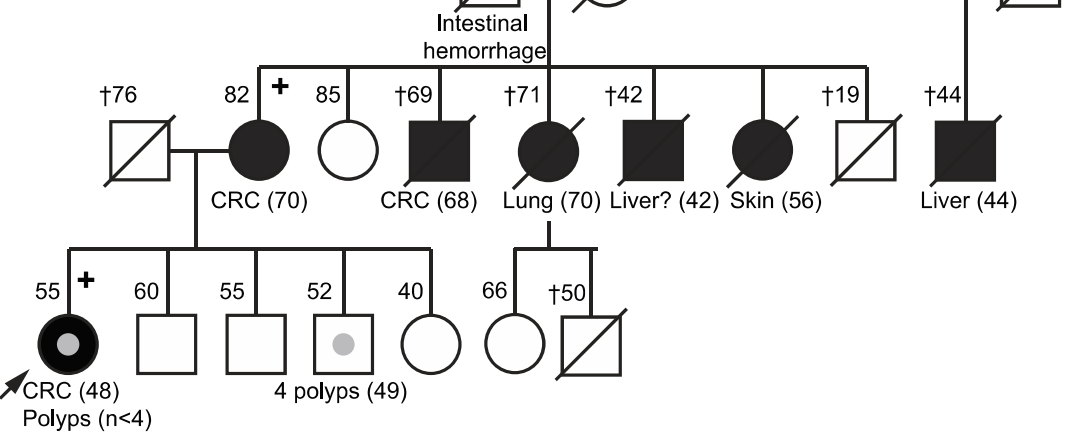
**Fam-3**  
c.1225C>T; p.R409W



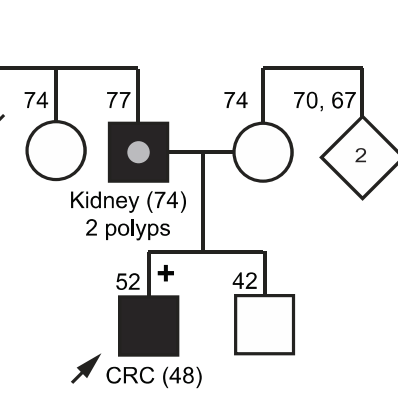
**Fam-4**  
c.1421C>T; p.L474P



**Fam-5**  
c.883G>A; p.V295M



**Fam-6**  
c.1562G>A; p.R521Q



**Table 1.** Germline variants in the exonuclease domain (aminoacids R311 to L526) and adjacent regions of *POLD1* identified in 456 familial or early onset non-polyposis CRC and 88 polyposis cases. Indicated in bold is the evidence that supports the damaging nature of the variants. *In silico* algorithm NNSplice did not predict splice site effects for any of the variants. Loss of *POLD1* wildtype allele could not be identified in 5 of 6 tumors analyzed (Supplementary Table 5), in agreement with the haploinsufficiency model previously proposed.<sup>1</sup>

<sup>a</sup> Variants	Population MAF (dbSNP/ESP)	Protein domain / secondary structure element	Evolutionary conservation <sup>q</sup> (PhyloP)	Protein function prediction PPH2 (HumDiv/HumVar)	SIFT	Mutation taster	Condel	3D structure prediction CUPSAT / I-Mutant / ERS	Mutator phenotype (S. cerevisiae)	Variant classification
c.883G>A; p.(V295M)	n.a./0.0003 (rs199545019)	N-terminal / loop	<b>1.096</b>	0.410/0.103 (N)	0.09 (N)	N	0.371 (N)	<b>Destabilize (all)</b>	n.a.	Uncertain significance
c.946G>C; p.(D316H)	<b>0/0</b>	<b>Exonucl. (catalytic res.) / <math>\beta</math>-strand</b>	<b>6.977</b>	<b>1/1 (PbD)</b>	<b>0 (D)</b>	<b>D</b>	<b>0.690 (D)</b>	No effect / <b>destabilize (I-Mut, ERS)</b>	<b>Yes<sup>5,6</sup></b>	<b>Pathogenic</b>
c.947A>G; p.(D316G)	<b>0/0</b>	<b>Exonucl. (catalytic res.) / <math>\beta</math>-strand</b>	<b>6.549</b>	<b>1/1 (PbD)</b>	<b>0 (D)</b>	<b>D</b>	<b>0.688 (D)</b>	<b>Destabilize (all)</b>	<b>Yes<sup>5,6</sup></b>	<b>Pathogenic</b>
c.1225C>T; p.(R409W)	<b>0/0</b>	<b>Exonucl. / <math>\alpha</math>-helix</b>	<b>1.115</b>	<b>1/1 (PbD)</b>	<b>0 (D)</b>	<b>D</b>	<b>0.610 (D)</b>	<b>Destabilize (all)</b>	n.a.	<b>Probably pathogenic</b>
<sup>b</sup> c.1421T>C; p.(L474P)	<b>0/0</b>	<b>Exonucl. / <math>\alpha</math>-helix</b>	<b>5.593</b>	<b>1/1 (PbD)</b>	<b>0 (D)</b>	<b>D</b>	<b>0.702 (D)</b>	<b>Destabilize (all)</b>	<b>Yes<sup>6</sup></b>	<b>Pathogenic</b>
c.1562G>A; p.(R521Q)	n.a./0.00035 (rs143076166)	<b>Exonucl. / <math>\alpha</math>-helix</b>	<b>8.762</b>	<b>0.816/0.195 (PsD/N)</b>	<b>0.05 (D)</b>	<b>D</b>	0.435 (N)	No effect / <b>destabilize (I-Mut, ERS)</b>	n.a.	Uncertain significance

a. NM\_002691

b. Previously reported in familial CRC.<sup>2</sup>

c. Not reported in dbSNP, 1000 Genomes and NHLBI GO Exome Sequencing Project (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>), or found in 500 alleles of Spanish origin.<sup>18</sup>

d. PhyloP100way vertebrate annotations in dbNSFP v.2.8. PhyloP (phylogenetic p-values) conservation score is based on the alignments of 100 vertebrate genomes. Positive scores indicate constraint (if score > 0.95, the variant is conserved). The higher the score, the more conserved is the residue.

e. Protein destabilization also predicted by PoPMuSiC.

f. The homologous residue in *Saccharomyces cerevisiae* (*Pol3* gene), when mutated causes a mutator phenotype.

Abbreviations: MAF, minor allele frequency; ESP, NHLBI Exome Sequencing Project; PPH2, Polyphen 2; N, neutral; PbD, probably damaging; PsD, possibly damaging; D, damaging or deleterious; Exonucl., exonuclease domain; Res., residue; n.a., not available.

**Table 2.** Phenotypic characteristics of the carriers of pathogenic mutations in the exonuclease domain of *POLE* (literature and current study).

<b>POLE mutation</b>	<b><sup>a</sup>Family (ind) (gender)</b>	<b>Tumors</b>	<b>Colonic polyps</b>	<b>Gastric polyps</b>	<b>MSI status</b>	<b>Publication</b>
p.L424V	SM7 (II.1) (♀)	-(>61y)	43 AP (34-61y)	n/a		Palles 2013
p.L424V	SM7 (II.2) (♀)	-(>60y)	Multiple AP (46-60y)	n/a		Palles 2013
p.L424V	SM7 (II.4) (♂)	CRC (43y)	5 AP (43y)	n/a	MSS (2 AP)	Palles 2013
p.L424V	SM7 (II.6) (♀)	CRC (40y)	27 AP (40-54y)	n/a	MSS (CRC, 17 AP)	Palles 2013
p.L424V	SM7 (II.8) (♀)	-(>51y)	9 AP, 1 HP (38-51y)	n/a	MSS (1 AP)	Palles 2013
p.L424V	SM7 (III.6) (♀)	-(>33y)	9 AP (26-33y)	n/a		Palles 2013
p.L424V	SM7 (III.7) (♀)	-(>30y)	68 AP (23-30y)	n/a		Palles 2013
p.L424V	A (III.1) (♀)	CRC (48y)	n/a	n/a	MSS (CRC)	Palles 2013
p.L424V	B (III.1) (♀)	CRC (48y 2x)	3 AP, 1 HP (48-63y)	n/a		Palles 2013
p.L424V	B (IV.2) (♂)	CRC (28y)	18 AP (29-41y)	n/a		Palles 2013
p.L424V	C (II.2) (♂)	CRC (50y)	n/a	n/a	MSS (CRC)	Palles 2013
p.L424V	C (II.3) (♂)	-(>60y)	6 AP, 5 HP (41-60y)	n/a		Palles 2013
p.L424V	C (III.1) (♂)	CRC (37y)	Polyps (37-42y)	n/a		Palles 2013
p.L424V	D (IV.2) (♀)	CRC (37y)	n/a	n/a		Palles 2013
p.L424V	E (III.1) (♀)	-(>75y)	>40 AP (53-75y)	n/a		Palles 2013
p.L424V	F (IV.1) (♂)	-(>74y)	4 AP (60-74y)	n/a	MSS (3 AP)	Palles 2013
p.L424V	G (III.1) (♂)	-(>55y)	2 AP (37-55y)	n/a		Palles 2013
p.L424V	H (III.2) (♀)	CRC (53y)	6 AP (52y)	n/a	MSS (1 AP)	Palles 2013
p.L424V	I (II.3) (♂)	CRC (46y, 62y), ureter ca. (46y)	5 AP (46y)	n/a		Palles 2013
p.L424V	I (II.9) (♂)	CRC (64y)	10 AP, 2 HP (64-82y)	n/a	MSS (10 AP)	Palles 2013
p.L424V	I (III.4) (♀)	CRC (40y)	Multiple polyps (40-56y)	n/a	MSS (1 AP)	Palles 2013
p.L424V	I (III.9) (♀)	CRC (47y 2x)	2 AP (47-54y)	n/a		Palles 2013
p.L424V	I (III.10) (♂)	-(>51y)	11 AP (38-51y)	n/a		Palles 2013
p.L424V	J (II.4) (♀)	-(>57y)	1 AP (57y)	n/a		Palles 2013
p.L424V	K (II.3) (♀)	CRC (40y, 42y), breast ca. (42y)	1 AP (40-62y)	n/a		Palles 2013
p.L424V	K (III.3) (♀)	-(>37y)	49 AP (27-37y)	n/a	MSS (1 AP)	Palles 2013
p.L424V	K (III.4) (♀)	-(>36y)	63 AP (23-36y)	n/a		Palles 2013
p.L424V	L (n.a) (♀)	CRC (45y)	n/a	n/a		Palles 2013
p.L424V (de novo)	Fig1A (III.6) (♀)	CRC (28y), anaplastic oligodendroglioma (30y)	>31 AP, 1 HP, 1 mixed polyp	n/a		Valle 2014, current study
p.L424V	Family 1 (PT1) (♀)	CRC (40y), EC (50y)	~30 AP	n/a	MSI / MSH6 loss (CRC), MSS (EC)	Elsayed 2014
p.L424V	<sup>b</sup> Family 1 (PT2) (♂)	CRC (30y), astrocytoma (15y)	n/a	n/a	MSI (CRC)	Elsayed 2014
p.L424V	Family 2 (PT3)	CRC (34y)	Multiple APs (34y)	n/a	MSI / MSH2 and MSH6 loss (CRC), MSS (1 AP)	Elsayed 2014
p.L424V (de novo)	Family 3 (PT4)	CRC (33y)	Polyps (33y)	n/a	MSS (CRC)	Elsayed 2014
p.L424V	F156 /F381 (F156_III:5) (♂)	CRC (27y)	51-100 AP (37y)	Duodenum +jejunum (APs)		<sup>c</sup> Spier 2014
p.L424V	F156 /F381 (F156_III:1) (♀)	-(>35y)	>100 AP, HP (35y)	Duodenum (APs), gastric fundic gland		<sup>c</sup> Spier 2014
p.L424V	F156 /F381 (F156_III:3) (♀)	CRC (42y)	Multiple APs (32y)	Duodenum (APs)		<sup>c</sup> Spier 2014
p.L424V	F156 /F381 (F156_III:4) (♂)	CRC (30y 4x, 46y)	51-100 AP, HP (30y)	Gastric fundic gland		<sup>c</sup> Spier 2014
p.L424V	F156 /F381 (F156_II:6) (♂)	CRC (36y 2x, 56y, 66y)	51-100 AP (36y)	Duodenum (APs)	MSS	<sup>c</sup> Spier 2014
p.L424V	F156 /F381 (F156_III:1) (♂)	CRC (36y), duodenal ca. (45y)	21-50 (34y)	0	MSS (duodenal ca.)	<sup>c</sup> Spier 2014
p.L424V	F156 /F381 (F156_III:2) (♀)	-(>37y)	21-50 AP (37y)	0		<sup>c</sup> Spier 2014

p.L424V	F156 /F381 (F156_III:5) (♀)	-(>32y)	11-20 AP (32y)	Duodenum (1 AP), gastric fundic gland		°Spier 2014
p.L424V	F354 (II:5) (♂)	CRC (27y, 38y, 39y), neuroendocrine colon ca. (41y), glioblastoma (47y)	51-100 AP (27y)	Duodenum (APs)		°Spier 2014
p.L424V	F354 (III:5) (♂)	-(>16y)	11-20 AP, HP (16y)	0		°Spier 2014
p.L424V	F1505 (index)	CRC (38y)	51-100 AP (38y)	0	MSS	°Spier 2014
p.L424V	H1427 (III:1) (♂)	CRC (46y, 48y)	<10 AP	0	MSS	Spier 2014
p.L424V	H1427 (II:2) (♀)	CRC (63y)	<10 AP	0		Spier 2014
p.L424V	H1427 (III:8) (♀)	CRC (45y 2x, 53y), ovarian ca. (33y)	21-50 AP, HP	Duodenum (1AP)		Spier 2014

a. According to the corresponding publication. The gender is indicated whenever available in the corresponding publication.

b. PT2 was diagnosed with neurofibromatosis (originated in the family branch without *POLE* L424V).

c. Selection criteria for polyposis patients included in the study:  $\geq 20$  synchronous or  $\geq 40$  metachronous colorectal adenomas.

Abbreviations: ind, individual; MSI, microsatellite instability; MSS, microsatellite stability; CRC, colorectal cancer; EC, endometrial cancer; AP, adenomatous polyp; HP, hyperplastic polyp; y, years old; n/a, not available information.

**Table 3.** Phenotypic characteristics of the carriers of pathogenic mutations in the exonuclease domain of *POLD1* (literature and current study).

<i>POLD1</i> mutation	<sup>a</sup> Family (ind) (gender)	Tumors	Colonic polyps	MSI status	Publication
p.S478N	SM6 (IV.2) (♂)	- (>65y)	10 AP (43-65y)	MSS (5 AP)	Palles et al. 2013
p.S478N	SM6 (IV.6) (♀)	EC (52y)	28 AP, 2 HP (52-68y)		Palles et al. 2013
p.S478N	SM6 (IV.8) (♀)	EC (45y)	17 AP (53-65y)		Palles et al. 2013
p.S478N	SM6 (V.2) (♂)	CRC (28y)	28 AP (28-35y)	MSS (tumor, 1 AP)	Palles et al. 2013
p.S478N	SM6 (V.10) (♂)	2 astrocytomas (26y)	7 AP, 2 HP (33-45y)		Palles et al. 2013
p.S478N	SM6 (V.12) (♂)	- (>39y)	6 AP, multiple HP (29-39y)		Palles et al. 2013
p.S478N	SM4 (III.2) (♀)	CRC (29y, 51y)	Multiple AP (48y)		Palles et al. 2013
p.S478N	SM4 (III.6) (♀)	CRC (41y), EC (50y)	>19 AP (41-53y)		Palles et al. 2013
p.S478N	SM4 (III.8) (♂)	CRC (32y)	45 AP, 1 HP (32-52y)	MSS (CRC)	Palles et al. 2013
p.S478N	SM4 (III.9) (♀)	CRC (33y), EC (45y)	40 AP (33-49y)		Palles et al. 2013
p.S478N	n.a.	CRC (28y)	n/a		Palles et al. 2013
p.L474P	Fig1B (II.2) (♀)	EC (52y)	n/a		Valle et al. 2014
p.L474P	Fig1B (II.6) (♀)	CRC (33y), EC (56y)	0		Valle et al. 2014
p.L474P	Fig1B (III.1) (♀)	CRC (36y), GIST (36y)	0		Valle et al. 2014
p.D316H	Fam-1 (III.7) (♀)	Breast ca. (64y)	11 AP, 2 HP		Current study
p.D316H	Fam-1 (III.8) (♂)	CRC (58y), angiomyolipoma (65y), mesothelioma (65y)	3 AP, 1 HP	MSS (CRC)	Current study
p.V295M; D316G	Fam-2 (II.2) (♀)	EC (57y), Breast ca. (65y, 75y)	n/a	MSS (EC)	Current study
p.D316G	Fam-2 (III.2) (♀)	CRC (44y), EC (54y)	2 AP, 1 HP	MSS (CRC)	Current study
p.R409W	Fam-3 (III.3) (♀)	CRC (32y)	3 HP (39-41y)	MSS (CRC)	Current study
p.L474P	Fam-4 (III.1) (♀)	- (50y)	2 polyps		Current study
p.L474P	Fam-4 (III.2) (♂)	CRC (50y)	0		Current study
p.L474P	Fam-4 (IV.1) (♀)	CRC (23y), benign esophageal tumor (25y)	0 [Gastric HPs]	MSS and loss of MSH6 (CRC)	Current study

a. According to the corresponding publication. The gender is indicated whenever available in the corresponding publication.

Abbreviations: ind, individual; MSS, microsatellite stability; CRC, colorectal cancer; EC, endometrial cancer; AP, adenomatous polyp; HP, hyperplastic polyp; y, years old; n/a, not available information.

**Table 4.** Common phenotypic features observed in carriers of pathogenic mutations in the exonuclease domains of *POLE* and *POLD1* reported to date<sup>1,2,3,4</sup> and current study<sup>5</sup>, and clinical suspicion or recommended guidelines for genetic testing. Tumor MMR deficiency should not be an exclusion criterion, based on its identification in two colorectal tumors developed by *POLE* mutation carriers.<sup>3</sup> A preliminary screening of the recurrent mutations *POLE* p.L424V, *POLD1* p.S478N and *POLD1* p.L474P, may be considered. When using gene panels (next generation sequencing), the proposed guidelines may be used for prioritization purposes in the data analysis.

<b>Observed features</b>	<b>Guidelines for genetic testing</b>
<p><b><i>POLE</i> exonuclease mutation carriers (n=47; 20 families)</b></p> <p><sup>a</sup> Colonic adenomas: Mean #: 19.3 (range: 1-68; n=23 carriers)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ≥2 adenomas: 81.8% (27/33) carriers</li> <li>• ≥5 adenomas: 73.9% (17/23) carriers</li> </ul> <p>CRC: 63.8% (30/47) carriers. Mean age at 1<sup>st</sup> diagnosis: 40.7</p> <p><sup>b</sup> Duodenal adenomas: 50% (7/14) carriers</p> <p><u>Brain tumor</u>: 6.4% (3/47) carriers. Mean age at diagnosis: 30.6</p>	<p><b><i>POLE</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Attenuated adenomatous polyposis (20-100 adenomas)</li> <li>• Amsterdam I (only CRC)</li> <li>• CRC and oligopolyposis (5-20 adenomas), both diagnosed before age 50</li> <li>• CRC or oligopolyposis (5-20 adenomas) and 1<sup>st</sup> degree relative with CRC diagnosed before age 50</li> <li>• CRC or oligopolyposis (5-20 adenomas) and two or more 1st or 2nd degree relatives with CRC, regardless of age</li> </ul>
<p><b><i>POLD1</i> exonuclease mutation carriers (n=22; 8 families)</b></p> <p>Colonic adenomas: Mean #: 12.3 (range: 0-45; n=16 carriers)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• ≥2 adenomas: 63.6% (14/22) carriers</li> <li>• ≥5 adenomas: 55.5% (10/18) carriers</li> </ul> <p>CRC: 59.1% (13/22) carriers. Mean age at 1<sup>st</sup> diagnosis: 35.9</p> <p><u>EC</u>: 57.1% (8/14) female carriers. Mean age at diagnosis: 51.4</p> <p><u>Breast cancer</u>: 14.3% (2/14) female carriers</p> <p><u>Brain tumor</u>: 4.5% (1/22; two synchronous at age 26)</p>	<p><b><i>POLD1</i></b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Attenuated adenomatous polyposis (20-100 adenomas)</li> <li>• Amsterdam II (only CRC and EC)</li> <li>• CRC before age 50 or EC before age 60, and oligopolyposis (5-20 adenomas) diagnosed before age 50</li> <li>• CRC or EC or oligopolyposis (5-20 adenomas) and 1<sup>st</sup> degree relative with CRC before age 50 or EC before age 60</li> <li>• CRC or EC or oligopolyposis (5-20 adenomas) and two or more 1st or 2nd degree relatives with CRC or EC, regardless of age</li> </ul> <p>Pending additional evidence, the presence of brain and/or breast tumors in the context of the characteristic features (CRC, polyposis and/or endometrial cancer), may be an indicator of the polymerase proofreading-associated syndrome.</p>

a. Data from Spier et al.<sup>4</sup> is not included because the number of adenomas is given in ranges (e.g.: 21-50 or 21-100)

b. The presence of upper gastrointestinal findings has not been systematically evaluated in *POLD1* exonuclease mutation carriers yet.

Abbreviations: MMR deficiency, mismatch repair deficiency (it includes microsatellite instability and/or loss of expression the MMR proteins); CRC, colorectal cancer; EC, endometrial cancer.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Supplementary Table 1.** Primers used in the study.

	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Extension primer	Amplicon size (bp)
<b><i>POLE</i> sequencing (Sanger and pool-based next gen sequencing)</b>				
Exon 9	AACCAGAGGGAGGTAGAGCA	CTCCCTGTTGGTGATGAGGT	-	567
Exon 10-11	GCACTTTCACATTGCTGTGG	CCTAAGTCGACATGGGAAGC	-	688
Exon 12	ACACGTCCAGGAGACCAAAC	TTGCAGCTGCCATACTCTTG	-	546
Exon 13	GGTGCCTGTTAGGAACTTGC	GAGCGGGCTGGCATACAT	-	380
Exon 14	GGCTTTGCTTTCTGTGCTTC	AGCACTCCTGGGACATCCAC	-	291
<b><i>POLD1</i> sequencing (Sanger and pool-based next gen sequencing)</b>				
Exon 6-8	CTCCCGAGAGAGTGAGTGCT	ATCTCCACACCCTCTGTGCT	-	787
Exon 9	AGGTGAGAGCAGAGCAGGAG	AGGAGCTGATGGCTCAGGAC	-	386
Exon 10	GGTTCTGCAGGATTTTCAGG	GTGGAGAGGGAGTGGGAAG	-	298
Exon 11-12	TGTCCCAAATCTCTTCCTG	CCAGGAAAGCAGAGACAAGG	-	869
Exon 13	TCCCTGACCCCATCCGTG	GGACAAGTCTCGGCTACTGA	-	242
<b><i>POLD1</i> LOH (microsatellites)</b>				
D19S867	CAATGAAAATGCTTTGTA AAC	CCTTCAGAGGTGACCAG	-	90-116
D19S904	ACAAGAATTGCTTGAACCTGG	GCTCCATTTCCGAGATGTTA	-	210-224
D19S907	GTGTCCAATCAACAGACCA	CTGCACTCCAGCAGAAAT	-	213-223
D19S585	AGCACCATAATGCCTGGATA	CAGCATAGCAAGACCCTGTC	-	103-127
D19S246	AGAGTGAGATTCCACCTTTC	GAAACACATCATTTACCCAC	-	185-229
D19S601	CAATGTGAGGCTGGTCTCTT	ATCATATGGCCTTCAGTGGA	-	137-228
<b><i>POLD1</i> LOH (SNaPshot)</b>				
c.883G>A	TGAGGCTGAAGGAGAAGGTG	TTCCGGTGGGTGACTGAC	GACGTGCTGTGGTCTGAC	156
c.946G>C	GCTGTGGTCTGACGTGGTC	CACCTTCATGCTTGCCATT	CCTTGCGCGTGCTCAGCTTC	199
c.947A>G	GCTGTGGTCTGACGTGGTC	CACCTTCATGCTTGCCATT	TTGCGCGTGCTCAGCTTCG	199
c.1225C>T	TCGACCTTCCGTACCTCATC	CTGAGGCACACAGAGCAAGA	ACCTTCCGTACCTCATCTCT	160
c.1421T>C	GGAGTACAAGCTCCGCTCCT	GTCAGAGTTGGGGTGAGAG	CAAGCTCCGCTCCTACACGC	140
c.1562G>A	CTGGCTGTGTA CTGCCTGAA	CGAGGACAAGTCTCGGCTAC	GGATGCCTACCTGCCACTGC	189

**Supplementary Table 2.** Clinicopathological features of the members of the *POLD1* mutated families identified in this study. In bold, clear pathogenic mutations, and in regular case, variants of unknown significance.

Family ID	Pedigree individual ID (gender)	Mutation carrier status	Tumor (age)	Tumor characteristics	Reported colonic polyps
Fam-1	II.3 (♂)	unk	CRC (33)		no
Fam-1	III.1 (♀)	unk	CRC (50)	Sigma	no
Fam-1	III.3 (♂)	unk	CRC (64)		no
Fam-1	III.4 (♀)	unk	Endometrium (52)		no
Fam-1	III.7 (♀)	<b>p.D316H</b>	Breast (64)	Invasive ductal carcinoma, PR-, ER-, HER2++	11 AP, 2 HP
Fam-1	III.8 (♂)*§	<b>p.D316H</b>	CRC (58) Mesothelioma (65, asbestos) Angiomyolipoma	Cecum.	3 AP, 1 HP
Fam-1	IV.2 (♀)	unk	Ovary (31)		no
Fam-1	IV.3 (♂)	unk	-		1 AP, 1 HP
Fam-1	IV.4 (♂)	unk	-		1 AP, 1 HP
Fam-1	IV.6 (♀)	unk	Hodgkin lymphoma (30)		no
Fam-2	II.2 (♀)	<b>p.D316G</b> ; p.V295M	Endometrium (57) Breast (65)  Breast (75)	Stage IA, grade 2. Atrophic ovaries. Invasive ductal carcinoma, T1N0M0, grade 2, PR+, ER+.	no
Fam-2	II.3 (♂)	unk	Lip (56, smoker)	Squamous carcinoma.	no
Fam-2	III.2 (♀)*§	<b>p.D316G</b>	CRC (44) Endom (54)	Sigma, T3N2M1 + serrated adenoma. Endometrioid carcinoma, stage Ia, grade 1.	2 AP, 1 HP
Fam-2	III.3 (♀)	p.V295M	Breast (46)	In situ, grade 1, cribriform-micropapilar.	no
Fam-3	III.3 (♀)*§	<b>p.R409W</b>	CRC (32)	Right colon, in ileo-cecal valve, mucinous, T3N0M1 + sessile polyp.	3 HP
Fam-4	I.1 (♂)	unk	Prostate CRC		no
Fam-4	II.1 (♂)	unk	CRC (42)		no
Fam-4	III.1 (♀)	<b>p.L474P</b>	-		2 polyps
Fam-4	III.2 (♂)	<b>p.L474P</b>	CRC (50)		no
Fam-4	III.3 (♂)	unk	-		1 polyp
Fam-4	IV.1 (♀)*	<b>p.L474P</b>	CRC (23) Benign esophageal tumor (25)		Gastric polyps (HP)
Fam-4	IV.2 (♀)	unk	-		1 polyp
Fam-5	II.2 (♀)	p.V295M	CRC (70)	Rectum adenocarcinoma on a villous adenoma, T2N0M0, grade 2, not mucinous.	no
Fam-5	II.4 (♂)	unk	CRC (68)	Rectum adenocarcinoma, stage IV, grade 1.	no
Fam-5	II.5 (♀)	unk	Lung (70)		no
Fam-5	II.6 (♂)	unk	Liver? (42)		no
Fam-5	II.7 (♀)	unk	Skin (56)		no
Fam-5	II.9 (♂)	unk	Liver (44)		no
Fam-5	III.1 (♀)*§	p.V295M	CRC (48)	Rectum adenocarcinoma, T3N0M0, grade 2, not mucinous.	<4 polyps
Fam-5	III.4 (♂)	unk	-		4
Fam-6	I.3 (♂)	unk	Renal oncocytoma (74)		2 AP
	II.1 (♂)*§	p.R521Q	CRC (48)	Left colon, T4N2M0, grade 2.	no

\* Proband

§ Recurrent *POLE* p.L424V and *POLD1* p.S478N studied in Valle et al.<sup>2</sup>

Abbreviations: unk, unknown mutation carrier status; AP, adenomatous polyp; HP, hyperplastic polyp.

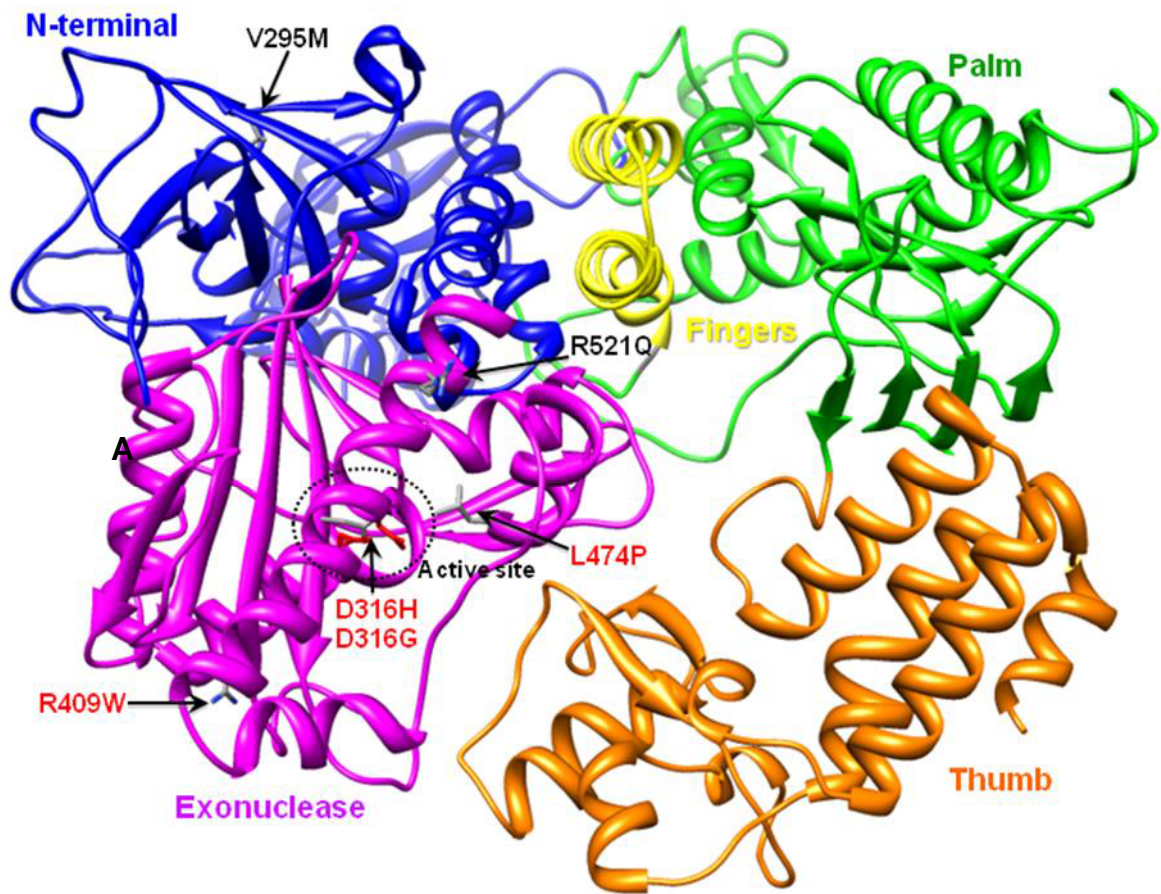


**Supplementary Table 3.** LOH results and characteristics of the studied individuals and tumors.

The individuals can be matched to the pedigrees in Figure 1 according to the pedigree identifiers and clinical features. In bold, clear pathogenic mutations.

Family ID	Pedigree individual ID	Germline mutation	Phenotype (age at diagnosis)	Tumor studied	MSI	<i>POLD1</i> LOH	Informative markers
Fam-2	II.2	<b>c.947A&gt;G (p.D316G)</b> ; c.883G>A (p.V295M)	Endometrial ca. (57), breast ca. (65), breast ca. (75)	Endometrial ca.	MSS	LOH (loss of D316G mutated allele)	D19S585 (no LOH), D19S904 (LOH), c.947A>G (LOH), D19S907 (LOH), D19S601 (LOH).
Fam-2	III.2	<b>c.947A&gt;G (p.D316G)</b>	CRC (44), endometrial ca. (54), 3 polyps (56)	CRC	MSS	No LOH	D19S867 (no LOH), c.947A>G (no LOH), D19S907 (no LOH), D19S601 (no LOH).
Fam-3	III.3	<b>c.1225C&gt;T (p.R409W)</b>	CRC (32)	CRC	MSS	No LOH	c.1225C>T (no LOH), D19S246 (no LOH), D19S601 (no LOH).
Fam-5	III.1	c.883G>A (p.V295M)	CRC (48)	CRC	MSS	No LOH	D19S867 (no LOH), c.883G>A (no LOH).
Fam-5	II.2	c.883G>A (p.V295M)	CRC (70)	CRC	MSS	No LOH	D19S867 (no LOH), D19S585 (no LOH), c.883G>A (no LOH), D19S907 (no LOH), D19S601 (no LOH).
Fam-6	II.1	c.1562G>A (p.R521Q)	CRC (48)	CRC	MSS	-	c.1562G>A (no LOH), D19S246 (LOH), D19S601 (no LOH).

Abbreviations: CRC, colorectal cancer; ca. cancer; MSI, microsatellite instability; MSS, microsatellite stability; LOH, loss of heterozygosity.



**Supplementary Figure 1.** Location of the variants identified in POLD1 in the 3D model of POLD1. The protein domains are depicted in different colors. Demonstrated pathogenic mutations are in red, and variants of uncertain significance, in black.



## **ARTÍCULO 4**

### **Exome sequencing identifies inherited mutations in *BRF1* and *BARD1* as probable causes of hereditary non-polyposis colorectal cancer.**

**Fernando Bellido et al.**

Artículo en preparación.

#### **Resumen:**

El cáncer colorrectal familiar del tipo X (CCRFx) abarca a todas aquellas familias que cumplen los criterios de Ámsterdam, siendo éstos los más estrictos para definir la agregación familiar de cáncer colorrectal (CCR) sin fallos en el sistema reparador de bases desapareadas. La causa de la agregación de CCR presente en este grupo de familias es a día de hoy desconocida. Con la intención de identificar nuevos genes causales implicados en el CCR familiar, realizamos la secuenciación de exomas completos de tres afectados de CCR pertenecientes a una misma familia CCRFX. Nos centramos en seleccionar aquellas variantes no sinónimas presentes en los tres individuos secuenciados, considerando: la función del gen y su expresión en colon normal/tumoral, la naturaleza de los cambios y su frecuencia en la población general o la información disponible en la literatura entre otros. Cinco mutaciones en los genes *BRF1*, *CLCA1*, *BARD1*, *MXRA8* y en el microARN hsa-mir-578 fueron seleccionadas para su estudio en profundidad. Esto incluyó el análisis de la cosegregación de estas variantes en la familia, la realización de predicciones *in silico* sobre su efecto o la búsqueda de variantes adicionales en series de casos de CCR familiar, entre otros análisis. En base a los resultados obtenidos en este estudio, propusimos un modelo poligénico para explicar la susceptibilidad al CCR presente en la familia estudiada. Las mutaciones *BRF1* c.1459+2T>C y *BARD1* c.1099T>A (p.S367T) estarían ejerciendo un papel de predisposición al CCR, mientras que los cambios *CLCA1* c.1114G>A (p.A372T) y *MXRA8* c.923-1G>C, aunque mostraron ciertos rasgos de patogenicidad, necesitarían ser evaluados en mayor profundidad para poder definir su papel en el riesgo al CCR de la familia. Por otro lado, la identificación de 9 mutaciones nuevas o raras en *BRF1*, (la mayoría con claros indicios de patogenicidad), afectando a 10 pacientes, en una serie de 547 afectados de CCR familiar y/o de temprana aparición sugeriría de forma consistente la implicación de dicho gen en la susceptibilidad al CCR familiar.



## **Exome sequencing identifies inherited mutations in *BRF1* and *BARD1* as probable causes of hereditary non-polyposis colorectal cancer.**

**Fernando Bellido et al.**

*(Article under current development)*

### **ABSTRACT**

Familial colorectal cancer type X (FCCTX) comprises all those families fulfilling the Amsterdam criteria, which establish a high degree of non-polyposis mismatch-repair proficient colorectal cancer (CRC) aggregation in absence of germinal defects in the mismatch repair system. The nature of the FCCTX predisposition to CRC is still unknown. Aiming to identify new causal genes implicated in this CRC entity, we performed whole-exome sequencing in three CRC-affected relatives from a FCCTX family. We focused on all those non-synonymous variants present in all the three affected patients taking into account the gene function or expression in the large intestine, literature revision or rarity and nature of the mutations, among others. Consequently, five changes in *BRF1*, *CLCA1*, *BARD1*, *MXRA8* and in the microRNA hsa-mir-578 were finally selected for further study. That included the analysis of the cosegregation of the mutations with the affected patients, *in silico* predictions for the impact of the changes into the function and the stability of the protein, or searching for additional variants in these genes in series of familial CRC affected patients. In base of the obtained results, we proposed an oligogenic model to explain the CRC aggregation within the studied family. The mutations *BRF1* c.1459+2T>C and *BARD1* c.1099T>A (p.S367T) would be acting as CRC predisposition variants, while *CLCA1* c.1114G>A (p.A372T) and *MXRA8* c.923-1G>C may be exerting an additional risk for this disease, although their effect could not be demonstrated.

### **INTRODUCTION**

Hereditary forms of colorectal cancer are caused by germline mutations in the mismatch repair (MMR) genes, *APC*, *MUTYH*, *POLE*, *POLD1*, *GREM1*, *SMAD4*, *BMPRIA*, *STK11* and *PTEN* (Lynch et al. 2009; Sieber et al. 2003; Palles et al. 2013; Jaeger et al. 2012; Howe et al. 2004; Beggs et al. 2010; Mester et al. 2013); however, much of the observed heritability and familial aggregation of the disease remains unexplained.

For years, the group of families included within the term Familial Colorectal Cancer Type X (FCCTX), characterized by the Amsterdam criteria, i.e., the most stringent criteria for hereditary non-polyposis CRC, and absence of DNA MMR deficiency (Lindor et al. 2005), has been subjected to study with the aim of identifying additional high-penetrance causal genes. The evidence gathered during these years indicates that, genetically, FCCTX is a very heterogeneous group. This heterogeneity may include both monogenic and polygenic causes of disease, or even shared life styles or environmental risk factors. Nevertheless, the apparent autosomal dominant inheritance of the disease in Amsterdam-positive families suggests that a large proportion of FCCTX are explained by rare mutations in high-penetrance genes (monogenic model). Moreover, no genes explaining a relatively large proportion of FCCTX have been identified, suggesting numerous causal genes, each explaining a small fraction of families (Valle, 2014).

Whole-genome and whole-exome sequencing constitute unbiased approaches that facilitate the identification of new genes responsible for the predisposition to human disease. In the field of CRC predisposition, these approaches have allowed the identification of germline mutations in two genes, *POLE* and *POLD1*, responsible of a new CRC and polyposis syndrome (Palles et al. 2013; Valle et al. 2014; Elsayed et al. 2014; Spier et al. 2014). Combining linkage analysis and whole-exome sequencing in a large FCCTX family, Schulz et al. identified a germline missense mutation in *SEMA4A* as the genetic cause of the colorectal aggregation in the family. The study of the gene in 53 additional FCCTX cases identified 2 additional mutations (Schulz et al. 2014). Likewise, also by combining linkage analysis and exome-sequencing, Nieminen et al. identified a truncating mutation in *RPS20* in 4 CRC-affected members of an Amsterdam-positive family, although up to date no additional germline mutations in the gene have been reported (Nieminen et al. 2014). Esteban-Jurado et al. performed whole-exome sequencing in 43 members of 29 MMR-proficient Amsterdam-positive families, which resulted the identification of mutations in *CDKN1B*, *XRCC4*, *EPHX1*, *NFKBIZ*, *SMARCA4*, and *BARD1* as potential causes of CRC predisposition (Esteban-Jurado et al. 2015). Also by whole-exome sequencing, Gylfe et al. studied 96 independent familial CRC cases and, focusing on protein-truncating variants present in at least two independent familial cases, identified 11 candidate CRC predisposing genes: *UACA*,

*SFXN4*, *TWSG1*, *PSPH*, *NUDT7*, *ZNF490*, *PRSS37*, *CCDC18*, *PRADC1*, *MRPL3*, and *AKR1C4* (Gylfe et al. 2013). DeRycke et al. studied the exomes of 40 cancer-affected individuals from 16 CRC families and proposed numerous candidate variants which require further functional and validation studies. Nevertheless, they highlighted two missense variants in *CENPE* and *KIF23*, both located within previously reported CRC linkage regions (DeRycke et al. 2013). Recently, a study covering the exomes of 16 patients with non-polyposis CRC diagnosed at  $\leq 40$  years of age, or from multiple affected CRC families with at least 1 first-degree relative diagnosed with CRC at  $\leq 55$  years of age, pointed out a potential role of the gene *EIF2AK4* in familial CRC predisposition (Zhang et al. 2015).

With the aim of identifying new causal genes for CRC predisposition, we carried out whole-exome sequencing in three CRC-affected members of an Amsterdam I MMR-proficient CRC family (FCCTX), followed by sequencing of the candidate genes in a large series of genetically unexplained CRC families.

## **RESULTS**

Whole-exome sequencing was performed in three CRC-affected members (ages at CRC diagnosis 65, 62 and 40) of an Amsterdam I family (Figure 1). A total of 42 unique or rare (MAF<1%) non-synonymous genetic variants located in 38 genes were shared by all 3 CRC-affected relatives. Based on the predicted severity of the variant, the function of the affected gene and/or the molecular pathway involved, and previous reports of an association with cancer predisposition, the genetic variants *BRF1* c.1459+2T>C, *BARD1* c.1099T>A (p.S367T), *CLCA1* c.1114G>A (p.A372T), *MXRA8* c.923-1G>C, and hsa-mir-578 n.-30G>A, all of them novel, were selected as potential candidates to be associated with the cancer aggregation observed in the family.

### ***BRF1***

The *BRF1* gene encodes the *Transcription factor IIIB 90 kDa subunit*, one of the three subunits of the RNA polymerase III (Pol III) transcription factor complex, whose deregulation has been linked to cancer (Marshall and White, Nature Rev 2008; Cabarcas and Schramm 2011). In the studied family, *BRF1* was affected by a splice-site mutation, c.1459+2T>C, which causes the skipping of exon 13 (82 bp) (Figure 2). Individual III.2, diagnosed with breast cancer at age 38 and daughter of a CRC-affected *BRF1* mutation



carrier, did not carry the mutation. Among the 6 cancer-free relatives that could be studied, 3 carried *BRF1* c.1459+2T>C (ages 51, 47 and 25), and 3 did not (Figure 1). Having been proposed as a tumor suppressor gene commonly lost in colorectal tumors (Carnero et al. 2008), loss of heterozygosity (LOH) of *BRF1* was assessed in the tumors developed by all three mutation carriers, finding no loss of the wildtype allele. Moreover, expression of the BRF1 protein, measured by immunohistochemistry, was detected in all three tumors (Suppl. Figure 1).

Using a strategy that combines pooled DNA and targeted next generation sequencing, we sequenced the coding region of *BRF1* and flanking sequences in 157 Amsterdam-positive and in 441 Bethesda-positive MMR-proficient families. A total of 9 novel or rare (MAF<1%) genetic variants were identified in 10 independent families (pedigrees in Suppl. Fig. 2), including 7 missense, one splice-site and another one located in the 3'UTR of a shorter transcript (Table 1). Four of the missense mutations, p.T12M, p.G70C, p.S81T and p.C140S, were predicted to be functionally relevant by all four programs used; two, p.V75M and p.R572G, by three of the four programs; and P405R was classified as neutral by three of them. The p.V75M variant had been reported in public databases (population  $MAF_{dbSNP}=0.0006$ ). Interestingly, the novel mutation p.T12M, located in a functional domain, occurred in two independent families.

The 3D structure could be predicted for the first 100 aminoacids of *BRF1*, where four missense mutations, p.T12M, p.G70C, p.V75M and p.S81T, were located (Figure 3A). Protein structure stability programs predominantly predicted destabilizing effects for p.G70C, p.V75M and p.S81T (Table 1). On the other hand, p.T12M, located in a Zinc finger that selects the transcription initiation site, showed short-range ( $\leq 5\text{\AA}$ ) contact with the metal binding cystein 25 (Figure 3A). Another missense mutation, p.C140S, located in an alpha helix within the Transcription factor TFIIB repeat I domain, was predicted as destabilizing by all programs (Table 1). No structure predictions could be performed for p.P405R and p.R572G, located in a region with a disordered structure (aa. 293-677, source: MobiDB) and outside known functional domains. Nevertheless, their proximity to the region 453-493, which directly interacts with hTBP, and the fact that a somatic mutation also affecting R572 has been described in endometrial cancer (COSM953966), avoid their exclusion as functionally relevant changes (Figure 3B).

Despite the proximal location of c.1516-4C>G to a canonical splice site, no alterations could be depicted when amplifying exons 14-16 nor when sequencing the resulting amplification product in the cDNA obtained from the RNA extracted from the carrier's lymphocytes, agreeing with the *in silico* predictions (Table 1). The novel variant identified in the 3'UTR of the *BRF1* transcript NM\_001242790 was also identified in the sister of the proband, affected with CRC at age 40, but no additional analyses could be performed to demonstrate or discard its functionality.

DNA availability allowed us to perform co-segregation analyses in two additional families. The G70C variant was identified in a daughter of the proband, diagnosed with a tubular adenoma at age 20. On the contrary, p.S81T was not found in the father of the corresponding proband, diagnosed with CRC at the age of 73 (pedigrees in Suppl. Fig 2).

LOH analysis was performed in 8 colorectal tumors developed by unrelated mutation carriers. As in the family (exome-seq) with the splice site mutation *BRF1* c.1459+2T>C, no loss of the wildtype allele was detected in any of the studied tumors.

Table 1. Novel and rare variants identified in *BRF1*.

BRF1 genetic change (NM_001519)	Polulation MAF (dbSNP/ ESP)	<i>In silico</i> protein predictions	Splicing predictions	Protein stability	Somatic mutations in the residue (COSMIC)	LOH	HNPCC criteria	Index patient	Co-segregation
c.1459+2T>C	0	-	<i>Breaks donor splice site (Fig 2)</i>	-	No	No	Ams I	(exome seq family)	Yes (Implicit to variant selection)
c.35C>T; p.(T12M) [Zinc finger]	0	SIFT: <b>Damaging (0.02)</b> PPH2: <b>Probably damaging (0.999)</b> Condel: <b>Deleterious (0.56)</b> Mut Taster: <b>Disease causing (0.57)</b>	HSF: no change ESRseq: 0.62	<b>PoPMuSiC: Destabilizing (ddG=0.25Kcal/mol)</b> Eris: Stabilizing (ddG=-1.48Kcal/mol) <b>I-Mutan2.0: Destabilizing (ddG=-0.11Kcal/mol)</b> CUPSAT: Stabilizing (ddG=0.34Kcal/mol)	No	No	Ams I	CRC (39y)	n.a. F-1938-04
c.35C>T; p.(T12M) [Zinc finger]	0	SIFT: <b>Damaging (0.02)</b> PPH2: <b>Probably damaging (0.999)</b> Condel: <b>Deleterious (0.56)</b> Mut Taster: <b>Disease causing (0.57)</b>	HSF: no change ESRseq: 0.62	<b>PoPMuSiC: Destabilizing (ddG=0.25Kcal/mol)</b> Eris: Stabilizing (ddG=-1.48Kcal/mol) <b>I-Mutan2.0: Destabilizing (ddG=-0.11Kcal/mol)</b> CUPSAT: Stabilizing (ddG=0.34Kcal/mol)	No	No	Beth	CRC (72y)	n.a. F-2166-05
c.208G>T; p.(G70C)	0	SIFT: <b>Damaging (0.03)</b> PPH2: <b>Probably damaging (1)</b> Condel: <b>Deleterious (0.71)</b> Mut Taster: <b>Disease causing</b>	HSF: <b>creates donor site and ESS</b> ESRseq: 1.18	<b>PoPMuSiC: Destabilizing (ddG=0.39Kcal/mol)</b> Eris: Stabilizing (ddG=-1.54 Kcal/mol) <b>I-Mutan2.0: Destabilizing (ddG=-1.56Kcal/mol)</b> CUPSAT: <b>Destabilizing (dd =-1.20Kcal/mol)</b>	No	No	- (2 brothers with CRC at age 60)	Tubular adenoma with low-grade dysplasia (55y)	Yes: Tubular adenoma (20y; daughter) F-0756-01
c.223G>A; p.(V75M)	rs144673138 (0.0006/ -)	SIFT: Tolerated (0.22) PPH2: <b>Probably damaging (0.982)</b> Condel: <b>Deleterious (0.61)</b> Mut Taster: <b>Disease causing (0.75)</b>	HSF: <b>disrupts ESE</b> ESRseq: -0.68	<b>PoPMuSiC: Destabilizing (ddG=0.21Kcal/mol)</b> Eris: <b>Destabilizing (ddG=2.66Kcal/mol)</b> <b>I-Mutan2.0: Destabilizing (ddG=-2.07Kcal/mol)</b> CUPSAT: <b>Destabilizing (ddG=-1.70Kcal/mol)</b>	No	No	Beth	CRC (46y)	n.a. F-2287-05
c.241T>A; p.(S81T)	0	SIFT: <b>Damaging (0.01)</b> PPH2: <b>Probably damaging (0.991)</b> Condel: <b>Deleterious (0.73)</b> Mut Taster: <b>Disease causing</b>	HSF: no change ESRseq: 0.83	<b>PoPMuSiC: Destabilizing (ddG=0.07Kcal/mol)</b> Eris: <b>Destabilizing (ddG=1.84Kcal/mol)</b> <b>I-Mutan2.0: Destabilizing (ddG=-0.01Kcal/mol)</b> CUPSAT: Stabilizing (ddG=0.49Kcal/mol)	p.(S81L): CRC (COSP29423)	No	Beth	Non-Hodgkin lymphoma (41y); CRC (43y)	No: CRC (73y; father) F-0432-00
c.419G>C; p.(C140S) [TFIIB repeat 1]	0	SIFT: <b>Damaging (0)</b> PPH2: <b>Probably damaging (0.999)</b> Condel: <b>Deleterious (0.80)</b> Mut Taster: <b>Disease causing</b>	HSF: no change ESRseq: -0.94	<b>PoPMuSiC: Destabilizing (ddG=1.87Kcal/mol)</b> Eris: <b>Destabilizing (ddG=4.56Kcal/mol)</b> <b>I-Mutan2.0: Destabilizing (ddG=-0.86Kcal/mol)</b> CUPSAT: <b>Destabilizing (ddG=-0.53Kcal/mol)</b>	No	No	Beth	CRC (49y)	n.a. F-1658-04
c.1214C>G; p.(P405R)	0	SIFT: Tolerated (0.54) PPH2: Benign (0.002) Condel: <b>Deleterious (0.62)</b> Mut Taster: Benign	HSF: <b>creates donor site and disrupts ESE</b> ESRseq: <b>1.73</b>	n.a. (disordered structure)	No	No (IHC+)	Beth	CRC (59y, 59y)	n.a. F-3181-07
c.1714C>G; p.(R572G)	0	SIFT: Tolerated (0.2) PPH2: <b>Possibly damaging (0.692)</b> Condel: <b>Deleterious (0.64)</b> Mut Taster: <b>Disease causing</b>	HSF: <b>creates donor, acceptor and ESS</b> ESRseq: -1.58	n.a. (disordered structure)	p.(R572Q): endometrial cancer (COSM953966)	-	Beth	CRC (73y, 73y)	n.a. F-4157-10
c.1516-4C>G	0	-	HSF: no change ESRseq: 1.27	-	No	-	Beth		n.a. - F-3637-08
c.60*C>G (NM_001242790)	0	3'UTR of short transcript	-	-	No	No	Ams I	CRC (56)	Yes: CRC (40y; sister) Oviedo 08-475

Reference genome: GRCh37

## ***BARDI***

The *BARDI* gene encodes an E3 ubiquitin-protein ligase that interacts with the N-terminal region of *BRCA1*. In the family where whole-exome sequencing was carried out, *BARDI* was affected by a missense mutation, c.1099T>A (p.S367T). Despite the inconclusive predicted functional implications for *BARDI* p.S367T, protein 3D modeling predicted preponderant destabilizing effects for T367 (Table 2, Figure 4A). In addition to the three CRC-affected family members, the *BARDI* variant also segregated with the early-onset breast cancer in the family (Figure 1). LOH of *BARDI* was assessed in the colorectal tumors of the three mutation carriers, finding no loss of the wildtype allele.

The fact that germline mutations have been associated with predisposition to breast and ovarian cancer, and that recently a *BARDI* splice-site mutation was identified, also by exome sequencing, in a FCCTX family (Esteban-Jurado et al. 2015), lead us to further explore the role of the gene in additional unexplained Amsterdam-positive CRC families. Direct automated sequencing of all exons and flanking regions was carried out in 179 independent MMR-proficient Amsterdam-positive families. A novel missense variant, c.2000T>C (p.L667P), predicted as functionally relevant by the *in silico* predictors, was identified in one family (pedigree in Suppl. Fig. 3). Structure stability programs using the available X-ray protein structure indicated destabilizing effects for P667 (Table 2; Figure 4B).

Three rare (MAF<0.003) synonymous changes in *BARDI*, rs368291318 (c.1152C>T; p.S384=), rs373257776 (c.1347A>G; p.Q449=) and rs147215925 (c.1977A>G; p.R659=), all of which might affect splicing according to *in silico* predictors, were identified in three additional independent Amsterdam-positive families (Table 2) (pedigrees in Suppl. Figure 3). The splicing effect had been experimentally validated for c.1977A>G, resulting in the aberrant skipping of exons 2-9, even though the whole-length (wildtype) transcript was also produced from the rare allele (Ratajska et al. 2012). Cosegregation analyses could not be performed in any of the families due to unavailability of biological material from other family members.

Table 2. Novel and rare variants identified in *BARD1*.

BARD1 genetic change (NM_000465)	Population MAF (dbSNP/ESP)	Familial CRC MAF	<i>In silico</i> protein predictions	Splicing predictions	Protein stability	Somatic mutations in the residue (COSMIC)	Index patient	Family ID
<b>c.1099T&gt;A ; p.(S367T)</b>	0	0.0028 (1/358)	SIFT: Tolerated (0.57) PPH2: <b>Possibly damaging (0.787)</b> Condel: <b>Deleterious (0.57)</b> Mutation Taster: Benign	HSF: no change ESRseq: -1.44	3D-model by I-TASSER PoPMuSiC: <b>Destabilizing (ddG=0.22Kcal/mol)</b> Eris: <b>Destabilizing (ddG=0.53Kcal/mol)</b> I-Mutant 2.0: <b>Destabilizing (ddG=-0.87Kcal/mol)</b> CUPSAT: <b>Destabilizing (ddG=-0.09Kcal/mol)</b>	No	(exome seq family)	F-0657-00
<b>Unique changes</b>								
c.2000T>C; p.(L667P)	0	0.0028 (1/354)	SIFT: <b>Damaging (0.02)</b> PPH2: <b>Probably damaging (1)</b> Condel: <b>Deleterious (0.54)</b> Mut Taster: <b>Disease causing</b>	HSF: <b>disrupts ESE</b> ESRseq: 1.23	X-ray structure, PDB ID: 2NTE PoPMuSiC: <b>Destabilizing (ddG=0.83Kcal/mol)</b> Eris: <b>Destabilizing (ddG=3.53Kcal/mol)</b> I-Mutant 2.0: <b>Destabilizing (ddG=-0.51Kcal/mol)</b> CUPSAT: <b>Destabilizing (ddG=0.43Kcal/mol)</b>	p.(L667L): oesophageal adenocarcinoma (COSP31475)	CRC (46)	86402-valencia
c.1152C>T; p.(S384=)	rs368291318 (n.a. / 0.00008)	0.0028 (1/358)	No effect (synonymous)	HSF: <b>creates ESS</b> ESRseq: -0.33	No effect (synonymous)	No	CRC (54)	86400-valencia
c.1347A>G; p.(Q449=)	rs373257776 (n.a. / 0.00023)	0.0028 (1/352)	No effect (synonymous)	HSF: <b>creates acceptor site and ESS</b> ESRseq: 0.63	No effect (synonymous)	No	CRC (64)	86413-valencia
c.1977A>G; p.(R659=)	rs147215925 (0.0008 / 0.0024)	0.0028 (1/354)	No effect (synonymous)	HSF: <b>creates ESS and disrupts ESE</b> ESRseq: -0.94	No effect (synonymous)	No	CRC (49)	86420-valencia

### **Other candidate genes**

Based on the coded protein function or severity of the variant found, three other genes were considered for further studies: *CLCA1*, *MXRA8* and hsa-miR-578 (Table 3).

*CLCA1* encodes a protein that may be involved in mediating calcium-activated chloride conductance in the intestine. *CLCA1* c.1114G>A (p.A372T) was predicted as functionally neutral by all *in silico* programs used, although splicing predictors indicated potential splicing effects. It had never been reported in population-based databases (blood DNA). However, the exact same mutation was identified in a pancreatic carcinoma (COSMIC mutation ID: COSM3786280; confirmed somatic). In the exome-sequenced family, the variant was identified in the three CRC-affected members but not in the breast cancer-affected relative. LOH analysis showed no evident loss of the wildtype allele in any of the three colorectal tumors studied. Likewise, expression of the *CLCA1* protein, assessed by immunohistochemistry, was detected in all of them (Suppl. Fig. 4).

Mutation screening of *CLCA1* was performed in 156 additional MMR-proficient Amsterdam-positive families. *CLCA1* c.2305A>G (I769V) was identified in an Amsterdam I family. Despite the neutral effect predicted by all programs, the variant was predicted to create a donor splice site and segregated with cancer in all 3 CRC-affected family members analyzed (pedigree in Suppl. Figure 5).

*MXRA8* (limitrin) encodes a protein that may play a role in the maturation and maintenance of blood-brain barrier. *MXRA8* c.923-1G>C affects a canonical splice site and was detected in all cancer-affected members of the family where it was identified, including the three CRC-affected individuals and the early onset breast cancer-affected woman. The three colorectal tumors showed no evidence of loss of the wildtype allele. Screening of the coding regions of *MXRA8* in 156 additional MMR-proficient Amsterdam-positive families identified a missense variant, c.1186G>A (p.D396N), in an Amsterdam II family (pedigree in Suppl. Figure 4). This variant was reported in public databases (rs150058708; population MAF: 0.0022) and classified as functionally relevant by 3 of 4 *in silico* predictors. Co-segregation studies could not be performed due to the lack of biological material from other family members (pedigree in Suppl. Fig 5).

The variant identified in the precursor sequence of hsa-miR-578 was predicted to affect the secondary structure of the precursor (pre-miR) (Suppl. Figure 6). In the exome-sequenced family, the variant was present in all 3 CRC-affected individuals but not in the breast cancer patient, and no LOH of the wildtype allele was identified in the carriers' colorectal tumors. qRT-PCR analysis in normal fresh colon tissues revealed extremely low (absent) expression of miR-578, as well as in the FFPE tumor of the mutation carrier (data not shown). Furthermore, no additional novel or rare genetic variants in miR-578 were identified in the 156 sequenced unexplained Amsterdam families.

Table 3. Novel and rare variants identified in *CLCA1*, *MXRA8* and *has-miR-578*.

Genetic change	Population MAF (dbSNP/ ESP)	<i>In silico</i> predictions	Splicing predictions	Somatic mutations in the residue (COSMIC)	LOH	HNPCC criteria	Index patient	Co-segregation
<i>CLCA1</i> c.1114G>A; p.(A372T)	0	SIFT: Tolerated (0.73) PPH2: Benign (0) Condel: Benign (0.5) MutationTaster: Benign	HSF: <b>creates ESS</b> ESRseq: <b>-1.44</b>	p.(A372T): Pancreas cancer (COSM3786280)	No	Ams I	(exome seq family)	Yes: 3 CRC No: Breast cancer (38y)
<i>CLCA1</i> c.2305A>G; p.(I769V)	0	SIFT: Tolerated (0.43) PPH2: Benign (0.05) Condel: Benign (0.446) Mutation Taster: Benign	HSF: <b>creates donor site</b> ESRseq: 0.29	No	-	Ams I	CRC (42y)	Yes: 3 CRC
<i>MXRA8</i> c.923-1G>C	0	-	HSF: <b>disrupts acceptor splice site</b> ESRseq: -0.27	No	No	Ams I	(exome seq family)	Yes: 3 CRC and breast cancer (38y)
<i>MXRA8</i> c.1186G>A; p.(D396N)	rs150058708 (0.0022/0.0037)	SIFT: <b>Damaging (0.04)</b> PPH2: <b>Probably damaging (0.997)</b> Condel: Benign (0.401) Mutation Taster: <b>Disease causing</b>	HSF: no change ESRseq: 0.34	No	No	Ams II	Endometrial cancer (46y)	-
<i>hsa-miR-578</i> n.-30G>C [chr4:g.166307424G>C].	0	RNA fold and RNAlogo: <b>Affects pre-miR conformation.</b>	-	n.a.	No	Ams I	(exome seq family)	Yes: 3 CRC No: Breast cancer (38y)

Reference genome: GRCh37



## **DISCUSSION**

Much of the genetic predisposition to CRC remains unexplained. Current evidence indicates that there is high heterogeneity in the causal factors of the yet-unexplained CRC predisposition, including monogenic, polygenic, environmental and multifactorial disease causes (Valle et al. 2014). In order to identify new high penetrance genes (monogenic model), we performed whole-exome sequencing in three CRC-affected members of a FCCTX (MMR-proficient Amsterdam I) family. The results obtained point towards a role of at least two genes, *BRF1* and *BARD1*, each probably exerting a moderate risk, in the familial aggregation of CCR.

*BRF1* is a subunit of the RNA polymerase III (Pol III) complex. RNA polymerase III (Pol III) synthesizes tRNAs and other small noncoding RNAs, such as 7SK RNA, 5S rRNA, and U6 snRNA, to regulate protein synthesis. Increased Pol III-dependent transcription has been linked to cell transformation and cancer (Marshall and White 2008; Cabarcas and Schramm2011). Experimental evidence indicated that *BRF1* is a tumor suppressor gene and it is affected by allelic loss in cancer, occurring in 50% and 23% of colon and rectal tumors respectively (Leal et al. 2008).

In our study we identified a total of 10 *BRF1* genetic variants in 11 independent families. Among them, one affected a splice site, c.1459+2T>C, causing the skipping of exon 13; six were missense variants with predicted damaging effects (function and/or structure predictions); and another one, a missense variant, c.1214C>G (p.P405R), was predicted to affect the splicing process by all prediction methods used. No relevant effects could be predicted or demonstrated for the remaining two, c.1516-4C>G and c.60\*C>G (NM\_001242790), both in non-coding regions of the gene. Nevertheless, the latter, located in the 3'UTR of a shorter *BRF1* transcript, also occurred in the CRC-affected sister of the proband. The pathogenicity of the novel *BRF1* missense variant c.35C>T (p.T12M), located in a functional (zinc finger) domain, was also supported by its presence in two independent CRC families. Likewise, the previous identification of somatic mutations affecting residues S81 and R572 in colorectal and endometrial tumors respectively (source: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>), supported the relevance of the germline missense mutations c.241T>A (p.S81T) and c.1714C>G (p.R572G).

LOH could be performed in 11 tumors developed by *BRF1* mutation carriers (9 families) and no loss of the wildtype allele was evidenced in any of them, suggesting haploinsufficiency or the presence of other mechanisms of allele inactivation, such as methylation or mutation. Nevertheless, haploinsufficiency is supported by the detection of BRF1 expression the carriers' tumors. This phenomenon has also been observed in tumors and cancer cell lines, where the loss of BRF1 is never complete (Leal et al. 2008; Cabarcas et al. 2008). Moreover, Leal et al. experimentally showed that partial silencing (50%) of *BRF1* in mouse embryo fibroblasts (MEFs) is enough to partially bypass cellular senescence.

In addition to the common allelic loss of *BRF1* in colorectal tumors, somatic mutations in the gene have been reported in several tumor types, being the most commonly mutated tumors endometrial (endometrioid carcinoma: 13/494; 2.63%), gastric (8/375; 2.13%), and colorectal (15/750; 2%) cancers, belonging all three to the spectrum of hereditary CRC syndromes (source: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>; inquiry data: Feb 2015), and supporting the relevance of BRF1 alterations in colorectal, endometrial and gastric carcinogenesis.

No additional monoallelic mutations in *BRF1* have been reported in familial cancer. However, a truncating mutation in *RPS20* was recently identified as the cause of the CRC aggregation in a MMR-proficient Amsterdam I family (FCCTX) (Nieminen et al. 2014). *RPS20* encodes a component (S20) of the small ribosomal subunit, and the mutation identified was associated with a defect in pre-ribosomal RNA maturation, leading to disequilibrium between the different pre-rRNA species. In line with this, RNA polymerase III complex, a subunit of which is BRF1, synthesizes, among other RNAs, 5S rRNA, a limiting molecule in ribosome formation. In fact, both *RPS20* and 5S rRNA are linked through the interaction with RPL11, required for rRNA maturation and formation of the 60S ribosomal subunits. This evidence links alterations in genes related to ribosomal synthesis to genetic predisposition to CRC.

Germline biallelic mutations in components of the Pol III or tRNA processing machinery have been associated with neurogenetic disorders, and in particular, biallelic mutations in *BRF1* cause intellectual disability and cerebellar, dental, and skeletal anomalies (Borck et al. 2015). A total of 6 biallelic carriers of *BRF1* mutations have

been described to date (ages: from 18 months to 21 years), none of which affected with cancer, and their cancer family history information was not reported. Interestingly, in contrast to the mutations identified in familial CRC families, all four *BRF1* mutations reported in the cerebellar-facial-dental syndrome affect the protein residues comprised between R223-P292, delimited within the cyclin 2 protein domain (R223 S226 and T259) or in its close proximity (P292) (Borck et al. 2015).

*BARD1* (BRCA1-associated ring domain 1) encodes a protein involved in homologous recombination that dimerizes with BRCA1. Germline mutations in *BARD1* have been described in hereditary breast and ovarian cancer (MIM# 601593) (Fergus J. Couch JCO 2015; Ratajska et al. 2012; De Brakeleer et al. 2010), and recently, a deleterious mutation (splice-site) in *BARD1* was identified in a MMR-proficient Amsterdam-positive CRC family (FCCTX) (Esteban-Jurado et al. 2015). We have identified a total of 2 novel missense mutations (predicted to be damaging and/or destabilizing) in 2 MMR-proficient Amsterdam-positive families, and three rare (MAF=0.00008-0.002) synonymous variants predicted to alter splicing in 3 additional Amsterdam families. Except for the exome-sequenced family, where all cancer-affected members of the family (three CRC and one 38 years-old breast cancer patients) carried the mutation, for the remaining *BARD1* variants co-segregation studies could not be performed due to sample unavailability. As in the case of *BRF1*, and similar to the FCCTX family with the splice site mutation in *BARD1* (Esteban-Jurado et al. 2015), no LOH of the wildtype allele was identified in the carriers' tumors, suggesting either haploinsufficiency or the presence of a different mechanism of allele inactivation.

Historically, *BARD1* mutations have been exclusively linked to breast/ovarian cancer predisposition, due to its belonging to the Fanconi Anemia Pathway and its close relationship with *BRCA1*. However, the identification of two damaging *BARD1* mutations in FCCTX using agnostic approaches (whole-exome sequencing), together with the identification of additional genetic variants in other unexplained Amsterdam families, highlight its role in the predisposition to CRC. Supporting this observation, as in the case of *BRF1*, the tumor types with the highest frequency of somatic *BARD1* mutations are colorectal (21/684; 3.07%), gastric (8/375; 2.13%) and endometrial (endometrioid carcinoma: 10/494; 2.02%) cancers, all of them related to hereditary CRC syndromes (source: <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>; inquiry data: Feb 2015).

In addition to *BRF1* and *BARD1*, other genes were selected for further studies based on the severity of the identified variant in the case of *MXRA8* (c.923-1G>C), or on the relevance of the protein in colon tissue and its potential tumor suppressor activity in the case of *CLCA1*. Also, hsa-miR-578 was included in the extension analysis based on the predicted effect of the variant identified in the conformation of the secondary structure of the precursor. We performed mutation screening of all three genes in 156 additional MMR-proficient Amsterdam-positive unrelated CRC patients. No additional changes were identified in the mature or precursor sequences of hsa-miR-578, which together with the absence of expression in normal and tumor colon tissues, suggest that hsa-miR-578 is not relevant in CRC predisposition. Regarding *CLCA1* and *MXRA8*, one additional missense mutation was identified in the extension series (156 Amsterdam families) for each gene. We found evidences of the potential implication of the variants in the CRC aggregation in the corresponding families, such as the co-segregation with CRC for the two *CLCA1* variants and *MXRA8* c.923-1G>C, the effect on the protein for *MXRA8* c.923-1G>C (splice-site) and *MXRA8* c.1186G>A (predicted damaging), or the presence of the same mutation, but somatic, in a pancreatic carcinoma for *CLCA1* c.1114G>A (p.A372T). Nevertheless, the role of *CLCA1* and *MXRA8* in CRC predisposition remains unclear, pending the identification of additional mutations in familial CRC cases.

The findings obtained in this study supports an oligogenic model for the exome-sequenced family, where concomitant germline mutations in *BRF1* and *BARD1*, and probably also in *CLCA1* and *MXRA8*, cause the aggregation of CRC cases in the family. In this regard, whole-exome sequencing in individual families arises as a useful strategy to identify these rare or novel mutations in several cancer predisposing genes. In our study we have identified mutations in *BRF1* and *BARD1* in several unexplained CRC families (up to 1.84% (11/598) for *BRF1* and up to 2.8% (5/179) for *BARD1*, where probably the combination of these and other (low/moderate risk) variants and/or life-style factors, determine the penetrance and cancer aggregation observed in the families.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Patients and samples**

#### Family 1 (whole-exome sequencing)

Family 1 consisted of three CRC-affected family members and one early-onset breast cancer patient. One of the CRC-affected individuals was first-degree relative of the other two, and the breast cancer patient, daughter of one of the CRC patients (Figure 1). The tumor developed by individual III.1 at age 62, corresponded to a pT2pN0pM0 grade 2 microsatellite-stable tumor located in the sigma. The CRC developed by III.2 at age 65 corresponded to a pT3pN1pM0 grade 2 microsatellite-stable tumor (unknown location in the colon). The rectal tumor developed at age 40 by individual IV.3 was pT3pN0pM0, grade 2, and showed normal expression of MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2, assessed by immunohistochemistry. The breast tumor developed by IV.2 at age 38 (pT1CpN1pM0) was estrogen receptor- and progesterone receptor-positive. Sanger sequencing of the exons and exon-intron boundaries of *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2* in individuals III.2 and IV.3, and study of large rearrangements by MLPA, confirmed the absence of a germline defect in the MMR system. The family was recruited through the Genetic Counselling Unit of the Hereditary Cancer Program of the Catalan Institute of Oncology, IDIBELL. The studied members of the family signed a specific informed consent for this project.

#### Validation series

*BRF1* mutation screening was performed in 151 Amsterdam-positive MMR-proficient unrelated probands and in 396 additional MMR-proficient familial non-polyposis CRC patients (351 families); 390 of whom corresponded to confirmed Bethesda-positive cases. For the remaining 6, no specific information on family history was available, although they had been referred to familial cancer diagnostic units for genetic testing. All 396 non-Amsterdam familial CRC cases had been referred to the Hereditary Cancer Program of the Catalan Institute of Oncology in the Spanish region of Catalonia between 1999 and 2012.

Among the 151 Amsterdam-positive cases, 92 (60.9%) fulfilled Amsterdam I and 59 (39.1%) Amsterdam II criteria. These were recruited at different hospitals in Spain: 42

were assessed through the Hereditary Cancer Program of the Catalan Institute of Oncology; 30 were evaluated at San Carlos University Hospital in Madrid; 27 were recruited in Castilla y León (Institute of Biology and Molecular Genetics, Valladolid), 27 in the Valencia Region (biological samples obtained from the Valencian Biobank Network and the Valencian Hereditary Cancer Program); 18 were recruited through the Human Genetics Program of the Spanish National Cancer Research Center (CNIO) in Madrid; and 7 were obtained from the Cancer Institute of the Central University Hospital in Oviedo, Asturias. These 151 probands were also screened for mutations in *CLCA1*, *MXRA8* and hsa-miR-578.

*BARD1* mutation screening was performed in 177 Amsterdam-positive unrelated probands. These consisted on the 151 mentioned in the previous paragraph plus 24 additional probands from the Valencian Region, 12 de Octubre Hospital (Madrid) and San Carlos University Hospital (Madrid). These made a total of 101 (57.1%) Amsterdam I families and 76 (42.9%) Amsterdam II.

In all cases MMR proficiency in the tumors was characterized by the absence of microsatellite instability and expression of the MMR proteins MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2, assessed by immunohistochemistry.

Informed consent was obtained from all subjects and the study received the approval of IDIBELL Ethics Committee (PR073/12).

### **DNA and RNA extractions**

DNA from peripheral blood was extracted using the FlexiGene DNA kit (Qiagen, Valencia, CA). DNA quantity and quality were evaluated using Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA), Picogreen (Life Technologies, Carlsbad, CA), PCRs of different length amplicons and 1% agarose gels. DNA from formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue was extracted from 10 µM thick tissue sections, selecting manually the tumoral areas guided by a hematoxylin-eosin stained slide. After deparaffinization with xylene, the tissue was incubated with sodium thiocyanate (NaSCN) to remove crosslinks, and then digested with Proteinase K before phenol-chloroform purification. RNA from lymphocytes was extracted after their culture in PBS for five days using a Trizol/Chloroform/Isopropanol standard protocol.

Lymphocytes were grown both in absence or presence of puromycin (added 6 hours before stopping cell growth). RNA quality was evaluated using Nanodrop (Thermo Scientific, Waltham, MA) and finally RT-transcribed into DNA using the Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

RNA for miRNA studies was extracted using High Pure FFPE RNA Micro Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) for tumor FFPE samples, while standard extraction procedures using Trizol/Chloroform/Isopropanol were used for the fresh tissue samples.

### **Whole-exome capture and massively parallel sequencing**

Library preparation for capturing selected DNA regions was performed according to Agilent's SureSelect protocol for Illumina paired-end sequencing (SureSelect XT Human All Exon V3, 50Mb, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). In brief, 3.0 µg of genomic DNA were sheared on a Covaris™ E220 instrument. Fragment size (150-300bp) and quantity were checked with the Agilent 2100 Bioanalyzer 7500 chip. Fragmented DNA was end-repaired, adenylated and ligated to Agilent indexing-specific paired-end adaptors. The DNA with adaptor-modified ends was PCR amplified (6 cycles, Herculase II fusion DNA polymerase) with SureSelect Primer and SureSelect Pre-capture Reverse PCR primers, quality controlled on the DNA 7500 assay for the library size range of 250 to 450 bp, and hybridized for 24hrs at 65°C (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, Life Technologies, Carlsbad, CA). The hybridization mix was washed in the presence of magnetic beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1, Life Technologies). The eluted fraction was PCR amplified (16 cycles) in order to add the index tags using SureSelectXT Indexes for Illumina. The final library size and concentration was determined on Agilent 2100 Bioanalyzer 7500 chip and sequenced on an Illumina HiSeq 2000 platform with paired end run of 2x76bp following the manufacturer's protocol. Images generated by Illumina HiSeq 2000 were processed using the manufacturer's software to generate FASTQ sequence files.

### **Sequencing data analysis**

Reads were aligned to the reference genome (GRCh37) using Burrows-Wheeler analysis (BWA) with the sample option, (Li and Durbin et al. 2009) and a BAM file was generated using SAMtools (Li et al. 2009) PCR-duplicates were removed using SAMtools and custom scripts, and initial SNP calling was performed using a

combination of SAMtools and Sidrón as previously described (Puente et al. 2011) Common variants, defined as those present in dbSNP135 with a minor allele frequency  $\geq 1\%$ , were filtered out.

### **Mutation identification in pooled samples**

Index patients were screened for new mutations in *BRF1* by using a combination of pooled samples, PCR amplification and high-throughput sequencing, as previously described (Puente et al. 2011). Amplification was performed using Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA) and custom-designed primers.

### **Direct automated sequencing**

Cosegregation studies, sample identification within the pools, and mutation screening of *BARD1* in the additional 177 Amsterdam-positive patients, were performed using a standard protocol for Sanger sequencing. Sequencing was performed on an ABI Sequencer 3730 and data analyzed using Mutation Surveyor v.3.10.

### **Loss of heterozygosity (LOH)**

LOH in *BRF1*, *CLCA1*, *MXRA8* and *BARD1* was assessed by combining Sanger sequencing, analysis of microsatellites and SNaPshot of the corresponding germline mutation. SNP or microsatellite markers located within the corresponding gene or in its proximity were used to assess LOH. Moreover, the LOH analysis performed by studying the corresponding germline mutation in tumor and corresponding normal tissue allowed the discrimination of the wildtype from the mutated alleles. LOH was considered if the intensity of any allele was reduced by  $\geq 50\%$  relative to the other allele after taking account of the relative allelic intensities in paired non-tumor DNA.

### ***In silico* functional prediction of genetic variants**

Protein damage prediction caused by missense genetic variants was performed with the *in silico* algorithms PolyPhen-2, SIFT, Condel and MutationTaster2 (Adzhubei et al. 2010; Kumar et al. 2009; Gonzalez-Perez and Lopez-Bigas, 2011, Schwarz et al. 2014). Potential disruption or creation of splicing sites or splicing regulatory elements (enhancers or silencers) was evaluated with the program *Human Splicing Finder 3.0* (Desmet et al. 2009). Moreover, a quantitative measure of the splicing impact of the



variants was performed using the ESR-seq score system developed by Ke et al. (Ke et al. 2011), and performed as described as Di Giacomo et al. (Di Giacomo et al. 2013). This measurement is based on the evaluation of all RNA hexamers as potential exonic splicing elements.

### **Evaluation of hsa-mir-578 expression**

Evaluation of the effect of the mutation on the hsa-mir-578 expression was evaluated in the RNA extracted from lymphocytes of patient III.2 (Figure 1) and of a cancer-free control, using RNU44 as positive control of expression. Also, hsa-mir-578 expression was assessed in the RNAs extracted from the mutation carriers' (III.1, III.2 and IV.III) FFPE tumor tissues and from 4 fresh frozen normal colon tissues from unrelated CRC patients. RNA was reverse-transcribed by using the TaqMan MicroRNA Reverse Transcriptase Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA), following the manufacturer's instructions. Quantitative RT-PCR was carried out with TaqMan Gene expression Assays (Life Technologies, Carlsbad, CA) in the LightCycler 480 real-time PCR detection system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany).

### **Immunohistochemistry**

BRF1 and CLCA1 protein expression was assessed in tumors by immunohistochemistry. Xylene-dewaxed paraffin tissue sections (4 microns thick) were heated for three minutes in a pressure cooker containing sodium citrate pH=6. Endogenous peroxidase was inactivated by sample immersion in 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dilution for 10 minutes. Blocking was performed with 1:10 goat serum diluted in PBS for one hour at room temperature. The BRF1 primary antibody (ab84560, Abcam, Cambridge, Massachusetts, diluted at 1:32) or the CLCA1 primary antibody (ab180851, Abcam, Cambridge, Massachusetts, diluted at 1:50), were incubated overnight at 4<sup>0</sup>C. After rinsing, the EnVision system-goat secondary antibody (Dako, Carpinteria, CA, USA) was incubated for 60 minutes at room temperature and subsequently revealed with DAB substrate (Dako, Carpinteria, CA, USA) exposed for 3 minutes. Slides were finally stained in hematoxylin and dehydrated (alcohol/xylene).

### **Culture of lymphocytes and splicing analysis**

The alteration of splicing by the *BRF1* changes c.1459+2T>C and c.1516-4C>G was tested experimentally. Peripheral blood lymphocytes from the corresponding carriers

were cultured in presence and absence of puromycin as previously described (Segui et al. 2014). RNA was extracted and reverse transcription performed using standard protocols (Segui et al. 2014). PCR amplification of the obtained cDNA was performed for the *BRF1* regions comprised between exons 11 and 15 for the study of c.1459+2T>C, and between exons 14 and 16 for c.1516-4C>G. The PCR product was run in a 1.5% agarose gel and visualized in a UV transilluminator. For c.1459+2T>C, the anomalous band was cut and subsequently processed for Sanger sequencing.

### **BRF1 and BARD1 structure stability predictions**

The main isoform of human BRF1 (UniProt: Q92994) is comprised by 677 amino acids. The three-dimensional (3D) structure is yet uncharacterized and different annotations of structural-disordered regions of BRF1 can be found in the database MobiDB (<http://mobidb.bio.unipd.it/entries/Q9Y2M0>). The first 100 amino acids region was modeled with I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>), based on two crystallographic structures determined for *Saccharomyces cerevisiae* RNA pol II-TFIIB. The Zinc ion union amino acids Cys6, Cys9, Cys25 and Cys28 were properly identified by the model, supporting its accuracy. The region comprised between amino acids 99 and 267 was analyzed based on a model described in SwissModel which uses as pattern the structure *PDB ID: 1 ais, chain B* which has 32% sequence identity. This percentage is over the threshold of 30%, established for reliable fold assignment. The region comprised between amino acids 293 and 677 is predicted by consensus as a disordered structure. Within this region are two domains which, based on *Interactome3D* models, interact with hTBP (amino acids 253-335) and hBRF1 (amino acids 453-493).

Full-length BARD1 (Uniprot Q99728) has 777 amino acids and contains several domains including a BRCA1 binding N-terminal finger domain and three tandem ankyrin repeats. I-TASSER tool was used to generate a 3D model for the region comprised between amino acids 141 and 424. This area includes multiple disordered subregions consensually predicted by several programs. The 3D X-ray-based structure for the region comprised between amino acids 568 and 777 had been previously resolved (PDB ID: 2NTE).

The effect of the identified variants on the stability of the protein 3D structure was predicted using four different programs: CUPSAT (<http://cupsat.tu-bs.de>) (Parthiban et al. 2006), I-Mutant 2.0 (<http://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html>) (Capriotti et al. 2005), ERIS (<http://troll.med.unc.edu/eris/>) (Yin et al. 2007) and PoPMuSiC (<http://dezyme.com>) (Dehouck et al. 2011; Gonelli et al. 2012).

## **REFERENCES**

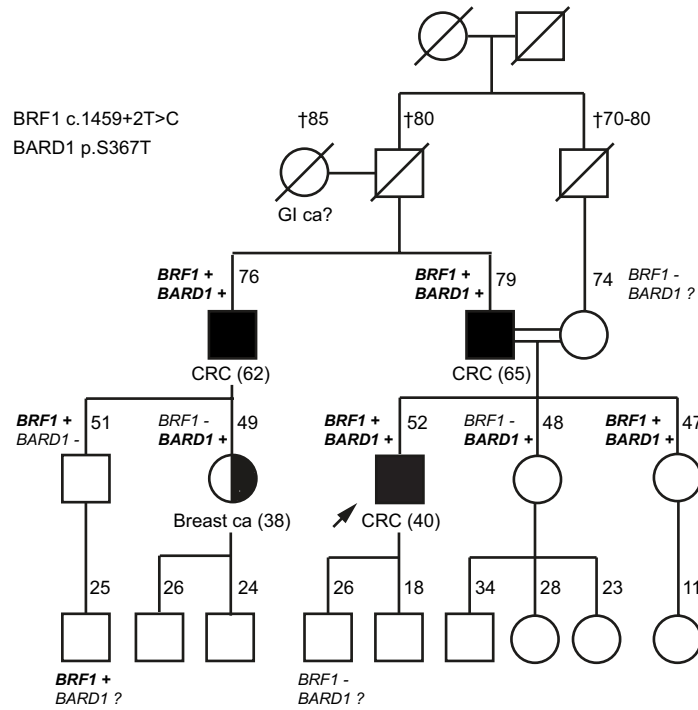
- Adzhubei, I. A., S. Schmidt, L. Peshkin, V. E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A. S. Kondrashov and S. R. Sunyaev (2010). "A method and server for predicting damaging missense mutations." *Nat Methods* 7(4): 248-9.
- Beggs, A. D., A. R. Latchford, H. F. Vasen, G. Moslein, A. Alonso, S. Aretz, L. Bertario, I. Blanco, S. Bulow, J. Burn, G. Capella, C. Colas, W. Friedl, P. Moller, F. J. Hes, H. Jarvinen, J. P. Mecklin, F. M. Nagengast, Y. Parc, R. K. Phillips, W. Hyer, M. Ponz de Leon, L. Renkonen-Sinisalo, J. R. Sampson, A. Stormorken, S. Tejpar, H. J. Thomas, J. T. Wijnen, S. K. Clark and S. V. Hodgson (2010). "Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management." *Gut* 59(7): 975-86.
- Borck, G., F. Hog, M. L. Dentici, P. L. Tan, N. Sowada, A. Medeira, L. Gueneau, H. Thiele, M. Kousi, F. Lepri, L. Wenzek, I. Blumenthal, A. Radicioni, T. L. Schwarzenberg, B. Mandriani, R. Fischetto, D. J. Morris-Rosendahl, J. Altmuller, A. Reymond, P. Nurnberg, G. Merla, B. Dallapiccola, N. Katsanis, P. Cramer and C. Kubisch (2015). "BRF1 mutations alter RNA polymerase III-dependent transcription and cause neurodevelopmental anomalies." *Genome Res* 25(2): 155-66.
- Cabarcas, S. and L. Schramm (2011). "RNA polymerase III transcription in cancer: the BRF2 connection." *Mol Cancer* 10: 47.
- Capriotti, E., P. Fariselli, R. Calabrese and R. Casadio (2005). "Predicting protein stability changes from sequences using support vector machines." *Bioinformatics* 21 Suppl 2: ii54-8.
- De Brakeleer, S., J. De Greve, R. Loris, N. Janin, W. Lissens, E. Sermijn and E. Teugels (2010). "Cancer predisposing missense and protein truncating BARD1 mutations in non-BRCA1 or BRCA2 breast cancer families." *Hum Mutat* 31(3): E1175-85.
- Dehouck, Y., J. M. Kwasigroch, D. Gilis and M. Rooman (2011). "PoPMuSiC 2.1: a web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality." *BMC Bioinformatics* 12: 151.
- DeRycke, M. S., S. R. Gunawardena, S. Middha, Y. W. Asmann, D. J. Schaid, S. K. McDonnell, S. M. Riska, B. W. Eckloff, J. M. Cunningham, B. L. Fridley, D. J. Serie, W. R. Bamlet, M. S. Cicek, M. A. Jenkins, D. J. Duggan, D. Buchanan, M. Clendenning, R. W. Haile, M. O. Woods, S. N. Gallinger, G. Casey, J. D. Potter, P. A. Newcomb, L. Le Marchand, N. M. Lindor, S. N. Thibodeau and E. L. Goode (2013). "Identification of novel variants in colorectal cancer families by high-throughput exome sequencing." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 22(7): 1239-51.
- Desmet, F. O., D. Hamroun, M. Lalande, G. Collod-Beroud, M. Claustres and C.

- Beroud (2009). "Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals." *Nucleic Acids Res* 37(9): e67.
- Di Giacomo, D., P. Gaildrat, A. Abuli, J. Abdat, T. Frebourg, M. Tosi and A. Martins (2013). "Functional analysis of a large set of BRCA2 exon 7 variants highlights the predictive value of hexamer scores in detecting alterations of exonic splicing regulatory elements." *Hum Mutat* 34(11): 1547-57.
- Elsayed, F. A., C. M. Kets, D. Ruano, B. van den Akker, A. R. Mensenkamp, M. Schrupf, M. Nielsen, J. T. Wijnen, C. M. Tops, M. J. Ligtenberg, H. F. Vasen, F. J. Hes, H. Morreau and T. van Wezel (2014). "Germline variants in POLE are associated with early onset mismatch repair deficient colorectal cancer." *Eur J Hum Genet*.
- Esteban-Jurado, C., M. Vila-Casadesus, P. Garre, J. J. Lozano, A. Pristoupilova, S. Beltran, J. Munoz, T. Ocana, F. Balaguer, M. Lopez-Ceron, M. Cuatrecasas, S. Franch-Exposito, J. M. Pique, A. Castells, A. Carracedo, C. Ruiz-Ponte, A. Abuli, X. Bessa, M. Andreu, L. Bujanda, T. Caldes and S. Castellvi-Bel (2015). "Whole-exome sequencing identifies rare pathogenic variants in new predisposition genes for familial colorectal cancer." *Genet Med* 17(2): 131-42.
- Gonnelli, G., M. Rooman and Y. Dehouck (2012). "Structure-based mutant stability predictions on proteins of unknown structure." *J Biotechnol* 161(3): 287-93.
- Gonzalez-Perez, A. and N. Lopez-Bigas (2011). "Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel." *Am J Hum Genet* 88(4): 440-9.
- Gylfe, A. E., R. Katainen, J. Kondelin, T. Tanskanen, T. Cajuso, U. Hanninen, J. Taipale, M. Taipale, L. Renkonen-Sinisalo, H. Jarvinen, J. P. Mecklin, O. Kilpivaara, E. Pitkanen, P. Vahteristo, S. Tuupanen, A. Karhu and L. A. Aaltonen (2013). "Eleven candidate susceptibility genes for common familial colorectal cancer." *PLoS Genet* 9(10): e1003876.
- Howe, J. R., M. G. Sayed, A. F. Ahmed, J. Ringold, J. Larsen-Haidle, A. Merg, F. A. Mitros, C. A. Vaccaro, G. M. Petersen, F. M. Giardiello, S. T. Tinley, L. A. Aaltonen and H. T. Lynch (2004). "The prevalence of MADH4 and BMPR1A mutations in juvenile polyposis and absence of BMPR2, BMPR1B, and ACVR1 mutations." *J Med Genet* 41(7): 484-91.
- Jaeger, E., S. Leedham, A. Lewis, S. Segditsas, M. Becker, P. R. Cuadrado, H. Davis, K. Kaur, K. Heinimann, K. Howarth, J. East, J. Taylor, H. Thomas and I. Tomlinson (2012). "Hereditary mixed polyposis syndrome is caused by a 40-kb upstream duplication that leads to increased and ectopic expression of the BMP antagonist GREM1." *Nat Genet* 44(6): 699-703.
- Ke, S., S. Shang, S. M. Kalachikov, I. Morozova, L. Yu, J. J. Russo, J. Ju and L. A. Chasin (2011). "Quantitative evaluation of all hexamers as exonic splicing elements." *Genome Res* 21(8): 1360-74.
- Kumar, P., S. Henikoff and P. C. Ng (2009). "Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm." *Nat Protoc* 4(7): 1073-81.
- Leal, J. F., J. Fominaya, A. Cascon, M. V. Guijarro, C. Blanco-Aparicio, M. Lleonart, M. E. Castro, Y. C. S. Ramon, M. Robledo, D. H. Beach and A. Carnero (2008). "Cellular senescence bypass screen identifies new putative tumor suppressor genes." *Oncogene* 27(14): 1961-70.
- Li, H. and R. Durbin (2009). "Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform." *Bioinformatics* 25(14): 1754-60.
- Li, H., B. Handsaker, A. Wysoker, T. Fennell, J. Ruan, N. Homer, G. Marth, G.

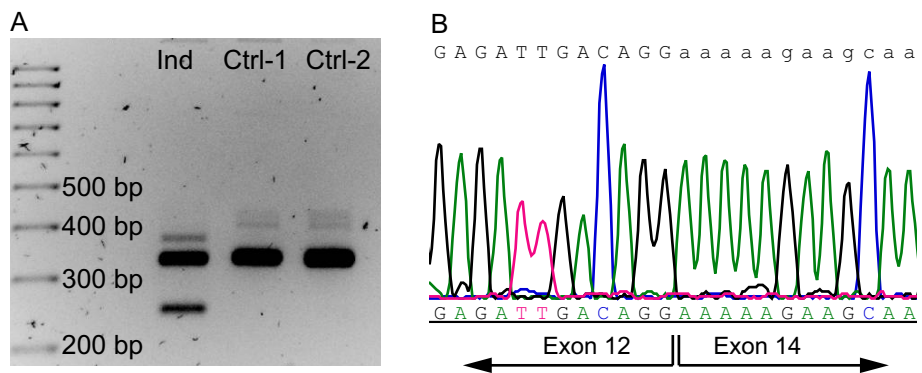
- Abecasis and R. Durbin (2009). "The Sequence Alignment/Map format and SAMtools." *Bioinformatics* 25(16): 2078-9.
- Lindor, N. M., K. Rabe, G. M. Petersen, R. Haile, G. Casey, J. Baron, S. Gallinger, B. Bapat, M. Aronson, J. Hopper, J. Jass, L. LeMarchand, J. Grove, J. Potter, P. Newcomb, J. P. Terdiman, P. Conrad, G. Moslein, R. Goldberg, A. Ziogas, H. Anton-Culver, M. de Andrade, K. Siegmund, S. N. Thibodeau, L. A. Boardman and D. Seminara (2005). "Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X." *Jama* 293(16): 1979-85.
- Lynch, H. T., P. M. Lynch, S. J. Lanspa, C. L. Snyder, J. F. Lynch and C. R. Boland (2009). "Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications." *Clin Genet* 76(1): 1-18.
- Mester, J. and C. Eng (2013). "When overgrowth bumps into cancer: the PTENopathies." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 163C(2): 114-21.
- Nieminen, T. T., M. F. O'Donohue, Y. Wu, H. Lohi, S. W. Scherer, A. D. Paterson, P. Ellonen, W. M. Abdel-Rahman, S. Valo, J. P. Mecklin, H. J. Jarvinen, P. E. Gleizes and P. Peltomaki (2014). "Germline mutation of RPS20, encoding a ribosomal protein, causes predisposition to hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma without DNA mismatch repair deficiency." *Gastroenterology* 147(3): 595-598 e5.
- Palles, C., J. B. Cazier, K. M. Howarth, E. Domingo, A. M. Jones, P. Broderick, Z. Kemp, S. L. Spain, E. Guarino, I. Salguero, A. Sherborne, D. Chubb, L. G. Carvajal-Carmona, Y. Ma, K. Kaur, S. Dobbins, E. Barclay, M. Gorman, L. Martin, M. B. Kovac, S. Humphray, A. Lucassen, C. C. Holmes, D. Bentley, P. Donnelly, J. Taylor, C. Petridis, R. Roylance, E. J. Sawyer, D. J. Kerr, S. Clark, J. Grimes, S. E. Kearsley, H. J. Thomas, G. McVean, R. S. Houlston and I. Tomlinson (2013). "Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas." *Nat Genet* 45(2): 136-44.
- Parthiban, V., M. M. Gromiha and D. Schomburg (2006). "CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations." *Nucleic Acids Res* 34(Web Server issue): W239-42.
- Puente, X. S., M. Pinyol, V. Quesada, L. Conde, G. R. Ordonez, N. Villamor, G. Escaramis, P. Jares, S. Bea, M. Gonzalez-Diaz, L. Bassaganyas, T. Baumann, M. Juan, M. Lopez-Guerra, D. Colomer, J. M. Tubio, C. Lopez, A. Navarro, C. Tornador, M. Aymerich, M. Rozman, J. M. Hernandez, D. A. Puente, J. M. Freije, G. Velasco, A. Gutierrez-Fernandez, D. Costa, A. Carrio, S. Guijarro, A. Enjuanes, L. Hernandez, J. Yague, P. Nicolas, C. M. Romeo-Casabona, H. Himmelbauer, E. Castillo, J. C. Dohm, S. de Sanjose, M. A. Piris, E. de Alava, J. San Miguel, R. Royo, J. L. Gelpi, D. Torrents, M. Orozco, D. G. Pisano, A. Valencia, R. Guigo, M. Bayes, S. Heath, M. Gut, P. Klatt, J. Marshall, K. Raine, L. A. Stebbings, P. A. Futreal, M. R. Stratton, P. J. Campbell, I. Gut, A. Lopez-Guillermo, X. Estivill, E. Montserrat, C. Lopez-Otin and E. Campo (2011). "Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia." *Nature* 475(7354): 101-5.
- Puente, X. S., M. Pinyol, V. Quesada, L. Conde, G. R. Ordonez, N. Villamor, G. Escaramis, P. Jares, S. Bea, M. Gonzalez-Diaz, L. Bassaganyas, T. Baumann, M. Juan, M. Lopez-Guerra, D. Colomer, J. M. Tubio, C. Lopez, A. Navarro, C. Tornador, M. Aymerich, M. Rozman, J. M. Hernandez, D. A. Puente, J. M. Freije, G. Velasco, A. Gutierrez-Fernandez, D. Costa, A. Carrio, S. Guijarro, A.

- Enjuanes, L. Hernandez, J. Yague, P. Nicolas, C. M. Romeo-Casabona, H. Himmelbauer, E. Castillo, J. C. Dohm, S. de Sanjose, M. A. Piris, E. de Alava, J. San Miguel, R. Royo, J. L. Gelpi, D. Torrents, M. Orozco, D. G. Pisano, A. Valencia, R. Guigo, M. Bayes, S. Heath, M. Gut, P. Klatt, J. Marshall, K. Raine, L. A. Stebbings, P. A. Futreal, M. R. Stratton, P. J. Campbell, I. Gut, A. Lopez-Guillermo, X. Estivill, E. Montserrat, C. Lopez-Otin and E. Campo (2011). "Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia." *Nature* 475(7354): 101-5.
- Ratajska, M., E. Antoszewska, A. Piskorz, I. Brozek, A. Borg, H. Kusmierek, W. Biernat and J. Limon (2012). "Cancer predisposing BARD1 mutations in breast-ovarian cancer families." *Breast Cancer Res Treat* 131(1): 89-97.
- Schulz, E., P. Klampfl, S. Holzapfel, A. R. Janecke, P. Ulz, W. Renner, K. Kashofer, S. Nojima, A. Leitner, A. Zebisch, A. Wolfler, S. Hofer, A. Gerger, S. Lax, C. Beham-Schmid, V. Steinke, E. Heitzer, J. B. Geigl, C. Windpassinger, G. Hoefler, M. R. Speicher, C. Richard Boland, A. Kumanogoh and H. Sill (2014). "Germline variants in the SEMA4A gene predispose to familial colorectal cancer type X." *Nat Commun* 5: 5191.
- Schwarz, J. M., D. N. Cooper, M. Schuelke and D. Seelow (2014). "MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age." *Nat Methods* 11(4): 361-2.
- Segui, N., M. Navarro, M. Pineda, N. Koger, F. Bellido, S. Gonzalez, O. Campos, S. Iglesias, R. Valdes-Mas, A. Lopez-Doriga, M. Gut, I. Blanco, C. Lazaro, G. Capella, X. S. Puente, G. Plotz and L. Valle (2014). "Exome sequencing identifies MUTYH mutations in a family with colorectal cancer and an atypical phenotype." *Gut* 64(2): 355-6.
- Sieber, O. M., L. Lipton, M. Crabtree, K. Heinemann, P. Fidalgo, R. K. Phillips, M. L. Bisgaard, T. F. Orntoft, L. A. Aaltonen, S. V. Hodgson, H. J. Thomas and I. P. Tomlinson (2003). "Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH." *N Engl J Med* 348(9): 791-9.
- Spier, I., S. Holzapfel, J. Altmuller, B. Zhao, S. Horpaopan, S. Vogt, S. Chen, M. Morak, S. Raeder, K. Kayser, D. Stienen, R. Adam, P. Nurnberg, G. Plotz, E. Holinski-Feder, R. P. Lifton, H. Thiele, P. Hoffmann, V. Steinke and S. Aretz (2014). "Frequency and phenotypic spectrum of germline mutations in POLE and seven other polymerase genes in 266 patients with colorectal adenomas and carcinomas." *Int J Cancer*.
- Valle, L. (2014). "Genetic predisposition to colorectal cancer: where we stand and future perspectives." *World J Gastroenterol* 20(29): 9828-49.
- Valle, L., E. Hernandez-Illan, F. Bellido, G. Aiza, A. Castillejo, M. I. Castillejo, M. Navarro, N. Segui, G. Vargas, C. Guarinos, M. Juarez, X. Sanjuan, S. Iglesias, C. Alenda, C. Egoavil, A. Segura, M. J. Juan, M. Rodriguez-Soler, J. Brunet, S. Gonzalez, R. Jover, C. Lazaro, G. Capella, M. Pineda, J. L. Soto and I. Blanco (2014). "New insights into POLE and POLD1 germline mutations in familial colorectal cancer and polyposis." *Hum Mol Genet* 23(13): 3506-12.
- Yin, S., F. Ding and N. V. Dokholyan (2007). "Eris: an automated estimator of protein stability." *Nat Methods* 4(6): 466-7.
- Zhang, J. X., L. Fu, R. M. de Voer, M. M. Hahn, P. Jin, C. X. Lv, E. T. Verwiel, M. J. Ligtenberg, N. Hoogerbrugge, R. P. Kuiper, J. Q. Sheng and A. Geurts van Kessel (2015). "Candidate colorectal cancer predisposing gene variants in Chinese early-onset and familial cases." *World J Gastroenterol* 21(14): 4136-49.

**Figure 1**



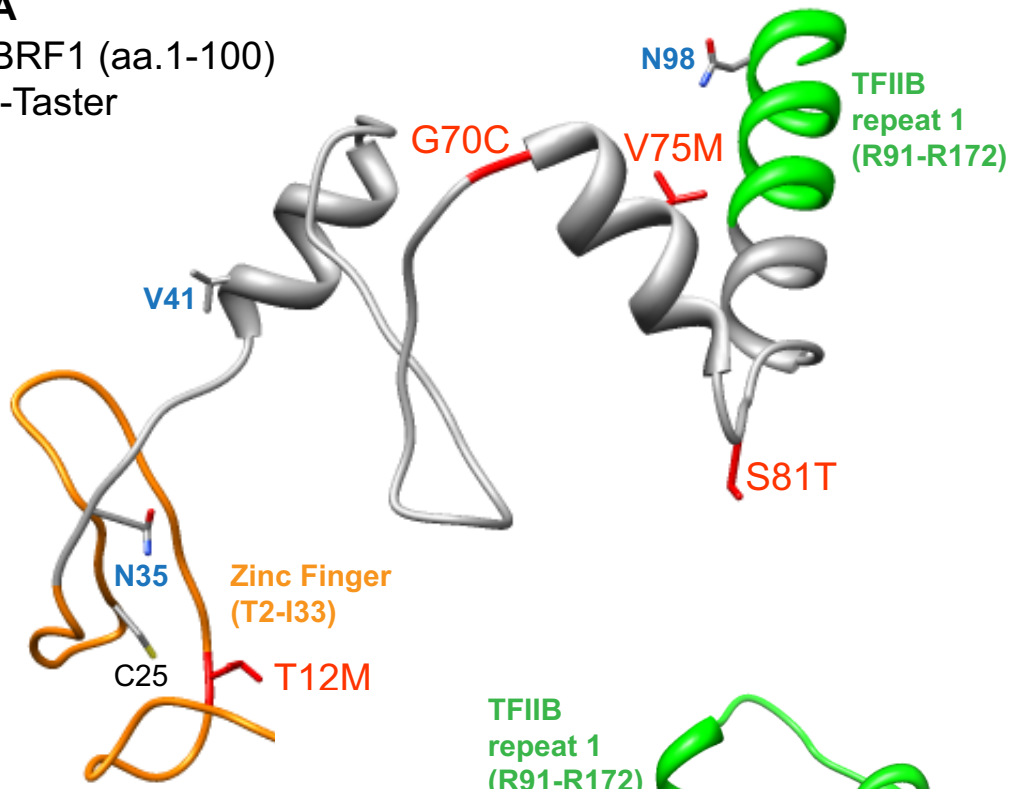
**Figure 2**



**Figure 3**

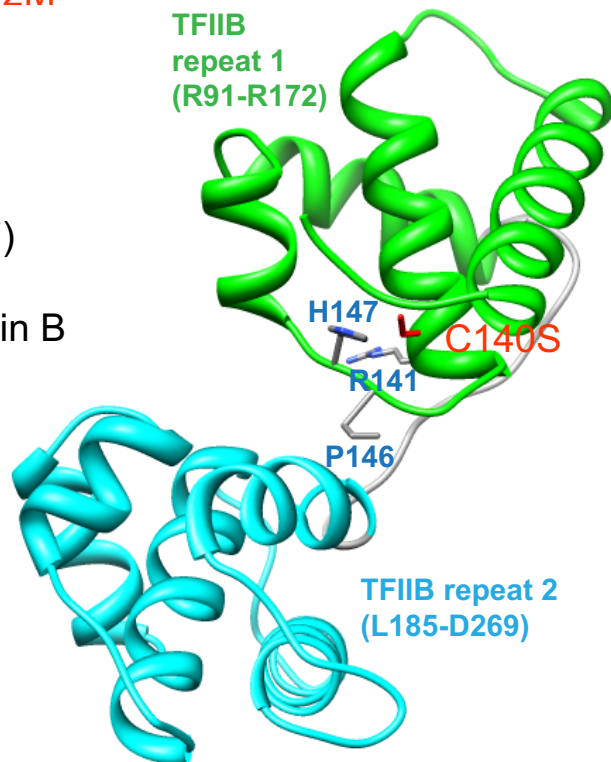
**A**

BRF1 (aa.1-100)  
I-Taster



**B**

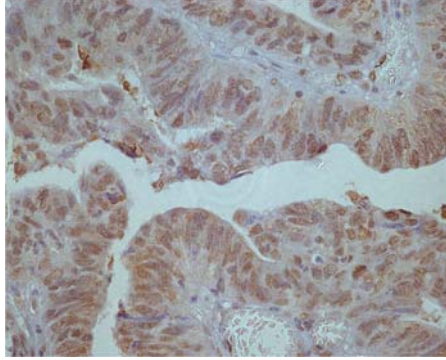
BRF1 (aa.99-267)  
Swissmodel  
PDB ID:1ais, chain B



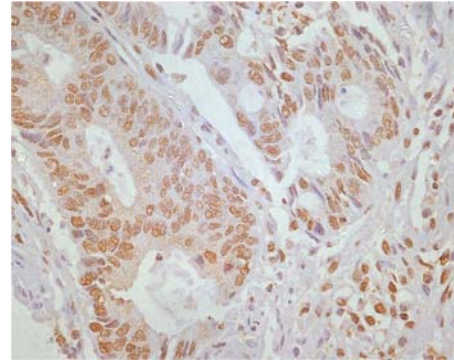


Supplementary figure 1

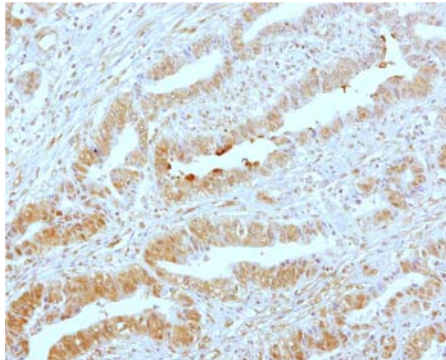
**A**



**B**

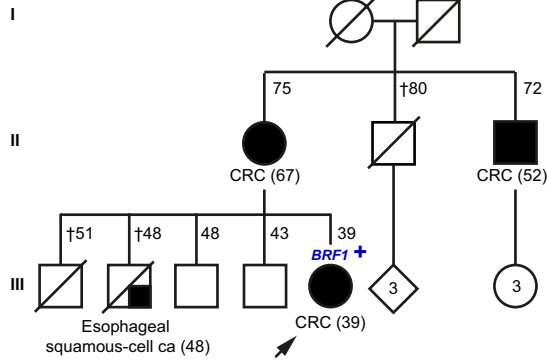


**C**

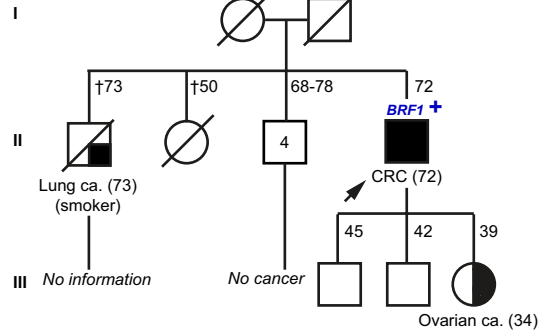


## Supplementary figure 2

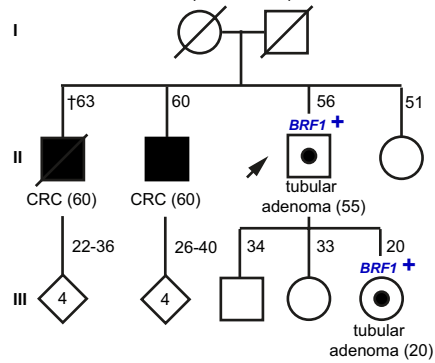
*BRF1* c.35C>T; p.(T12M)  
F-1938-04



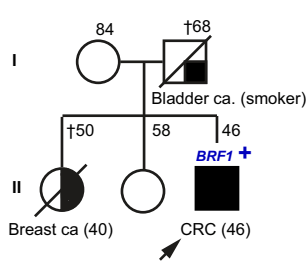
*BRF1* c.35C>T; p.(T12M)  
F-2166-05



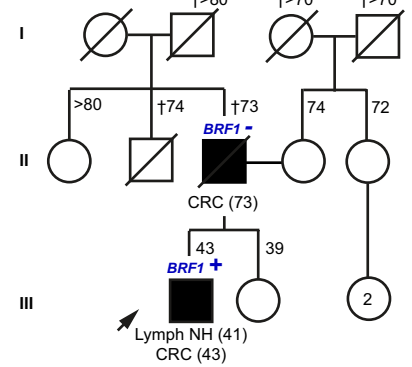
*BRF1* c.208G>T; p.(G70C)  
F-0756-01



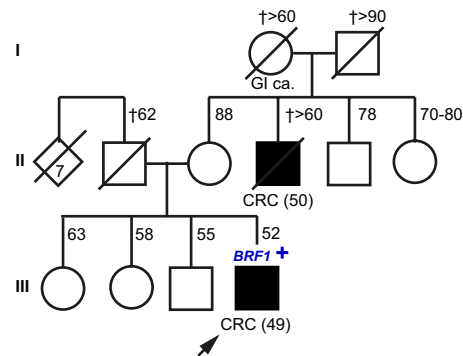
*BRF1* c.223G>A; p.(V75M)  
F-2287-05



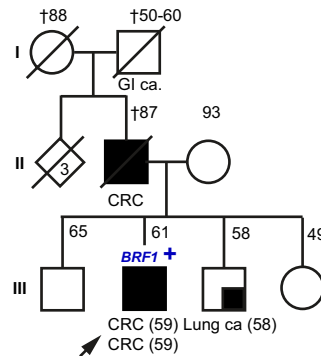
*BRF1* c.241T>A; p.(S81T)  
F-0432-00



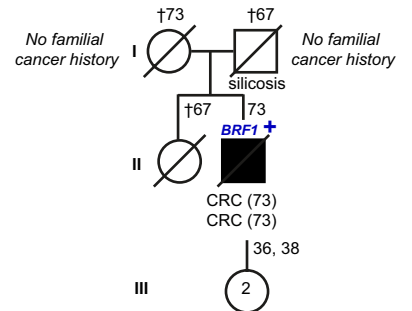
*BRF1* c.419G>C; p.(C140S)  
F-1658-04



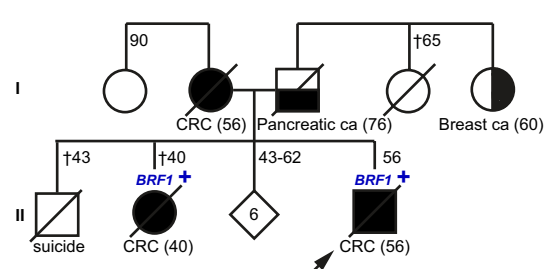
*BRF1* c.1214C>G; p.(P405R)  
F-3181-07



*BRF1* c.1714C>G; p.(R572G)  
F-4157-10



*BRF1* c.60\*C>G (NM\_001242790)  
Oviedo 08-475

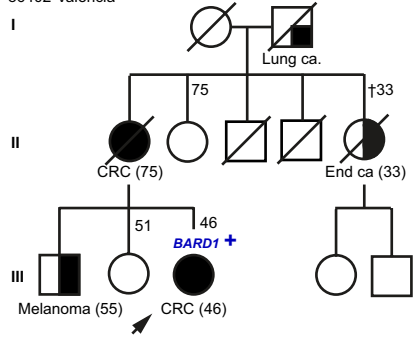


*BRF1* c.1516-4C>G  
F-3637-08

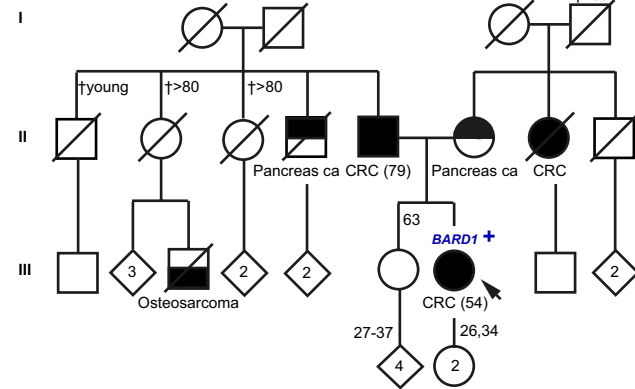
Unavailable pedigree

### Supplementary figure 3

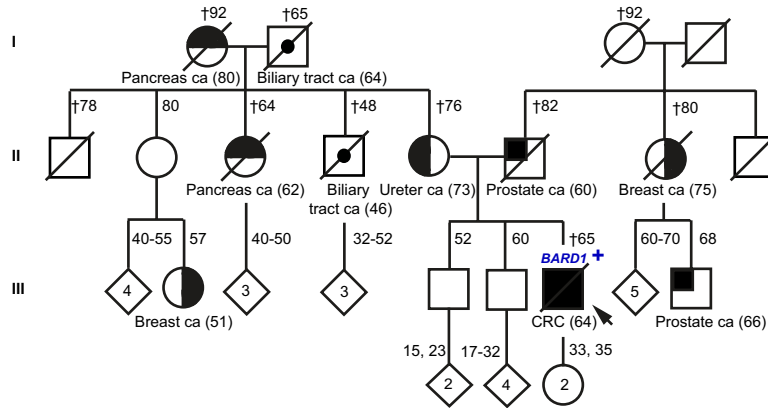
*BARD1* c.2000T>C; p.(L667P)  
86402-Valencia



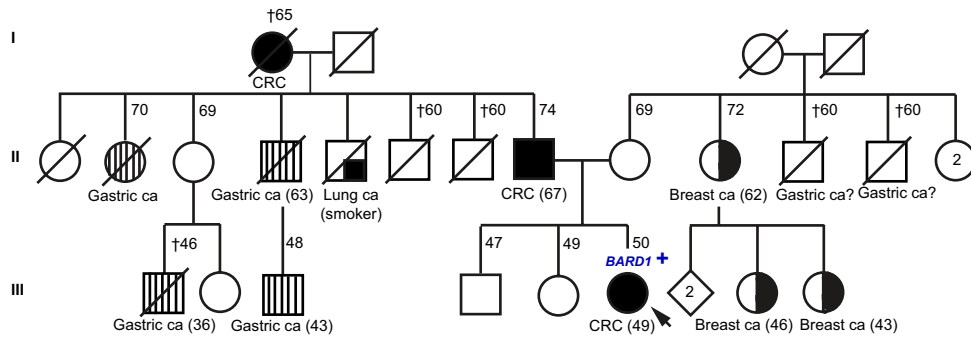
*BARD1* c.1152C>T; p.(S384=)  
86400-Valencia



*BARD1* c.1347A>G; p.(Q449=)  
86413-Valencia

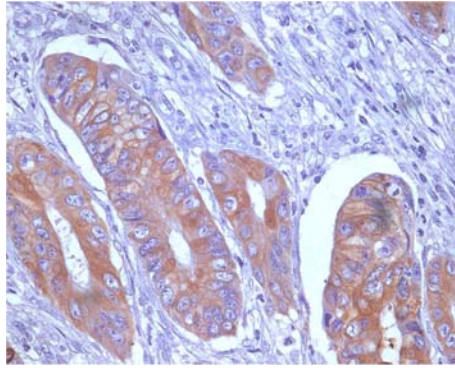


*BARD1* c.1977A>G; p.(R659=)  
86420-Valencia

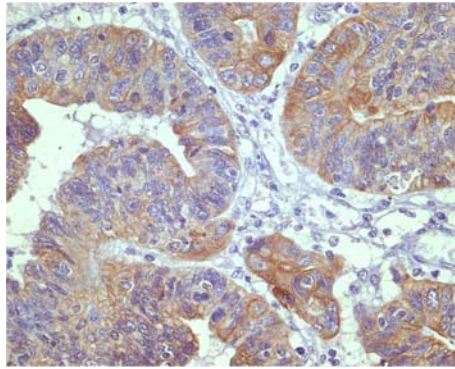


Supplementary figure 4

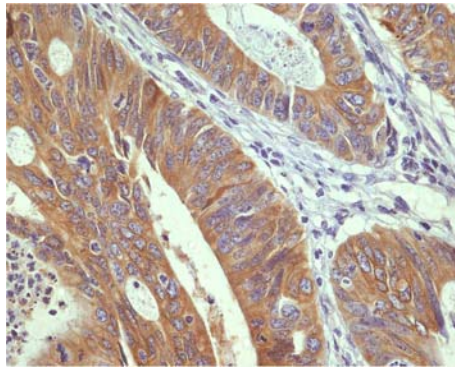
**A**



**B**

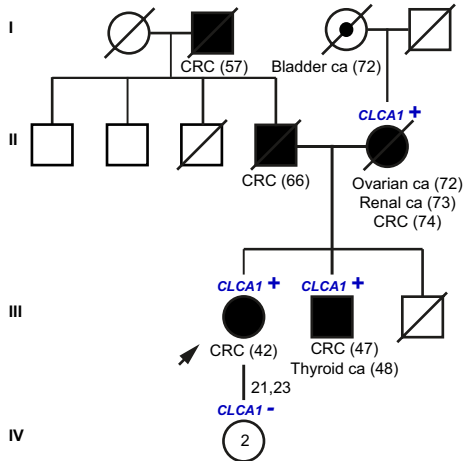


**C**

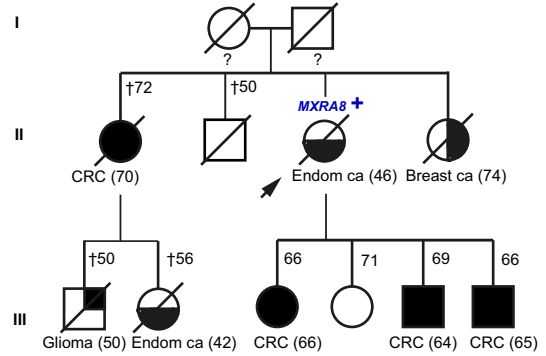


## Supplementary figure 5

*CLCA1* c.2305A>G; p.(I769V)



*MXRA8* c.1186G>A; p.(D396N)  
Valladolid 111



## Supplementary figure 6

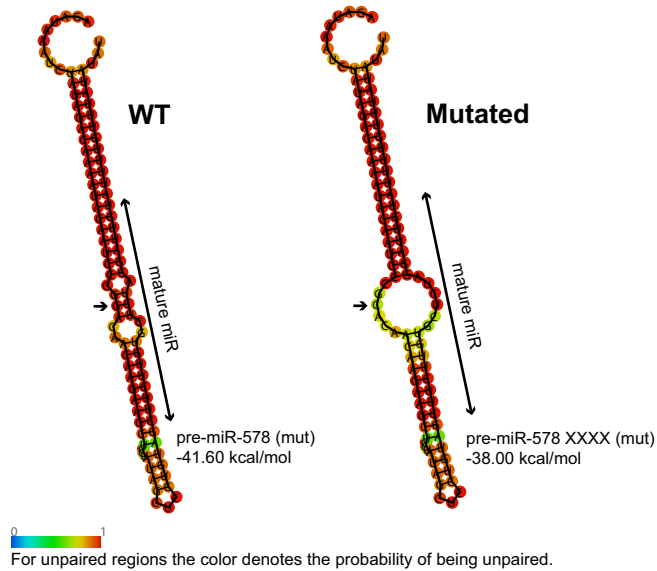


Figure: Prediction of the minimum free energy secondary structures for pre-miR-578 (wt) and pre-miR-578 -30 (mut), using the RNAfold server. Identical results were obtained with RNAlogo.





# DISCUSIÓN

---





La presente tesis engloba diferentes proyectos centrados en la investigación de la naturaleza y el origen causal de varios tipos de CCR hereditario: El Síndrome de Lynch (SL), el cáncer colorrectal familiar de tipo X (CCRFx) y la poliposis asociada a la actividad reparadora de la polimerasa. La intención global de este trabajo es contribuir al esclarecimiento de las bases genéticas de estas formas de CCR familiar. De este modo, se pretende lograr una mejor comprensión de las mismas, lo cual pueda contribuir a optimizar los procesos de diagnóstico y consejo genético, y en última instancia, a mejorar su prevención y tratamiento. Los cuatro estudios realizados en la presente tesis, recogidos cada uno en artículos independientes, serán discutidos por separado debido a su diferente temática y objetivo.

## **A. MODIFICACION DEL RIESGO AL CANCER EN EL SÍNDROME DE LYNCH POR UNA VARIANTE EN EL GEN DE LA TELOMERASA**

### **A.1. La motivación y el enfoque del estudio**

Tal y como se explicó el apartado 6 de la Introducción, el SL está causado por alteraciones que afectan al correcto funcionamiento de los genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*, y cuya consecuencia final es el fallo del sistema de reparación de bases desapareadas (MMR, del inglés *mismatch repair*). Existe una amplia variabilidad en el riesgo de cáncer asociado al SL en función tanto del gen afectado como de la naturaleza de las propias mutaciones causales. Sin embargo, la manifestación del SL y la edad de aparición del cáncer también difieren notoriamente dentro de una misma familia o entre familias portadoras de una misma mutación. Una parte de estas diferencias podría deberse al efecto de los factores ambientales o del azar. Sin embargo, es lógico considerar la influencia de variantes genéticas propias de cada individuo como factor modulador de esta variabilidad fenotípica. Hasta la fecha, puede asumirse que existen indicios suficientes para considerar que la variante c.163C>G (p.H63D) en el gen *HFE* y el polimorfismo de repetición CA cerca del promotor de *IGF-1* provocan incrementos de riesgo al cáncer en SL (Shi et al., 2009; Reeves et al., 2008a). Los SNPs rs16892766 (8q23.3) y rs3802842 (11q23.1) –identificados como variantes de riesgo al CCR en la población general– han sido relacionados a su vez con incrementos de riesgo a cáncer en SL, aunque estudios más recientes no han podido confirmar dicha asociación (Talseth-Palmer et al., 2012; Houille et al., 2011; Win et al., 2013b). Por otro lado, los cambios c.677C>T (p.A222V) y c.1298A>C (p.E429A) heredados en *trans* en el gen de la enzima metileno-tetrahidrofolato reductasa (*MTHFR*) ejercerían un papel protector (Reeves et al., 2009).

Alteraciones en la longitud telomérica han sido identificadas en numerosos tipos de cáncer, siendo un rasgo generalmente visible desde las etapas iniciales de la progresión tumoral (Mu et al., 2012; Londono-Vallejo et al., 2004; Meeker et al., 2004). Debido a que la telomerasa es la enzima encargada del mantenimiento de los telómeros, no es de extrañar que variantes en el gen *hTERT*, el cual codifica la subunidad catalítica de esta enzima, hayan sido asociadas con incrementos de riesgo en diversos tipos de cáncer, entre ellos el CCR (Kinnersley et al., 2012; Peters et al., 2012) (Introducción, Capítulo 9).

Considerando la gran variabilidad en la penetrancia del SL, y la influencia de los telómeros y la telomerasa en el riesgo y desarrollo del cáncer, decidimos plantear el estudio del papel de varias variantes en *hTERT* en el riesgo a cáncer en SL. Para ello, realizamos un genotipado inicial de 6 SNPs de *hTERT* en una serie inicial de 106 portadores de mutación en los genes MMR (afectos de SL). La intención fue identificar posibles diferencias en la distribución alélica entre los afectados de cáncer y los portadores sanos, lo cual haría sospechar del papel de la variante en el riesgo a cáncer. El SNP rs2075786 (c.2654+269G/A), el cual se ha relacionado con un incremento de riesgo al cáncer de pulmón (Hosgood et al., 2009; Van Dyke et al., 2009) mostró un cierto desequilibrio en la proporción de ambos grupos, captando nuestro interés. En base a este resultado, se planteó un estudio en mayor profundidad para evaluar el papel de rs2075786 en el riesgo a cáncer en portadores de SL. El objetivo final de este estudio fue la valoración de la inclusión de *hTERT* rs2075786 en las predicciones de riesgo en el SL, lo cual podría ayudar a afinar programas de seguimiento individualizados en base a los riesgos propios de cada paciente.

Este estudio planteado incluyó el genotipado para la variante *hTERT* rs2075786 de dos series independientes de portadores de SL de España y Holanda con individuos tanto afectados de cáncer asociado a SL como no afectados. El efecto del polimorfismo también fue interrogado en una serie de controles sanos y afectados de CCR esporádico. El resultado global fue la identificación de un riesgo relativo (RR) de 2.90 (IC 95% = 1.02–8.26) de desarrollar un cáncer asociado a SL para el genotipo *hTERT* rs2075786 AA –al compararlo frente al riesgo de los portadores del genotipo GG– para aquellos portadores de mutación en los genes MMR menores de 45 años de edad.

### A.2. El estudio inicial

El estudio inicial basado en la serie española fue planteado como un estudio “piloto” para estudiar la distribución de genotipos en portadores sanos y afectados de cáncer asociado al SL. La comparativa de las frecuencias genotípicas entre los dos grupos ofreció una ausencia de asociación entre riesgo y genotipo. La revisión de los datos mostró sin embargo diferencias identificables a simple vista entre los pacientes más jóvenes. Debido a que, implícitamente a su función de “reloj celular”, los telómeros se acortan progresivamente a lo largo de la vida (Harley et al., 1991; Lindsey et al., 1991), la variabilidad de la influencia del SNP en función de la edad pareció un planteamiento razonable. En base a esta observación, el análisis se repitió utilizando la mediana de la edad de la serie (45 años) como punto de corte para establecer dos grupos diferenciados en base a la variable edad.

Debido a que la recolección de casos en la serie española se realiza en base al asesoramiento genético de familias, la proporción de afectados incluidos en el estudio resultó ser muy alta respecto al grupo de no afectados (147 afectados frente a 108 no afectados). Para solventar esta cuestión, se enfrentó al grupo de pacientes con SL que habían desarrollado un CCR antes de los 45 años *versus* todos aquellos que a esa edad no lo habían padecido (independientemente de posteriormente fuesen afectados o continuasen libres de cáncer). El alelo *hTERT* rs2075786 A (en su forma homo- y heterocigota) mostró una mayor

frecuencia en el grupo de afectos menores de 45 años. Si bien el número de muestras –y sobre todo el número de casos para el genotipo *hTERT* rs2075786 AA era bajo–, la tendencia identificada se considero de interés como para validar los resultados en una serie independiente.

Aprovechando la disponibilidad de datos relativos a la longitud telomérica en linfocitos de los pacientes con SL afectos de cáncer, se decidió comparar dichas longitudes en función de los genotipos obtenidos. Los pacientes con genotipo *hTERT* rs2075786 AA mostraron una longitud telomérica en sangre periférica menor que la de los pacientes GG ( $p=0,011$ ) y AG ( $p=0,058$ ). Este resultado centró por tanto el efecto del alelo A, en homocigosis, sobre la longitud telomérica en afectos de cáncer en SL.

En conclusión, a pesar de la falta de significación estadística de este estudio piloto, pudo deducirse la participación del alelo *hTERT* rs2075786 A en un potencial incremento de riesgo a cáncer asociado al SL en pacientes menores de 45 años. Esto podría estar asociado a un acortamiento telomérico en portadores homocigotos.

### A.3. Estudio de validación en una serie independiente

La serie holandesa constituye una de las series de familias con SL más extensas disponibles a nivel mundial e incluye además un gran número de portadores no afectos de cáncer. Tras realizar el genotipado de los pacientes disponibles para *hTERT* rs2075786, la comparativa global de genotipos no mostró diferencias entre afectos y no afectos, reafirmado lo anteriormente descrito en la serie española.

Tras ello, se repitió el análisis anterior en función de la edad de corte de 45 años. En base a la mayor disponibilidad de portadores no afectos en la serie holandesa, se decidió establecer una comparativa de tipo “transversal”, agrupando los individuos en función de su carácter “afecto” o “no afecto” y de su edad (</> de 45 años) en el momento de la recogida de datos. Otra de las características clave de esta serie es la especificación de los pacientes en los que se habían realizado previamente polipectomías. La resección de pólipos identificados mediante colonoscopias reduce considerablemente la tasa de CCR y la mortalidad asociada (Engel et al., 2010). Por lo tanto, la eliminación de aquellos casos en los que se había realizado dicha intervención permitió eliminar potenciales falsos negativos, afinando más la comparativa.

En esta segunda ocasión, los individuos afectos menores de 45 años mostraron una ligera frecuencia superior del alelo *hTERT* rs2075786 A respecto al grupo control, agudizándose esta diferencia de forma notoria en el caso del genotipo homocigoto AA ( $RR[AA/GG] = 2,90$ ). Esto mostró una ligera discordancia con el estudio inicial, donde dicho genotipo AA no se encontraba sobrerrepresentado en el grupo de afectos (lo estaba el alelo A en el conjunto), pero sí correlacionaba con la menor longitud telomérica encontrada en los afectos de cáncer con este genotipo. Debido al enfoque transversal y el mayor número de muestras incluido, el incremento de riesgo del alelo A en su forma homocigota se consideró más consistente.

### **A.4. El efecto del genotipo AA en *hTERT* rs2075786 en el CCR esporádico.**

En base al papel modificador de *hTERT* rs2075786 en el SL, planteamos la evaluación de su efecto esta vez, sobre el riesgo a desarrollar CCR esporádico en la población general. La comparativa realizada entre individuos sanos y afectados de CCR esporádico, todos ellos sin SL, no identificó ninguna relación en la comparativa global ni tampoco estratificando por edades. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Hofer y colaboradores donde no se identificó ninguna asociación entre siete variantes en *hTERT* (entre ellos rs2075786) y el incremento de riesgo de CCR o de poliposis (Hofer et al., 2012).

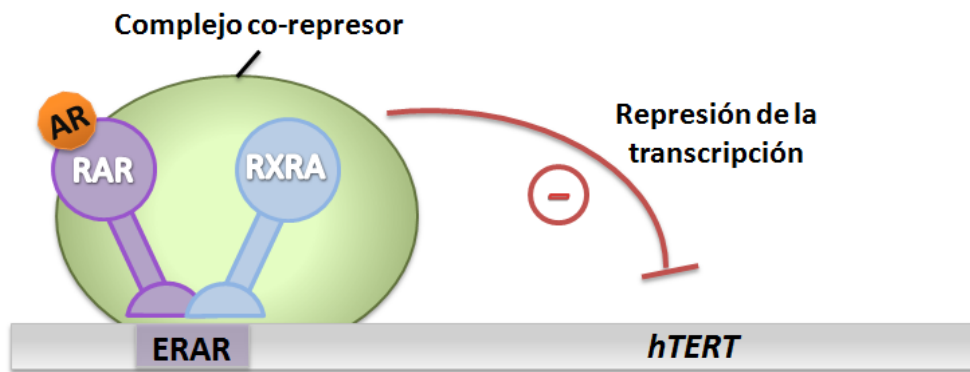
En base a estos resultados, es importante considerar que mientras en el CCR esporádico la inestabilidad cromosómica (IC) está presente en una alta proporción de los casos, en el SL el mecanismo de inestabilidad génica es la inestabilidad de microsatélites (IMS) (Herzig y Tsikitis., 2015; Vasen et al., 2005). La divergencia en los mecanismos moleculares en el desarrollo del CCR hace lógico el diferente impacto del SNP en la predisposición a esta enfermedad. Igualmente es importante destacar que nuestro estudio reveló un incremento de riesgo a cualquier tipo de cáncer asociado a SL, por lo que es obvio que los mecanismos implicados van más allá de los propios y exclusivos del CCR. La evaluación del impacto de este SNP en tumores esporádicos extracolónicos con IMS aclararía si el riesgo identificado en este estudio es extrapolable al mecanismo IMS o es un rasgo más bien propio de los tumores asociados al SL.

### **A.5. Posibles mecanismos causales del incremento de riesgo asociado a *hTERT* rs2075786.**

#### **a) Hipótesis acerca del efecto fisiológico de la variante**

Diferentes estudios de predicción *in silico* fueron realizados con la intención de identificar las implicaciones fisiológicas del cambio *hTERT* rs2075786 (c.2654+269G/A) en la regulación de la transcripción génica. A pesar de que la variante no parecía alterar zonas de unión de microARNs o de regulación de *splicing*, sí se identificó la rotura de un sitio de unión para el receptor X retinoide alfa (RXRA).

El ácido retinoico (AR) es un metabolito que deriva de la vitamina A. Participa en numerosas funciones de crecimiento, diferenciación y apoptosis, siendo su presencia indispensable para el crecimiento y desarrollo de los cordados (De Luca 1991; Duester et al., 2008). Cuando el AR está presente, éste se une al receptor de ácido retinoico (RAR), el cual a su vez se enlaza con RXRA formando un heterodímero. Este complejo se une al ADN en zonas denominadas "elementos de respuesta al ácido retinoico" (ERAR), cuya consecuencia es la inducción o la activación de diferentes genes. En este caso, se sabe que la unión de RAR-AR-RXRA al sitio ERAR provoca una disminución de la expresión por desregulación del gen *hTERT* causando una disminución de la actividad telomerasa (Ding et al., 2002; Pendino et al., 2003 (Figura 23).



**Figura 23. Mecanismo de inhibición de la expresión de *hTERT* mediante la unión del complejo represor activado por el ácido retinoico a la región ERAR.** Adaptado de Marletaz et al., 2006.

Por ello, la rotura del sitio ERAR debido a la presencia del alelo *hTERT* rs2075786 A impediría la unión del complejo RAR-AR-RXRA, evitándose la acción pro-silenciamiento de *hTERT* ejercida por esta unión. Tal y como se explicó en el capítulo 9 de la introducción, la resolución del problema del agotamiento telomérico es una de las competencias necesarias para que avance la progresión tumoral (Hanahan y Weinberg, 2011). La actividad de la telomerasa se encuentra sobreexpresada en el 85% de todos los cánceres, lo cual demuestra su importancia como mecanismo evasor de la senescencia por acortamiento telomérico (Shay et al., 1997). La consecución de esta competencia correlaciona con un peor pronóstico y una mayor malignidad en el CCR (Li et al., 2013; Bertorelle et al., 2013). La desaparición del sitio de unión a RAR-AR-RXRA podría conllevar a una transición más rápida desde la inhibición natural (propia de las células somáticas adultas) a su activación, satisfaciéndose así la necesidad tumoral de replicación telomérica. Éste sería uno de los potenciales mecanismos implicados en el aumento de riesgo a cáncer asociado al alelo A de *hTERT* rs2075786, ya que podría acelerar la transición adenoma-carcinoma y/o la malignización tumoral.

#### **b) Acortamiento telomérico ligado a la forma homocigota del alelo A de *hTERT* rs2075786**

Los datos relativos a la longitud telomérica de los portadores SL de la serie española indicaron la presencia de telómeros más cortos en linfocitos portadores del genotipo AA. Este hecho sería consecuencia de un mecanismo no directamente relacionado con la rotura del sitio de unión para RXRA. Sin embargo, igualmente podría estar implicado en la predisposición a cáncer antes mencionada.

La longitud telomérica ha sido frecuentemente estudiada (generalmente en linfocitos) como posible marcador de riesgo a cáncer (Burke et al., 2013; Ma et al., 2011; Willeit et al., 2011; Julin et al., 2015). En CCR los resultados obtenidos son muchas veces contradictorios entre sí. Algunos estudios recientes parecen indicar que la alteración tanto por exceso como por defecto podría provocar en ambos casos una mayor predisposición a este tipo de cáncer (Jones et al., 2012; Cui et al., 2012).

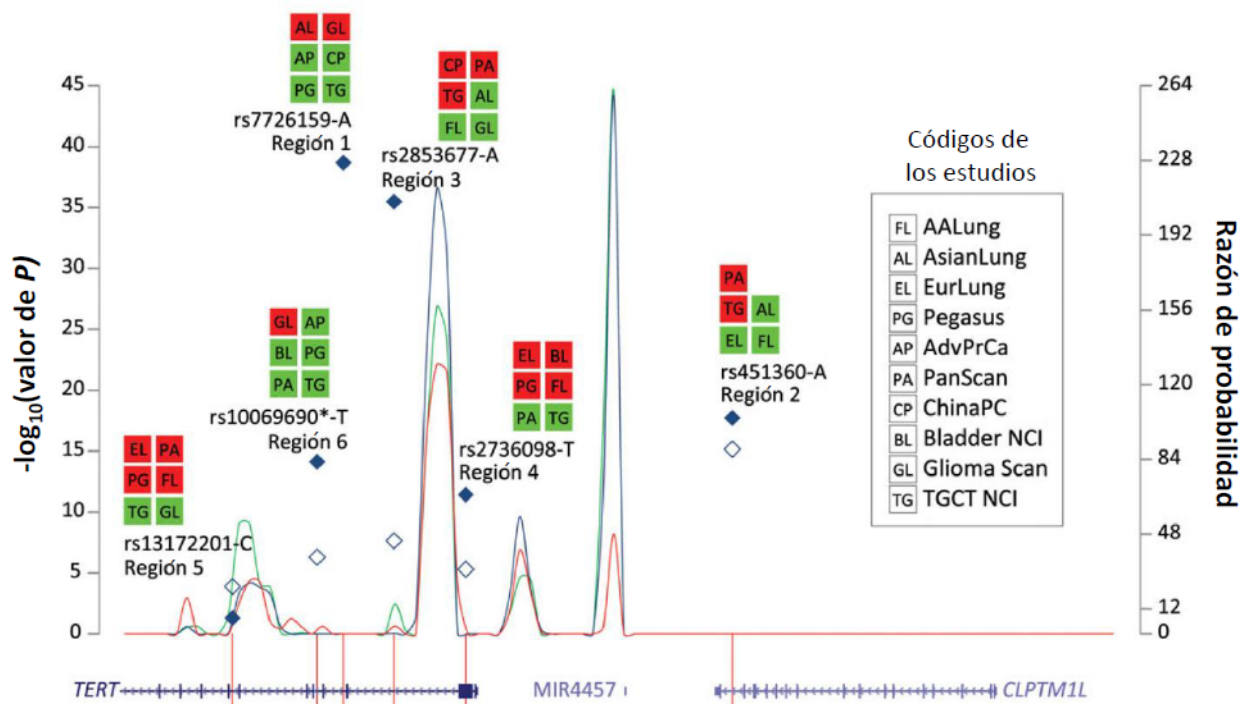
Considerando el SL, un estudio de Bozzao y colaboradores identificó una tasa de acortamiento telomérico más veloz en individuos SL con mutaciones germinales en *MSH2*, los cuales además desarrollaban cáncer a edades más tempranas (Bozzao et al., 2011). Un análisis realizado por nuestro grupo, también identificó telómeros más cortos y una tasa de acortamiento más rápida en los pacientes SL afectados de cáncer respecto al grupo de portadores sanos (Seguí et al., 2013). Considerando que el acortamiento telomérico es un factor de riesgo en el SL, la confluencia de telómeros cortos y el mayor riesgo de cáncer en los pacientes con el genotipo *hTERT* rs2075786 AA apoya la hipótesis planteada en este artículo.

Un hecho interesante y que contrasta con los datos aquí observados es la identificación, en un estudio realizado por nuestro grupo, de un incremento de riesgo a desarrollar CCR en individuos con cáncer colorrectal familiar de tipo X (CCRFx) que tienen los telómeros más largos (Seguí et al., 2014c). Este resultado, en consonancia con el encontrado por Cui y colaboradores, debería ser relacionado con un mecanismo diferente al que explicaría la predisposición causada por los telómeros cortos encontrada en el SL. Considerando la importancia del sistema MMR como mecanismo de generación de inestabilidad genómica en el desarrollo tumoral, no es de extrañar que la longitud telomérica pueda influir de diferente modo en el CCRFx y el SL. Esto es igualmente extrapolable a la influencia de la activación más temprana de la telomerasa en el desarrollo tumoral.

### **c) Interpretación de los resultados obtenidos**

La razón por la cual el incremento de riesgo asociado al genotipo *hTERT* rs2075786 AA no puede encontrarse a edades avanzadas es una cuestión compleja. Una posibilidad es que al aumentar la edad, se incremente la proporción de cánceres originados por mecanismos donde el acortamiento telomérico o la activación más temprana de la telomerasa no sean tan relevantes para la progresión tumoral. Por ejemplo, es posible que la acumulación de mutaciones –propia del SL– pueda generar vías de progresión tumoral capaces de activar la telomerasa por mecanismos independientes a la rotura del sitio de unión a RXRA, enmascarando el efecto de la variante *hTERT* rs2075786 AA. Otra hipótesis es que, si la longitud telomérica es especialmente corta (considerando el efecto de la edad superior, sumado al de menor longitud asociada a genotipo AA), la activación temprana de la telomerasa en la transición tumoral no juegue un papel tan importante como en individuos con telómeros más largos.

La diferente actuación de *hTERT* rs2075786 en función de la edad y/o el tipo de CCR supone un carácter pleiotrópico de este SNP. Un meta-análisis reciente analizando los resultados de varios GWAS en seis tipos de cáncer diferente identificó cinco *loci* independientes en *hTERT* en los que existen asociaciones tanto protectoras como de riesgo para al menos tres tipos de cáncer distintos (Wang et al., 2014) (Figura 24).



**Figura 24. Estudios de asociación positivos para el riesgo a diferentes tipos de cáncer en seis loci independientes de la región *TERT-CLPTM1L*.** Se indican los resultados positivos para los test no condicionales (rombos azules). Las cajas rojas indican incrementos de riesgo, mientras que las cajas verdes corresponden a efectos de tipo protector. Los estudios incluidos corresponden a los siguientes tipos de cáncer y poblaciones (donde se indica): AALung: cáncer de pulmón en afroamericanos; AsianLung: cáncer de pulmón en asiáticos; EurLung: cáncer de pulmón en europeos; Pegasus: cáncer de próstata; AdvPrCa: cáncer de próstata avanzado; PanScan: cáncer de páncreas; ChinaPC: cáncer de páncreas en población china; Bladder NCI: cáncer de vejiga; Glioma Scan: Glioma; TGCT NCI: cáncer de células germinales testiculares. Adaptado de Wang et al., 2014.

Estos resultados demuestran que cambios presentes en la secuencia de *hTERT*, conllevan alteraciones leves del funcionamiento de la proteína que comportan efectos diferentes según el tejido. Esto apoya la variabilidad de efectos de las variantes en *hTERT* en función de los diferentes mecanismos tumorales implicados.

#### A.6. Otras consideraciones.

Debido a la alta frecuencia de falsos positivos en los estudios de identificación de modificadores de riesgo (en parte debidos a la limitación en el acceso a series grandes y bien documentadas de pacientes, al gran número de variantes que son testadas o a las pequeñas magnitudes de efecto que se consideran relevantes), es siempre imprescindible contar con estudios complementarios. En este caso, sería de vital importancia realizar una validación completa en un mínimo de dos series adicionales independientes con número de pacientes SL mayor incluso al de la serie holandesa.

De manera general, puede considerarse que los resultados aquí obtenidos muestran un incremento de riesgo 2,5 veces superior a cáncer asociado a SL en pacientes portadores de la forma homocigota AA de *hTERT* rs2075786 menores de 45 años respecto al grupo de pacientes con genotipo GG. Debido a la dificultad de encontrar modificadores de riesgo que generen RR superiores a 2, sería de gran interés



repetir los análisis aquí realizados en series adicionales. Si estos resultados se confirman, los pacientes SL jóvenes portadores del alelo AA deberían ser sometidos a un protocolo de prevención de CCR (y otros tumores SL) más exhaustivo que aquellos portadores con genotipos GG/GA.

Los hallazgos identificados en este estudio sin embargo, no son aplicables a día de hoy en los protocolos de diagnóstico y de consejo genético de cáncer familiar. La moderada fracción de heterogeneidad en la penetrancia del SL capaz de ser explicada actualmente en base a mecanismos genéticos es todavía muy baja. Por ello, las recomendaciones actuales para los pacientes con SL son exhaustivas y homogéneas, considerándose en alto riesgo a todos los portadores. Sin embargo, la identificación de nuevas variantes asociadas a riesgos de cáncer en el SL así como el mayor conocimiento en las causas de la variabilidad en la penetrancia del SL posibilitarán en un futuro la adaptación de los programas de prevención de una forma más individualizada. Esto permitirá optimizar los recursos disponibles, al mismo tiempo que aumentará la capacidad de detección del cáncer en los pacientes de mayor riesgo.

## B. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS TUMORES DESARROLLADOS EN EL CONTEXTO DEL CÁNCER COLORRECTAL FAMILIAR DE TIPO X.

### B.1. Contextualización y planteamiento del estudio.

Aproximadamente el 40% de las familias que cumplen los criterios de Ámsterdam no presentan fallos germinales en el sistema MMR, quedando agrupadas bajo la denominación del cáncer colorrectal familiar de tipo X (CCRFX) (Lynch et al., 2009). En estas familias, la agregación de CCR no puede explicarse en base a mutaciones en genes asociados a alto riesgo de CCR o a otras causas genéticas conocidas. La caracterización de los tumores desarrollados en este contexto podría ser una buena estrategia para identificar rasgos particulares de este tipo de tumores. De esta forma, aquellas vías alteradas específicamente en los tumores CCRFX podrían conducir a la razón molecular de la agregación de CCR presente en este grupo de familias.

El SL y el CCRFX son las dos únicas entidades que constituyen el CCR hereditario no polipósico. A pesar de esta cercanía en la clasificación del CCR hereditario, el mecanismo de iniciación tumoral es claramente distinto: Mientras en el SL la inestabilidad génica se debe a la IMS, en el CCRFX la EMS es un requisito de inclusión en el grupo. Estudios de expresión génica ya habían mostrado grandes diferencias entre el SL y el CCRFX, considerándose la principal causa la diferencia en el estado del sistema MMR (Dominguez-Valentin et al., 2013). Estas diferencias en la expresión génica también fueron identificadas en tumores esporádicos en función de la integridad en su sistema MMR, lo cual confirma la enorme importancia de este mecanismo de reparación en las características moleculares de los tumores. Nosotros consideramos que las diferencias entre los casos de CCR esporádicos y familiares sin fallos en el sistema MMR (MMR+) podrían ayudarnos a identificar rasgos propiamente característicos de las formas familiares, facilitando la identificación de las causas genéticas responsables del CCRFX..

En base a esta premisa, decidimos plantear una caracterización de 40 tumores CCRFX (36 Ámsterdam I y 4 Ámsterdam II) disponibles en nuestro laboratorio, pertenecientes a 27 familias. Este análisis incluyó el estudio genómico (número de copia), el estudio del patrón de metilación de islas CpG y el análisis de varios puntos calientes de mutación en los genes *KRAS*, *BRAF*, *TP53* y *PIK3CA*. Finalmente, se realizó la comparación de los resultados obtenidos frente a los descritos para el CCR esporádico MMR+.

### B.2. El análisis de número de copia.

El estudio genético de 16 tumores CCRFX (14 Ámsterdam I y 2 Ámsterdam II) provenientes de 14 familias mediante un *array* comercial de número de copia especialmente diseñado para el estudio de muestras incluidas en parafina (Oncoscan, Affymetrix), identificó la ganancia de los cromosomas 2, 7, 8q, 12q, 13q, 16, 19q y 20, y la pérdida de 18, 17p y 22q en más de un tercio de los tumores CCRFX. Estos cambios coinciden, *a grosso modo*, con los descritos en otras series de CCR familiar MMR+ (Therkildsen et al., 2013; Middeldorp et al., 2013; Abdel-Rahman et al., 2005; Chen et al., 2013), aunque pudieron

identificarse algunas variaciones específicas no descritas anteriormente. En base a la idea inicial de estudio, se planteó comparar estos resultados con los propios de tumores esporádicos equivalentes (con el sistema MMR intacto). Gracias al proyecto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA, “El Atlas del Genoma del Cáncer” en español), es posible acceder de forma pública a numerosos perfiles moleculares de diversos tipos tumorales. Esto posibilitó la obtención del perfil de número de copia de 328 CCR esporádicos MMR+, generando un grupo control consistente y representativo de este colectivo de tumores. De este modo, se logró una mejora en la calidad del grupo de referencia respecto a los utilizados en otros estudios anteriores de características semejantes. La utilización del software *Nexus* de *BioDiscovery* permitió analizar de forma homogénea los datos generados a partir de nuestras muestras y los obtenidos a través del TCGA.

A pesar del limitado número de muestras CCRFX incluidas en el *array* en nuestro estudio, el patrón de número de copia generado mostró una gran semejanza con el obtenido a partir de los 328 tumores esporádicos procedentes de la base de datos TCGA. Este resultado, en concordancia con lo anteriormente descrito en otras investigaciones, confirmó la elevada similitud existente entre los tumores de CCRFX y de CCR esporádicos (Middeldorp et al., 2011; Dominguez-Valentin et al., 2013).

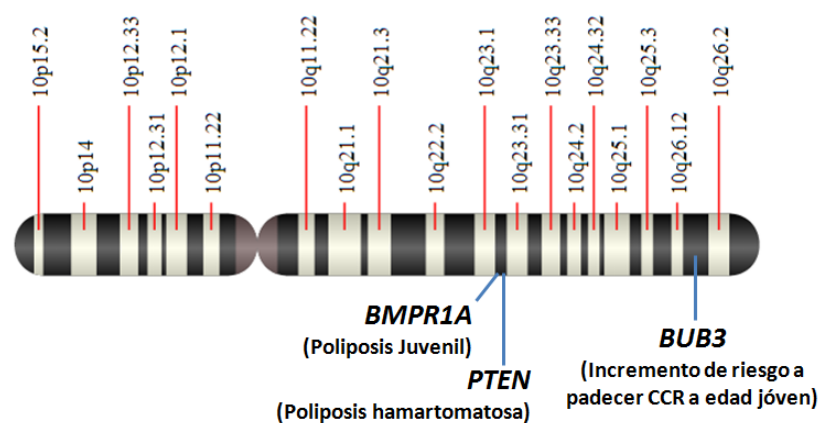
La comparativa del patrón de número de copia obtenido frente al de los casos esporádicos MMR+ arrojó dos/tres zonas diferencialmente alteradas: los brazos 2p y 2q se identificaron ganados en una frecuencia superior en el grupo CCRFX, mientras que el brazo 10q se encontró perdido también en mayor proporción en este grupo. Estos cambios fueron identificados por primera vez como cambios específicos del CCRFX frente al CCR esporádico sin alteraciones en el sistema MMR.

Middeldorp y Therkildsen encontraron ganancias en el brazo 20q en el 77% y el 65% de los casos de CCR familiar respectivamente, las cuales se identificaron como significativamente más frecuentes respecto a su grupos control de CCR esporádico (36% y 32% respectivamente). Nuestro estudio identificó dicho cambio en un 75% de los casos, en consonancia con los datos anteriores. Sin embargo, esta frecuencia es casi idéntica a la identificada en la serie de 328 casos esporádicos MMR+. Debido a que Middeldorp y Therkildsen establecieron comparaciones con series propias de casos esporádicos más pequeñas (22 muestras en ambos casos), las diferencias identificadas pueden deberse más a la particularidad de su propio grupo control que a los cambios presentes en el grupo de CCRFX. Otros estudios disponibles en la literatura muestran proporciones similares –o incluso más elevadas– de ganancias de la región 20q en el CCR esporádico MMR+ (Laiho et al., 2003; Chen et al., 2013). Sin embargo, no hay que descartar la posibilidad de que sus *arrays* tuviesen una sensibilidad de detección de cambios menor, habiendo identificado diferencias realmente existentes entre ambos grupos.

En nuestro estudio identificamos por primera vez la ganancia del cromosoma 2 como un evento significativamente más frecuente en CCRFX. Las frecuencias de este cambio descritas en otros estudios semejantes son bajas y similares a las descritas en los grupos de CCR esporádico control. Una posible explicación para esta observación es que una parte de los tumores de nuestra serie estuvieran originados por alteraciones en genes desencadenantes de un mecanismo de progresión tumoral que

seleccionase aquellos clones con una sobreexpresión de uno o varios genes situados en el cromosoma 2. La validación de esta observación en casos adicionales podría estar indicando la existencia de un mecanismo de desarrollo tumoral propio del CCRFX donde la ganancia de este cromosoma esté jugando un papel relevante. La identificación de nuevos tumores con la ganancia del cromosoma 2 posibilitaría la realización de un estudio de ligamiento que podría conducir a la identificación de los mecanismos causales. Del mismo modo, una comparativa del patrón de número de copia entre los casos con y sin ganancia del cromosoma 2, podría ayudar a identificar más alteraciones cromosómicas propias de esta vía concreta.

Otro cambio específico identificado en nuestra serie CCRFX respecto a los tumores de CCR esporádicos fue la pérdida más frecuente de 10q al considerar únicamente los casos Ámsterdam I. De nuevo, ésta fue la primera vez que se identificó la pérdida de 10q como un rasgo significativamente más frecuente en CCRFX. Al igual que sucedía con el cromosoma 2, se sospecha que la pérdida de esta región podría suponer una ventaja adaptativa en tumores que siguen una vía de desarrollo tumoral determinada. La pérdida de 10q ha sido identificada en diversidad de cánceres diferentes, incluyendo el CCR (Frayling et al., 1997; Karoui et al., 2004). El brazo 10q contiene varios supresores tumorales implicados en síndromes hereditarios de CCR, como son *BMPR1A*, *PTEN* o *BUB3* (Figura 25) (Howe et al., 2004; Mester et al., 2013; de Voer et al., 2013). Aunque la pérdida de 10q no es uno de los cambios más frecuentes en CCR (Ver Introducción, sección 3.b.l) este evento podría jugar un papel relevante en la progresión tumoral de determinados CCR en base a la relevancia de los genes que contiene. La existencia de mutaciones germinales específicas en un subgrupo de pacientes CCRFX en combinación con la pérdida de 10q podría estar favoreciendo el desarrollo tumoral en este grupo de tumores.



**Figura 25. Localización de varios genes relacionados con CCR familiar y/o hereditario situados en el brazo cromosómico 10q.**

Analizando los cariotipos obtenidos individualmente, observamos un patrón generalizado de inestabilidad cromosómica (>5 alteraciones cromosómicas) en 15 de los 16 tumores incluidos, mientras que la muestra restante mostró dos alteraciones. Esto demuestra que los tumores CCRFX, tal y como se había identificado en estudios anteriores, siguen la vía de la inestabilidad cromosómica como forma de

inestabilidad genómica (Middeldorp et al., 2011; Therkildsen et al., 2013; Chen et al., 2013). Los resultados del *array* de tres tumores mostraron una menor intensidad en los cambios, debido probablemente a su presencia en únicamente una subpoblación de células del tumor. Sin embargo, los cambios detectados se asemejan a los patrones obtenidos en el resto de muestras. Esto hace pensar que en estos tres tumores la progresión de los clones con los cambios *ventajosos* sobre las células menos diferenciadas se encontraba en fases más iniciales. Otra posibilidad a considerar es que estas tres muestras contengan una proporción elevada de células normales.

Los datos disponibles acerca de las regiones con pérdida de heterocigosidad sin alteraciones o con ganancias en el número de copia (cn/gLOH, del inglés *copy neutral/gain loss of heterozygosity*) en nuestro estudio son bastante limitados. De las siete muestras en las que pudimos analizar esta característica, únicamente tres mostraron fragmentos grandes (>2 Mb) en cn/gLOH con una, cinco y seis regiones identificadas cada una (Valor medio = 1,71 cn/gLOH por tumor). Los cambios cn/gLOH identificados representan una proporción muy baja de todas las aberraciones detectadas. Esto contrasta con los datos obtenidos por Middeldorp y colaboradores, en cuyo estudio identificaron una media de 3,3 cnLOH por tumor (32% del total de las grandes alteraciones detectadas) o los resultados de Chen y colaboradores donde identificaron 3,9 cnLOH por tumor (Middeldorp et al., 2011; Chen et al., 2013). Es posible que debido al reducido número de muestras incluidas en nuestro estudio, exista una sobrerrepresentación por azar de tumores con un número reducido de cambios.

Un hecho llamativo es que dos muestras concentrasen 11 de los 12 cambios cn/gLOH identificados. Esta distribución desigual del número de regiones LOH por tumor también pudo observarse en el estudio realizado por Middeldorp. El análisis de la distribución del número de regiones en cn/gLOH en ambos estudios reveló una distribución no-normal para ambos casos (Tabla 18). Esto es indicativo de que los cambios no se producen de manera homogénea entre las muestras, pudiéndose tratar de un mecanismo de inestabilidad genética específico de cierto grupo de tumores. Además, el estadio tumoral de las muestras con alta LOH en nuestro estudio es I y II, por lo que no parece ser un mecanismo propio de fases tumorales avanzadas ni tampoco una característica que aparezca al azar a lo largo del tiempo.

**Tabla 18. Test de normalidad de Shapiro-Wilk para la distribución del número de regiones en LOH por tumor.**

Estudio	Muestras	cn/gLOH	Shapiro-Wilk "W"	p
Middeldorp et al.	30	99	0,879	0,002669
Bellido et al.	7	12	0,7025	0,00395

### B.3. El patrón mutacional en *KRAS*, *BRAF*, *PI3KCA* y *TP53*.

Tal y como se explicó en la sección 7.b.2 de la introducción, existen determinadas vías moleculares de especial importancia en el desarrollo del CCR. Entre ellas figuran la vía de las MAP quinasas y de m-

TOR, en las que intervienen proteínas como BRAF, KRAS, PIK3CA. Por otro lado, la función de supresor tumoral de p53 es a su vez clave para la integridad celular. La comparativa de las frecuencias mutacionales para los cuatro genes que codifican estas proteínas en los tumores CCRFX y los de CCR esporádico MMR+ indicará si el grado de alteración de las vías implicadas difiere entre ambas entidades.

Considerando los puntos calientes más frecuentemente mutados en CCR esporádico para los cuatro genes mencionados, se analizó el patrón mutacional de 37 tumores CCRFX y 99 tumores de CCR esporádico MMR+. Los resultados obtenidos (Figura 26) mostraron grandes similitudes entre ambos grupos para *BRAF*, *KRAS* y *PIK3CA*, mientras que *TP53* mostró una frecuencia mutacional superior en el grupo de tumores esporádicos (diferencias no significativas).

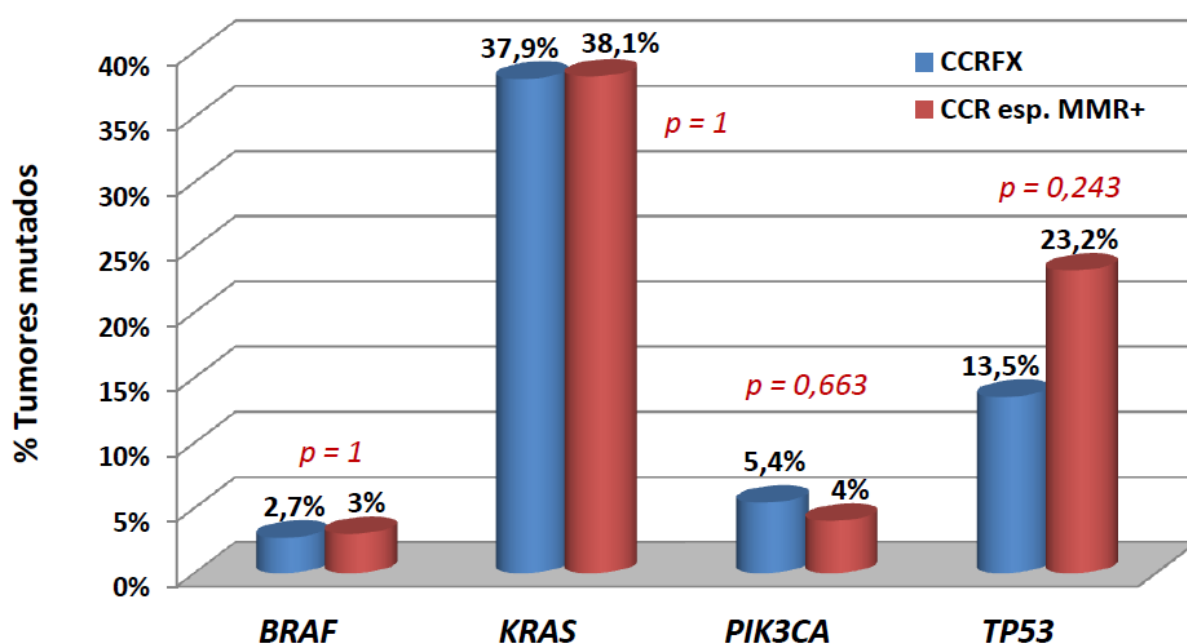


Figura 26. Frecuencias mutacionales obtenidas tras testar los puntos calientes más importantes de *BRAF*, *KRAS*, *PIK3CA* y *TP53* en las series de CCRFX y de CCR esporádico MMR+. Se indica en rojo el valor de “p” asociado a la comparación entre ambos grupos de la frecuencia mutacional de cada gen.

Estudios similares en otras series de CCR familiar con estabilidad de microsatélites ofrecen frecuencias mutacionales en consonancia con los resultados obtenidos para *BRAF* (0-13%), y para *KRAS* (17-40,3%) (Sanchez-de-Abajo et al., 2007; Goel et al., 2010; Middeldorp et al.; Abdel-Rahman et al., 2005; Sánchez-Tomé et al., 2014). Un único estudio ha analizado la frecuencia de mutaciones en *TP53*, obteniéndose una frecuencia del 26% (Abdel-Rahman et al., 2005). La prevalencia de mutaciones en *PIK3CA* también fue interrogada en otro estudio, sin encontrarse ninguna (0/29) (Middeldorp et al., 2011). Estos datos, aun coincidiendo mayoritariamente con nuestros resultados, no pueden ser directamente comparados debido a la diversidad de técnicas utilizadas y zonas de cada gen cubiertas por cada una de ellas.

Dos de los citados estudios realizaron una comparativa entre la frecuencia mutacional de *KRAS* y *BRAF* de tumores de CCR familiar y de CCR esporádico MMR+. Al igual que en nuestro caso, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Sánchez-de-Abajo et al., 2007; Goel et al., 2010). Considerando mutaciones específicas de nuestra serie CCRFX, destaca la ausencia de *KRAS* c.34G>T (p.G12C), a pesar de ser el segundo tipo de mutación más frecuente en los tumores CCR esporádicos analizados (presente en 11.4% de los tumores).

La mutación V600E en *BRAF*, de relativa alta frecuencia en tumores CCR con IMS esporádicos, no aparece como un evento frecuente en tumores CCRFX (ni tampoco en CCR esporádico MMR+). Sanchez de Abajo y colaboradores identificaron 2 tumores con este cambio en una serie de 57 tumores de CCR familiar, los cuales fueron diagnosticados a edad temprana (ambos a los 43 años) (Sánchez-de-Abajo et al., 2007). Un caso adicional identificado por Abdel-Rahman al analizar una serie de 23 tumores de CCR familiar correspondió a un CCR diagnosticado a los 49 años (Abdel-Rahman et al., 2005). Del mismo modo, Middeldorp identificó el cambio *BRAF* p.V600E en 3 de los 26 tumores de CCR familiar analizados en su estudio. Dos de estos CCR fueron diagnosticados a los 50 años, mientras que el tercero lo fue a los 72 años (Middeldorp et al., 2011). El único tumor con mutación en *BRAF* identificado en los 37 tumores CCRFX analizados en nuestro estudio corresponde a un CCR diagnosticado a los 37 años de edad. Estos resultados en conjunto sugerirían la presencia de mutaciones en *BRAF* en el CCR desarrollado a temprana edad en el CCRFX. Esto sería opuesto a lo descrito para los tumores CCR esporádicos MMR+, en los que dichas mutaciones se asociarían a tumores desarrollados a edades avanzadas (Kirzin et al., 2014).

La diferencia más relevante identificada en el estudio se centra en *TP53*. Este gen mostró una frecuencia mutacional del 13,5% en el grupo de tumores CCRFX, lo que supone una reducción del 42% respecto al grupo de tumores esporádicos (frecuencia mutacional del 23,2%). El bajo número de tumores CCRFX disponibles supone una seria limitación en la potencia estadística, pudiendo ser ésta una de las razones por la cual las diferencias no alcanzaron un valor significativo ( $p=0,243$ ). La diferencia identificada podría sugerir la existencia de vías específicas en los tumores CCRFX donde la mutación de *TP53* no resulta tan crucial en la progresión tumoral. Abdel-Rahman también identificó una menor frecuencia mutacional en sus muestras de CCR familiar frente a la descrita en literatura para los casos esporádicos (Abdel-Rahman et al., 2005), aunque cubrió zonas diferentes. El estudio de *TP53* en series adicionales de casos CCRFX sería de gran utilidad para ampliar la potencia estadística y poder así confirmar o descartar las diferencias identificadas en nuestro estudio. Un hallazgo curioso es la ausencia de la mutación c.844C>T (p.R282W) en la serie CCRFX considerando que la mutación más frecuente identificada en *TP53* en los tumores de CCR esporádico MMR+.

En resumen, podemos afirmar que los tumores CCRFX y los CCR esporádicos MMR+ portan mutaciones en *KRAS*, *BRAF* y *PIK3CA* en una proporción similar. Las diferencias encontradas para *TP53* sugerirían una menor carga mutacional en los tumores CCRFX potencialmente ligada a un menor impacto de este gen en el desarrollo de estos tumores. Sin embargo, la ausencia de significación estadística para este hallazgo impide concluir con certeza sobre esta hipótesis. La limitación al acceso de un número superior

de tumores CCRFX hace que la potencia estadística de las comparaciones entre grupos sea bastante limitada. Por ello, la realización de un análisis similar en series más amplias y cubriendo al menos las mismas regiones génicas abarcadas en nuestro estudio, es necesaria para corroborar o descartar los hallazgos identificados.

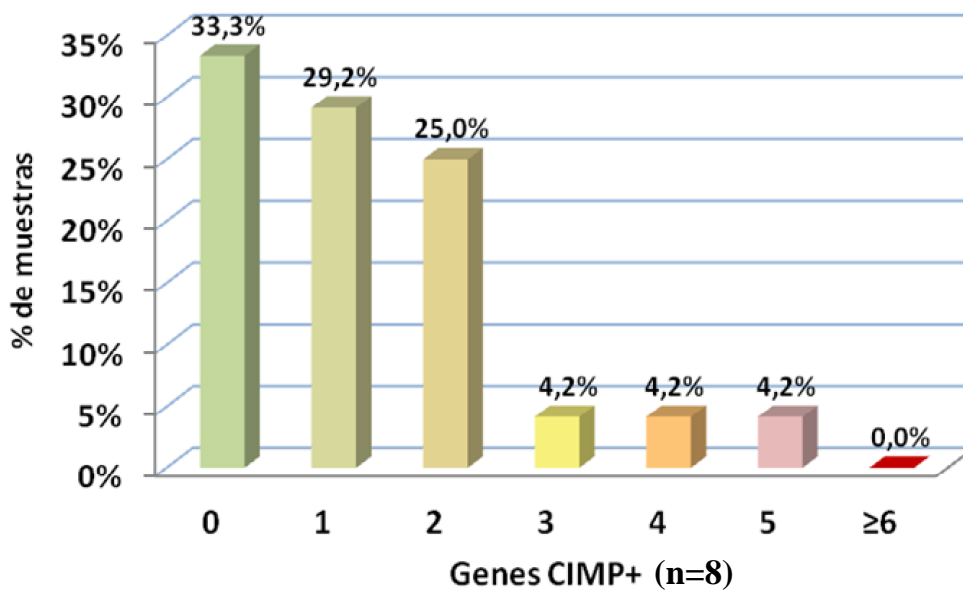
#### **B.4. El fenotipo metilador de islas CpG**

El fenotipo metilador de islas CpG (CIMP, del inglés *CpG island methylator phenotype*) es considerado como un mecanismo de adquisición de inestabilidad genómica independiente hacia el desarrollo tumoral, estando presente en el 11-23% de todos los tumores de CCR. Existe además una proporción de tumores del 23-40% donde existiría un fenotipo CIMP más suave, asociado a mutaciones en *KRAS* (Ogino et al., 2006). El estudio genético de los 16 tumores CCRFX mostró la inestabilidad cromosómica como mecanismo claro de generación de inestabilidad genómica. Sin embargo, una menor proporción de los casos CCRFX (1/16 en nuestro estudio) muestran patrones de inestabilidad cromosómica más suaves o incluso ausencia total de aberraciones cromosómicas, en consonancia con otros estudios (Abdel-Rahman et al., 2005; Middeldorp et al., 2011; Therkildsen et al., 2013). Una hipótesis es que el fenotipo CIMP en el CCRFX podría ser el mecanismo de inestabilidad genética en tumores con estabilidad cromosómica. Sin embargo, también podría estar presente en tumores con inestabilidad cromosómica como mecanismo adicional de inestabilidad genómica (Cheng et al., 2008; Pino y Chung, 2010).

En nuestro estudio, interrogamos el estado CIMP de una serie de 25 tumores CCRFX mediante el análisis de la metilación de ocho genes representativos del fenotipo global: *CACNA1G*, *CDKN2A*, *CRABP1*, *IGF2*, *MLH1*, *NEUROG1*, *RUNX3* y *SOCS1*.

Un total de 22 de los 24 casos interpretables (91,7%) mostraron bajos niveles de metilación ( $\leq 3$  genes metilados) (Figura 27). En líneas generales, los tumores CCRFX no muestran fenotipo CIMP (CIMP-), aunque se encontró un nivel constante de metilación basal en la mayoría de muestras o incluso moderado en una pequeña proporción. Estos resultados van en línea con los obtenidos por Goel y colaboradores, donde ninguno de los tumores CCRFX analizados mostró fenotipo CIMP (CIMP+) aunque la mayoría era portador de un nivel moderado de metilación basal generalizada (Goel et al., 2010). Este patrón de metilación moderada fue también identificado en series de tumores de SL y de CCR esporádico sin defectos en el sistema MMR, donde una pequeña proporción de casos fue clasificada como CIMP+. Únicamente el grupo tumores esporádicos con inestabilidad de microsatélites mostró una proporción significativa de casos CIMP+. (Goel et al., 2010)





**Figura 27.** Frecuencia de tumores CCRFX en función del número de genes cuyo promotor indicó metilación positiva de islas CpG.

Un reciente estudio en el que se analizó el estado CIMP de 23 tumores CCRFX clasificó su estado de metilación como CIMP-, baja-CIMP y CIMP+, en proporciones cercanas a un tercio para cada grupo (Sánchez-Tomé et al., 2014). Estos resultados discreparían con los descritos en nuestra serie, donde la fracción de casos con metilación moderada (4-5 genes metilados) representa menos del 10% del total, sin encontrarse casos con un patrón claro de CIMP+. Es posible que el estudio de Sánchez-Tomé y colaboradores haya establecido un bajo porcentaje de metilación para considerar un promotor como metilado, o que el pequeño tamaño de las series haya podido concentrar muestras de subgrupos específicos en alguno de los estudios. El estudio de la metilación CIMP en series adicionales de tumores CCRFX ayudará a acotar la proporción real de casos CIMP+ presentes en esta entidad.

El fenotipo CIMP, tal y como se explica en el apartado 3.b.III de la introducción, suele ir ligado a rasgos moleculares como la mutación de *BRAF* V600E o fallos en el sistema reparador MMR. (Nosho et al., 2008a). La EMS ligada a la propia definición del CCRFX así como la mínima proporción de casos mutados para *BRAF* van en consonancia con la ausencia de CIMP en estos tumores.

En nuestra serie, la única muestra que mostró ausencia de inestabilidad cromosómica clara (con dos grandes cambios cromosómicos) no pudo evaluarse en su fenotipo CIMP por no disponer de suficiente ADN tumoral. Sin embargo, no mostró mutaciones en *BRAF* ni en *KRAS*, lo que *a priori* no hace sospechar en un fenotipo metilador positivo. Por otro lado, las dos muestras CCRFX con niveles moderados de CIMP presentaron mutaciones en *KRAS*, una de ellas en homocigosis (la única con esta condición identificada en el estudio). Esto encajaría con el fenotipo de CIMP suave asociado a mutaciones en *KRAS* (Nagasaka et al., 2008; Ogino et al., 2006). En cierta manera, algo similar se describe en el estudio de Sánchez-Tomé, donde 2/7 tumores CIMP+ están mutados en *BRAF*, de

manera que 3 de los 5 restantes lo hacen para *KRAS* (Sánchez-Tomé et al., 2014). Considerando de nuevo nuestro estudio, una de las dos muestras de CIMP-moderado identificadas fue analizada en el *array* de número de copia, mostrando un patrón de alta inestabilidad cromosómica. Esto indicaría la presencia de mecanismos de inestabilidad genética simultáneos en un mismo tumor CCRFX. (Cheng et al., 2008)

La literatura describe una proporción del 5-25% de casos con CIMP en los CCR esporádicos sin defectos en el sistema MMR (Samowitz et al., 2005b; Noshó et al., 2008a; Ogino et al., 2008; Barault et al., 2008). En cierto modo, esta proporción resultaría bastante similar –algo superior en base a nuestros datos– a la descrita para el conjunto de casos CCRFX estudiados en la literatura. La aparición de este mecanismo en los casos esporádicos se ha asociado a la acción de mutágenos ambientales (Samowitz et al., 2006; Wallace et al., 2009). Es por tanto posible que algunas de las familias CCRFX que incluyan fenocopias de CCR esporádico (o simplemente surjan por concentración de casos de CCR esporádico) puedan aportar casos CIMP+ al conjunto de tumores CCRFX. En base a la identificación de tumores CCRFX con fenotipo CIMP+ e inestabilidad cromosómica de forma simultánea, es también plausible pensar que en algunos casos se haya podido desencadenar el mecanismo CIMP+ (por ejemplo, por la acción de mutágenos) independientemente de la causa genética germinal intrínseca a su naturaleza CCRFX.

Adicionalmente a la metilación de islas CpG, el estudio de metilación de los elementos *LINE* –representativo del estado general de metilación del genoma (Kitkumthorn et al., 2012; Yang et al., 2004)– en diferentes tipos de tumores ha mostrado niveles menores de metilación en el grupo CCRFX respecto a los casos de CCR esporádicos (independientemente de su estatus en el sistema MMR) y el SL (Goel et al., 2010; Pavicic et al., 2012). Estos resultados sugerirían la presencia de un mecanismo hereditario adicional ligado a este rasgo específico de los tumores CCRFX. Esta característica queda pendiente de análisis en nuestra serie de tumores CCRFX.

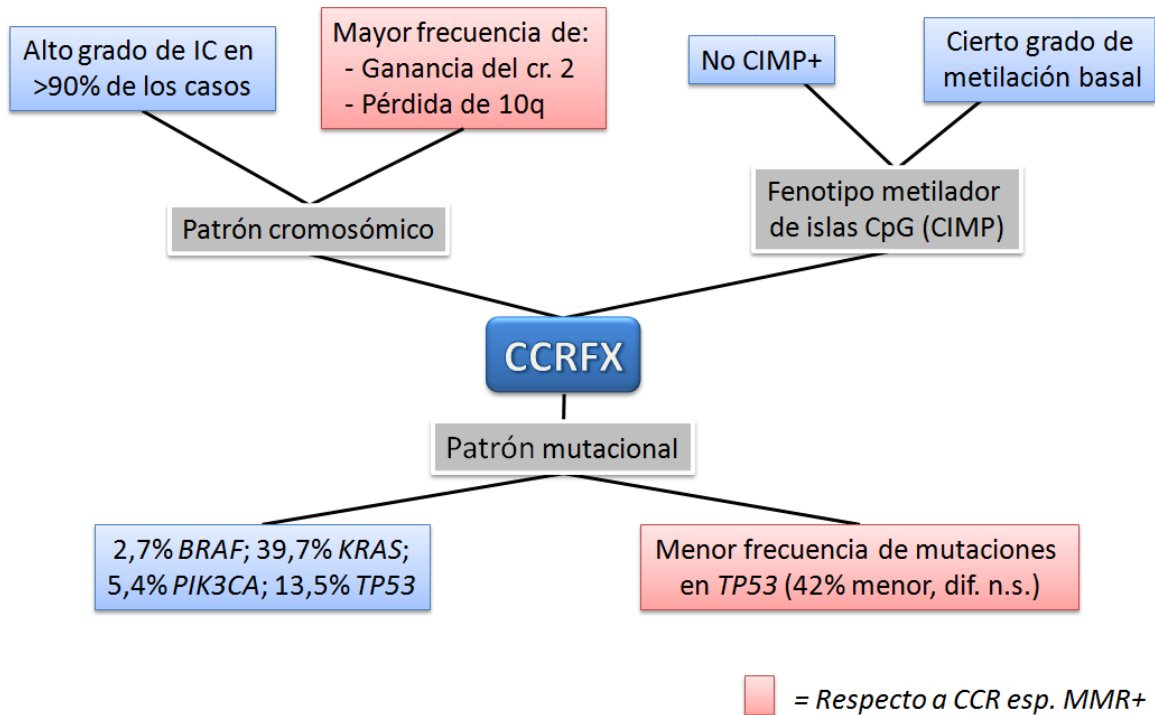
En conclusión, en base a nuestro estudio y los datos descritos en la literatura, podemos considerar el CIMP no es un mecanismo de inestabilidad genómica frecuente en el CCRFX. Sin embargo, puede encontrarse un cierto nivel basal de metilación de islas CpG de forma general. Este nivel basal, potencialmente ligado a mutaciones en *KRAS* y *BRAF* como sucede en los casos esporádicos, ocurriría de forma concomitante a la inestabilidad cromosómica.

### **B.5. El perfil molecular de los tumores CCRFX**

En base a los datos obtenidos en nuestro estudio, podemos resumir las características moleculares más relevantes de los tumores CCRFX en la Figura 28.

El estudio corrobora la gran similitud molecular existente entre los tumores CCRFX y el CCR esporádico sin defectos en el sistema MMR. Las diferencias identificadas en el patrón mutacional y de número de

copia cromosómica, así como la confirmación de la ausencia de fenotipo CIMP en los tumores CCRFX ayudará a una mejor caracterización de esta forma sindrómica.



**Figura 28. Principales características de los tumores CCRFX (azul) y diferencias respecto a los tumores CCR MMR+ esporádicos (rojo) identificadas en este estudio.** cr = cromosoma; dif n.s. = diferencias no significativas.

La presuposición de vías moleculares comunes en los tumores CCRFX y de CCR esporádico MMR+ –en base a los resultados obtenidos– implicaría que el valor pronóstico de marcadores tales como las mutaciones en *KRAS*, el cambio V600E en *BRAF* o la pérdida del brazo 18q tendría una interpretación similar en ambos grupos. Sin embargo, las diferencias identificadas entre ambos grupos indicarían la presencia de ciertos mecanismos particulares en determinados pacientes con CCRFX, probablemente ligados a la causa genética del síndrome. Estos rasgos específicos discordantes podrían ser de utilidad en la identificación de la causa genética de la agregación de CCR en las familias CCRFX.

## C. EVALUACIÓN GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA DEL SÍNDROME DE CCR Y POLIPOSIS ASOCIADO A LA ACTIVIDAD REPARADORA DE LA POLIMERASA

### C.1. Contextualización y planteamiento del estudio.

Recientemente, la secuenciación genómica en 18 pacientes provenientes de 13 familias que habían desarrollado más de 5-10 adenomas a la edad de 60 años (8 de ellos también habían padecido CCR) sin portar mutaciones germinales en *APC*, *MUTYH* o fallos en el sistema MMR, permitió identificar dos mutaciones en los dominios exonucleasa de *POLE* c.1270C>G (p.Leu424Val) y *POLD1* c.1433G>A (p.Ser478Asn) como la causa de su fenotipo patogénico (Palles et al., 2013). El genotipado posterior de estas dos posiciones en una serie de más de 3800 pacientes con poliposis y/o CCR (con alta presencia de casos de CCR familiar y/o de aparición temprana) logró identificar la mutación *POLE* p.L424V en 12 familias adicionales, mientras que *POLD1* p.S478N se encontró en una familia más. Además, se observó que un individuo secuenciado en un estudio previo, proveniente de una familia con un largo historial de CCR y poliposis, era también portador del cambio *POLD1* p.S478N. El estudio de la mutación en esta familia mostró cosegregación positiva con el fenotipo patogénico. De forma adicional, el dominio exonucleasa de ambos genes fue secuenciado en una serie de 469 casos con adenomas colorectales múltiples y/o CCR familiar. Esto condujo a la identificación de tres nuevas variantes en *POLD1*, de las que c.981C>G (P327L) mostró una potencial participación en el fenotipo polipósico de su portadora, aunque este papel no pudo ser demostrado. A pesar de que el efecto de este tipo de mutaciones ya había sido estudiado en modelos de ratón y levadura (Palles et al., 2012; Morrison et al., 1993; Albertson et al., 2009), ésta fue la primera ocasión en la que encontró una asociación clara entre mutación y predisposición a CCR en humanos. A este síndrome se le ha denominado “síndrome asociado a la actividad reparadora de la polimerasa” (SAARP).

Debido al gran impacto de este descubrimiento, nuestro grupo realizó el estudio de las dos mutaciones recurrentes *POLE* c.1270C>G (p.Leu424Val) y *POLD1* c.1433G>A (p.Ser478Asn) en una serie constituida por 581 casos con CCR familiar y/o de aparición temprana, 86 casos con CCR y alteraciones germinales en el sistema MMR, y 191 casos con poliposis (Valle et al., 2014b, adjunto en *Anexos*). Ésta fue la primera búsqueda de casos adicionales de SAARP tras el estudio inicial por Palles y colaboradores. El genotipado dirigido de *POLE* p.L424V y *POLD1* p.S478N o la secuenciación del exón afectado por la mutación en una fracción de los casos, permitió la identificación de *POLE* p.L424V (mutación de *novo*) en un individuo con poliposis, diagnosticado además de CCR y oligodendroglioma anaplásico a los 28 y 30 años de edad respectivamente. Por otro lado, la secuenciación de los exones afectados por las dos mutaciones en una fracción de los casos, permitió la detección de un nuevo cambio genético hasta ahora no identificado, *POLD1* p.L474P, en una familia que cumplía los criterios de Ámsterdam II. Ésta fue la primera ocasión en la que se identificaba tanto una mutación *de novo* como una mutación en una familia Amsterdam (CCR no polipósico) en el SAARP.

El genotipado de *POLE* p.L424V y *POLD1* p.S478N en 1188 casos índice de CCR familiar y poliposis de una serie holandesa permitió la identificación de tres individuos no relacionados portadores del cambio *POLE* p.L424V (en una de ellas generada *de novo*), identificando por primera vez tumores con IMS en el contexto del SAARP (Elsayed et al., 2014).

Recientemente, Spier y colaboradores llevaron a cabo la secuenciación exónica completa de los genes *POLD1*, *POLD2*, *POLD3*, *POLD4*, *POLE*, *POLE2* y *POLE3*, –los cuales forman los complejos de las polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$ – en una serie de 266 pacientes no relacionados con poliposis o que cumplían los criterios de Ámsterdam I/II. Se identificaron cuatro familias portadoras de la mutación *POLE* p.L424V. En todas ellas había al menos un caso de CCR diagnosticado antes de los 40 años y presencia de poliposis. Por otro lado, nueve mutaciones adicionales fueron detectadas en *POLE*, *POLD1*, *POLE2* y *POLD3* con diversas sospechas de patogenicidad (Spier et al., 2014).

Además, un estudio centrado en la secuenciación de 50 pacientes con CCR identificó la delección de dos pares de bases *POLE* c.5621\_5622delGT en un paciente diagnosticado con CCR a los 26 años de edad (Smith et al., 2013). Debido a la falta de datos relativos a la cosegregación de la variante con la enfermedad, la ausencia de estudios funcionales, así como lo atípico del tipo de mutación dentro del conjunto de variantes relacionadas con el SAARP, no fue posible concluir acerca de la influencia de *POLE* c.5621\_5622delGT en el temprano desarrollo de CCR del paciente.

El reciente descubrimiento del SAARP y la existencia de pocos casos identificados dificultan el diseño de unos criterios para la identificación de pacientes portadores ligados a este síndrome. El fenotipo asociado a día de hoy al SAARP es amplio, solapándose en muchos puntos con el descrito en otros síndromes como la poliposis familiar atenuada, la poliposis asociada a mutaciones en *MUTYH*, o el SL. Por ello, la identificación de portadores de mutación adicionales es clave para mejorar la caracterización de este síndrome y poder establecer así unas recomendaciones de selección de familias candidatas a ser analizadas. Además, la descripción exhaustiva del fenotipo asociado ayudará a establecer un protocolo de seguimiento clínico en individuos portadores de mutaciones en *POLE* y *POLD1*.

En el trabajo que se presenta en esta tesis, planteamos la secuenciación del dominio exonucleasa de los genes *POLE* y *POLD1* en 456 pacientes (pertenecientes a 441 familias) con CCR familiar sin fallos en el sistema MMR y en 88 pacientes con poliposis no relacionados. Hasta la fecha, este es el estudio con mayor número de casos de cáncer colorrectal hereditario no polipósico en el que el dominio exonucleasa de ambos genes ha sido secuenciado. La serie estudiada (con muy leves variaciones) ya había sido genotipada para las posiciones *POLE* p.L424V y *POLD1* p.S478N en nuestro estudio anterior (Valle et al., 2014b), identificándose la mutación *POLE* p.L424V en el individuo con poliposis, CCR y oligodendroglioma anaplásico anteriormente mencionado.

## C.2. Variantes identificadas en *POLE* y *POLD1* y características fenotípicas de los portadores.

Mediante la secuenciación del dominio exonucleasa de *POLE* y *POLD1* en nuestra serie identificamos seis nuevas mutaciones en *POLD1*, aunque ninguna mutación adicional fue encontrada en *POLE* (únicamente se confirmó la presencia de p.L424V para el caso ya identificado en nuestro estudio anterior). De las estas seis nuevas mutaciones en *POLD1*, cuatro; p.D316H, p.D316G, p.R409W y p.L474P, mostraron evidencias significativas de conllevar un efecto deletéreo: los cinco programas de predicción de impacto sobre la función proteica coincidieron en asignar un papel dañino para las cuatro variantes. Además, se había descrito previamente que mutaciones en los residuos homólogos a p.D316 y p.L474 en *POLD1* de *Saccharomyces cerevisiae* (*Pol3*) generaban un fenotipo hipermutante (Kokoska et al., 2000; Murphy et al., 2006). El cambio p.R409W mostró un efecto desestabilizador en los tres programas *in silico* de evaluación de estabilidad estructural de la proteína utilizados.

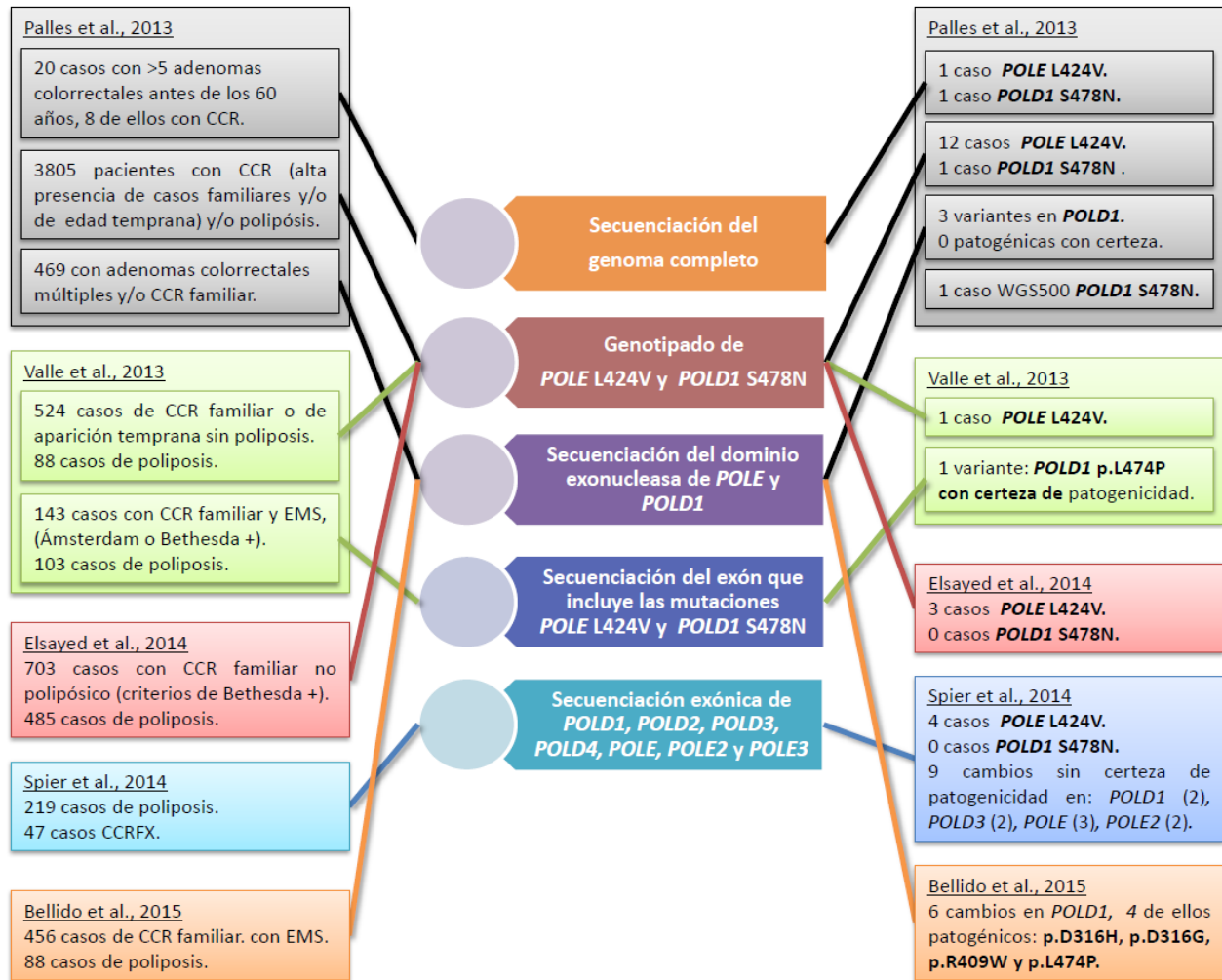
Por otro lado, las variantes p.V295M y p.R521Q, descritas previamente con frecuencias alélicas poblacionales  $\leq 0.00035$  restan aún pendientes de clasificar. Es importante destacar sin embargo, que el cambio p.V295M (situado fuera del dominio exonucleasa, aunque muy próximo a él), de muy baja frecuencia en población general ( $MAF_{ESP}=0,0003^1$ ) se encontró en dos casos independientes. Uno de estos casos correspondió a una paciente diagnosticada con cáncer de endometrio y dos cánceres de mama sincrónicos y que también era portadora del cambio p.D316G (considerado patogénico). La presencia simultánea de estas dos variantes, situadas en *trans*, podría ser la causa de este fenotipo tan agresivo. De confirmarse la participación de p.V295M en el SAARP, éste sería el primer caso identificado con mutaciones bialélicas en los genes *POLE* o *POLD1*. Por otro lado, el cambio p.R521Q, a pesar de haber sido clasificado como un cambio neutral por algunos programas de predicción *in silico*, su baja frecuencia en población general ( $MAF_{ESP}=0,00035$ ), así como su situación dentro del dominio exonucleasa de *POLD1* hacen que no deba descartarse su implicación en el SAARP.

## C.3. Características fenotípicas del SAARP.

Tras completar la secuenciación de nuestra serie de casos, el siguiente objetivo fue realizar una descriptiva del cuadro clínico asociado al SAARP en base a los casos identificados previamente. Para ello, consideramos todos los casos descritos en la literatura con mutaciones claramente patogénicas en el dominio exonucleasa de *POLE* y *POLD1*. La figura 29 resume todos los estudios realizados, las muestras incluidas por serie, las zonas génicas cubiertas y las mutaciones patogénicas o con sospecha de patogenidad identificadas en cada estudio.

---

<sup>1</sup> MAF = frecuencia alélica menor, del inglés *minor allele frequency*. ESP 6500= NHLBI GO Exome Sequencing Project.

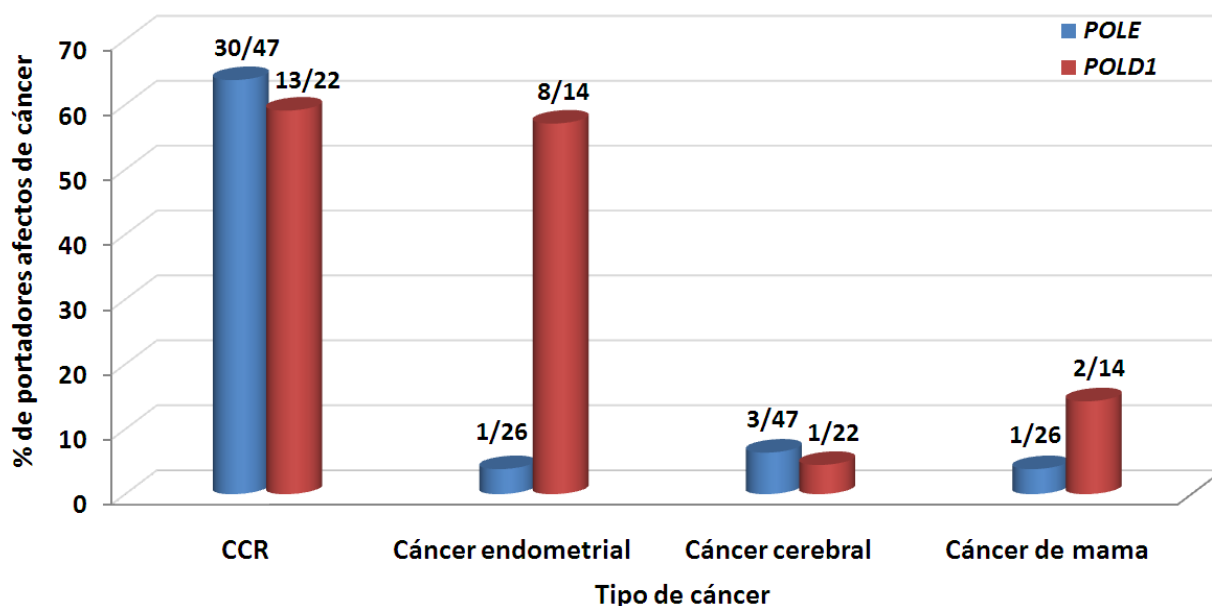


**Figura 29. Estudios que incluyen la búsqueda de casos de CCR y/o poliposis ligados al SAARP y mutaciones identificadas.** No se incluye el estudio de Smith y colaboradores (Smith et al., 2013) al no identificarse ninguna variante claramente patológica. El número de mutaciones identificado considera un único caso por familia. Abreviaturas: WGS500, *whole genome sequencing* 500.

C.3.a. Espectro de tipos tumorales asociados al SAARP.

El SAARP, en base a la primera descripción realizada por Palles y colaboradores (Palles et al., 2013) suele ser descrito como un síndrome de poliposis y CCR, con riesgo incrementado a cáncer de endometrio para *POLD1*. Sin embargo, existen otros tipos de tumores y fenotipos no ligados a la aparición de pólipos que aparecen de forma más o menos frecuente en individuos portadores. Para describir el fenotipo asociado al SAARP, realizamos una revisión bibliográfica de todos los portadores de mutaciones claramente patológicas en los dominios exonucleasa de *POLE* y *POLD1* descritos hasta el día de hoy, incluidos los casos indetificados en nuestro estudio, para evaluar su fenotipo asociado. Es importante destacar que, puesto que las series para el análisis de *POLE* y *POLD1* se configuran en base a la presencia de CCR, poliposis o el cumplimiento de los Criterios de Ámsterdam, los tipos tumorales identificados así como su frecuencia en portadores están fuertemente condicionados por este sesgo en

la selección muestral. La figura 30 recoge la frecuencia de diferentes tipos de cáncer hallados en el conjunto de portadores identificados.



**Figura 30. Porcentaje de pacientes portadores de mutaciones ligadas al SAARP afectados de los principales tipos de cáncer asociados a este síndrome.** Los datos relativos a cáncer endometrial y de mama se basan únicamente en mujeres portadoras.

Centrando la atención en el CCR, encontramos frecuencias muy similares (59-64%) entre los portadores de mutaciones en *POLE* y *POLD1*. Es importante destacar que la totalidad de los portadores no afectados de CCR (21/21) han requerido la aplicación de polipeptomías preventivas, por lo que se intuye que la penetrancia de CCR pueda ser muy elevada.

Un hecho a destacar es la desigual frecuencia de cáncer de endometrio identificada en portadoras según el gen alterado: 3,9% para *POLE* frente al 57,1% para *POLD1*. A pesar del limitado número de familias con SAARP analizadas hasta la fecha, la diferencia en la incidencia entre ambos genes es notoria. Mientras que el papel de *POLD1* en el riesgo de cáncer de endometrio es evidente, estudios adicionales serán necesarios para corroborar la existencia de un incremento de riesgo ligado a la presencia de mutaciones en *POLE*. Este hecho muestra, al igual que sucede en el Síndrome de Lynch, la existencia de consecuencias variables dentro de una misma forma sindrómica en función del gen dañado (Senter et al., 2008; Ten Broeke et al., 2015).

Existen otros tipos de cáncer descritos en pacientes con SAARP donde la baja frecuencia de casos impide concluir acerca de riesgos asociados a este síndrome. La asociación del SAARP con un incremento de riesgo a cáncer de mama se apoya en la existencia de 3 casos en un total de 40 portadoras identificadas (3/40=7,5%), siendo la incidencia superior cuando el gen afecto es *POLD1* (2/14=14,3%) respecto a cuándo lo es *POLE* (1/26=3,85%). La presencia de un caso diagnosticado a



edad joven (42 años) y otro bilateral apoyarían la influencia del SAARP en el desarrollo de esta neoplasia. Sin embargo, teniendo en cuenta que el riesgo de cáncer de mama en la población general se sitúa en torno al 12%, la relación del SAARP y el aumento de riesgo a este síndrome debe ser necesariamente estudiada en mayor profundidad. Una posibilidad sería el estudio de una serie de familias con casos de cáncer de mama y poliposis y/o CCR. La identificación de portadoras con en una frecuencia mayor de la esperada por azar sería indicativa del aumento de riesgo al cáncer de mama ligado al SAARP.

Por otro lado, existen cuatro casos de tumores cerebrales (4/69=5.8%) identificados en pacientes con mutaciones en *POLE* (3/47=6.4%) y *POLD1* (1/22=4.5%). La agresividad como rasgo común de todos los fenotipos descritos (todos los pacientes fueron diagnosticados entre los 16-41 años, dos de ellos con dos tumores cerebrales sincrónicos) apunta hacia la influencia del SAARP en el desarrollo de estos tumores. La escasez de datos disponibles requiere la identificación de familias afectas adicionales para validar esta observación.

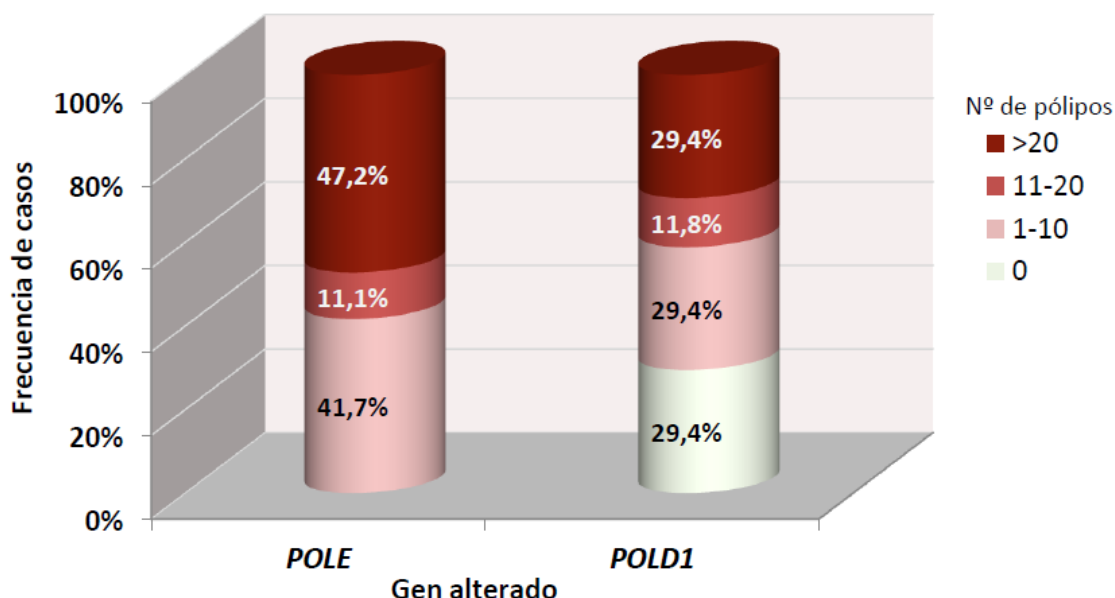
Es importante destacar además, que la práctica de gastroduodenoscopias en 14 portadores de mutaciones en *POLE* (Spier et al., 2014) mostró una elevada tasa de adenomas (7/14), además de carcinoma en uno de los casos sin adenomas (Spier et al., 2014). A pesar de que la incidencia de tumores gastrointestinales más allá del CCR es baja en el SAARP, este hallazgo ha de tenerse en cuenta a efectos preventivos. A su vez, sería importante la realización de gastroduodenoscopias en portadores de mutaciones en *POLD1*, de cara a definir riesgos para este gen en este mismo sentido.

### C.3.b. La penetrancia y naturaleza de la poliposis colorrectal en el SAARP.

En base al fenotipo de los primeros casos reportados por Palles y colaboradores (Palles et al., 2013), el SAARP fue asociado, además de a un incremento de riesgo a cáncer, a la presencia de pólipos colorrectales (Palles et al., 2013). Sin embargo, los sucesivos estudios realizados también identificaron individuos portadores sin pólipos, incluso en presencia de CCR. Considerando el total de portadores de SAARP identificados hasta la fecha, se han descrito rangos de 1 a >100 pólipos para portadores de mutaciones en *POLE* y de 0 a 45 pólipos para los de *POLD1*. Agrupando el número de pólipos por rangos (Figura 31), *POLD1* muestra una mayor proporción de casos no polipósicos/oligopolipósicos, mientras que *POLE* comprende un mayor número de casos con poliposis más pronunciadas.

La identificación de nuevos casos junto al estudio de las bases moleculares del SAARP será clave para comprender el porqué de esta cierta variabilidad en la expresión polipósica entre portadores. Una posible explicación podría ser la acción de modificadores tanto genéticos como ambientales (tal y como sucede en otros síndromes, como el SL). La condición de hipermutabilidad ligada al SAARP podría ser la causa de dicha variabilidad fenotípica: las mutaciones somáticas fijadas fruto del fallo de la capacidad reparadora de la polimerasa podrían estar alterando vías diferentes en función de los genes afectados, derivando en fenotipos variables. La presencia de mutaciones somáticas en genes de importancia en el mantenimiento del colon en fases tempranas del desarrollo embrionario podría estar predisponiendo a

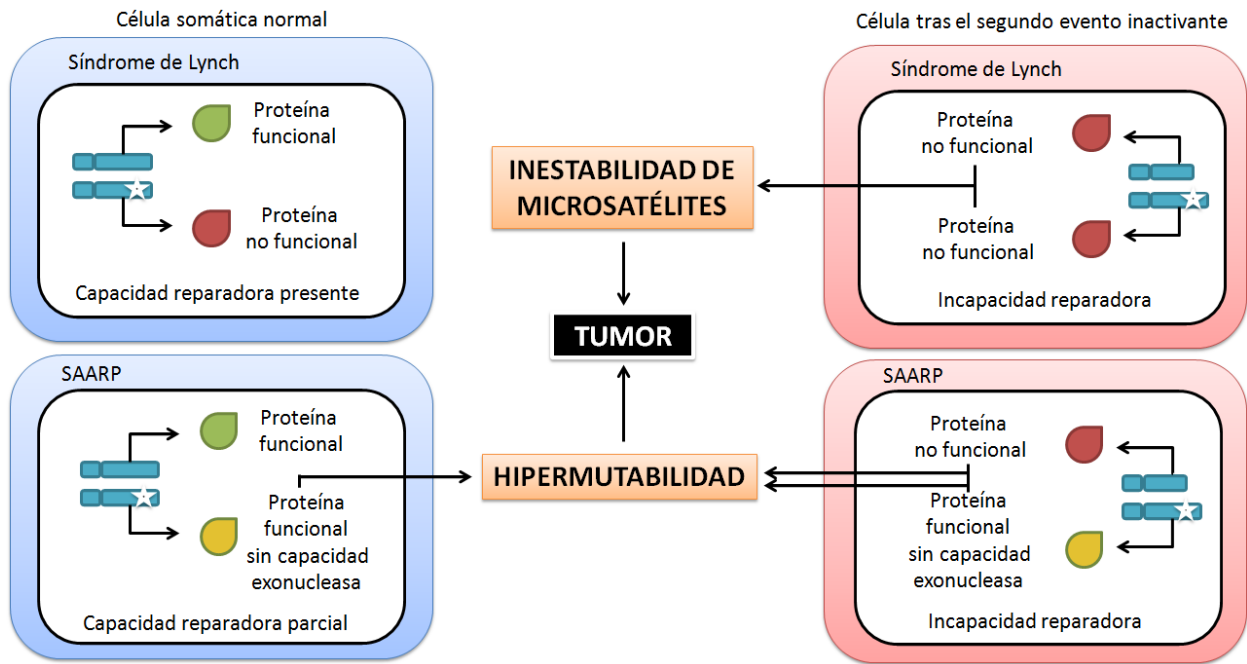
una forma concreta y específica de CCR a cada individuo. Esta variabilidad inter- e intraindividual podría explicar el porqué de ciertos fenotipos particulares dentro de familias concretas (tanto a nivel polipósico, como de tipos de cáncer concretos). Otra posibilidad es que existan mutaciones heredadas derivadas del efecto de la SAARP en generaciones anteriores. Esto podría crear un *background* o fondo mutacional específico que explicase fenotípicos específicos familiares en el SAARP.



**Figura 31. Frecuencia de portadores de SAARP en función del número de pólipos colorrectales identificados.** Únicamente se incluyen aquellos casos que indican un número o rango específico de pólipos detectados (*POLE*= 36 muestras, *POLD1* = 17 muestras). Una y cuatro muestras de *POLE* y *POLD1* no fueron incluidas en el gráfico al indicarse únicamente la presencia de “múltiples pólipos”.

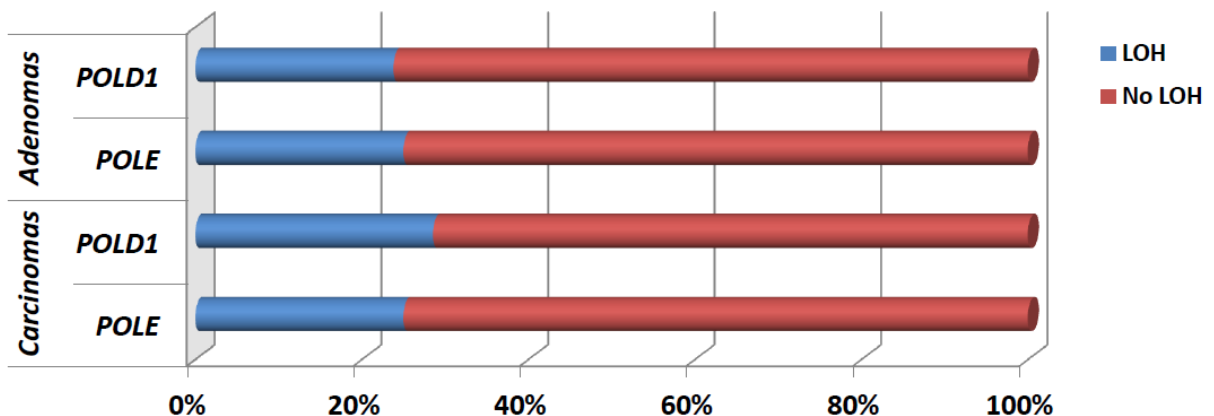
#### C.4. Características moleculares de los tumores desarrollados en el contexto del SAARP.

Tanto el SAARP como el SL son síndromes autosómicos dominantes causados por mutaciones germinales en genes con función reparadora de errores en el ADN. En el SL, la incapacidad reparadora llega con la inactivación de la copia funcional del gen mutado. Sin embargo, el incremento mutacional del SAARP se debe a la presencia de proteína capaz de formar el complejo polimerasa, pero sin capacidad reparadora: Un único alelo mutado es suficiente como para que aproximadamente la mitad de la actividad exonucleasa de Pol  $\delta$  y  $\epsilon$  no sea capaz de corregir adecuadamente los errores generados. La presencia de un segundo evento inactivante del alelo salvaje supondría una incapacidad correctora mayor (cuyo impacto sobre el riesgo de CCR se desconoce a día de hoy), pero no es requisito para que se produzca un aumento basal del ratio mutacional – al contrario de lo que sucede en el SL– (Figura 32).



**Figura 32. Comparativa de los mecanismos de generación de inestabilidad genómica del SAARP y el SL en función de la presencia o ausencia de un segundo evento inactivante del alelo salvaje.** La figura pone de manifiesto como en el SAARP, a diferencia del SL, el aumento de la inestabilidad genómica es independiente de la presencia de un segundo evento inactivante del alelo salvaje.

Para evaluar el impacto del LOH en el desarrollo tumoral del SAARP, planteamos el análisis del estado de la copia *salvaje* en seis tumores con mutaciones germinales en *POLD1*. De los cinco casos interpretables, cuatro mostraron ausencia de LOH, mientras que uno mostró la pérdida del alelo mutado. Añadiendo los datos disponibles en la literatura relativos a la presencia de LOH en la región (Palles et al., 2013; Valle et al., 2014b), la frecuencia de éste fenómeno se sitúa en torno al 25% tanto en tumores como en adenomas para ambos genes (Figura 33). Sin embargo, sería relevante conocer si el alelo perdido es el alelo salvaje, lo que indicaría la inactivación total de la actividad exonucleasa. En nuestros tumores, esto no ocurre en ningún tumor analizado.



**Figura 33. Estatus LOH para *POLE* y *POLD1* en los adenomas y carcinomas analizados en portadores de SAARP.** La clasificación de LOH positivo considera la pérdida de un alelo del gen mutado independientemente del alelo perdido.

La similitud en la proporción de LOH entre adenomas y carcinomas para ambos genes sugeriría que se trata de un evento temprano en dicha progresión. Una hipótesis es que la pérdida del alelo salvaje incrementa notablemente la mutabilidad, aumentando la inestabilidad génica y favoreciendo así una transición adenoma-carcinoma más rápida. Sin embargo la falta de información acerca del alelo perdido imposibilita conocer el impacto real de este fenómeno en el SAARP.

En términos de evaluación de la LOH, es importante considerar además que otros mecanismos de inactivación alélica restarían por ser estudiados, tales como la metilación del promotor y la existencia de mutaciones somáticas deletéreas. Este último mecanismo podría ser de gran relevancia, puesto que debido al fenotipo hipermutante ligado al SAARP, la probabilidad de encontrar mutaciones somáticas como *segundo evento* podría ser mucho mayor que en otros síndromes.

Por otro lado y en base al estado MMR de los tumores SAARP, los primeros casos identificados por Palles y colaboradores mostraron EMS en todos los tumores y adenomas analizados. Sin embargo, más adelante fue confirmada la presencia de IMS en tres CCR desarrollados por portadores del cambio *POLE* p.L424V (Elsayed et al., 2014), siendo los únicos tumores con IMS ligados al SAARP identificados hasta la fecha. Esta IMS es consecuencia de mutaciones somáticas en los genes MMR, lo cual es perfectamente compatible con el fenotipo hipermutante ligado al SAARP. Además, un estudio mutacional de tumores de CCR ya había revelado una alta frecuencia de mutaciones simultáneas en *POLE* y en los genes MMR (Yoshida et al., 2011).

#### **C.5. Recomendaciones para la selección de familias candidatas a estudio de *POLE* y *POLD1* y para el seguimiento en portadores.**

En base a las características fenotípicas de los portadores descritos hasta la fecha, se establecieron unas recomendaciones provisionales para identificar a aquellos pacientes y familias sospechosos de padecer SAARP. La diversidad fenotípica asociada a este síndrome, así como su solapamiento con los rasgos propios de otras formas de CCR hereditario (PAF atenuada, poliposis asociada a *MUTYH* y el SL) (Jasperson et al., 1998; Nielsen et al., 2011; Grover et al., 2012) limita notablemente la capacidad de crear unos criterios con alta especificidad: muchas de las familias seleccionadas serán también candidatas al testado genético asociado de otros síndromes de CCR. La aplicación de paneles de genes en el diagnóstico genético del cáncer familiar (que permiten testar varios genes ligados a la susceptibilidad a diferentes tipos de cáncer hereditario) ya está comenzando a aliviar el problema de los fenotipos solapantes (Domchek et al., 2013; Walsh et al., 2010). Las recomendaciones de selección propuestas se basan en los criterios utilizados en el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (Criterios de Bethesda modificados), aunque adaptadas a las particularidades propias del SAARP (Tabla 19).

**Tabla 19. Recomendaciones para la selección de casos a estudio genético de *POLE* y *POLD1*.** Además de las indicaciones recomendadas, la presencia de tumores cerebrales y/o de mama en el contexto de CCR, poliposis y/o CE podría ser un indicador de SAARP

<b><i>POLE</i></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poliposis adenomatosa atenuada (20-100 adenomas).</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cumplimiento de los criterios de Ámsterdam I.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• CCR y oligopoliposis (5-20 adenomas), ambos diagnosticados antes de los 50 años.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• CCR u oligopoliposis (5-20 adenomas) y un pariente de primer grado diagnosticado de CCR antes de los 50 años.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• CCR u oligopoliposis (5-20 adenomas) y dos o más parientes de primer o segundo grado diagnosticados de CCR a cualquier edad.</li> </ul>
<b><i>POLD1</i></b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Poliposis adenomatosa atenuada (20-100 adenomas).</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cumplimiento de los criterios de Ámsterdam II (sólo para CCR y CE).</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• CCR antes de los 50 años o CE antes de los 60 años, y oligopoliposis (5-20 adenomas) diagnosticados antes de los 50 años.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• CCR o CE o oligopoliposis (5-20 adenomas) y un pariente de primer grado diagnosticado de CCR antes de los 50 años o de CE antes de los 60 años.</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• CCR o CE o oligopoliposis (5-20 adenomas) y dos o más parientes de primer o segundo grado diagnosticados de CCR o de CE a cualquier edad.</li> </ul>

Abreviaturas: CE, cáncer de endometrio.

Tan importante como identificar a las familias con SAARP, es establecer un eficiente programa de seguimiento clínico para los portadores de mutaciones en *POLE* o *POLD1*. A día de hoy, el riesgo asociado al SAARP no está lo suficientemente definido como para poder establecer recomendaciones de seguimiento estandarizadas. Mientras tanto, en base a las características de los portadores identificados, y a las semejanzas con el SL y las poliposis atenuadas causadas por mutaciones en APC o MUTYH, sugerimos la realización de colonoscopias cada 1-2 años y de gastroduodenoscopias cada 3 años, a partir de los 20-25 años, añadiendo el seguimiento del cáncer de endometrio a partir de los 40 años para los portadores de mutación en *POLD1*. Además, en base a la predisposición observada al cáncer de mama para este gen, podría sugerirse un adelanto en la edad de inicio y una mayor frecuencia en la realización de mamografías preventivas. Finalmente, tanto para portadores de mutaciones en *POLE* y *POLD1* debe tenerse en consideración a la posibilidad de un incremento en el riesgo a desarrollar tumores cerebrales.

## D. BÚSQUEDA DE GENES CAUSALES DEL CCRFX MEDIANTE SECUENCIACIÓN DE EXOMAS.

Aproximadamente la mitad de las familias que cumplen los criterios de Ámsterdam no presentan fallos en el sistema MMR, siendo su etiología desconocida. Estas familias han sido agrupadas en la categoría del CCRFX (Ver sección 7. de la Introducción). Numerosos esfuerzos han sido realizados con el objetivo de identificar las causas de la agregación de CCR presente en esta entidad. El análisis de ligamiento o la secuenciación de genes candidatos han sido algunas de las técnicas más utilizadas en este sentido. Sin embargo, el desarrollo de la secuenciación masiva en paralelo o de siguiente generación (NGS, del inglés *next-generation sequencing*) ha posibilitado que esta tecnología esté cobrando actualmente un gran protagonismo en la investigación de las causas del cáncer hereditario. Varios estudios se han centrado en el estudio del CCR familiar haciendo uso de la NGS (Esteban-Jurado et al., 2014; Gyfre et al., 2013; deRycke et al., 2013; Smith et al., 2013) o del CCRFX (Nieminen et al., 2014; Schulz et al., 2014), identificándose decenas de genes candidatos a explicar parte de la heredabilidad total de CCR presente en los casos estudiados (Ver capítulos 4.b.I –CCR familiar– y 7.d –CCRFX–).

### D.1. Selección de la familia y planteamiento del estudio.

La identificación de mutaciones en el dominio exonucleasa de *POLE* y *POLD1* como responsables del SAARP puso de manifiesto el éxito de la NGS en la identificación de las causas genéticas implicadas en el CCR familiar (Palles et al., 2013). Considerando además el éxito de esta técnica en la identificación de genes causales de enfermedades mendelianas, (Comino-Mendez et al., 2011, Ng et al., 2010, entre muchos otros), incluidas algunas formas de cáncer hereditario, nuestro grupo planteó su utilización para la búsqueda de las causas genéticas del CCRFX. Varias familias asesoradas por la unidad de consejo genético del Institut Català d'Oncologia que cumplían los criterios de Ámsterdam y que no mostraban fallos germinales en el sistema MMR fueron seleccionadas para su estudio.

Una de las cuestiones iniciales fue plantear la estrategia para interrogar la causalidad de la agregación de CCR en dichas familias. La(s) causa(s) genética(s) responsable(s) implicadas en el CCRFX puede(n) ser planteadas de cara a su estudio como “única” (como sucede con el sistema MMR en el SL) hasta “muy diversas”, donde cada gen mutado (o la acción conjunta de varios genes) explicaría una pequeña fracción del CCRFX. La caracterización molecular del CCRFX realizada en esta tesis mostró ciertos rasgos *uniformes* en esta entidad (inestabilidad cromosómica, ausencia de CIMP, baja tasa de mutaciones en *BRAF*, además de la estabilidad de microsatélites intrínseca a la propia definición del grupo) (Bellido et al., 2014). Sin embargo, la incapacidad de encontrar genes de moderada o alta penetrancia que expliquen una fracción importante de los casos CCRFX, hace sospechar de una gran heterogeneidad causal dentro del grupo (revisado por Ku et al., 2012; Valle, 2014). Por otro lado, dos estudios recientes centrados en el análisis de familias independientes pudieron identificar los genes *SEMA4A* y *RPS20* como potencialmente causales de la agregación de CCR en dichas familias mediante el uso combinado del análisis de ligamiento y la secuenciación exómica (Nieminen et al., 2014; Schulz et al., 2014). La búsqueda de mutaciones adicionales en otros casos de CCRFX identificó 2/57 y 0/25

cambios de interés para cada gen respectivamente, confirmando la heterogeneidad genética dentro del grupo.

Otros estudios basados en la secuenciación de exomas en el CCR familiar –sin considerar los criterios de Ámsterdam– han evaluado numerosos casos índice con la intención de buscar genes alterados en varias familias independientes. La identificación de un mínimo número de genes dañados en 2 ó 3 familias simultáneamente también pone de manifiesto la dificultad de encontrar nuevos genes que expliquen una porción importante del CCR familiar (Esteban-Jurado et al., 2014; Gylfre et al., 2013; DeRycke et al., 2013; Smith et al., 2013). En base a esta heterogeneidad consideramos como mejor opción el análisis individualizado de cada familia secuenciada. Para esta tesis, seleccionamos una de estas familias para el estudio de las causas genéticas ligadas a su agregación de CCR.

### **D.2. Selección de variantes candidatas.**

La secuenciación de exomas en ADN extraído de sangre periférica se realizó en tres familiares diagnosticados de CCR a los 65, 62 y 40 años. En base al modelo de herencia dominante propio del CCRFX, se seleccionaron aquellas variantes no comunes ( $MAF < 0.01$ ) presentes en los tres individuos secuenciados. La presencia de consanguinidad en la familia hizo poner especial atención en la posible presencia de homocigosis para la(s) variante(s) implicada(s) en el individuo más joven, fruto de esta consanguineidad.

El primer paso consistió en el cribado de la lista de variantes obtenidas. Para comenzar, se seleccionaron únicamente aquellos cambios no sinónimos e infrecuentes ( $MAF < 0.01$ ) localizados en exones o que afectaban a sitios canónicos de *splicing*. Esto resultó en un total de 42 variantes localizadas en 38 genes distintos, ninguna de las cuales se encontró en homocigosis en el paciente consanguíneo. Posteriormente, procedimos a clasificar dichas variantes en base a la patogenicidad del cambio producido, la función de los genes afectados y la presencia de indicios que relacionasen al gen afectado con un incremento de riesgo a cáncer general, o CCR. Las cinco mutaciones *BRF1* c.1459+2T>C, *BARD1* c.1099T>A (p.S367T), *CLCA1* c.1114G>A (p.A372T), *MXRA8* c.923-1G>C, y hsa-mir-578 n.-30G>A fueron seleccionadas en base su posible implicación en la susceptibilidad al CCR de la familia. Para arrojar luz acerca de esta implicación, y evaluar a su vez el impacto de estos genes en el CCRFX, se llevaron a cabo una serie de estudios adicionales. Estos incluyeron la realización de predicciones *in silico* acerca del impacto de cada mutación (sobre la estabilidad y la función proteica, además del *splicing*), la búsqueda de un segundo evento inactivante en tejido tumoral, el estudio de cosegregación en la familia y la búsqueda de mutaciones adicionales en otros afectos de CCR familiar o de aparición temprana.

### D.3. *BRF1*.

#### D.3.a Impacto de la mutación identificada y relevancia de *BRF1*

La mutación c.1459+2T>C de *BRF1* se sitúa en un sitio canónico donador de *splicing*. La amplificación de la región correspondiente en el ADNc de uno de los portadores reveló la pérdida del exón 13, suponiendo esto además la rotura del marco de lectura. *BRF1* es una subunidad del complejo ARN polimerasa III (Pol III). Esta enzima transcribe genes de vital relevancia en el desarrollo celular, los cuales se dividen en tres grupos. (Geiduschek et al., 2001; Canella et al., 2010; Moqtaderi et al., 2010; Dieci et al., 2013). La transcripción de los genes del grupo 1 (ARNr 5S) y 2 (todos los ARN de transferencia) requieren la unión al promotor del complejo TFIIB formado por la proteína TBP (proteína de unión a TATA-box), *BRF1* y *BDP1* (Wang et al., 1995; Mital et al., 1996).

*BRF1* juega además un papel crucial en la regulación de Pol III como parte del complejo TFIIB. La actividad de Pol III debe ser regulada en función de la necesidad de generar nuevas células o de detener la proliferación celular: Es mayor en la fase proliferativa de G1 y menor en S y G2 (Gottesfeld et al., 1994; White et al., 1995). Numerosos supresores tumorales tales como p53 (Crighton et al., 2003; Stein et al., 2002; Cairns et al., 1998; Chesnokov et al., 1996), PTEN (Woiwode et al., 2008), RB (Sutcliffe et al., 2000; Felton-Edkins et al., 2003a; White 1996), ARF (Morton et al., 2007), C-MYC (Kenneth et al., 2007), ERK (Felton-Edkins et al., 2003b) o la familia de proteínas *Pocket* de RB (Sutcliffe et al., 1999) regulan la actividad de Pol III a través de TFIIB. Otro ejemplo es la quinasa Polo-like, que regula la transcripción de Pol III a través de la unión directa y fosforilación de *BRF1* (Fairley et al., 2012). Es decir, *BRF1* estaría jugando un papel de supresor tumoral, en base a su participación de en la actividad y la regulación de la enzima Pol III.

#### D.3.b Búsqueda de mutaciones en *BRF1* en otras familias con CCR.

Debido a la relevancia de la mutación c.1459+2T>C en *BRF1*, el conjunto de exones de este gen fue secuenciado en una serie adicional de 156 casos índice de CCRFX y 441 casos índice de familias Bethesda. Seleccionamos aquellas variantes no descritas con anterioridad o con MAF<0,01. Como resultado se identificaron 9 mutaciones adicionales afectando a 10 pacientes distintos. Seis de las variantes correspondieron a mutaciones de cambio de sentido con predicción de daño proteico asociado. Por otro lado, el cambio c.1214C>G (p.P405R) fue predicho como modificador del *splicing* por los dos sistemas *in silico* utilizados, mientras que c.1516-4C>G (cerca de un sitio aceptor de *splicing*) y c.60\*C>G (NM\_001242790) (en la región 3' UTR de un transcrito menor de *BRF1*) no mostraron consecuencias relevantes en base a las predicciones *in silico* realizadas. De las nueve variantes identificadas, únicamente p.V75M figuraba en bases de datos públicas, mostrando una frecuencia muy baja (MAF<sub>dbSNP</sub>=0.0006<sup>2</sup>). Un hallazgo relevante fue la identificación de la misma mutación c. 35C>T

<sup>2</sup> dbSNP: Single Nucleotide Polymorphism database



(p.T12M) en dos familias independientes, lo que junto a su localización en un dominio funcional de la proteína (dedo de Zinc), apoyó el impacto funcional de dicha variante.

La evaluación de la presencia de pérdida de heterocigosidad (LOH, del inglés *loss of heterozygosity*) como mecanismo de inactivación del alelo salvaje se realizó en 11 tumores pertenecientes a 9 familias. En ninguno de los casos se encontró pérdida del alelo salvaje. A pesar de que los mecanismos de metilación del promotor o la presencia de mutaciones somáticas adicionales no fueron testados, la no identificación de LOH en ninguno de los tumores analizados –junto a la expresión de la proteína identificada en los 4 tumores estudiados mediante inmunohistoquímica– apoyó la haploinsuficiencia como mecanismo de actuación de *BRF1* en la susceptibilidad al CCR. Esto va en consonancia con estudios realizados en pez cebra (*Danio rerio*), en los que las proteínas ribosomales mostraron un papel supresor tumoral haploinsuficiente (Amsterdam et al., 2004; Lai et al., 2009). Debido a la vital importancia de *BRF1* en el funcionamiento de Pol III, es lógico pensar que la ausencia total de la proteína sea letal por conllevar la incapacidad proliferativa de la célula. Los estudios de Leal y colaboradores no encontraron ningún tumor en el que la expresión de *BRF1* estuviese totalmente perdida, lo cual apoya el papel indispensable de la proteína para la supervivencia celular (Leal et al., 2008). Análisis en diversas líneas celulares tampoco encontraron casos de pérdida total de expresión de *BRF1* (Cabarcas et al., 2008).

Sin embargo, cabe destacar que sí se han descrito mutaciones bialélicas en componentes de Pol III o de la maquinaria de procesamiento de los ARN de transferencia, las cuales se asocian con enfermedades neurológicas. Para *BRF1* se han identificado únicamente seis casos mutados en homocigosis (de edades que van desde los 18 meses a los 21 años), todos ellos ligados a fenotipos con anomalías esqueléticas, dentales y discapacidad intelectual. Ninguno de los pacientes presentó historia personal de cáncer. Es importante mencionar que las cuatro mutaciones identificadas en los pacientes homocigotos se sitúan en una región muy delimitada (entre los aminoácidos R223 y P292) que abarca el dominio ciclina 2 o sus proximidades (Borck et al., 2015). Debido a que se trata de mutaciones *missense* localizadas en una región muy específica, es posible que su presencia suponga alteraciones funcionales concretas, no necesariamente similares a las causadas por alteraciones más severas o situadas en otros dominios funcionales.

### D.3.c *BRF1* como supresor tumoral en la literatura.

Los estudios funcionales realizados por Leal y colaboradores apoyan de forma consistente el rol de *BRF1* como supresor tumoral (Leal et al., 2008). Mediante el silenciamiento parcial del gen en fibroblastos, observaron un detenimiento del proceso de senescencia celular. Este experimento, que también fue positivo para *BUB1*, –más tarde identificado como un gen de riesgo en el CCR familiar (de Voer et al., 2013)–, demostró la haploinsuficiencia de *BRF1* como un mecanismo capaz de evadir los sistemas de control celular pro-apoptóticos. En otro experimento de este mismo estudio, células en cultivo con expresión activa de RAS en forma oncogénica mostraron una tasa de crecimiento incrementada en un ~50% si co-expresaban ARNs anti-sentido contra *BRF1*. Además, Leal y

colaboradores crearon células que expresaban ADNc potenciadores de la formación de *foci* – agrupaciones celulares– en combinación con RAS oncogénico. El número de foci quedaba drásticamente reducido –casi nulo– si *BRF1* se encontraba sobreexpresado.

Leal y colaboradores también analizaron la expresión de *BRF1* en diferentes tipos de cáncer. Niveles de expresión menores al 50% para *BRF1* fueron encontrados en 1/6 de los tumores de recto, mientras que los tumores de colon mostraron niveles medios de expresión de *BRF1* un 30% más bajo. Se identificó LOH en aproximadamente un 25% de los tumores de recto.

La desregulación de Pol III es un hecho frecuentemente identificado en cáncer (White et al., 2005; Daly et al., 2005), lo cual apoya el papel de supresor tumoral de las moléculas que, como *BRF1*, regulan la actuación de esta enzima. En base a esta desregulación de Pol III en procesos cancerosos, se ha observado que la excesiva presencia de determinados productos transcritos por esta enzima podría ser suficiente para inducir la progresión celular o incluso la iniciación tumoral (Marsall et al., 2008).

La sobreproducción de ARNr 5S podría ser uno de los mecanismos implicados de este crecimiento excesivo: La enzima Pol III transcribe el ARNr 5S, siendo éste el único ARN ribosomal que no es sintetizado por Pol I. El ARNr 5S es además la molécula limitante en la formación de los ribosomas. En la mayoría de tipos celulares, la cantidad de ARNm excede la capacidad ribosomal, lo cual otorga al ARNr 5S un papel clave en la regulación de la producción proteica, y por ende, en el crecimiento celular. Considerando que el 80-90% de la masa seca celular es proteína, la concatenación “niveles de ARNr 5S, producción proteica y crecimiento celular” podría estar jugando un papel importante en el desarrollo tumoral.

Por otro lado, las proporciones entre los diferentes ARNr están precisamente reguladas (Gomez-Herreros et al., 2013), habiéndose encontrado alteradas en cáncer. La identificación de una mutación truncante en *RPS20* (que codifica el componente S20 de la subunidad menor ribosomal) como probable causa de la agregación de CCR en una familia CCRFX apoya la relevancia del sistema ribosomal en el desarrollo del CCR (Nieminen et al., 2014). En este estudio, al igual que sucede en nuestra familia estudiada, no se identificó un segundo evento inactivamente del alelo salvaje.

En resumen, podemos afirmar que TFIIB condiciona la actividad de Pol III en base a señales recibidas a través de las vías de señalización regulatorias de la célula. Esto modula la entrada en fases de crecimiento celular, estabilización o incluso apoptosis, dependiendo de las necesidades de la célula en cada momento. Fallos en la capacidad de inhibir Pol III por la ausencia de alguno de los componentes de TFIIB, como es *BRF1*, podría contribuir a un crecimiento celular excesivo, y favorecer así la iniciación y/o progresión tumoral.

### D.4. *BARD1*.

#### D.4.1 Impacto de la mutación identificada y relevancia de *BARD1*.

La mutación c.1099T>A (p.S367T) identificada en la familia secuenciada no mostró un efecto deletéreo sobre la proteína tan claro como el cambio detectado en *BRF1*: mientras que las predicciones *in silico* de su impacto sobre la estabilidad estructural de la proteína sí mostraron un efecto desestabilizante, las predicciones del efecto de c.1099T>A sobre la función proteica no indicaron consecuencias deletéreas. Sin embargo, la reciente identificación de una mutación *sin sentido* como potencial causa de la agregación de CCR en una familia portadora (Esteban-Jurado et al., 2014), hizo que focalizásemos nuestra atención sobre esta variante. Además, la cosegregación de la variante con el caso de cáncer de mama se consideró de gran relevancia debido a la interacción directa de *BARD1* con la proteína *BRCA1*.

*BRCA1* es un conocido supresor tumoral cuya mutación germinal está ligada a un incremento de riesgo de padecer cáncer de mama o de ovario (riesgos del 65% y 39% respectivamente para la edad de 70 años) (Antoniou et al., 2003). *BARD1* codifica una ligasa ubiquitina-proteína que interacciona con la región N-terminal de *BRCA1*. Este dímero lleva a cabo la función reparadora de ADN mediante recombinación homóloga. La presencia de mutaciones germinales en *BARD1* ya ha sido relacionada con la predisposición al cáncer de mama y al de ovario (MIM# 601593) (Couch et al., 2015; Ratajska et al., 2012; De Brakeleer, et al., 2010;). El estudio de Esteban-Jurado antes mencionado, supuso el primer indicio consistente asociando mutaciones en *BARD1* con incremento de riesgo a CCR.

En base a las premisas anteriores, decidimos considerar la mutación c.1099T>A p.(S367T) en *BARD1* como un cambio de interés en la familia secuenciada.

#### D.4.2 Estudios adiciones realizados e interpretación de resultados.

En primer lugar, decidimos ampliar la búsqueda de mutaciones germinales en *BARD1* en 179 casos índice de CCRFX. La secuenciación exónica del gen identificó el cambio c.2000T>C (p.L667P) en una familia, el cual fue catalogado como deletéreo por todos los programas *in silico* de evaluación de impacto sobre la función proteica. Del mismo modo, los cuatro programas de predicción de estabilidad estructural coincidieron en asignar un efecto desestabilizante a la mutación identificada. Estudios de cosegregación o de LOH no pudieron ser realizados por falta de material disponible.

Además, tres cambios sinónimos infrecuentes: (MAF<sub>dbSNP</sub><0,003): rs368291318 (c.1152C>T; p.S384=), rs373257776 (c.1347A>G; p.Q449=) y rs147215925 (c.1977A>G; p.R659=), potencialmente alteradores del *splicing*, fueron identificados cada uno en una familia CCRFX. Debido a la falta de material disponible, el efecto real de estas variantes en la estructura final del ARN no pudo comprobarse experimentalmente. No obstante, el cambio c.1977A>G –identificado por múltiples algoritmos como causante de la transformación de una región potenciadora del *splicing* en otra silenciadora del *splicing*– ya había sido validado experimentalmente como causante de la pérdida de los exones 2-9 en el transcrito generado.

Sin embargo, el transcrito salvaje, aunque en menor proporción, también seguía generándose (Ratajska et al., 2012)

La búsqueda de un segundo evento inactivante para *BARD1* sólo pudo realizarse en la familia inicial, observándose una ausencia de LOH en los tres tumores analizados. Este resultado coincide con el identificado en la familia mutada en *BARD1* descrita por Esteban-Jurado (Esteban-Jurado et al., 2014). En base a estos resultados (a falta de comprobar la presencia de mutaciones somáticas inactivantes y el estado de metilación de las islas CpG del promotor del gen), la haploinsuficiencia parece ser el mecanismo de actuación de este supresor tumoral. Estudios en ratones *knock-out* para esta proteína mostraron letalidad embrionaria, lo cual apoyaría la inviabilidad celular en ausencia de *BARD1* y la haploinsuficiencia como mecanismo pro-tumoral (McCarthy et al., 2003).

#### D.5. *CLCA1*.

En el caso de *CLCA1*, la mutación c.1114G>A (p.A372T) identificada en la familia secuenciada mostró efectos neutrales *in silico* a nivel aminoacídico. Sin embargo, los dos sistemas de evaluación del impacto en el *splicing* mostraron indicios de alterar sitios reguladores de este proceso. A pesar de las numerosas pruebas realizadas, no pudimos comprobar experimentalmente esta posible alteración en el ARN debido a la incapacidad de amplificar adecuadamente la región de ADNc implicada. A pesar de ello, en base al papel de supresor tumoral sugerido en la literatura, y su elevada expresión en colon normal (Bustin et al., 2011; Yang et al., 2013b; Yang et al., 2015), decidimos extender la búsqueda de mutaciones germinales en nuestra serie de casos CCRFX. (n=151)

Como resultado de esta prueba, la mutación c.2305A>G (p.I769V) fue identificada en uno de los casos estudiados. Los programas *in silico* no predijeron efectos funcionales para la mutación identificada, aunque sí una potencial afectación del *splicing* (creando un sitio donador). En este caso, la falta de material nos impidió comprobar el efecto de dicho cambio en el ARN de los pacientes portadores. Sin embargo, la cosegregación de la mutación con los dos casos adicionales de CCR en la familia apoyó el papel relevante del cambio en la predisposición familiar a este tipo de cáncer.

El estudio de LOH en los 3 tumores de colon desarrollados por los portadores de la mutación en *CLCA1* de la familia inicial no mostró pérdida del alelo salvaje. Asimismo, la proteína correspondiente estaba conservada en los tumores (inmunohistoquímica).

En base al papel de *CLCA1* y los indicios existentes respecto a su potencial papel de supresor tumoral, consideramos que las variantes identificadas podrían estar contribuyendo con un potencial aporte de riesgo extra a la predisposición al CCR en ambas familias portadoras. La incapacidad de comprobar experimentalmente el efecto de estas variantes sobre el *splicing* supone la gran limitación en la evaluación de su impacto.

**D.6. Mutaciones somáticas en *BRF1*, *BARD1* y *CLCA1* en cáncer.**

La presencia recurrente de mutaciones somáticas en un determinado gen es indicativa de la relevancia de ese mismo gen en la progresión del tipo tumoral analizado. La base de datos COSMIC recoge las frecuencias mutaciones génicas clasificadas por tipo de tumor. La consulta para los genes *BRF1*, *BARD1* y *CLCA1* puede observarse en la Tabla 20.

**Tabla 20. Tipos de cáncer en los que la tasa de mutaciones somáticas en *BRF1*, *BARD1* y *CLCA1* supera la frecuencia de 0,5%.** Datos extraídos de la base de datos COSMIC v.72. Se destacan en negrita los tumores relacionados con síndromes de CCR familiar.

<i>BRF1</i>		<i>BARD1</i>		<i>CLCA1</i>	
Endometrio	2,50%	CCR	2,77%	Piel	3,74%
Estómago	2,13%	Estómago	2,30%	CCR	3,43%
CCR	1,91%	Endometrio	1,93%	Endometrio	3,21%
Tracto urinario	1,17%	Esófago	1,66%	Pulmón	2,25%
Piel	0,86%	Pulmón	1,24%	Estómago	1,87%
Esófago	0,66%	Próstata	1,14%	Hígado	1,14%
		Hígado	0,61%	Tejidos blandos	0,87%
		Piel	0,57%	Mama	0,80%
				Ovario	0,77%

Para los tres genes pueden observarse frecuencias mutacionales relativamente altas en tejidos del aparato digestivo, destacando el CCR (sería el tipo de cáncer más frecuente para *BARD1*) y el estómago. Resulta interesante la alta frecuencia mutacional en endometrio para los tres casos. Este órgano también aparece dentro del espectro mutacional de otros síndromes donde el CCR tiene un papel principal, véase el SL o el SAARP.

**D.7. Otras variantes identificadas.**

Además de los cambios en *BRF1*, *BARD1* y *CLCA1*, otras dos mutaciones fueron seleccionadas para su análisis en mayor profundidad.

La mutación c.923-1G>C en *MXRA8* –gen que codifica una limitrina potencialmente implicada en la maduración y el mantenimiento de la barrera hematoencefálica– causa la rotura de un sitio canónico de *splicing*. El análisis de LOH en los tres tumores analizados ofreció resultados negativos para la pérdida del alelo salvaje. Del mismo modo, la búsqueda bibliográfica no reveló ninguna relación entre este gen y su posible participación en procesos regulatorios clave y/o riesgo de cáncer. Sin embargo, la cosegregación de la mutación con el caso de cáncer de mama y su carácter deletéreo nos hicieron

considerar la búsqueda de nuevas mutaciones en nuestra serie de CCRFX. Como resultado, el cambio c.1186G>A (p.D396N), correspondiente al SNP rs150058708 (MAF<sub>dbSNP</sub>=0,0022) fue identificado en una familia. Tres de cuatro programas *in silico* indicaron un potencial efecto deletéreo del cambio a nivel aminoacídico. En base a los resultados obtenidos y la literatura disponible, consideramos que el papel de las mutaciones identificadas en este gen podría asociarse con la participación en la predisposición al CCR de las familias portadoras, aunque sería necesario un estudio en mayor profundidad para poder concluir sobre esta cuestión.

Por último, el cambio n.-30G>C en el microARN *hsa-miR-578* fue seleccionado por causar, según los dos programas *in silico* consultados, la alteración de la estructura tridimensional del pre-mir. El cambio supone la fusión de las dos horquillas existentes en la forma salvaje. Esta alteración estructural podría afectar al procesamiento de las enzimas de maduración de los pre-mir, alterándose el proceso de formación del microARN maduro. Algunas de las dianas de este microARN predichas *in silico* incluyen genes de relevancia en el metabolismo celular como *TGFB2* o *PPM1A*. Estudios de LOH en los tres tumores de la familia mostraron ausencia de éste fenómeno. La no identificación de mutaciones adicionales en nuestra serie de 151 casos de CCRFX, así como la ausencia de expresión de este microARN encontrada tanto en colon normal como en los tumores de la familia secuenciada, nos hizo sospechar de una baja o nula relevancia de la mutación n.-30G>C en la susceptibilidad al CCR en la familia secuenciada.

#### D.8. La predisposición al CCR en la familia secuenciada.

En base a los resultados obtenidos, podemos afirmar que existen evidencias consistentes que relacionan al menos dos/tres, de las mutaciones identificadas con el incremento de riesgo a CCR inherente a la familia. En la tabla 21 se resumen las razones que apoyan la susceptibilidad aportada por estas variantes en la familia secuenciada.

**Tabla 21. Evidencias a favor de la implicación de las mutaciones identificadas en *BRF1*, *BARD1* y *CLCA1* en la agregación de CCR de la familia CCRFX estudiada.**

Mutación	Evidencias a favor de su implicación en la predisposición al CCR.
<b><i>BRF1</i> c.1459+2T&gt;C</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutación deletérea (eliminación del exón 13 e interrupción del marco de lectura).</li> <li>• Función de supresor tumoral comprobada en estudios funcionales descritos en la literatura (Leal et al., 2008)</li> <li>• Identificación de numerosas mutaciones adicionales en nuestra serie de casos de CCR familiar.</li> <li>• Identificación de la mutación c. 35C&gt;T (p.T12M) en dos familias con CCR familiar no relacionadas.</li> <li>• Relativa alta tasa de mutaciones somáticas en cánceres gastrointestinales y de endometrio.</li> </ul>

<p><b>BARD1</b> <b>c.1099T&gt;A</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutación con efecto desestabilizante en la proteína (<i>in silico</i>).</li> <li>• Gen supresor tumoral en cáncer de mama y ovario (interacción con <i>BRCA1</i>).</li> <li>• Cosegregación con el caso de cáncer de mama presente en la familia.</li> <li>• Identificación de una mutación deletérea adicional en una familia CCRFX en nuestro estudio.</li> <li>• Mutación deletérea identificada en una familia CCRFX descrita en la literatura (Esteban-Jurado et al., 2014).</li> <li>• Alta tasa de mutaciones somáticas en cánceres gastrointestinales y de endometrio.</li> </ul>
<p><b>CLCA1</b> <b>c.1114G&gt;A</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutación con potencial efecto en el splicing (<i>In silico</i>).</li> <li>• Proteína con función de supresor tumoral en intestino grueso.</li> <li>• Identificación de una mutación adicional con potencial afectación del <i>splicing</i> en una familia CCRFX. La variante cosegrega con los dos casos de CCR adicionales presentes en la familia.</li> <li>• Correlación entre bajos niveles de expresión y peor pronóstico en cáncer.</li> <li>• Alta tasa de mutaciones somáticas en cánceres gastrointestinales y de endometrio.</li> </ul>

Las evidencias que apoyan el papel de las variantes en el CCR de la familia resultan especialmente notorias para *BRF1*. La patogenicidad de la mutación, así como las numerosas variantes adicionales identificadas apoyarían el papel del cambio en la familia y el del gen en el CCR familiar.

El efecto de la mutación en *BARD1* aún resultando prometedor, quedaría supeditado a la verificación de su efecto deletéreo. El papel de este gen en el CCR familiar ya había sido reportado por Esteban-Jurado y colaboradores, pero en ese caso, la mutación suponía la anulación alélica total (Esteban-Jurado et al., 2014). Por ello, estudios funcionales que analizaran la capacidad proliferativa de células colónicas portadoras del cambio c.1099T>A podrían mostrar el efecto de este cambio. Una hipótesis es que, considerando la cosegregación del caso de cáncer de mama con la mutación (siendo los otros tres afectos de CCR de género masculino), el cambio c.1099T>A implique un fallo en el dímero reparador *BRCA1-BARD1*. Un estudio de la tasa mutacional en línea celular colónica portadora del cambio (o en el propio tumor de mama de la paciente afectada en caso de disponibilidad) sería indicativo de si el fallo en la capacidad reparadora de *BRCA1-BARD1* podría estar contribuyendo a la susceptibilidad al cáncer en la familia.

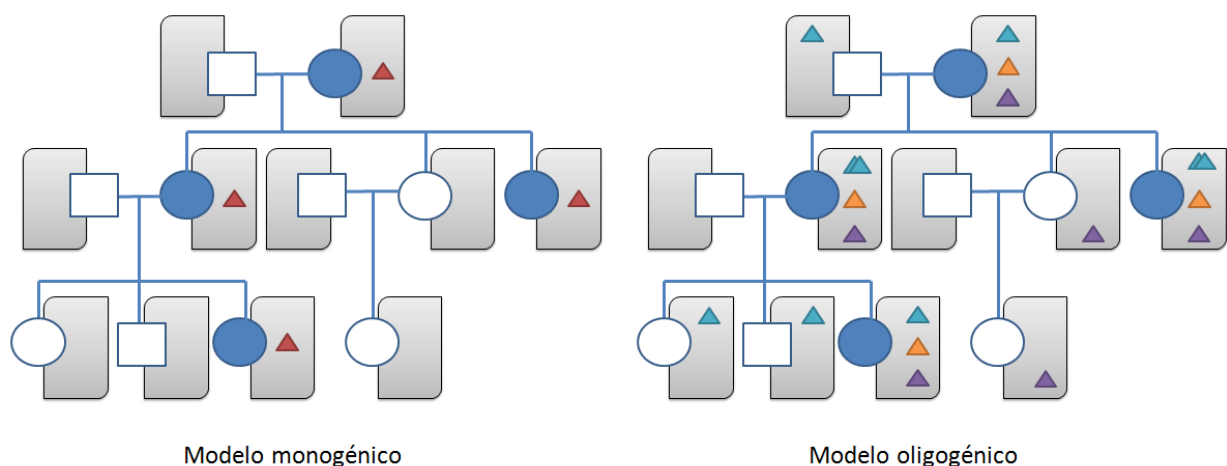
Por otro lado, el papel de *CLCA1* en el desarrollo de cáncer, y más concretamente, de CCR ya ha sido descrito anteriormente. Al igual que para *BARD1*, es la naturaleza de la mutación lo que impide definir con mayor certeza su papel en la predisposición al CCR en la familia. Estudios más extensivos de análisis del ARNm producido en presencia de la mutación otorgarían una gran informatividad sobre el impacto del cambio detectado.

La mutación en *MXRA8*, c.923-1G>C, si bien implica un claro efecto deletéreo, no puede relacionarse de manera clara con un aumento a la susceptibilidad al CCR debido a la función del gen y la falta de evidencias que lo relacionen con fallos en la regulación celular del intestino grueso. Sin embargo, la identificación de casos adicionales de CCR familiar con fallos en dicho gen, o la profundización en el conocimiento de la función de esta proteína en el intestino grueso, ayudarían a perfilar el impacto del cambio identificado en nuestra familia.

Finalmente, la ausencia de expresión en colon de *hsa-mir-578*, tanto en tejido normal como tumoral, o la no identificación de mutaciones adicionales en este microARN en los casos de CCR familiar analizados, parecen indicar el bajo o nulo impacto del cambio *hsa-mir-578* n.-30G>A en la susceptibilidad al CCR de la familia estudiada.

#### D.9. La susceptibilidad al CCR en el CCRFX.

En base a los datos obtenidos, planteamos un modelo basado en una predisposición multigénica, donde las mutaciones identificadas en *BRF1*, *BARD1*, *CLCA1*, y quizá *MXRA8* estarían aportando una susceptibilidad al CCR de forma aditiva. Esto va en total consonancia con los nuevos enfoques del CCRFX que plantean, ante la dificultad de identificar nuevos genes de alta penetrancia que expliquen una fracción importante de casos de esta forma sindrómica, la posible participación de varios genes de moderado riesgo como causa del CCRFX. De este modo, algunas familias quedarían explicadas en base al modelo monogénico clásico (Nieminen et al., 2014; Schulz et al., 2014), mientras que en otras sería necesaria la identificación de múltiples mutaciones (Figura 34).



**Figura 34. Modelos de herencia monogénico y oligogénico.** Mientras que hasta ahora todas las formas de CCR hereditario se han explicado en base a mutaciones en un solo gen, los modelos oligogénicos podrían explicar ciertas familias con alta agregación de CCR en base a variantes que aportan riesgos moderados a este tipo de cáncer.



Los resultados obtenidos y el modelo propuesto apoyan el sistema de *estudio individualizado* de las familias CCRFX a la hora de buscar las causas genéticas de su predisposición al CCR. Si bien una porción variable de ellas podrán quedar explicadas a partir de mutaciones en genes específicos, la tendencia actual parece mostrar la necesidad de un análisis profundo de las variantes heredadas de forma particular en cada familia, o incluso a nivel individual en cada paciente.

La secuenciación de exomas en el contexto del CCR familiar ha identificado numerosos genes potencialmente relacionados con este tipo de cáncer. La identificación de evidencias que relacionan *BRF1*, *BARD1*, *CLCA1* y quizá *MXRA8*, con un incremento de riesgo al CCRFX permite aumentar el conjunto de genes asociados a esta entidad de CCR. El estudio de familias CCRFX adicionales permitirá dilucidar sobre el verdadero impacto de *BRF1*, *BARD1* y *CLCA1* en la susceptibilidad al CCR familiar.





# CONCLUSIONES

---



- Los pacientes con síndrome de Lynch portadores del genotipo AA para la variante *hTERT* rs2075786 tienen un riesgo más elevado de desarrollar cáncer a edades jóvenes que los portadores del genotipo GG.
- Los tumores CCRFX presentan características moleculares muy similares a las del CCR esporádico sin fallos en el sistema MMR. Se caracterizan por una alta inestabilidad cromosómica, ausencia de fenotipo CIMP, y frecuencias mutacionales del 2,7% para *BRAF*, 39,7% para *KRAS*, 5,4% para *PIK3CA* y 13,5% para *TP53*.
- Sin embargo, los tumores CCRFX presentan mayor frecuencia de la ganancia del cromosoma 2 y de la pérdida de 10q. Asimismo, estos tumores muestran menor carga mutacional en *TP53*, aunque la diferencia no alcanzó la significación estadística.
- Mediante la secuenciación del dominio exonucleasa de *POLE* y *POLD1* en una serie de 441 casos de CCR familiar y 88 poliposis hemos identificado 6 variantes nuevas o altamente infrecuentes en *POLD1*. Cuatro de estas variantes mostraron claros signos de patogenicidad en base a predicciones *in silico*, conservación evolutiva, alteración de residuos catalíticos del dominio exonucleasa, y/o estudios funcionales en levadura.
- Considerando las variantes probablemente patogénicas identificadas en nuestro estudio, las mutaciones en el dominio exonucleasa de *POLD1* explicarían el 1% (4/411) de todos los casos de CCR familiar sin fallos en el sistema reparador de bases desapareadas o de temprana aparición, incluyendo el 1,7% (1/60) de los casos que cumplen los criterios de Ámsterdam (CCRFx).
- Los datos disponibles de 69 portadores (de 29 familias) sobre mutaciones patogénicas en el dominio exonucleasa de *POLE/POLD1* indican un fenotipo asociado al SAARP caracterizado por la presencia de poliposis colorrectal adenomatosa atenuada u oligopoliposis, CCR y probablemente tumores cerebrales. Además, el espectro fenotípico asociado a *POLD1* incluye la presencia de tumores endometriales y probablemente, también de mama.
- Proponemos una serie de recomendaciones para la selección de familias candidatas al análisis genético de *POLE* y *POLD1*, en base al conjunto de portadores identificados y/o revisados en nuestro estudio. Del mismo modo, sugerimos un programa de seguimiento clínico de portadores basado en colonoscopias y gastroduodenoscopias periódicas a partir de los 20-25 años, así como pruebas de detección de cáncer endometrial a partir de los 40 años en portadoras de mutaciones en *POLD1*.
- Siguiendo un modelo oligogénico, mutaciones en *BRF1* y *BARD1*, y posiblemente en *CLCA1* y *MXRA8*, serían causantes de la alta agregación de cáncer observada en la familia CCRFX en la que secuenciamos el exoma completo de tres familiares afectados de CCR.
- La identificación de mutaciones adicionales en *BRF1* y *BARD1* en otras familias afectas de CCR no polipósico refuerza la implicación de estos genes en el CCR familiar.

## CONCLUSIONES

---

- En base a los resultados obtenidos, la secuenciación del exoma completo en varios miembros afectados de familias individuales se presenta como una herramienta útil para la identificación de mutaciones causales de alta o moderada penetrancia que afectan a varios genes de predisposición al cáncer (modelo oligogénico).







# **BIBLIOGRAFÍA**

---



# A

- Aaltonen, L., L. Johns, H. Jarvinen, J. P. Mecklin and R. Houlston (2007). "Explaining the familial colorectal cancer risk associated with mismatch repair (MMR)-deficient and MMR-stable tumors." *Clin Cancer Res* 13(1): 356-61.
- Aaltonen, L. A., R. Salovaara, P. Kristo, F. Canzian, A. Hemminki, P. Peltomaki, R. B. Chadwick, H. Kaariainen, M. Eskelinen, H. Jarvinen, J. P. Mecklin and A. de la Chapelle (1998). "Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease." *N Engl J Med* 338(21): 1481-7.
- Abdelmaksoud-Dammak, R., I. Miladi-Abdennadher, A. Amouri, N. Tahri, L. Ayadi, A. Khabir, F. Frikha, A. Gargouri and R. Mokdad-Gargouri (2012). "High prevalence of the c.1227\_1228dup (p.Glu410GlyfsX43) mutation in Tunisian families affected with MUTYH-associated-polyposis." *Fam Cancer* 11(3): 503-8.
- Abdel-Rahman, W. M., K. Katsura, W. Rens, P. A. Gorman, D. Sheer, D. Bicknell, W. F. Bodmer, M. J. Arends, A. H. Wyllie and P. A. Edwards (2001). "Spectral karyotyping suggests additional subsets of colorectal cancers characterized by pattern of chromosome rearrangement." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(5): 2538-43.
- Abdel-Rahman, W. M., M. Ollikainen, R. Kariola, H. J. Jarvinen, J. P. Mecklin, M. Nystrom-Lahti, S. Knuutila and P. Peltomaki (2005). "Comprehensive characterization of HNPCC-related colorectal cancers reveals striking molecular features in families with no germline mismatch repair gene mutations." *Oncogene* 24(9): 1542-51.
- Abdel-Rahman, W. M. and P. Peltomaki (2008). "Lynch syndrome and related familial colorectal cancers." *Crit Rev Oncog* 14(1): 1-22; discussion 23-31.
- Adams, M. D., S. E. Celniker, R. A. Holt, C. A. Evans, J. D. Gocayne, P. G. Amanatides, S. E. Scherer, P. W. Li, R. A. Hoskins, R. F. Galle, R. A. George, S. E. Lewis, S. Richards, M. Ashburner, S. N. Henderson, G. G. Sutton, J. R. Wortman, M. D. Yandell, Q. Zhang, L. X. Chen, R. C. Brandon, Y. H. Rogers, R. G. Blazej, M. Champe, B. D. Pfeiffer, K. H. Wan, C. Doyle, E. G. Baxter, G. Helt, C. R. Nelson, G. L. Gabor, J. F. Abril, A. Agbayani, H. J. An, C. Andrews-Pfannkoch, D. Baldwin, R. M. Ballew, A. Basu, J. Baxendale, L. Bayraktaroglu, E. M. Beasley, K. Y. Beeson, P. V. Benos, B. P. Berman, D. Bhandari, S. Bolshakov, D. Borkova, M. R. Botchan, J. Bouck, P. Brokstein, P. Brottier, K. C. Burtis, D. A. Busam, H. Butler, E. Cadieu, A. Center, I. Chandra, J. M. Cherry, S. Cawley, C. Dahlke, L. B. Davenport, P. Davies, B. de Pablos, A. Delcher, Z. Deng, A. D. Mays, I. Dew, S. M. Dietz, K. Dodson, L. E. Doup, M. Downes, S. Dugan-Rocha, B. C. Dunkov, P. Dunn, K. J. Durbin, C. C. Evangelista, C. Ferraz, S. Ferriera, W. Fleischmann, C. Fosler, A. E. Gabrielian, N. S. Garg, W. M. Gelbart, K. Glasser, A. Glodek, F. Gong, J. H. Gorrell, Z. Gu, P. Guan, M. Harris, N. L. Harris, D. Harvey, T. J. Heiman, J. R. Hernandez, J. Houck, D. Hostin, K. A. Houston, T. J. Howland, M. H. Wei, C. Ibegwam, M. Jalali, F. Kalush, G. H. Karpen, Z. Ke, J. A. Kennison, K. A. Ketchum, B. E. Kimmel, C. D. Kodira, C. Kraft, S. Kravitz, D. Kulp, Z. Lai, P. Lasko, Y. Lei, A. A. Levitsky, J. Li, Z. Li, Y. Liang, X. Lin, X. Liu, B. Mattei, T. C. McIntosh, M. P. McLeod, D. McPherson, G. Merkulov, N. V. Milshina, C. Mobarry, J. Morris, A. Moshrefi, S. M. Mount, M. Moy, B. Murphy, L. Murphy, D. M. Muzny, D. L. Nelson, D. R. Nelson, K. A. Nelson, K. Nixon, D. R. Nusskern, J. M. Pacleb, M. Palazzolo, G. S. Pittman, S. Pan, J. Pollard, V. Puri, M. G. Reese, K. Reinert, K. Remington, R. D. Saunders, F. Scheeler, H. Shen, B. C. Shue, I. Sidenkiamos, M. Simpson, M. P. Skupski, T. Smith, E. Spier, A. C. Spradling, M. Stapleton, R. Strong, E. Sun, R. Svirskas, C. Tector, R. Turner, E. Venter, A. H. Wang, X. Wang, Z. Y. Wang, D. A. Wassarman, G. M. Weinstock, J. Weissenbach, S. M. Williams, WoodageT, K. C. Worley, D. Wu, S. Yang, Q. A. Yao, J. Ye, R. F. Yeh, J. S. Zaveri, M. Zhan, G. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, X. H. Zheng, F. N. Zhong, W. Zhong, X. Zhou, S. Zhu, X. Zhu, H. O. Smith, R. A. Gibbs, E. W. Myers, G. M. Rubin and J. C. Venter (2000). "The genome sequence of *Drosophila melanogaster*." *Science* 287(5461): 2185-95.
- Adzhubei, I., D. M. Jordan and S. R. Sunyaev (2013). "Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2." *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 7: Unit7 20.

- Adzhubei, I. A., S. Schmidt, L. Peshkin, V. E. Ramensky, A. Gerasimova, P. Bork, A. S. Kondrashov and S. R. Sunyaev (2010). "A method and server for predicting damaging missense mutations." *Nat Methods* 7(4): 248-9.
- Ahn, J. B., W. B. Chung, O. Maeda, S. J. Shin, H. S. Kim, H. C. Chung, N. K. Kim and J. P. Issa (2011). "DNA methylation predicts recurrence from resected stage III proximal colon cancer." *Cancer* 117(9): 1847-54.
- Alarcon, F., C. Lasset, J. Carayol, V. Bonadona, H. Perdry, F. Desseigne, Q. Wang and C. Bonaiti-Pellie (2007). "Estimating cancer risk in HNPCC by the GRL method." *Eur J Hum Genet* 15(8): 831-6.
- Albertson, T. M., M. Ogawa, J. M. Bugni, L. E. Hays, Y. Chen, Y. Wang, P. M. Treuting, J. A. Heddle, R. E. Goldsby and B. D. Preston (2009). "DNA polymerase epsilon and delta proofreading suppress discrete mutator and cancer phenotypes in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(40): 17101-4.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, A. Benito-Hernandez, S. J. Morrison and M. F. Clarke (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7): 3983-8.
- Allegra, C. J., J. M. Jessup, M. R. Somerfield, S. R. Hamilton, E. H. Hammond, D. F. Hayes, P. K. McAllister, R. F. Morton and R. L. Schilsky (2009). "American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy." *J Clin Oncol* 27(12): 2091-6.
- Al-Sohaily, S., A. Biankin, R. Leong, M. Kohonen-Corish and J. Warusavitarne (2012). "Molecular pathways in colorectal cancer." *J Gastroenterol Hepatol* 27(9): 1423-31.
- Al-Tassan, N., N. H. Chmiel, J. Maynard, N. Fleming, A. L. Livingston, G. T. Williams, A. K. Hodges, D. R. Davies, S. S. David, J. R. Sampson and J. P. Cheadle (2002). "Inherited variants of MYH associated with somatic G:C->T:A mutations in colorectal tumors." *Nat Genet* 30(2): 227-32.
- Alter, B. P., N. Giri, S. A. Savage and P. S. Rosenberg (2009). "Cancer in dyskeratosis congenita." *Blood* 113(26): 6549-57.
- Amsterdam, A., K. C. Sadler, K. Lai, S. Farrington, R. T. Bronson, J. A. Lees and N. Hopkins (2004). "Many ribosomal protein genes are cancer genes in zebrafish." *PLoS Biol* 2(5): E139.
- Antelo, M., F. Balaguer, J. Shia, Y. Shen, K. Hur, L. Moreira, M. Cuatrecasas, L. Bujanda, M. D. Giraldez, M. Takahashi, A. Cabanne, M. E. Barugel, M. Arnold, E. L. Roca, M. Andreu, S. Castellvi-Bel, X. Llor, R. Jover, A. Castells, C. R. Boland and A. Goel (2012). "A high degree of LINE-1 hypomethylation is a unique feature of early-onset colorectal cancer." *PLoS One* 7(9): e45357.
- Antoniou, A., P. D. Pharoah, S. Narod, H. A. Risch, J. E. Eyfjord, J. L. Hopper, N. Loman, H. Olsson, O. Johannsson, A. Borg, B. Pasini, P. Radice, S. Manoukian, D. M. Eccles, N. Tang, E. Olah, H. Anton-Culver, E. Warner, J. Lubinski, J. Gronwald, B. Gorski, H. Tulinius, S. Thorlacius, H. Eerola, H. Nevanlinna, K. Syrjakoski, O. P. Kallioniemi, D. Thompson, C. Evans, J. Peto, F. Laloo, D. G. Evans and D. F. Easton (2003). "Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies." *Am J Hum Genet* 72(5): 1117-30.
- Antoniou, A. C. and G. Chenevix-Trench (2010). "Common genetic variants and cancer risk in Mendelian cancer syndromes." *Curr Opin Genet Dev* 20(3): 299-307.
- Aretz, S., D. Stienen, S. Uhlhaas, S. Loff, W. Back, C. Pagenstecher, D. R. McLeod, G. E. Graham, E. Mangold, R. Santer, P. Propping and W. Friedl (2005). "High proportion of large genomic STK11 deletions in Peutz-Jeghers syndrome." *Hum Mutat* 26(6): 513-9.
- Aretz, S., R. Tricarico, L. Papi, I. Spier, E. Pin, S. Horpaopan, E. L. Cordisco, M. Pedroni, D. Stienen, A. Gentile, A. Panza, A. Piepoli, M. P. de Leon, W. Friedl, A. Viel and M. Genuardi (2014). "MUTYH-associated polyposis (MAP): evidence for the origin of the common European mutations p.Tyr179Cys and p.Gly396Asp by founder events." *Eur J Hum Genet* 22(7): 923-9.
- Aretz, S., S. Uhlhaas, H. Goergens, K. Siberg, M. Vogel, C. Pagenstecher, E. Mangold, R. Caspari, P. Propping and W. Friedl (2006). "MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype." *Int J Cancer* 119(4): 807-14.

**B**

- Baba, Y., C. Huttenhower, K. Nosho, N. Tanaka, K. Shima, A. Hazra, E. S. Schernhammer, D. J. Hunter, E. L. Giovannucci, C. S. Fuchs and S. Ogino (2010). "Epigenomic diversity of colorectal cancer indicated by LINE-1 methylation in a database of 869 tumors." *Mol Cancer* 9: 125.
- Baena, R. and P. Salinas (2015). "Diet and colorectal cancer." *Maturitas* 80(3): 258-64.
- Baird, D. M. (2010). "Variation at the TERT locus and predisposition for cancer." *Expert Rev Mol Med* 12: e16.
- Baker, D. J., J. Chen and J. M. van Deursen (2005). "The mitotic checkpoint in cancer and aging: what have mice taught us?" *Curr Opin Cell Biol* 17(6): 583-9.
- Bala, S. and P. Peltomaki (2001). "CYCLIN D1 as a genetic modifier in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." *Cancer Res* 61(16): 6042-5.
- Baldus, S. E., K. L. Schaefer, R. Engers, D. Hartleb, N. H. Stoecklein and H. E. Gabbert (2010). "Prevalence and heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations in primary colorectal adenocarcinomas and their corresponding metastases." *Clin Cancer Res* 16(3): 790-9.
- Bamshad, M. J., S. B. Ng, A. W. Bigham, H. K. Tabor, M. J. Emond, D. A. Nickerson and J. Shendure (2011). "Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery." *Nat Rev Genet* 12(11): 745-55.
- Barault, L., C. Charon-Barra, V. Jooste, M. F. de la Vega, L. Martin, P. Roignot, P. Rat, A. M. Bouvier, P. Laurent-Puig, J. Faivre, C. Chapusot and F. Piard (2008). "Hypermethylator phenotype in sporadic colon cancer: study on a population-based series of 582 cases." *Cancer Res* 68(20): 8541-6.
- Barker, N. (2014). "Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration." *Nat Rev Mol Cell Biol* 15(1): 19-33.
- Barrow, E., L. Robinson, W. Alduaij, A. Shenton, T. Clancy, F. Laloo, J. Hill and D. G. Evans (2009). "Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations." *Clin Genet* 75(2): 141-9.
- Beesley, J., H. A. Pickett, S. E. Johnatty, A. M. Dunning, X. Chen, J. Li, K. Michailidou, Y. Lu, D. N. Rider, R. T. Palmieri, M. D. Stutz, D. Lambrechts, E. Despierre, S. Lambrechts, I. Vergote, J. Chang-Claude, S. Nickels, A. Vrieling, D. Flesch-Janys, S. Wang-Gohrke, U. Eilber, N. Bogdanova, N. Antonenkova, I. B. Runnebaum, T. Dork, M. T. Goodman, G. Lurie, L. R. Wilkens, R. K. Matsuno, L. A. Kiemeny, K. K. Aben, T. Mares, L. F. Massuger, B. L. Fridley, R. A. Vierkant, E. V. Bandera, S. H. Olson, I. Orlow, L. Rodriguez-Rodriguez, L. S. Cook, N. D. Le, A. Brooks-Wilson, L. E. Kelemen, I. Campbell, S. A. Gayther, S. J. Ramus, A. Gentry-Maharaj, U. Menon, S. Ahmed, C. Baynes, P. D. Pharoah, K. Muir, A. Lophatananon, A. Chaiwerawattana, S. Wiangnon, S. Macgregor, D. F. Easton, R. R. Reddel, E. L. Goode and G. Chenevix-Trench (2011). "Functional polymorphisms in the TERT promoter are associated with risk of serous epithelial ovarian and breast cancers." *PLoS One* 6(9): e24987.
- Bellido, F., M. Pineda, R. Sanz-Pamplona, M. Navarro, M. Nadal, C. Lazaro, I. Blanco, V. Moreno, G. Capella and L. Valle (2014). "Comprehensive molecular characterisation of hereditary non-polyposis colorectal tumours with mismatch repair proficiency." *Eur J Cancer* 50(11): 1964-72.
- Bennani, B., S. Gilles, F. Fina, I. Nanni, S. A. Ibrahimi, A. A. Riffi, C. Nejjari, D. A. Benajeh, M. El Abkari, P. M. Martin and L. Ouafik (2010). "Mutation analysis of BRAF exon 15 and KRAS codons 12 and 13 in Moroccan patients with colorectal cancer." *Int J Biol Markers* 25(4): 179-84.
- Bergfeld, S. A. and Y. A. DeClerck (2010). "Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment." *Cancer Metastasis Rev* 29(2): 249-61.
- Bertorelle, R., M. Briarava, E. Rampazzo, L. Biasini, M. Agostini, I. Maretto, S. Lonardi, M. L. Friso, C. Mescoli, V. Zagonel, D. Nitti, A. De Rossi and S. Pucciarelli (2013). "Telomerase is an independent prognostic marker of overall survival in patients with colorectal cancer." *Br J Cancer* 108(2): 278-84.

- Bhajjee, F. and A. S. Brown (2014). "Muir-Torre syndrome." *Arch Pathol Lab Med* 138(12): 1685-9.
- Bisgaard, M. L., K. Fenger, S. Bulow, E. Niebuhr and J. Mohr (1994). "Familial adenomatous polyposis (FAP): frequency, penetrance, and mutation rate." *Hum Mutat* 3(2): 121-5.
- Bisoffi, M., C. M. Heaphy and J. K. Griffith (2006). "Telomeres: prognostic markers for solid tumors." *Int J Cancer* 119(10): 2255-60.
- Blackburn, E. H. (1991). "Structure and function of telomeres." *Nature* 350(6319): 569-73.
- Blackburn, E. H., C. W. Greider and J. W. Szostak (2006). "Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging." *Nat Med* 12(10): 1133-8.
- Boardman, L. A., S. N. Thibodeau, D. J. Schaid, N. M. Lindor, S. K. McDonnell, L. J. Burgart, D. A. Ahlquist, K. C. Podratz, M. Pittelkow and L. C. Hartmann (1998). "Increased risk for cancer in patients with the Peutz-Jeghers syndrome." *Ann Intern Med* 128(11): 896-9.
- Bojesen, S. E., K. A. Pooley, S. E. Johnatty, J. Beesley, K. Michailidou, J. P. Tyrer, S. L. Edwards, H. A. Pickett, H. C. Shen, C. E. Smart, K. M. Hillman, P. L. Mai, K. Lawrenson, M. D. Stutz, Y. Lu, R. Karevan, N. Woods, R. L. Johnston, J. D. French, X. Chen, M. Weischer, S. F. Nielsen, M. J. Maranian, M. Ghousaini, S. Ahmed, C. Baynes, M. K. Bolla, Q. Wang, J. Dennis, L. McGuffog, D. Barrowdale, A. Lee, S. Healey, M. Lush, D. C. Tessier, D. Vincent, F. Bacot, I. Vergote, S. Lambrechts, E. Despierre, H. A. Risch, A. Gonzalez-Neira, M. A. Rossing, G. Pita, J. A. Doherty, N. Alvarez, M. C. Larson, B. L. Fridley, N. Schoof, J. Chang-Claude, M. S. Cicek, J. Peto, K. R. Kalli, A. Broeks, S. M. Armasu, M. K. Schmidt, L. M. Braaf, B. Winterhoff, H. Nevanlinna, G. E. Konecny, D. Lambrechts, L. Rogmann, P. Guenel, A. Teoman, R. L. Milne, J. J. Garcia, A. Cox, V. Shridhar, B. Burwinkel, F. Marme, R. Hein, E. J. Sawyer, C. A. Haiman, S. Wang-Gohrke, I. L. Andrulis, K. B. Moysich, J. L. Hopper, K. Odunsi, A. Lindblom, G. G. Giles, H. Brenner, J. Simard, G. Lurie, P. A. Fasching, M. E. Carney, P. Radice, L. R. Wilkens, A. Swerdlow, M. T. Goodman, H. Brauch, M. Garcia-Closas, P. Hillemanns, R. Winqvist, M. Durst, P. Devilee, I. Runnebaum, A. Jakubowska, J. Lubinski, A. Mannermaa, R. Butzow, N. V. Bogdanova, T. Dork, L. M. Pelttari, W. Zheng, A. Leminen, H. Anton-Culver, C. H. Bunker, V. Kristensen, R. B. Ness, K. Muir, R. Edwards, A. Meindl, F. Heitz, K. Matsuo, A. du Bois, A. H. Wu, P. Harter, S. H. Teo, I. Schwaab, X. O. Shu, W. Blot, S. Hosono, D. Kang, T. Nakanishi, M. Hartman, Y. Yatabe, U. Hamann, B. Y. Karlan, S. Sangrajrang, S. K. Kjaer, V. Gaborieau, A. Jensen, D. Eccles, E. Hogdall, C. Y. Shen, J. Brown, Y. L. Woo, M. Shah, M. A. Azmi, R. Luben, S. Z. Omar, K. Czene, R. A. Vierkant, B. G. Nordestgaard, H. Flyger, C. Vachon, J. E. Olson, X. Wang, D. A. Levine, A. Rudolph, R. P. Weber, D. Flesch-Janys, E. Iversen, S. Nickels, J. M. Schildkraut, S. Silva Idos, D. W. Cramer, L. Gibson, K. L. Terry, O. Fletcher, A. F. Vitonis, C. E. van der Schoot, E. M. Poole, F. B. Hogervorst, S. S. Tworoger, J. Liu, E. V. Bandera, J. Li, S. H. Olson, K. Humphreys, I. Orlow, C. Blomqvist, L. Rodriguez-Rodriguez, K. Aittomaki, H. B. Salvesen, T. A. Muranen, E. Wik, B. Brouwers, C. Krakstad, E. Wauters, M. K. Halle, H. Wildiers, L. A. Kiemeny, C. Mulot, K. K. Aben, P. Laurent-Puig, A. M. Altena, T. Truong, L. F. Massuger, J. Benitez, T. Pejovic, J. I. Perez, M. Hoatlin, M. P. Zamora, L. S. Cook, S. P. Balasubramanian, L. E. Kelemen, A. Schneeweiss, N. D. Le, C. Sohn, A. Brooks-Wilson, I. Tomlinson, M. J. Kerin, N. Miller, C. Cybulski, B. E. Henderson, J. Menkiszak, F. Schumacher, N. Wentzensen, L. Le Marchand, H. P. Yang, A. M. Mulligan, G. Glendon, S. A. Engelholm, J. A. Knight, C. K. Hogdall, C. Apicella, M. Gore, H. Tsimiklis, H. Song, M. C. Southey, A. Jager, A. M. den Ouweland, R. Brown, J. W. Martens, J. M. Flanagan, M. Kriege, J. Paul, S. Margolin, N. Siddiqui, G. Severi, A. S. Whittemore, L. Baglietto, V. McGuire, C. Stegmaier, W. Sieh, H. Muller, V. Arndt, F. Labreche, Y. T. Gao, M. S. Goldberg, G. Yang, M. Dumont, J. R. McLaughlin, A. Hartmann, A. B. Ekici, M. W. Beckmann, C. M. Phelan, M. P. Lux, J. Permuth-Wey, B. Peissel, T. A. Sellers, F. Ficarazzi, M. Barile, A. Ziogas, A. Ashworth, A. Gentry-Maharaj, M. Jones, S. J. Ramus, N. Orr, U. Menon, C. L. Pearce, T. Bruning, M. C. Pike, Y. D. Ko, J. Lissowska, J. Figueroa, J. Kupryjanczyk, S. J. Chanock, A. Dansonka-Mieszkowska, A. Jukkola-Vuorinen, I. K. Rzepecka, K. Pylkas, M. Bidzinski, S. Kauppila, A. Hollestelle, C. Seynaeve, R. A. Tollenaar, K. Durda, K. Jaworska, J. M. Hartikainen, V. M. Kosma, V. Kataja, N. N. Antonenkova, J. Long, M. Shrubsole, S. Deming-Halverson, A. Lophatananon, P. Siriwanarangsana, S. Stewart-Brown, N. Ditsch, P. Lichtner, R. K. Schmutzler, H. Ito, H. Iwata, K. Tajima, C. C. Tseng, D. O. Stram, D. van den Berg, C. H. Yip, M. K. Ikram, Y. C. Teh, H. Cai, W. Lu, L. B. Signorello, Q. Cai, D. Y. Noh, K. Y. Yoo, H. Miao, P. T. Iau, Y. Y. Teo, J. McKay, C. Shapiro, F. Ademuyiwa, G. Fountzilias, C. N. Hsiung, J. C. Yu, M. F. Hou, C. S. Healey, C. Luccarini, S. Peock, D. Stoppa-Lyonnet, P. Peterlongo, T. R. Rebbeck, M. Piedmonte, C. F. Singer, E. Friedman, M. Thomassen, K. Offit, T. V. Hansen, S. L. Neuhausen, C. I. Szabo, I.

- Blanco, J. Garber, S. A. Narod, J. N. Weitzel, M. Montagna, E. Olah, A. K. Godwin, D. Yannoukakos, D. E. Goldgar, T. Caldes, E. N. Imyanitov, L. Tihomirova, B. K. Arun, I. Campbell, A. R. Mensenkamp, C. J. van Asperen, K. E. van Roozendaal, H. Meijers-Heijboer, J. M. Collee, J. C. Oosterwijk, M. J. Hoening, M. A. Rookus, R. B. van der Luitj, T. A. Os, D. G. Evans, D. Frost, E. Fineberg, J. Barwell, L. Walker, M. J. Kennedy, R. Platte, R. Davidson, S. D. Ellis, T. Cole, B. Bressac-de Paillerets, B. Buecher, F. Damiola, L. Faivre, M. Frenay, O. M. Sinilnikova, O. Caron, S. Giraud, S. Mazoyer, V. Bonadona, V. Caux-Moncoutier, A. Toloczko-Grabarek, J. Gronwald, T. Byrski, A. B. Spurdle, B. Bonanni, D. Zaffaroni, G. Giannini, L. Bernard, R. Dolcetti, S. Manoukian, N. Arnold, C. Engel, H. Deissler, K. Rhiem, D. Niederacher, H. Plendl, C. Sutter, B. Wappenschmidt, A. Borg, B. Melin, J. Rantala, M. Soller, K. L. Nathanson, S. M. Domchek, G. C. Rodriguez, R. Salani, D. G. Kaulich, M. K. Tea, S. S. Paluch, Y. Laitman, A. B. Skytte, T. A. Kruse, U. B. Jensen, M. Robson, A. M. Gerdes, B. Ejlersen, L. Foretova, S. A. Savage, J. Lester, P. Soucy, K. B. Kuchenbaecker, C. Olsword, J. M. Cunningham, S. Slager, V. S. Pankratz, E. Dicks, S. R. Lakhani, F. J. Couch, P. Hall, A. N. Monteiro, S. A. Gayther, P. D. Pharoah, R. R. Reddel, E. L. Goode, M. H. Greene, D. F. Easton, A. Berchuck, A. C. Antoniou, G. Chenevix-Trench and A. M. Dunning (2013). "Multiple independent variants at the TERT locus are associated with telomere length and risks of breast and ovarian cancer." *Nat Genet* 45(4): 371-84, 384e1-2.
- Boland, C. R., S. N. Thibodeau, S. R. Hamilton, D. Sidransky, J. R. Eshleman, R. W. Burt, S. J. Meltzer, M. A. Rodriguez-Bigas, R. Fodde, G. N. Ranzani and S. Srivastava (1998). "A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer." *Cancer Res* 58(22): 5248-57.
- Bonadona, V., B. Bonaiti, S. Olschwang, S. Grandjouan, L. Huiart, M. Longy, R. Guimbaud, B. Buecher, Y. J. Bignon, O. Caron, C. Colas, C. Nogues, S. Lejeune-Dumoulin, L. Olivier-Faivre, F. Polycarpe-Osaer, T. D. Nguyen, F. Desseigne, J. C. Saurin, P. Berthet, D. Leroux, J. Duffour, S. Manouvrier, T. Frebourg, H. Sobol, C. Lasset and C. Bonaiti-Pellie (2011). "Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in Lynch syndrome." *Jama* 305(22): 2304-10.
- Borck, G., F. Hog, M. L. Dentici, P. L. Tan, N. Sowada, A. Medeira, L. Gueneau, T. Holger, M. Kousi, F. Lepri, L. Wenzek, I. Blumenthal, A. Radicioni, T. L. Schwarzenberg, B. Mandriani, R. Fischetto, D. J. Morris-Rosendahl, J. Altmuller, A. Reymond, P. Nunberg, G. Merla, B. Dallapiccola, N. Katsanis, P. Cramer and C. Kubisch (2015). "BRF1 mutations alter RNA polymerase III-dependent transcription and cause neurodevelopmental anomalies." *Genome Res* 25(4): 609.
- Botstein, D. and N. Risch (2003). "Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease." *Nat Genet* 33 Suppl: 228-37.
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis (1980). "Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms." *Am J Hum Genet* 32(3): 314-31.
- Bozic, I., T. Antal, H. Ohtsuki, H. Carter, D. Kim, S. Chen, R. Karchin, K. W. Kinzler, B. Vogelstein and M. A. Nowak (2010). "Accumulation of driver and passenger mutations during tumor progression." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(43): 18545-50.
- Bozzao, C., P. Lastella, M. Ponz de Leon, M. Pedroni, C. Di Gregorio, F. D. D'Ovidio, N. Resta, F. Prete, G. Guanti and A. Stella (2011). "Analysis of telomere dynamics in peripheral blood cells from patients with Lynch syndrome." *Cancer* 117(18): 4325-35.
- Brand, R., M. Nielsen, H. Lynch and E. Infante (2012). "MUTYH-Associated Polyposis."
- Briggs, S. and I. Tomlinson (2013). "Germline and somatic polymerase epsilon and delta mutations define a new class of hypermutated colorectal and endometrial cancers." *J Pathol* 230(2): 148-53.
- Brink, M., A. F. de Goeij, M. P. Weijenberg, G. M. Roemen, M. H. Lentjes, M. M. Pachen, K. M. Smits, A. P. de Bruine, R. A. Goldbohm and P. A. van den Brandt (2003). "K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study." *Carcinogenesis* 24(4): 703-10.
- Broderick, P., L. Carvajal-Carmona, A. M. Pittman, E. Webb, K. Howarth, A. Rowan, S. Lubbe, S. Spain, K. Sullivan, S. Fielding, E. Jaeger, J. Vijaykrishnan, Z. Kemp, M. Gorman, I. Chandler, E. Papaemmanuil, S. Penegar, W. Wood, G. Sellick, M. Qureshi, A. Teixeira, E. Domingo, E. Barclay, L. Martin, O. Sieber, D. Kerr, R. Gray, J. Peto, J. B. Cazier, I. Tomlinson and R. S. Houlston (2007). "A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7



- influence colorectal cancer risk." *Nat Genet* 39(11): 1315-7.
- Brosens, L. A., A. van Hattem, L. M. Hyllind, C. Iacobuzio-Donahue, K. E. Romans, J. Axilbund, M. Cruz-Correa, A. C. Tersmette, G. J. Offerhaus and F. M. Giardiello (2007). "Risk of colorectal cancer in juvenile polyposis." *Gut* 56(7): 965-7.
- Bryan, T. M., A. Englezou, L. Dalla-Pozza, M. A. Dunham and R. R. Reddel (1997). "Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines." *Nat Med* 3(11): 1271-4.
- Bubien, V., F. Bonnet, V. Brouste, S. Hoppe, E. Barouk-Simonet, A. David, P. Edery, A. Bottani, V. Layet, O. Caron, B. Gilbert-Dussardier, C. Delnatte, C. Dugast, J. P. Fricker, D. Bonneau, N. Sevenet, M. Longy and F. Caux (2013). "High cumulative risks of cancer in patients with PTEN hamartoma tumour syndrome." *J Med Genet* 50(4): 255-63.
- Buchanan, D. D., C. Rosty, M. Clendenning, A. B. Spurdle and A. K. Win (2014). "Clinical problems of colorectal cancer and endometrial cancer cases with unknown cause of tumor mismatch repair deficiency (suspected Lynch syndrome)." *Appl Clin Genet* 7: 183-93.
- Buermans, H. P. and J. T. den Dunnen (2014). "Next generation sequencing technology: Advances and applications." *Biochim Biophys Acta* 1842(10): 1932-1941.
- Burke, L. S., P. L. Hyland, R. M. Pfeiffer, J. Prescott, W. Wheeler, L. Mirabello, S. A. Savage, L. Burdette, M. Yeager, S. Chanock, I. De Vivo, M. A. Tucker, A. M. Goldstein and X. R. Yang (2013). "Telomere length and the risk of cutaneous malignant melanoma in melanoma-prone families with and without CDKN2A mutations." *PLoS One* 8(8): e71121.
- Bustin, S. A., S. R. Li and S. Dorudi (2001). "Expression of the Ca<sup>2+</sup>-activated chloride channel genes CLCA1 and CLCA2 is downregulated in human colorectal cancer." *DNA Cell Biol* 20(6): 331-8.
- Byrnes, J. J., K. M. Downey, V. L. Black and A. G. So (1976). "A new mammalian DNA polymerase with 3' to 5' exonuclease activity: DNA polymerase delta." *Biochemistry* 15(13): 2817-23.

## C

- Cabarcas, S., J. Jacob, I. Veras and L. Schramm (2008). "Differential expression of the TFIIIB subunits Brf1 and Brf2 in cancer cells." *BMC Mol Biol* 9: 74.
- Cairns, C. A. and R. J. White (1998). "p53 is a general repressor of RNA polymerase III transcription." *Embo J* 17(11): 3112-23.
- Campbell, P. T., L. Edwards, J. R. McLaughlin, J. Green, H. B. Younghusband and M. O. Woods (2007). "Cytochrome P450 17A1 and catechol O-methyltransferase polymorphisms and age at Lynch syndrome colon cancer onset in Newfoundland." *Clin Cancer Res* 13(13): 3783-8.
- Canella, D., V. Praz, J. H. Reina, P. Cousin and N. Hernandez (2010). "Defining the RNA polymerase III transcriptome: Genome-wide localization of the RNA polymerase III transcription machinery in human cells." *Genome Res* 20(6): 710-21.
- Capezzone, M., S. Cantara, S. Marchisotta, S. Filetti, M. M. De Santi, B. Rossi, G. Ronga, C. Durante and F. Pacini (2008). "Short telomeres, telomerase reverse transcriptase gene amplification, and increased telomerase activity in the blood of familial papillary thyroid cancer patients." *J Clin Endocrinol Metab* 93(10): 3950-7.
- Capriotti, E., P. Fariselli and R. Casadio (2005). "I-Mutant2.0: predicting stability changes upon mutation from the protein sequence or structure." *Nucleic Acids Res* 33(Web Server issue): W306-10.
- Carethers, J. M. (2014). "Differentiating Lynch-like from Lynch syndrome." *Gastroenterology* 146(3): 602-4.
- Center, M. M., A. Jemal, R. A. Smith and E. Ward (2009a). "Worldwide variations in colorectal cancer." *CA Cancer J Clin* 59(6): 366-78.
- Center, M. M., A. Jemal and E. Ward (2009b). "International trends in colorectal cancer incidence rates."

- Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 18(6): 1688-94.
- Chen, J. R., J. M. Chiang, C. R. Changchien, J. S. Chen, R. P. Tang and J. Y. Wang (2008). "Mismatch repair protein expression in Amsterdam II criteria-positive patients in Taiwan." *Br J Surg* 95(1): 102-10.
- Chen, W., L. Yuan, Y. Cai, X. Chen, Y. Chi, P. Wei, X. Zhou and D. Shi (2013). "Identification of chromosomal copy number variations and novel candidate loci in hereditary nonpolyposis colorectal cancer with mismatch repair proficiency." *Genomics* 102(1): 27-34.
- Cheng, T. H., M. Gorman, L. Martin, E. Barclay, G. Casey, B. Saunders, H. Thomas, S. Clark and I. Tomlinson (2015). "Common colorectal cancer risk alleles contribute to the multiple colorectal adenoma phenotype, but do not influence colonic polyposis in FAP." *Eur J Hum Genet* 23(2): 260-3.
- Cheng, Y. W., H. Pincas, M. D. Bacolod, G. Schemmann, S. F. Giardina, J. Huang, S. Barral, K. Idrees, S. A. Khan, Z. Zeng, S. Rosenberg, D. A. Notterman, J. Ott, P. Paty and F. Barany (2008). "CpG island methylator phenotype associates with low-degree chromosomal abnormalities in colorectal cancer." *Clin Cancer Res* 14(19): 6005-13.
- Chesnokov, I., W. M. Chu, M. R. Botchan and C. W. Schmid (1996). "p53 inhibits RNA polymerase III-directed transcription in a promoter-dependent manner." *Mol Cell Biol* 16(12): 7084-8.
- Choi, H. S., Y. J. Park, E. G. Youk, K. A. Yoon, J. L. Ku, N. K. Kim, S. M. Kim, Y. J. Kim, D. J. Moon, J. S. Min, C. J. Park, O. S. Bae, D. H. Yang, S. H. Jun, E. S. Chung, P. M. Jung, Y. Whang and J. G. Park (2000). "Clinical characteristics of Peutz-Jeghers syndrome in Korean polyposis patients." *Int J Colorectal Dis* 15(1): 35-8.
- Choi, Y. H., M. Cotterchio, G. McKeown-Eyssen, M. Neerav, B. Bapat, K. Boyd, S. Gallinger, J. McLaughlin, M. Aronson and L. Briollais (2009). "Penetrance of colorectal cancer among MLH1/MSH2 carriers participating in the colorectal cancer familial registry in Ontario." *Hered Cancer Clin Pract* 7(1): 14.
- Chughtai, S. A., M. C. Crundwell, N. R. Cruickshank, E. Affie, S. Armstrong, M. A. Knowles, L. A. Takle, M. Kuo, N. Khan, S. M. Phillips, J. P. Neoptolemos and D. G. Morton (1999). "Two novel regions of interstitial deletion on chromosome 8p in colorectal cancer." *Oncogene* 18(3): 657-65.
- Ciardello, F. and G. Tortora (2008). "EGFR antagonists in cancer treatment." *N Engl J Med* 358(11): 1160-74.
- Clarke, E., R. C. Green, J. S. Green, K. Mahoney, P. S. Parfrey, H. B. Younghusband and M. O. Woods (2012). "Inherited deleterious variants in GALNT12 are associated with CRC susceptibility." *Hum Mutat* 33(7): 1056-8.
- Cleary, S. P., M. Cotterchio, M. A. Jenkins, H. Kim, R. Bristow, R. Green, R. Haile, J. L. Hopper, L. LeMarchand, N. Lindor, P. Parfrey, J. Potter, B. Younghusband and S. Gallinger (2009). "Germline MutY human homologue mutations and colorectal cancer: a multisite case-control study." *Gastroenterology* 136(4): 1251-60.
- Coffelt, S. B., C. E. Lewis, L. Naldini, J. M. Brown, N. Ferrara and M. De Palma (2010). "Elusive identities and overlapping phenotypes of proangiogenic myeloid cells in tumors." *Am J Pathol* 176(4): 1564-76.
- Coissieux, M. M., J. Tomsic, M. Castets, H. Hampel, S. Tuupainen, N. Andrieu, I. Comeras, Y. Drouet, C. Lasset, S. Liyanarachchi, L. Mazelin, A. Puisieux, J. C. Saurin, J. Y. Scoazec, Q. Wang, L. Aaltonen, S. M. Tanner, A. de la Chapelle, A. Bernet and P. Mehlen (2011). "Variants in the netrin-1 receptor UNC5C prevent apoptosis and increase risk of familial colorectal cancer." *Gastroenterology* 141(6): 2039-46.
- Collins, F. (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." *Nature* 431(7011): 931-45.
- Comino-Mendez, I., F. J. Gracia-Aznarez, F. Schiavi, I. Landa, L. J. Leandro-Garcia, R. Leton, E. Honrado, R. Ramos-Medina, D. Caronia, G. Pita, A. Gomez-Grana, A. A. de Cubas, L. Inglada-Perez, A. Maliszewska, E. Taschin, S. Bobisse, G. Pica, P. Loli, R. Hernandez-Lavado, J. A. Diaz, M. Gomez-Morales, A. Gonzalez-Neira, G. Roncador, C. Rodriguez-Antona, J. Benitez, M. Mannelli, G. Opocher, M. Robledo and A. Cascon (2011). "Exome sequencing identifies MAX mutations as a cause of hereditary pheochromocytoma." *Nat Genet* 43(7): 663-7.

- Conomos, D., H. A. Pickett and R. R. Reddel (2013). "Alternative lengthening of telomeres: remodeling the telomere architecture." *Front Oncol* 3: 27.
- Cosme-Blanco, W., M. F. Shen, A. J. Lazar, S. Pathak, G. Lozano, A. S. Multani and S. Chang (2007). "Telomere dysfunction suppresses spontaneous tumorigenesis in vivo by initiating p53-dependent cellular senescence." *EMBO Rep* 8(5): 497-503.
- Couch, F. J., S. N. Hart, P. Sharma, A. E. Toland, X. Wang, P. Miron, J. E. Olson, A. K. Godwin, V. S. Pankratz, C. Olswold, S. Slettedahl, E. Hallberg, L. Guidugli, J. I. Davila, M. W. Beckmann, W. Janni, B. Rack, A. B. Ekici, D. J. Slamon, I. Konstantopoulou, F. Fostira, A. Vratimos, G. Fountzilas, L. M. Pelttari, W. J. Tapper, L. Durcan, S. S. Cross, R. Pilarski, C. L. Shapiro, J. Klemp, S. Yao, J. Garber, A. Cox, H. Brauch, C. Ambrosone, H. Nevanlinna, D. Yannoukakos, S. L. Slager, C. M. Vachon, D. M. Eccles and P. A. Fasching (2015). "Inherited mutations in 17 breast cancer susceptibility genes among a large triple-negative breast cancer cohort unselected for family history of breast cancer." *J Clin Oncol* 33(4): 304-11.
- Crighton, D., A. Woiwode, C. Zhang, N. Mandavia, J. P. Morton, L. J. Warnock, J. Milner, R. J. White and D. L. Johnson (2003). "p53 represses RNA polymerase III transcription by targeting TBP and inhibiting promoter occupancy by TFIIIB." *Embo J* 22(11): 2810-20.
- Criscitiello, C., G. Viale, L. Gelao, A. Esposito, M. De Laurentiis, S. De Placido, M. Santangelo, A. Goldhirsch and G. Curigliano (2015). "Crosstalk between bone niche and immune system: osteoimmunology signaling as a potential target for cancer treatment." *Cancer Treat Rev* 41(2): 61-8.
- Cross, A. J., S. Boca, N. D. Freedman, N. E. Caporaso, W. Y. Huang, R. Sinha, J. N. Sampson and S. C. Moore (2014). "Metabolites of tobacco smoking and colorectal cancer risk." *Carcinogenesis* 35(7): 1516-22.
- Cui, R., Y. Okada, S. G. Jang, J. L. Ku, J. G. Park, Y. Kamatani, N. Hosono, T. Tsunoda, V. Kumar, C. Tanikawa, N. Kamatani, R. Yamada, M. Kubo, Y. Nakamura and K. Matsuda (2011). "Common variant in 6q26-q27 is associated with distal colon cancer in an Asian population." *Gut* 60(6): 799-805.
- Cui, Y., Q. Cai, S. Qu, W. H. Chow, W. Wen, Y. B. Xiang, J. Wu, N. Rothman, G. Yang, X. O. Shu, Y. T. Gao and W. Zheng (2012). "Association of leukocyte telomere length with colorectal cancer risk: nested case-control findings from the Shanghai Women's Health Study." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21(10): 1807-13.

## D

- Daly, N. L., D. A. Arvanitis, J. A. Fairley, N. Gomez-Roman, J. P. Morton, S. V. Graham, D. A. Spandidos and R. J. White (2005). "Deregulation of RNA polymerase III transcription in cervical epithelium in response to high-risk human papillomavirus." *Oncogene* 24(5): 880-8.
- De Brakeleer, S., J. De Greve, R. Loris, N. Janin, W. Lissens, E. Sermijn and E. Teugels (2010). "Cancer predisposing missense and protein truncating BARD1 mutations in non-BRCA1 or BRCA2 breast cancer families." *Hum Mutat* 31(3): E1175-85.
- de la Chapelle, A., G. Palomaki and H. Hampel (2009). "Identifying Lynch syndrome." *Int J Cancer* 125(6): 1492-3.
- De Luca, L. M. (1991). "Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis, and neoplasia." *Faseb J* 5(14): 2924-33.
- de Voer, R. M., A. Geurts van Kessel, R. D. Weren, M. J. Ligtenberg, D. Smeets, L. Fu, L. Vreede, E. J. Kamping, E. T. Verwiel, M. M. Hahn, M. Ariaans, L. Spruijt, T. van Essen, G. Houge, H. K. Schackert, J. Q. Sheng, H. Venselaar, C. M. van Ravenswaaij-Arts, J. H. van Krieken, N. Hoogerbrugge and R. P. Kuiper (2013). "Germline mutations in the spindle assembly checkpoint genes BUB1 and BUB3 are risk factors for colorectal cancer." *Gastroenterology* 145(3): 544-7.
- de Voer, R. M., N. Hoogerbrugge and R. P. Kuiper (2011). "Spindle-assembly checkpoint and

- gastrointestinal cancer." *N Engl J Med* 364(13): 1279-80.
- DeFrancisco, J. and W. M. Grady (2003). "Diagnosis and management of hereditary non-polyposis colon cancer." *Gastrointest Endosc* 58(3): 390-408.
- Dehouck, Y., J. M. Kwasigroch, D. Gilis and M. Rooman (2011). "PoPMuSiC 2.1: a web server for the estimation of protein stability changes upon mutation and sequence optimality." *BMC Bioinformatics* 12: 151.
- DeNardo, D. G., P. Andreu and L. M. Coussens (2010). "Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity." *Cancer Metastasis Rev* 29(2): 309-16.
- Deng, G., I. Bell, S. Crawley, J. Gum, J. P. Terdiman, B. A. Allen, B. Truta, M. H. Sleisenger and Y. S. Kim (2004). "BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." *Clin Cancer Res* 10(1 Pt 1): 191-5.
- DeRycke, M. S., S. R. Gunawardena, S. Middha, Y. W. Asmann, D. J. Schaid, S. K. McDonnell, S. M. Riska, B. W. Eckloff, J. M. Cunningham, B. L. Fridley, D. J. Serie, W. R. Bamlet, M. S. Cicek, M. A. Jenkins, D. J. Duggan, D. Buchanan, M. Clendenning, R. W. Haile, M. O. Woods, S. N. Gallinger, G. Casey, J. D. Potter, P. A. Newcomb, L. Le Marchand, N. M. Lindor, S. N. Thibodeau and E. L. Goode (2013). "Identification of novel variants in colorectal cancer families by high-throughput exome sequencing." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 22(7): 1239-51.
- Desai, D. C., J. C. Lockman, R. B. Chadwick, X. Gao, A. Percesepe, D. G. Evans, M. Miyaki, S. T. Yuen, P. Radice, E. R. Maher, F. A. Wright and A. de La Chapelle (2000). "Recurrent germline mutation in MSH2 arises frequently de novo." *J Med Genet* 37(9): 646-52.
- Dieci, G., M. C. Bosio, B. Fermi and R. Ferrari (2003). "Transcription reinitiation by RNA polymerase III." *Biochim Biophys Acta* 1829(3-4): 331-41.
- Ding, Z., A. G. Green, X. Yang, G. Chernenko, S. C. Tang and A. Pater (2002). "Retinoic acid inhibits telomerase activity and downregulates expression but does not affect splicing of hTERT: correlation with cell growth rate inhibition in an in vitro cervical carcinogenesis/multidrug-resistance model." *Exp Cell Res* 272(2): 185-91.
- Djureinovic, T., J. Skoglund, J. Vandrovцова, X. L. Zhou, A. Kalushkova, L. Iselius and A. Lindblom (2006). "A genome wide linkage analysis in Swedish families with hereditary non-familial adenomatous polyposis/non-hereditary non-polyposis colorectal cancer." *Gut* 55(3): 362-6.
- Domchek, S. M., A. Bradbury, J. E. Garber, K. Offit and M. E. Robson (2013). "Multiplex genetic testing for cancer susceptibility: out on the high wire without a net?" *J Clin Oncol* 31(10): 1267-70.
- Dominguez-Valentin, M., C. Therkildsen, S. Da Silva and M. Nilbert (2014). "Familial colorectal cancer type X: genetic profiles and phenotypic features." *Mod Pathol* 28(1): 30-6.
- Dominguez-Valentin, M., C. Therkildsen, S. Veerla, M. Jonsson, I. Bernstein, A. Borg and M. Nilbert (2013). "Distinct gene expression signatures in lynch syndrome and familial colorectal cancer type x." *PLoS One* 8(8): e71755.
- Dove-Edwin, I., A. E. de Jong, J. Adams, D. Mesher, L. Lipton, P. Sasieni, H. F. Vasen and H. J. Thomas (2006). "Prospective results of surveillance colonoscopy in dominant familial colorectal cancer with and without Lynch syndrome." *Gastroenterology* 130(7): 1995-2000.
- Duester, G. (2008). "Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis." *Cell* 134(6): 921-31.
- Dunham, I., N. Shimizu, B. A. Roe, S. Chissoe, A. R. Hunt, J. E. Collins, R. Bruskiewich, D. M. Beare, M. Clamp, L. J. Smink, R. Ainscough, J. P. Almeida, A. Babbage, C. Bagguley, J. Bailey, K. Barlow, K. N. Bates, O. Beasley, C. P. Bird, S. Blakey, A. M. Bridgeman, D. Buck, J. Burgess, W. D. Burrill, K. P. O'Brien and et al. (1999). "The DNA sequence of human chromosome 22." *Nature* 402(6761): 489-95.
- Dunlop, M. G., S. E. Dobbins, S. M. Farrington, A. M. Jones, C. Palles, N. Whiffin, A. Tenesa, S. Spain, P. Broderick, L. Y. Ooi, E. Domingo, C. Smillie, M. Henrion, M. Frampton, L. Martin, G. Grimes, M. Gorman, C. Semple, Y. P. Ma, E. Barclay, J. Prendergast, J. B. Cazier, B. Olver, S. Penegar, S. Lubbe, I. Chander, L. G. Carvajal-Carmona, S. Ballereau, A. Lloyd, J. Vijaykrishnan, L. Zgaga, I. Rudan, E. Theodoratou, J. M. Starr, I. Deary, I. Kirac, D. Kovacevic, L. A. Aaltonen, L. Renkonen-Sinisalo, J. P. Mecklin, K. Matsuda, Y. Nakamura, Y. Okada, S. Gallinger, D. J. Duggan, D. Conti,

- P. Newcomb, J. Hopper, M. A. Jenkins, F. Schumacher, G. Casey, D. Easton, M. Shah, P. Pharoah, A. Lindblom, T. Liu, C. G. Smith, H. West, J. P. Cheadle, R. Midgley, D. J. Kerr, H. Campbell, I. P. Tomlinson and R. S. Houlston (2012). "Common variation near CDKN1A, POLD3 and SHROOM2 influences colorectal cancer risk." *Nat Genet* 44(7): 770-6.
- Dunlop, M. G., S. M. Farrington, A. D. Carothers, A. H. Wyllie, L. Sharp, J. Burn, B. Liu, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1997). "Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations." *Hum Mol Genet* 6(1): 105-10.
- Dunlop, M. G., A. Tenesa, S. M. Farrington, S. Ballereau, D. H. Brewster, T. Koessler, P. Pharoah, C. Schafmayer, J. Hampe, H. Volzke, J. Chang-Claude, M. Hoffmeister, H. Brenner, S. von Holst, S. Picelli, A. Lindblom, M. A. Jenkins, J. L. Hopper, G. Casey, D. Duggan, P. A. Newcomb, A. Abuli, X. Bessa, C. Ruiz-Ponte, S. Castellvi-Bel, I. Niittymaki, S. Tuupanen, A. Karhu, L. Aaltonen, B. Zanke, T. Hudson, S. Gallinger, E. Barclay, L. Martin, M. Gorman, L. Carvajal-Carmona, A. Walther, D. Kerr, S. Lubbe, P. Broderick, I. Chandler, A. Pittman, S. Penegar, H. Campbell, I. Tomlinson and R. S. Houlston (2013). "Cumulative impact of common genetic variants and other risk factors on colorectal cancer risk in 42,103 individuals." *Gut* 62(6): 871-81.
- Durko, L. and E. Malecka-Panas (2014). "Lifestyle Modifications and Colorectal Cancer." *Curr Colorectal Cancer Rep* 10: 45-54.

## E

- Edwards, B. K., A. M. Noone, A. B. Mariotto, E. P. Simard, F. P. Boscoe, S. J. Henley, A. Jemal, H. Cho, R. N. Anderson, B. A. Kohler, C. R. Ehemann and E. M. Ward (2014). "Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2010, featuring prevalence of comorbidity and impact on survival among persons with lung, colorectal, breast, or prostate cancer." *Cancer* 120(9): 1290-314.
- Edwards, S., C. M. Li, D. L. Levy, J. Brown, P. M. Snow and J. L. Campbell (2003). "Saccharomyces cerevisiae DNA polymerase epsilon and polymerase sigma interact physically and functionally, suggesting a role for polymerase epsilon in sister chromatid cohesion." *Mol Cell Biol* 23(8): 2733-48.
- Egeblad, M., E. S. Nakasone and Z. Werb (2010). "Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism." *Dev Cell* 18(6): 884-901.
- Elgar, G. and T. Vavouri (2008). "Tuning in to the signals: noncoding sequence conservation in vertebrate genomes." *Trends Genet* 24(7): 344-52.
- Elsayed, F. A., C. M. Kets, D. Ruano, B. van den Akker, A. R. Mensenkamp, M. Schrupf, M. Nielsen, J. T. Wijnen, C. M. Tops, M. J. Ligtenberg, H. F. Vasen, F. J. Hes, H. Morreau and T. van Wezel (2014). "Germline variants in POLE are associated with early onset mismatch repair deficient colorectal cancer." *Eur J Hum Genet*.
- Engel, C., N. Rahner, K. Schulmann, E. Holinski-Feder, T. O. Goecke, H. K. Schackert, M. Kloor, V. Steinke, H. Vogelsang, G. Moslein, H. Gorgens, S. Dechant, M. von Knebel Doeberitz, J. Ruschoff, N. Friedrichs, R. Buttner, M. Loeffler, P. Propping and W. Schmiegel (2010). "Efficacy of annual colonoscopic surveillance in individuals with hereditary nonpolyposis colorectal cancer." *Clin Gastroenterol Hepatol* 8(2): 174-82.
- Engelhardt, M., P. Drullinsky, J. Guillem and M. A. Moore (1997). "Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer." *Clin Cancer Res* 3(11): 1931-41.
- Esteban-Jurado, C., M. Vila-Casadesus, P. Garre, J. J. Lozano, A. Pristoupilova, S. Beltran, J. Munoz, T. Ocana, F. Balaguer, M. Lopez-Ceron, M. Cuatrecasas, S. Franch-Exposito, J. M. Pique, A. Castells, A. Carracedo, C. Ruiz-Ponte, A. Abuli, X. Bessa, M. Andreu, L. Bujanda, T. Caldes and S. Castellvi-Bel (2015). "Whole-exome sequencing identifies rare pathogenic variants in new predisposition genes for familial colorectal cancer." *Genet Med* 17(2): 131-42.

Estecio, M. R., V. Gharibyan, L. Shen, A. E. Ibrahim, K. Doshi, R. He, J. Jelinek, A. S. Yang, P. S. Yan, T. H. Huang, E. H. Tajara and J. P. Issa (2007). "LINE-1 hypomethylation in cancer is highly variable and inversely correlated with microsatellite instability." *PLoS One* 2(5): e399.

## F

Fairley, J. A., L. E. Mitchell, T. Berg, N. S. Kenneth, C. von Schubert, H. H. Sillje, R. H. Medema, E. A. Nigg and R. J. White (2012). "Direct regulation of tRNA and 5S rRNA gene transcription by Polo-like kinase 1." *Mol Cell* 45(4): 541-52.

Fang, S. and P. Salven (2011). "Stem cells in tumor angiogenesis." *J Mol Cell Cardiol* 50(2): 290-5.

Farrington, S. M., A. Tenesa, R. Barnetson, A. Wiltshire, J. Prendergast, M. Porteous, H. Campbell and M. G. Dunlop (2005). "Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects." *Am J Hum Genet* 77(1): 112-9.

Fearon, E. R. and B. Vogelstein (1990). "A genetic model for colorectal tumorigenesis." *Cell* 61(5): 759-67.

Felix, R., W. Bodmer, N. S. Fearnhead, L. van der Merwe, P. Goldberg and R. S. Ramesar (2006). "GSTM1 and GSTT1 polymorphisms as modifiers of age at diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) in a homogeneous cohort of individuals carrying a single predisposing mutation." *Mutat Res* 602(1-2): 175-81.

Felton-Edkins, Z. A., N. S. Kenneth, T. R. Brown, N. L. Daly, N. Gomez-Roman, C. Grandori, R. N. Eisenman and R. J. White (2003a). "Direct regulation of RNA polymerase III transcription by RB, p53 and c-Myc." *Cell Cycle* 2(3): 181-4.

Felton-Edkins, Z. A., J. A. Fairley, E. L. Graham, I. M. Johnston, R. J. White and P. H. Scott (2003b). "The mitogen-activated protein (MAP) kinase ERK induces tRNA synthesis by phosphorylating TFIIIB." *Embo J* 22(10): 2422-32.

Ferlay, J., E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. Coebergh, H. Comber, D. Forman and F. Bray (2013). "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012." *Eur J Cancer* 49(6): 1374-403.

Fernandez-Rozadilla, C., J. B. Cazier, I. Tomlinson, A. Brea-Fernandez, M. J. Lamas, M. Baiget, L. A. Lopez-Fernandez, J. Clofent, L. Bujanda, D. Gonzalez, L. de Castro, K. Hemminki, X. Bessa, M. Andreu, R. Jover, R. Xicola, X. Llor, V. Moreno, A. Castells, S. Castellvi-Bel, A. Carracedo and C. Ruiz-Ponte (2013). "A genome-wide association study on copy-number variation identifies a 11q11 loss as a candidate susceptibility variant for colorectal cancer." *Hum Genet* 133(5): 525-34.

Ferrari, P., M. Jenab, T. Norat, A. Moskal, N. Slimani, A. Olsen, A. Tjonneland, K. Overvad, M. K. Jensen, M. C. Boutron-Ruault, F. Clavel-Chapelon, S. Morois, S. Rohrmann, J. Linseisen, H. Boeing, M. Bergmann, D. Kontopoulou, A. Trichopoulou, C. Kassapa, G. Masala, V. Krogh, P. Vineis, S. Panico, R. Tumino, C. H. van Gils, P. Peeters, H. B. Bueno-de-Mesquita, M. C. Ocke, G. Skeie, E. Lund, A. Agudo, E. Ardanaz, D. C. Lopez, M. J. Sanchez, J. R. Quiros, P. Amiano, G. Berglund, J. Manjer, R. Palmqvist, B. Van Gulpen, N. Allen, T. Key, S. Bingham, M. Mazuir, P. Boffetta, R. Kaaks and E. Riboli (2007). "Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancers in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC)." *Int J Cancer* 121(9): 2065-72.

Fleischmann, R. D., M. D. Adams, O. White, R. A. Clayton, E. F. Kirkness, A. R. Kerlavage, C. J. Bult, J. F. Tomb, B. A. Dougherty, J. M. Merrick and et al. (1995). "Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd." *Science* 269(5223): 496-512.

Foulds, L. (1954). "The experimental study of tumor progression: a review." *Cancer Res* 14(5): 327-39.

Francisco, I., C. Albuquerque, P. Lage, H. Belo, I. Vitoriano, B. Filipe, I. Claro, S. Ferreira, P. Rodrigues, P. Chaves, C. N. Leitao and A. D. Pereira (2011). "Familial colorectal cancer type X syndrome: two distinct molecular entities?" *Fam Cancer* 10(4): 623-31.

- Frayling, I. M., W. F. Bodmer and I. P. Tomlinson (1997). "Allele loss in colorectal cancer at the Cowden disease/juvenile polyposis locus on 10q." *Cancer Genet Cytogenet* 97(1): 64-9.
- Frazier, M. L., F. T. O'Donnell, S. Kong, X. Gu, I. Campos, R. Luthra, P. M. Lynch and C. I. Amos (2001). "Age-associated risk of cancer among individuals with N-acetyltransferase 2 (NAT2) mutations and mutations in DNA mismatch repair genes." *Cancer Res* 61(4): 1269-71.
- Fukuyama, R., R. Nicolaita, K. P. Ng, E. Obusez, J. Sanchez, M. Kalady, P. P. Aung, G. Casey and N. Sizemore (2008). "Mutated in colorectal cancer, a putative tumor suppressor for serrated colorectal cancer, selectively represses beta-catenin-dependent transcription." *Oncogene* 27(46): 6044-55.

## G

- Garre, P., V. Briceno, R. M. Xicola, B. J. Doyle, M. de la Hoya, J. Sanz, P. Llovet, P. Pescador, J. Puente, E. Diaz-Rubio, X. Llor and T. Caldes (2011). "Analysis of the oxidative damage repair genes NUDT1, OGG1, and MUTYH in patients from mismatch repair proficient HNPCC families (MSS-HNPCC)." *Clin Cancer Res* 17(7): 1701-12.
- Garre, P., L. Martin, J. Sanz, A. Romero, A. Tosar, I. Bando, P. Llovet, P. Diaque, B. Garcia-Paredes, E. Diaz-Rubio, M. de la Hoya and T. Caldes (2014). "BRCA2 gene: a candidate for clinical testing in familial colorectal cancer type X." *Clin Genet*.
- Gatalica, Z. and E. Torlakovic (2008). "Pathology of the hereditary colorectal carcinoma." *Fam Cancer* 7(1): 15-26.
- Gebhardt, F., K. S. Zanker and B. Brandt (1999). "Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1." *J Biol Chem* 274(19): 13176-80.
- Geiduschek, E. P. and G. A. Kassavetis (2001). "The RNA polymerase III transcription apparatus." *J Mol Biol* 310(1): 1-26.
- Giaccia, A. J. and E. Schipani (2010). "Role of carcinoma-associated fibroblasts and hypoxia in tumor progression." *Curr Top Microbiol Immunol* 345: 31-45.
- Gilissen, C., A. Hoischen, H. G. Brunner and J. A. Veltman (2012). "Disease gene identification strategies for exome sequencing." *Eur J Hum Genet* 20(5): 490-7.
- Giovannucci, E. (2001). "Insulin, insulin-like growth factors and colon cancer: a review of the evidence." *J Nutr* 131(11 Suppl): 3109S-20S.
- Gismondi, V., M. Meta, L. Bonelli, P. Radice, P. Sala, L. Bertario, A. Viel, M. Fornasarig, A. Arrigoni, M. Gentile, M. Ponz de Leon, L. Anselmi, C. Mareni, P. Bruzzi and L. Varesco (2004). "Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas." *Int J Cancer* 109(5): 680-4.
- Goel, A., T. Nagasaka, C. N. Arnold, T. Inoue, C. Hamilton, D. Niedzwiecki, C. Compton, R. J. Mayer, R. Goldberg, M. M. Bertagnolli and C. R. Boland (2007). "The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer." *Gastroenterology* 132(1): 127-38.
- Goel, A., R. M. Xicola, T. P. Nguyen, B. J. Doyle, V. R. Sohn, P. Bandipalliam, L. S. Rozek, J. Reyes, C. Cordero, F. Balaguer, A. Castells, R. Jover, M. Andreu, S. Syngal, C. R. Boland and X. Llor (2010). "Aberrant DNA methylation in hereditary nonpolyposis colorectal cancer without mismatch repair deficiency." *Gastroenterology* 138(5): 1854-62.
- Goffin, A., L. H. Hoefsloot, E. Bosgoed, A. Swillen and J. P. Fryns (2001). "PTEN mutation in a family with Cowden syndrome and autism." *Am J Med Genet* 105(6): 521-4.
- Gomez-Fernandez, N., S. Castellvi-Bel, C. Fernandez-Rozadilla, F. Balaguer, J. Munoz, I. Madrigal, M. Mila, B. Grana, A. Vega, A. Castells, A. Carracedo and C. Ruiz-Ponte (2009). "Molecular analysis of the APC and MUTYH genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations?" *BMC Med Genet* 10: 57.

- Gomez-Herreros, F., O. Rodriguez-Galan, M. Morillo-Huesca, D. Maya, M. Arista-Romero, J. de la Cruz, S. Chavez and M. C. Munoz-Centeno (2013). "Balanced production of ribosome components is required for proper G1/S transition in *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 288(44): 31689-700.
- Gonnelli, G., M. Rooman and Y. Dehouck (2012). "Structure-based mutant stability predictions on proteins of unknown structure." *J Biotechnol* 161(3): 287-93.
- Gottesfeld, J. M., V. J. Wolf, T. Dang, D. J. Forbes and P. Hartl (1994). "Mitotic repression of RNA polymerase III transcription in vitro mediated by phosphorylation of a TFIIIB component." *Science* 263(5143): 81-4.
- Grady, W. M. and S. D. Markowitz (2002). "Genetic and epigenetic alterations in colon cancer." *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3: 101-28.
- Gray-McGuire, C., K. Guda, I. Adrianto, C. P. Lin, L. Natale, J. D. Potter, P. Newcomb, E. M. Poole, C. M. Ulrich, N. Lindor, E. L. Goode, B. L. Fridley, R. Jenkins, L. Le Marchand, G. Casey, R. Haile, J. Hopper, M. Jenkins, J. Young, D. Buchanan, S. Gallinger, M. Adams, S. Lewis, J. Willis, R. Elston, S. D. Markowitz and G. L. Wiesner (2010). "Confirmation of linkage to and localization of familial colon cancer risk haplotype on chromosome 9q22." *Cancer Res* 70(13): 5409-18.
- Green, D. R. and G. Kroemer (2009). "Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53." *Nature* 458(7242): 1127-30.
- Greider, C. W. and E. H. Blackburn (1985). "Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts." *Cell* 43(2 Pt 1): 405-13.
- Grover, S., F. Kastrinos, E. W. Steyerberg, E. F. Cook, A. Dewanwala, L. A. Burbidge, R. J. Wenstrup and S. Syngal (2012). "Prevalence and phenotypes of APC and MUTYH mutations in patients with multiple colorectal adenomas." *Jama* 308(5): 485-92.
- Guda, K., H. Moinova, J. He, O. Jamison, L. Ravi, L. Natale, J. Lutterbaugh, E. Lawrence, S. Lewis, J. K. Willson, J. B. Lowe, G. L. Wiesner, G. Parmigiani, J. Barnholtz-Sloan, D. W. Dawson, V. E. Velculescu, K. W. Kinzler, N. Papadopoulos, B. Vogelstein, J. Willis, T. A. Gerken and S. D. Markowitz (2009). "Inactivating germ-line and somatic mutations in polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 12 in human colon cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(31): 12921-5.
- Gusella, J. F., N. S. Wexler, P. M. Conneally, S. L. Naylor, M. A. Anderson, R. E. Tanzi, P. C. Watkins, K. Ottina, M. R. Wallace, A. Y. Sakaguchi and et al. (1983). "A polymorphic DNA marker genetically linked to Huntington's disease." *Nature* 306(5940): 234-8.
- Gylfe, A. E., R. Katainen, J. Kondelin, T. Tanskanen, T. Cajuso, U. Hanninen, J. Taipale, M. Taipale, L. Renkonen-Sinisalo, H. Jarvinen, J. P. Mecklin, O. Kilpivaara, E. Pitkanen, P. Vahteristo, S. Tuupanen, A. Karhu and L. A. Aaltonen (2013). "Eleven candidate susceptibility genes for common familial colorectal cancer." *PLoS Genet* 9(10): e1003876.
- Gylfe, A. E., J. Sirkia, M. Ahlsten, H. Jarvinen, J. P. Mecklin, A. Karhu and L. A. Aaltonen (2010). "Somatic mutations and germline sequence variants in patients with familial colorectal cancer." *Int J Cancer* 127(12): 2974-80.

## H

- Haanstra, J. F., W. H. de Vos Tot Nederveen Cappel, J. P. Gopie, J. Vecht, S. A. Vanhoutvin, A. Cats, H. J. van der Zaag-Loonen, A. M. Langers, J. H. Bergmann, P. C. van de Meeberg, E. Dekker, J. H. Kleibeuker, H. F. Vasen, F. M. Nagengast and P. van Duijvendijk (2012). "Quality of life after surgery for colon cancer in patients with Lynch syndrome: partial versus subtotal colectomy." *Dis Colon Rectum* 55(6): 653-9.
- Hackett, J. A., D. M. Feldser and C. W. Greider (2001). "Telomere dysfunction increases mutation rate



- and genomic instability." *Cell* 106(3): 275-86.
- Haiman, C. A., G. K. Chen, C. M. Vachon, F. Canzian, A. Dunning, R. C. Millikan, X. Wang, F. Ademuyiwa, S. Ahmed, C. B. Ambrosone, L. Baglietto, R. Balleine, E. V. Bandera, M. W. Beckmann, C. D. Berg, L. Bernstein, C. Blomqvist, W. J. Blot, H. Brauch, J. E. Buring, L. A. Carey, J. E. Carpenter, J. Chang-Claude, S. J. Chanock, D. I. Chasman, C. L. Clarke, A. Cox, S. S. Cross, S. L. Deming, R. B. Diasio, A. M. Dimopoulos, W. R. Driver, T. Dunnebier, L. Durcan, D. Eccles, C. K. Edlund, A. B. Ekici, P. A. Fasching, H. S. Feigelson, D. Flesch-Janys, F. Fostira, A. Forsti, G. Fountzilas, S. M. Gerty, G. G. Giles, A. K. Godwin, P. Goodfellow, N. Graham, D. Greco, U. Hamann, S. E. Hankinson, A. Hartmann, R. Hein, J. Heinz, A. Holbrook, R. N. Hoover, J. J. Hu, D. J. Hunter, S. A. Ingles, A. Irwanto, J. Ivanovich, E. M. John, N. Johnson, A. Jukkola-Vuorinen, R. Kaaks, Y. D. Ko, L. N. Kolonel, I. Konstantopoulou, V. M. Kosma, S. Kulkarni, D. Lambrechts, A. M. Lee, L. L. Marchand, T. Lesnick, J. Liu, S. Lindstrom, A. Mannermaa, S. Margolin, N. G. Martin, P. Miron, G. W. Montgomery, H. Nevanlinna, S. Nickels, S. Nyante, C. Olswold, J. Palmer, H. Pathak, D. Pectasides, C. M. Perou, J. Peto, P. D. Pharoah, L. C. Pooler, M. F. Press, K. Pylkas, T. R. Rebbeck, J. L. Rodriguez-Gil, L. Rosenberg, E. Ross, T. Rudiger, S. Silva Idos, E. Sawyer, M. K. Schmidt, R. Schulz-Wendtland, F. Schumacher, G. Severi, X. Sheng, L. B. Signorello, H. P. Sinn, K. N. Stevens, M. C. Southey, W. J. Tapper, I. Tomlinson, F. B. Hogervorst, E. Wauters, J. Weaver, H. Wildiers, R. Winqvist, D. Van Den Berg, P. Wan, L. Y. Xia, D. Yannoukakos, W. Zheng, R. G. Ziegler, A. Siddiq, S. L. Slager, D. O. Stram, D. Easton, P. Kraft, B. E. Henderson and F. J. Couch (2011). "A common variant at the TERT-CLPTM1L locus is associated with estrogen receptor-negative breast cancer." *Nat Genet* 43(12): 1210-4.
- Half, E., D. Bercovich and P. Rozen (2009). "Familial adenomatous polyposis." *Orphanet J Rare Dis* 4: 22.
- Hamilton, S. R., B. Liu, R. E. Parsons, N. Papadopoulos, J. Jen, S. M. Powell, A. J. Krush, T. Berk, Z. Cohen, B. Tetu and et al. (1995). "The molecular basis of Turcot's syndrome." *N Engl J Med* 332(13): 839-47.
- Hammerling, U., J. B. Laurila, R. Grafstrom and N. G. Ilback (2014). "Consumption of Red/processed Meat and Colorectal Carcinoma: Possible Mechanisms underlying the Significant Association." *Crit Rev Food Sci Nutr*: 0.
- Hampel, H., W. L. Frankel, E. Martin, M. Arnold, K. Khanduja, P. Kuebler, M. Clendenning, K. Sotamaa, T. Prior, J. A. Westman, J. Panescu, D. Fix, J. Lockman, J. LaJeunesse, I. Comeras and A. de la Chapelle (2008). "Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer." *J Clin Oncol* 26(35): 5783-8.
- Hampel, H., W. L. Frankel, E. Martin, M. Arnold, K. Khanduja, P. Kuebler, H. Nakagawa, K. Sotamaa, T. W. Prior, J. Westman, J. Panescu, D. Fix, J. Lockman, I. Comeras and A. de la Chapelle (2005). "Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer)." *N Engl J Med* 352(18): 1851-60.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-74.
- Hanks, S. and N. Rahman (2005). "Aneuploidy-cancer predisposition syndromes: a new link between the mitotic spindle checkpoint and cancer." *Cell Cycle* 4(2): 225-7.
- Harley, C. B. (1991). "Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?" *Mutat Res* 256(2-6): 271-82.
- Harley, C. B., A. B. Futcher and C. W. Greider (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." *Nature* 345(6274): 458-60.
- Hassan, C., P. Giorgi Rossi, L. Camilloni, D. K. Rex, B. Jimenez-Cendales, E. Ferroni, P. Borgia, A. Zullo and G. Guasticchi (2012). "Meta-analysis: adherence to colorectal cancer screening and the detection rate for advanced neoplasia, according to the type of screening test." *Aliment Pharmacol Ther* 36(10): 929-40.
- Hatina, J., M. Kripnerova, J. Tukova, J. Sramek, P. Dvorak, M. Pesta, J. Dobra, V. Babuska, J. Racek, M. Sobol, A. Philimonenko, P. Hozak, Z. Czuba, W. A. Schulz, C. Strell, S. Grimm, S. Jennek and K. H. Friedrich (2015). "[Tumour-stroma interactions in urothelial cancer]." *Urologe A* 54(4): 516-25.
- Heald, B., T. Plesec, X. Liu, R. Pai, D. Patil, J. Moline, R. R. Sharp, C. A. Burke, M. F. Kalady, J. Church and C. Eng (2013). "Implementation of universal microsatellite instability and immunohistochemistry screening for diagnosing lynch syndrome in a large academic medical

- center." *J Clin Oncol* 31(10): 1336-40.
- Hearle, N., V. Schumacher, F. H. Menko, S. Olschwang, L. A. Boardman, J. J. Gille, J. J. Keller, A. M. Westerman, R. J. Scott, W. Lim, J. D. Trimbath, F. M. Giardiello, S. B. Gruber, G. J. Offerhaus, F. W. de Rooij, J. H. Wilson, A. Hansmann, G. Moslein, B. Royer-Pokora, T. Vogel, R. K. Phillips, A. D. Spigelman and R. S. Houlston (2006). "Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome." *Clin Cancer Res* 12(10): 3209-15.
- Heinimann, K., R. J. Scott, P. Chappuis, W. Weber, H. Muller, Z. Dobbie and P. Hutter (1999). "N-acetyltransferase 2 influences cancer prevalence in hMLH1/hMSH2 mutation carriers." *Cancer Res* 59(13): 3038-40.
- Hemminki, A., D. Markie, I. Tomlinson, E. Avizienyte, S. Roth, A. Loukola, G. Bignell, W. Warren, M. Aminoff, P. Hoglund, H. Jarvinen, P. Kristo, K. Pelin, M. Ridanpaa, R. Salovaara, T. Toro, W. Bodmer, S. Olschwang, A. S. Olsen, M. R. Stratton, A. de la Chapelle and L. A. Aaltonen (1998). "A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome." *Nature* 391(6663): 184-7.
- Hemminki, K., A. Forsti and J. L. Bermejo (2008a). "The 'common disease-common variant' hypothesis and familial risks." *PLoS One* 3(6): e2504.
- Hemminki, K., A. Forsti and J. Lorenzo Bermejo (2008b). "New cancer susceptibility loci: population and familial risks." *Int J Cancer* 123(7): 1726-9.
- Herman, G. E., E. Butter, B. Enrile, M. Pastore, T. W. Prior and A. Sommer (2007). "Increasing knowledge of PTEN germline mutations: Two additional patients with autism and macrocephaly." *Am J Med Genet A* 143A(6): 589-93.
- Herzig, D. O. and V. L. Tsikitis (2015). "Molecular markers for colon diagnosis, prognosis and targeted therapy." *J Surg Oncol* 111(1): 96-102.
- Hes, F. J., M. Nielsen, E. C. Bik, D. Konvalinka, J. T. Wijnen, E. Bakker, H. F. Vasen, M. H. Breuning and C. M. Tops (2008). "Somatic APC mosaicism: an underestimated cause of polyposis coli." *Gut* 57(1): 71-6.
- Hitchins, M. P. (2013). "The role of epigenetics in Lynch syndrome." *Fam Cancer* 12(2): 189-205.
- Hofer, P., A. Baierl, K. Bernhart, G. Leeb, K. Mach, M. Micksche and A. Gsur (2012). "Association of genetic variants of human telomerase with colorectal polyps and colorectal cancer risk." *Mol Carcinog* 51 Suppl 1: E176-82.
- Hosgood, H. D., 3rd, R. Cawthon, X. He, S. Chanock and Q. Lan (2009). "Genetic variation in telomere maintenance genes, telomere length, and lung cancer susceptibility." *Lung Cancer* 66(2): 157-61.
- Houille, S., F. Charbonnier, E. Houivet, J. Tinat, M. P. Buisine, O. Caron, J. Benichou, S. Baert-Desurmont and T. Frebourg (2011). "Evaluation of Lynch syndrome modifier genes in 748 MMR mutation carriers." *Eur J Hum Genet* 19(8): 887-92.
- Houlston, R. S. (2012). "COGENT (COlorectal cancer GENEtics) revisited." *Mutagenesis* 27(2): 143-51.
- Houlston, R. S., J. Cheadle, S. E. Dobbins, A. Tenesa, A. M. Jones, K. Howarth, S. L. Spain, P. Broderick, E. Domingo, S. Farrington, J. G. Prendergast, A. M. Pittman, E. Theodoratou, C. G. Smith, B. Olver, A. Walther, R. A. Barnetson, M. Churchman, E. E. Jaeger, S. Penegar, E. Barclay, L. Martin, M. Gorman, R. Mager, E. Johnstone, R. Midgley, I. Niittymaki, S. Tuupanen, J. Colley, S. Idziaszczyk, H. J. Thomas, A. M. Lucassen, D. G. Evans, E. R. Maher, T. Maughan, A. Dimas, E. Dermitzakis, J. B. Cazier, L. A. Aaltonen, P. Pharoah, D. J. Kerr, L. G. Carvajal-Carmona, H. Campbell, M. G. Dunlop and I. P. Tomlinson (2010). "Meta-analysis of three genome-wide association studies identifies susceptibility loci for colorectal cancer at 1q41, 3q26.2, 12q13.13 and 20q13.33." *Nat Genet* 42(11): 973-7.
- Houlston, R. S., E. Webb, P. Broderick, A. M. Pittman, M. C. Di Bernardo, S. Lubbe, I. Chandler, J. Vijayakrishnan, K. Sullivan, S. Penegar, L. Carvajal-Carmona, K. Howarth, E. Jaeger, S. L. Spain, A. Walther, E. Barclay, L. Martin, M. Gorman, E. Domingo, A. S. Teixeira, D. Kerr, J. B. Cazier, I. Niittymaki, S. Tuupanen, A. Karhu, L. A. Aaltonen, I. P. Tomlinson, S. M. Farrington, A. Tenesa, J. G. Prendergast, R. A. Barnetson, R. Cetnarskyj, M. E. Porteous, P. D. Pharoah, T. Koessler, J. Hampe, S. Buch, C. Schafmayer, J. Tepel, S. Schreiber, H. Volzke, J. Chang-Claude, M. Hoffmeister, H. Brenner, B. W. Zanke, A. Montpetit, T. J. Hudson, S. Gallinger, H. Campbell and M. G. Dunlop (2008). "Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer." *Nat Genet* 40(12): 1426-35.

- Howe, J. R., J. L. Haidle, G. Lal, J. Bair, C. Song, B. Pechman, S. Chinnathambi and H. T. Lynch (2007). "ENG mutations in MADH4/BMPR1A mutation negative patients with juvenile polyposis." *Clin Genet* 71(1): 91-2.
- Howe, J. R., F. A. Mitros and R. W. Summers (1998). "The risk of gastrointestinal carcinoma in familial juvenile polyposis." *Ann Surg Oncol* 5(8): 751-6.
- Howe, J. R., M. G. Sayed, A. F. Ahmed, J. Ringold, J. Larsen-Haidle, A. Merg, F. A. Mitros, C. A. Vaccaro, G. M. Petersen, F. M. Giardiello, S. T. Tinley, L. A. Aaltonen and H. T. Lynch (2004). "The prevalence of MADH4 and BMPR1A mutations in juvenile polyposis and absence of BMPR2, BMPR1B, and ACVR1 mutations." *J Med Genet* 41(7): 484-91.
- Hughes, L. A., C. A. Khalid-de Bakker, K. M. Smits, P. A. van den Brandt, D. Jonkers, N. Ahuja, J. G. Herman, M. P. Weijenberg and M. van Engeland (2012). "The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: progress and problems." *Biochim Biophys Acta* 1825(1): 77-85.
- Hutter, R. V. and L. H. Sobin (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

- Iacopetta, B. (2003). "TP53 mutation in colorectal cancer." *Hum Mutat* 21(3): 271-6.
- Iacopetta, B., F. Grieu and B. Amanuel (2010). "Microsatellite instability in colorectal cancer." *Asia Pac J Clin Oncol* 6(4): 260-9.
- Imamura, Y., P. Lochhead, M. Yamauchi, A. Kuchiba, Z. R. Qian, X. Liao, R. Nishihara, S. Jung, K. Wu, K. Nosho, Y. E. Wang, S. Peng, A. J. Bass, K. M. Haigis, J. A. Meyerhardt, A. T. Chan, C. S. Fuchs and S. Ogino (2014). "Analyses of clinicopathological, molecular, and prognostic associations of KRAS codon 61 and codon 146 mutations in colorectal cancer: cohort study and literature review." *Mol Cancer* 13: 135.
- Iyer, R. R., A. Pluciennik, V. Burdett and P. L. Modrich (2006). "DNA mismatch repair: functions and mechanisms." *Chem Rev* 106(2): 302-23.

## J

- Jaeger, E., S. Leedham, A. Lewis, S. Segditsas, M. Becker, P. R. Cuadrado, H. Davis, K. Kaur, K. Heinemann, K. Howarth, J. East, J. Taylor, H. Thomas and I. Tomlinson (2012). "Hereditary mixed polyposis syndrome is caused by a 40-kb upstream duplication that leads to increased and ectopic expression of the BMP antagonist GREM1." *Nat Genet* 44(6): 699-703.
- Jaeger, E., E. Webb, K. Howarth, L. Carvajal-Carmona, A. Rowan, P. Broderick, A. Walther, S. Spain, A. Pittman, Z. Kemp, K. Sullivan, K. Heinemann, S. Lubbe, E. Domingo, E. Barclay, L. Martin, M. Gorman, I. Chandler, J. Vijaykrishnan, W. Wood, E. Papaemmanuil, S. Penegar, M. Qureshi, S. Farrington, A. Tenesa, J. B. Cazier, D. Kerr, R. Gray, J. Peto, M. Dunlop, H. Campbell, H. Thomas, R. Houlston and I. Tomlinson (2008). "Common genetic variants at the CRAC1 (HMPS) locus on chromosome 15q13.3 influence colorectal cancer risk." *Nat Genet* 40(1): 26-8.
- Jaeger, E. E., K. L. Woodford-Richens, M. Lockett, A. J. Rowan, E. J. Sawyer, K. Heinemann, P. Rozen, V. A. Murday, S. C. Whitelaw, A. Ginsberg, W. S. Atkin, H. T. Lynch, M. C. Southey, H. Debinski, C. Eng, W. F. Bodmer, I. C. Talbot, S. V. Hodgson, H. J. Thomas and I. P. Tomlinson (2003). "An ancestral Ashkenazi haplotype at the HMPS/CRAC1 locus on 15q13-q14 is associated with hereditary mixed polyposis syndrome." *Am J Hum Genet* 72(5): 1261-7.
- Jarvinen, H. J., L. Renkonen-Sinisalo, K. Aktan-Collan, P. Peltomaki, L. A. Aaltonen and J. P. Mecklin

- (2009). "Ten years after mutation testing for Lynch syndrome: cancer incidence and outcome in mutation-positive and mutation-negative family members." *J Clin Oncol* 27(28): 4793-7.
- Jasperson, K. W. and R. W. Burt (1998). "APC-Associated Polyposis Conditions."
- Jass, J. R. (2006). "Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term." *World J Gastroenterol* 12(31): 4943-50.
- Jass, J. R., D. S. Cottier, P. Jeevaratnam, V. Pokos, K. M. Holdaway, M. L. Bowden, N. S. Van de Water and P. J. Browett (1995). "Diagnostic use of microsatellite instability in hereditary non-polyposis colorectal cancer." *Lancet* 346(8984): 1200-1.
- Jass, J. R., C. B. Williams, H. J. Bussey and B. C. Morson (1988). "Juvenile polyposis--a precancerous condition." *Histopathology* 13(6): 619-30.
- Jelsig, A. M., N. Qvist, K. Brusgaard, C. B. Nielsen, T. P. Hansen and L. B. Ousager (2014). "Hamartomatous polyposis syndromes: a review." *Orphanet J Rare Dis* 9: 101.
- Jenkins, M. A., L. Baglietto, J. G. Dowty, C. M. Van Vliet, L. Smith, L. J. Mead, F. A. Macrae, D. J. St John, J. R. Jass, G. G. Giles, J. L. Hopper and M. C. Southey (2006). "Cancer risks for mismatch repair gene mutation carriers: a population-based early onset case-family study." *Clin Gastroenterol Hepatol* 4(4): 489-98.
- Jenne, D. E., H. Reimann, J. Nezu, W. Friedel, S. Loff, R. Jeschke, O. Muller, W. Back and M. Zimmer (1998). "Peutz-Jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase." *Nat Genet* 18(1): 38-43.
- Jia, W. H., B. Zhang, K. Matsuo, A. Shin, Y. B. Xiang, S. H. Jee, D. H. Kim, Z. Ren, Q. Cai, J. Long, J. Shi, W. Wen, G. Yang, R. J. Delahanty, B. T. Ji, Z. Z. Pan, F. Matsuda, Y. T. Gao, J. H. Oh, Y. O. Ahn, E. J. Park, H. L. Li, J. W. Park, J. Jo, J. Y. Jeong, S. Hosono, G. Casey, U. Peters, X. O. Shu, Y. X. Zeng and W. Zheng (2013). "Genome-wide association analyses in East Asians identify new susceptibility loci for colorectal cancer." *Nat Genet* 45(2): 191-6.
- Jiao, S., L. Hsu, S. Berndt, S. Bezieau, H. Brenner, D. Buchanan, B. J. Caan, P. T. Campbell, C. S. Carlson, G. Casey, A. T. Chan, J. Chang-Claude, S. Chanock, D. V. Conti, K. R. Curtis, D. Duggan, S. Gallinger, S. B. Gruber, T. A. Harrison, R. B. Hayes, B. E. Henderson, M. Hoffmeister, J. L. Hopper, T. J. Hudson, C. M. Hutter, R. D. Jackson, M. A. Jenkins, E. D. Kantor, L. N. Kolonel, S. Kury, L. Le Marchand, M. Lemire, P. A. Newcomb, J. D. Potter, C. Qu, S. A. Rosse, R. E. Schoen, F. R. Schumacher, D. Seminara, M. L. Slattery, C. M. Ulrich, B. W. Zanke and U. Peters (2012). "Genome-wide search for gene-gene interactions in colorectal cancer." *PLoS One* 7(12): e52535.
- Jin, G., L. Xu, Y. Shu, T. Tian, J. Liang, Y. Xu, F. Wang, J. Chen, J. Dai, Z. Hu and H. Shen (2009). "Common genetic variants on 5p15.33 contribute to risk of lung adenocarcinoma in a Chinese population." *Carcinogenesis* 30(6): 987-90.
- Johansson, M., D. G. Denardo and L. M. Coussens (2008). "Polarized immune responses differentially regulate cancer development." *Immunol Rev* 222: 145-54.
- Johns, L. E. and R. S. Houlston (2001). "A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk." *Am J Gastroenterol* 96(10): 2992-3003.
- Johnson, C. M., C. Wei, J. E. Ensor, D. J. Smolenski, C. I. Amos, B. Levin and D. A. Berry (2013). "Meta-analyses of colorectal cancer risk factors." *Cancer Causes Control* 24(6): 1207-22.
- Jones, A. M., A. D. Beggs, L. Carvajal-Carmona, S. Farrington, A. Tenesa, M. Walker, K. Howarth, S. Ballereau, S. V. Hodgson, A. Zauber, M. Bertagnolli, R. Midgley, H. Campbell, D. Kerr, M. G. Dunlop and I. P. Tomlinson (2012). "TERC polymorphisms are associated both with susceptibility to colorectal cancer and with longer telomeres." *Gut* 61(2): 248-54.
- Jones, J. S., C. I. Amos, M. Pande, X. Gu, J. Chen, I. M. Campos, Q. Wei, M. Rodriguez-Bigas, P. M. Lynch and M. L. Frazier (2006). "DNMT3b polymorphism and hereditary nonpolyposis colorectal cancer age of onset." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(5): 886-91.
- Jones, J. S., X. Chi, X. Gu, P. M. Lynch, C. I. Amos and M. L. Frazier (2004). "p53 polymorphism and age of onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Caucasian population." *Clin Cancer Res* 10(17): 5845-9.
- Joshi, A. D., A. Kim, J. P. Lewinger, C. M. Ulrich, J. D. Potter, M. Cotterchio, L. Le Marchand and M. C.

- Stern (2015). "Meat intake, cooking methods, dietary carcinogens, and colorectal cancer risk: findings from the Colorectal Cancer Family Registry." *Cancer Med.*
- Julin, B., I. Shui, C. M. Heaphy, C. E. Joshi, A. K. Meeker, E. Giovannucci, I. De Vivo and E. A. Platz (2015). "Circulating leukocyte telomere length and risk of overall and aggressive prostate cancer." *Br J Cancer* 112(4): 769-76.
- Juo, Y. Y., F. M. Johnston, D. Y. Zhang, H. H. Juo, H. Wang, E. P. Pappou, T. Yu, H. Easwaran, S. Baylin, M. van Engeland and N. Ahuja (2014). "Prognostic value of CpG island methylator phenotype among colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis." *Ann Oncol* 25(12): 2314-27.

## K

- Kang, K. J., B. H. Min, K. J. Ryu, K. M. Kim, D. K. Chang, J. J. Kim, J. C. Rhee and Y. H. Kim (2015). "The role of the CpG island methylator phenotype on survival outcome in colon cancer." *Gut Liver* 9(2): 202-7.
- Karoui, M., C. Tresallet, C. Julie, U. Zimmermann, F. Staroz, A. Brams, C. Muti, C. Boulard, A. M. Robreau, H. Puy, R. Malafosse, C. Penna, F. R. Pruvot, J. P. Thiery, C. Boileau, P. Rougier, B. Nordlinger, F. Radvanyi, B. Franc and H. Hofmann-Radvanyi (2004). "Loss of heterozygosity on 10q and mutational status of PTEN and BMP1A in colorectal primary tumours and metastases." *Br J Cancer* 90(6): 1230-4.
- Keimling, M., A. G. Renehan, G. Behrens, B. Fischer, A. R. Hollenbeck, A. J. Cross and M. F. Leitzmann (2013). "Comparison of associations of body mass index, abdominal adiposity, and risk of colorectal cancer in a large prospective cohort study." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 22(8): 1383-94.
- Kemp, Z. E., L. G. Carvajal-Carmona, E. Barclay, M. Gorman, L. Martin, W. Wood, A. Rowan, C. Donohue, S. Spain, E. Jaeger, D. G. Evans, E. R. Maher, T. Bishop, H. Thomas, R. Houlston and I. Tomlinson (2006). "Evidence of linkage to chromosome 9q22.33 in colorectal cancer kindreds from the United Kingdom." *Cancer Res* 66(10): 5003-6.
- Kenneth, N. S., B. A. Ramsbottom, N. Gomez-Roman, L. Marshall, P. A. Cole and R. J. White (2007). "TRRAP and GCN5 are used by c-Myc to activate RNA polymerase III transcription." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(38): 14917-22.
- Killela, P. J., Z. J. Reitman, Y. Jiao, C. Bettegowda, N. Agrawal, L. A. Diaz, Jr., A. H. Friedman, H. Friedman, G. L. Gallia, B. C. Giovanella, A. P. Grollman, T. C. He, Y. He, R. H. Hruban, G. I. Jallo, N. Mandahl, A. K. Meeker, F. Mertens, G. J. Netto, B. A. Rasheed, G. J. Riggins, T. A. Rosenquist, M. Schiffman, M. Shih, D. Theodorescu, M. S. Torbenson, V. E. Velculescu, T. L. Wang, N. Wentzensen, L. D. Wood, M. Zhang, R. E. McLendon, D. D. Bigner, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, N. Papadopoulos and H. Yan (2013). "TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(15): 6021-6.
- Kim, N. W., M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich and J. W. Shay (1994). "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer." *Science* 266(5193): 2011-5.
- Kinnersley, B., G. Migliorini, P. Broderick, N. Whiffin, S. E. Dobbins, G. Casey, J. Hopper, O. Sieber, L. Lipton, D. J. Kerr, M. G. Dunlop, I. P. Tomlinson and R. S. Houlston (2012). "The TERT variant rs2736100 is associated with colorectal cancer risk." *Br J Cancer* 107(6): 1001-8.
- Kirwan, M. and I. Dokal (2009). "Dyskeratosis congenita, stem cells and telomeres." *Biochim Biophys Acta* 1792(4): 371-9.
- Kirzin, S., L. Marisa, R. Guimbaud, A. De Reynies, M. Legrain, P. Laurent-Puig, P. Cordelier, B. Pradere, D. Bonnet, F. Meggetto, G. Portier, P. Brousset and J. Selves (2014). "Sporadic early-onset colorectal cancer is a specific sub-type of cancer: a morphological, molecular and genetics

- study." *PLoS One* 9(8): e103159.
- Kitkumthorn, N. and A. Mutirangura (2011). "Long interspersed nuclear element-1 hypomethylation in cancer: biology and clinical applications." *Clin Epigenetics* 2(2): 315-30.
- Klarskov, L., S. Holck, I. Bernstein and M. Nilbert (2012). "Hereditary colorectal cancer diagnostics: morphological features of familial colorectal cancer type X versus Lynch syndrome." *J Clin Pathol* 65(4): 352-6.
- Knickelbein, K. and L. Zhang (2015). "Mutant KRAS as a critical determinant of the therapeutic response of colorectal cancer." *Genes Dis* 2(1): 4-12.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* 68(4): 820-3.
- Koh, P. K., M. Kalady, M. Skacel, S. Fay, E. McGannon, J. Shenal, L. Arroyo, K. Toderick and J. Church (2011). "Familial colorectal cancer type X: polyp burden and cancer risk stratification via a family history score." *ANZ J Surg* 81(7-8): 537-42.
- Kokko, A., P. Laiho, R. Lehtonen, S. Korja, L. G. Carvajal-Carmona, H. Jarvinen, J. P. Mecklin, C. Eng, J. Schleutker, I. P. Tomlinson, P. Vahteristo and L. A. Aaltonen (2006). "EPHB2 germline variants in patients with colorectal cancer or hyperplastic polyposis." *BMC Cancer* 6: 145.
- Kokoska, R. J., L. Stefanovic, J. DeMai and T. D. Petes (2000). "Increased rates of genomic deletions generated by mutations in the yeast gene encoding DNA polymerase delta or by decreases in the cellular levels of DNA polymerase delta." *Mol Cell Biol* 20(20): 7490-504.
- Kolquist, K. A., L. W. Ellisen, C. M. Counter, M. Meyerson, L. K. Tan, R. A. Weinberg, D. A. Haber and W. L. Gerald (1998). "Expression of TERT in early premalignant lesions and a subset of cells in normal tissues." *Nat Genet* 19(2): 182-6.
- Koornstra, J. J., M. J. Mourits, R. H. Sijmons, A. M. Leliveld, H. Hollema and J. H. Kleibeuker (2009). "Management of extracolonic tumours in patients with Lynch syndrome." *Lancet Oncol* 10(4): 400-8.
- Korkaya, H. and M. S. Wicha (2010). "Cancer stem cells: nature versus nurture." *Nat Cell Biol* 12(5): 419-21.
- Kote-Jarai, Z., A. A. Olama, G. G. Giles, G. Severi, J. Schleutker, M. Weischer, D. Campa, E. Riboli, T. Key, H. Gronberg, D. J. Hunter, P. Kraft, M. J. Thun, S. Ingles, S. Chanock, D. Albanes, R. B. Hayes, D. E. Neal, F. C. Hamdy, J. L. Donovan, P. Pharoah, F. Schumacher, B. E. Henderson, J. L. Stanford, E. A. Ostrander, K. D. Sorensen, T. Dork, G. Andriole, J. L. Dickinson, C. Cybulski, J. Lubinski, A. Spurdle, J. A. Clements, S. Chambers, J. Aitken, R. A. Gardiner, S. N. Thibodeau, D. Schaid, E. M. John, C. Maier, W. Vogel, K. A. Cooney, J. Y. Park, L. Cannon-Albright, H. Brenner, T. Habuchi, H. W. Zhang, Y. J. Lu, R. Kaneva, K. Muir, S. Benlloch, D. A. Leongamornlert, E. J. Saunders, M. Tymrakiewicz, N. Mahmud, M. Guy, L. T. O'Brien, R. A. Wilkinson, A. L. Hall, E. J. Sawyer, T. Dadaev, J. Morrison, D. P. Dearnaley, A. Horwich, R. A. Huddart, V. S. Khoo, C. C. Parker, N. Van As, C. J. Woodhouse, A. Thompson, T. Christmas, C. Ogden, C. S. Cooper, A. Lophatonanon, M. C. Southey, J. L. Hopper, D. R. English, T. Wahlfors, T. L. Tammela, P. Klarskov, B. G. Nordestgaard, M. A. Roder, A. Tybjaerg-Hansen, S. E. Bojesen, R. Travis, F. Canzian, R. Kaaks, F. Wiklund, M. Aly, S. Lindstrom, W. R. Diver, S. Gapstur, M. C. Stern, R. Corral, J. Virtamo, A. Cox, C. A. Haiman, L. Le Marchand, L. Fitzgerald, S. Kolb, E. M. Kwon, D. M. Karyadi, T. F. Orntoft, M. Borre, A. Meyer, J. Serth, M. Yeager, S. I. Berndt, J. R. Marthick, B. Patterson, D. Wokolorczyk, J. Batra, F. Lose, S. K. McDonnell, A. D. Joshi, A. Shahabi, A. E. Rinckleb, A. Ray, T. A. Sellers, H. Y. Lin, R. A. Stephenson, J. Farnham, H. Muller, D. Rothenbacher, N. Tsuchiya, S. Narita, G. W. Cao, C. Slavov, V. Mitev, D. F. Easton and R. A. Eeles (2011). "Seven prostate cancer susceptibility loci identified by a multi-stage genome-wide association study." *Nat Genet* 43(8): 785-91.
- Kozłowska, J., P. Karpinski, E. Szmida, I. Laczmanska, B. Misiak, D. Ramsey, M. Bebenek, W. Kielan, K. A. Pesz and M. M. Sasiadek (2012). "Assessment of chromosomal imbalances in CIMP-high and CIMP-low/CIMP-0 colorectal cancers." *Tumour Biol* 33(4): 1015-9.
- Kruger, S., C. Engel, A. Bier, E. Mangold, C. Pagenstecher, M. Doeberitz, E. Holinski-Feder, G. Moeslein, G. Keller, E. Kunstmann, W. Friedl, J. Plaschke, J. Ruschoff and H. K. Schackert (2006). "Absence of association between cyclin D1 (CCND1) G870A polymorphism and age of onset in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." *Cancer Lett* 236(2): 191-7.

- Kruse, R., S. Uhlhaas, C. Lamberti, K. M. Keller, C. Jackisch, J. Steinhard, G. Knopfle, S. Loff, W. Back, M. Stolte, M. Jungck, P. Propping, W. Friedl and D. E. Jenne (1999). "Peutz-Jeghers syndrome: four novel inactivating germline mutations in the STK11 gene. Mutations in brief no. 227. Online." *Hum Mutat* 13(3): 257-8.
- Kuiper, R. P., L. E. Vissers, R. Venkatachalam, D. Bodmer, E. Hoenselaar, M. Goossens, A. Haufe, E. Kamping, R. C. Niessen, F. B. Hogervorst, J. J. Gille, B. Redeker, C. M. Tops, M. E. van Gijn, A. M. van den Ouweland, N. Rahner, V. Steinke, P. Kahl, E. Holinski-Feder, M. Morak, M. Kloor, S. Stemmler, B. Betz, P. Hutter, D. J. Bunyan, S. Syngal, J. O. Culver, T. Graham, T. L. Chan, I. D. Nagtegaal, J. H. van Krieken, H. K. Schackert, N. Hoogerbrugge, A. G. van Kessel and M. J. Ligtenberg (2011). "Recurrence and variability of germline EPCAM deletions in Lynch syndrome." *Hum Mutat* 32(4): 407-14.
- Kumar, P., S. Henikoff and P. C. Ng (2009). "Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm." *Nat Protoc* 4(7): 1073-81.
- Kury, S., C. Garrec, F. Airaud, F. Breheret, V. Guibert, C. Frenard, S. Jiao, D. Bonneau, P. Berthet, C. Bossard, O. Ingster, E. Cauchin and S. Bezieau (2014). "Evaluation of the colorectal cancer risk conferred by rare UNC5C alleles." *World J Gastroenterol* 20(1): 204-13.

**L**

- Lachlan, K. L., A. M. Lucassen, D. Bunyan and I. K. Temple (2007). "Cowden syndrome and Bannayan Riley Ruvalcaba syndrome represent one condition with variable expression and age-related penetrance: results of a clinical study of PTEN mutation carriers." *J Med Genet* 44(9): 579-85.
- Laghi, L., P. Bianchi, M. Roncalli and A. Malesci (2004). "Re: Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability." *J Natl Cancer Inst* 96(18): 1402-3; author reply 1403-4.
- Lai, K., A. Amsterdam, S. Farrington, R. T. Bronson, N. Hopkins and J. A. Lees (2009). "Many ribosomal protein mutations are associated with growth impairment and tumor predisposition in zebrafish." *Dev Dyn* 238(1): 76-85.
- Laken, S. J., G. M. Petersen, S. B. Gruber, C. Oddoux, H. Ostrer, F. M. Giardiello, S. R. Hamilton, H. Hampel, A. Markowitz, D. Klimstra, S. Jhanwar, S. Winawer, K. Offit, M. C. Luce, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1997). "Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC." *Nat Genet* 17(1): 79-83.
- Lammi, L., S. Arte, M. Somer, H. Jarvinen, P. Lahermo, I. Thesleff, S. Pirinen and P. Nieminen (2004). "Mutations in AXIN2 cause familial tooth agenesis and predispose to colorectal cancer." *Am J Hum Genet* 74(5): 1043-50.
- Lander, E. S. and D. Botstein (1987). "Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children." *Science* 236(4808): 1567-70.
- Lander, E. S., L. M. Linton, B. Birren, C. Nusbaum, M. C. Zody, J. Baldwin, K. Devon, K. Dewar, M. Doyle, W. FitzHugh, R. Funke, D. Gage, K. Harris, A. Heaford, J. Howland, L. Kann, J. Lehoczky, R. LeVine, P. McEwan, K. McKernan, J. Meldrim, J. P. Mesirov, C. Miranda, W. Morris, J. Naylor, C. Raymond, M. Rosetti, R. Santos, A. Sheridan, C. Sougnez, N. Stange-Thomann, N. Stojanovic, A. Subramanian, D. Wyman, J. Rogers, J. Sulston, R. Ainscough, S. Beck, D. Bentley, J. Burton, C. Clee, N. Carter, A. Coulson, R. Deadman, P. Deloukas, A. Dunham, I. Dunham, R. Durbin, L. French, D. Grafham, S. Gregory, T. Hubbard, S. Humphray, A. Hunt, M. Jones, C. Lloyd, A. McMurray, L. Matthews, S. Mercer, S. Milne, J. C. Mullikin, A. Mungall, R. Plumb, M. Ross, R. Shownkeen, S. Sims, R. H. Waterston, R. K. Wilson, L. W. Hillier, J. D. McPherson, M. A. Marra, E. R. Mardis, L. A. Fulton, A. T. Chinwalla, K. H. Pepin, W. R. Gish, S. L. Chissoe, M. C. Wendl, K. D. Delehaunty, T. L. Miner, A. Delehaunty, J. B. Kramer, L. L. Cook, R. S. Fulton, D. L. Johnson, P. J. Minx, S. W. Clifton, T. Hawkins, E. Branscomb, P. Predki, P. Richardson, S. Wenning, T. Slezak, N. Doggett, J. F. Cheng, A. Olsen, S. Lucas, C. Elkin, E. Uberbacher, M. Frazier, R. A. Gibbs, D. M. Muzny, S. E. Scherer, J. B. Bouck, E. J. Sodergren, K. C. Worley, C.

- M. Rives, J. H. Gorrell, M. L. Metzker, S. L. Naylor, R. S. Kucherlapati, D. L. Nelson, G. M. Weinstock, Y. Sakaki, A. Fujiyama, M. Hattori, T. Yada, A. Toyoda, T. Itoh, C. Kawagoe, H. Watanabe, Y. Totoki, T. Taylor, J. Weissenbach, R. Heilig, W. Saurin, F. Artiguenave, P. Brottier, T. Bruls, E. Pelletier, C. Robert, P. Wincker, D. R. Smith, L. Doucette-Stamm, M. Rubenfield, K. Weinstock, H. M. Lee, J. Dubois, A. Rosenthal, M. Platzer, G. Nyakatura, S. Taudien, A. Rump, H. Yang, J. Yu, J. Wang, G. Huang, J. Gu, L. Hood, L. Rowen, A. Madan, S. Qin, R. W. Davis, N. A. Federspiel, A. P. Abola, M. J. Proctor, R. M. Myers, J. Schmutz, M. Dickson, J. Grimwood, D. R. Cox, M. V. Olson, R. Kaul, C. Raymond, N. Shimizu, K. Kawasaki, S. Minoshima, G. A. Evans, M. Athanasiou, R. Schultz, B. A. Roe, F. Chen, H. Pan, J. Ramser, H. Lehrach, R. Reinhardt, W. R. McCombie, M. de la Bastide, N. Dedhia, H. Blocker, K. Hornischer, G. Nordsiek, R. Agarwala, L. Aravind, J. A. Bailey, A. Bateman, S. Batzoglou, E. Birney, P. Bork, D. G. Brown, C. B. Burge, L. Cerutti, H. C. Chen, D. Church, M. Clamp, R. R. Copley, T. Doerks, S. R. Eddy, E. E. Eichler, T. S. Furey, J. Galagan, J. G. Gilbert, C. Harmon, Y. Hayashizaki, D. Haussler, H. Hermjakob, K. Hokamp, W. Jang, L. S. Johnson, T. A. Jones, S. Kasif, A. Kasprzyk, S. Kennedy, W. J. Kent, P. Kitts, E. V. Koonin, I. Korf, D. Kulp, D. Lancet, T. M. Lowe, A. McLysaght, T. Mikkelsen, J. V. Moran, N. Mulder, V. J. Pollara, C. P. Ponting, G. Schuler, J. Schultz, G. Stater, A. F. Smit, E. Stupka, J. Szustakowski, D. Thierry-Mieg, J. Thierry-Mieg, L. Wagner, J. Wallis, R. Wheeler, A. Williams, Y. I. Wolf, K. H. Wolfe, S. P. Yang, R. F. Yeh, F. Collins, M. S. Guyer, J. Peterson, A. Felsenfeld, K. A. Wetterstrand, A. Patrinos, M. J. Morgan, P. de Jong, J. J. Catanese, K. Osoegawa, H. Shizuya, S. Choi and Y. J. Chen (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." *Nature* 409(6822): 860-921.
- Landi, M. T., N. Chatterjee, K. Yu, L. R. Goldin, A. M. Goldstein, M. Rotunno, L. Mirabello, K. Jacobs, W. Wheeler, M. Yeager, A. W. Bergen, Q. Li, D. Consonni, A. C. Pesatori, S. Wacholder, M. Thun, R. Diver, M. Oken, J. Virtamo, D. Albanes, Z. Wang, L. Burdette, K. F. Doheny, E. W. Pugh, C. Laurie, P. Brennan, R. Hung, V. Gaborieau, J. D. McKay, M. Lathrop, J. McLaughlin, Y. Wang, M. S. Tsao, M. R. Spitz, Y. Wang, H. Krokan, L. Vatten, F. Skorpen, E. Arnesen, S. Benhamou, C. Bouchard, A. Metspalu, T. Vooder, M. Nelis, K. Valk, J. K. Field, C. Chen, G. Goodman, P. Sulem, G. Thorleifsson, T. Rafnar, T. Eisen, W. Sauter, A. Rosenberger, H. Bickeboller, A. Risch, J. Chang-Claude, H. E. Wichmann, K. Stefansson, R. Houlston, C. I. Amos, J. F. Fraumeni, Jr., S. A. Savage, P. A. Bertazzi, M. A. Tucker, S. Chanock and N. E. Caporaso (2009). "A genome-wide association study of lung cancer identifies a region of chromosome 5p15 associated with risk for adenocarcinoma." *Am J Hum Genet* 85(5): 679-91.
- Lanza, G., M. Matteuzzi, R. Gafa, E. Orvieto, I. Maestri, A. Santini and L. del Senno (1998). "Chromosome 18q allelic loss and prognosis in stage II and III colon cancer." *Int J Cancer* 79(4): 390-5.
- Larrea, A. A., S. A. Lujan and T. A. Kunkel (2010). "SnapShot: DNA mismatch repair." *Cell* 141(4): 730 e1.
- Leal, J. F., J. Fominaya, A. Cascon, M. V. Guijarro, C. Blanco-Aparicio, M. Leonart, M. E. Castro, Y. C. S. Ramon, M. Robledo, D. H. Beach and A. Carnero (2008). "Cellular senescence bypass screen identifies new putative tumor suppressor genes." *Oncogene* 27(14): 1961-70.
- Lee, I. M., J. Lin, A. J. Castonguay, N. S. Barton, J. E. Buring and R. Y. Zee (2010). "Mean leukocyte telomere length and risk of incident colorectal carcinoma in women: a prospective, nested case-control study." *Clin Chem Lab Med* 48(2): 259-62.
- Lejbkovicz, F., I. Cohen, O. Barnett-Griness, M. Pinchev, J. Poynter, S. B. Gruber and G. Rennert (2012). "Common MUTYH mutations and colorectal cancer risk in multiethnic populations." *Fam Cancer* 11(3): 329-35.
- Lengauer, C., K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1997). "Genetic instability in colorectal cancers." *Nature* 386(6625): 623-7.
- Levine, A. J. and M. Oren (2009). "The first 30 years of p53: growing ever more complex." *Nat Rev Cancer* 9(10): 749-58.
- Levy, S., G. Sutton, P. C. Ng, L. Feuk, A. L. Halpern, B. P. Walenz, N. Axelrod, J. Huang, E. F. Kirkness, G. Denisov, Y. Lin, J. R. MacDonald, A. W. Pang, M. Shago, T. B. Stockwell, A. Tsiamouri, V. Bafna, V. Bansal, S. A. Kravitz, D. A. Busam, K. Y. Beeson, T. C. McIntosh, K. A. Remington, J. F. Abril, J. Gill, J. Borman, Y. H. Rogers, M. E. Frazier, S. W. Scherer, R. L. Strausberg and J. C. Venter (2007). "The diploid genome sequence of an individual human." *PLoS Biol* 5(10): e254.
- Li, H. and R. Durbin (2009). "Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform."



- Bioinformatics 25(14): 1754-60.
- Li, J., X. Cao, Y. Fang, Z. E. Liao, Y. Y. Liu, B. D. Huang and Y. J. Han (2013). "Overexpression of hTERT in potentially malignant colorectal laterally spreading tumors." *Mol Med Rep* 7(5): 1409-12.
- Li, X., F. Hu, Y. Wang, X. Yao, Z. Zhang, F. Wang, G. Sun, B. B. Cui, X. Dong and Y. Zhao (2014). "CpG island methylator phenotype and prognosis of colorectal cancer in Northeast China." *Biomed Res Int* 2014: 236361.
- Li, X. L., J. Zhou, Z. R. Chen and W. J. Chng (2015). "P53 mutations in colorectal cancer - molecular pathogenesis and pharmacological reactivation." *World J Gastroenterol* 21(1): 84-93.
- Lichtenstein, P., N. V. Holm, P. K. Verkasalo, A. Iliadou, J. Kaprio, M. Koskenvuo, E. Pukkala, A. Skytthe and K. Hemminki (2000). "Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland." *N Engl J Med* 343(2): 78-85.
- Lim, W., S. Olschwang, J. J. Keller, A. M. Westerman, F. H. Menko, L. A. Boardman, R. J. Scott, J. Trimbath, F. M. Giardiello, S. B. Gruber, J. J. Gille, G. J. Offerhaus, F. W. de Rooij, J. H. Wilson, A. D. Spigelman, R. K. Phillips and R. S. Houlston (2004). "Relative frequency and morphology of cancers in STK11 mutation carriers." *Gastroenterology* 126(7): 1788-94.
- Lindhurst, M. J., J. C. Sapp, J. K. Teer, J. J. Johnston, E. M. Finn, K. Peters, J. Turner, J. L. Cannons, D. Bick, L. Blakemore, C. Blumhorst, K. Brockmann, P. Calder, N. Cherman, M. A. Deardorff, D. B. Everman, G. Golas, R. M. Greenstein, B. M. Kato, K. M. Keppler-Noreuil, S. A. Kuznetsov, R. T. Miyamoto, K. Newman, D. Ng, K. O'Brien, S. Rothenberg, D. J. Schwartzentruber, V. Singhal, R. Tirabosco, J. Upton, S. Wientroub, E. H. Zackai, K. Hoag, T. Whitewood-Neal, P. G. Robey, P. L. Schwartzberg, T. N. Darling, L. L. Tosi, J. C. Mullikin and L. G. Biesecker (2011). "A mosaic activating mutation in AKT1 associated with the Proteus syndrome." *N Engl J Med* 365(7): 611-9.
- Lindor, N. M. (2009). "Familial colorectal cancer type X: the other half of hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome." *Surg Oncol Clin N Am* 18(4): 637-45.
- Lindor, N. M., G. M. Petersen, D. W. Hadley, A. Y. Kinney, S. Miesfeldt, K. H. Lu, P. Lynch, W. Burke and N. Press (2006). "Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome: a systematic review." *Jama* 296(12): 1507-17.
- Lindor, N. M., K. Rabe, G. M. Petersen, R. Haile, G. Casey, J. Baron, S. Gallinger, B. Bapat, M. Aronson, J. Hopper, J. Jass, L. LeMarchand, J. Grove, J. Potter, P. Newcomb, J. P. Terdiman, P. Conrad, G. Moslein, R. Goldberg, A. Ziogas, H. Anton-Culver, M. de Andrade, K. Siegmund, S. N. Thibodeau, L. A. Boardman and D. Seminara (2005). "Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X." *Jama* 293(16): 1979-85.
- Lindsey, J., N. I. McGill, L. A. Lindsey, D. K. Green and H. J. Cooke (1991). "In vivo loss of telomeric repeats with age in humans." *Mutat Res* 256(1): 45-8.
- Ling, Y., J. M. Ying, T. Qiu, L. Shan, L. Guo and N. Lu (2012). "[Detection of KRAS, BRAF, PIK3CA and EGFR gene mutations in colorectal carcinoma]." *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi* 41(9): 590-4.
- Llor, X., E. Pons, R. M. Xicola, A. Castells, C. Alenda, V. Pinol, M. Andreu, S. Castellvi-Bel, A. Paya, R. Jover, X. Bessa, A. Giros, A. Roca and M. A. Gassull (2005). "Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam criteria without involvement of the mutator pathway." *Clin Cancer Res* 11(20): 7304-10.
- Londono-Vallejo, J. A. (2008). "Telomere instability and cancer." *Biochimie* 90(1): 73-82.
- Lopez, I., P. O. L, P. Tucci, F. Alvarez-Valin, A. C. R and M. Marin (2012). "Different mutation profiles associated to P53 accumulation in colorectal cancer." *Gene* 499(1): 81-7.
- Lopez-Abente, G., J. Garcia-Perez, P. Fernandez-Navarro, E. Boldo and R. Ramis (2012). "Colorectal cancer mortality and industrial pollution in Spain." *BMC Public Health* 12: 589.
- Lu, K. H. and M. Daniels (2013). "Endometrial and ovarian cancer in women with Lynch syndrome: update in screening and prevention." *Fam Cancer* 12(2): 273-7.
- Lubbe, S. J., A. M. Pittman, C. Matijssen, P. Twiss, B. Olver, A. Lloyd, M. Qureshi, N. Brown, E. Nye, G. Stamp, J. Blagg and R. S. Houlston (2011). "Evaluation of germline BMP4 mutation as a cause of colorectal cancer." *Hum Mutat* 32(1): E1928-38.

- Lynch, H. T. and A. de la Chapelle (2003). "Hereditary colorectal cancer." *N Engl J Med* 348(10): 919-32.
- Lynch, H. T., P. M. Lynch, S. J. Lanspa, C. L. Snyder, J. F. Lynch and C. R. Boland (2009). "Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications." *Clin Genet* 76(1): 1-18.
- Lynch, H. T., T. C. Smyrk, P. Watson, S. J. Lanspa, J. F. Lynch, P. M. Lynch, R. J. Cavalieri and C. R. Boland (1993). "Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review." *Gastroenterology* 104(5): 1535-49.

## M

- Ma, H., Z. Zhou, S. Wei, Z. Liu, K. A. Pooley, A. M. Dunning, U. Svenson, G. Roos, H. D. Hosgood, 3rd, M. Shen and Q. Wei (2011). "Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis." *PLoS One* 6(6): e20466.
- Ma, X., B. Zhang and W. Zheng (2012). "Genetic variants associated with colorectal cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence." *Gut* 63(2): 326-36.
- Macartney-Coxson, D. P., K. A. Hood, H. J. Shi, T. Ward, A. Wiles, R. O'Connor, D. A. Hall, R. A. Lea, J. A. Royds, R. S. Stubbs and S. Rooker (2008). "Metastatic susceptibility locus, an 8p hot-spot for tumour progression disrupted in colorectal liver metastases: 13 candidate genes examined at the DNA, mRNA and protein level." *BMC Cancer* 8: 187.
- Majewski, J., J. Schwartzentruber, E. Lalonde, A. Montpetit and N. Jabado (2011). "What can exome sequencing do for you?" *J Med Genet* 48(9): 580-9.
- Manfredi, M. (2010). "Hereditary hamartomatous polyposis syndromes: understanding the disease risks as children reach adulthood." *Gastroenterol Hepatol (N Y)* 6(3): 185-96.
- Mange, S., C. Bellcross, D. Cragun, D. Duquette, L. Gorman, H. Hampel and K. Jasperson (2014). "Creation of a Network to Promote Universal Screening for Lynch Syndrome: The Lynch Syndrome Screening Network." *J Genet Couns.*
- Margulies, M., M. Egholm, W. E. Altman, S. Attiya, J. S. Bader, L. A. Bemben, J. Berka, M. S. Braverman, Y. J. Chen, Z. Chen, S. B. Dewell, L. Du, J. M. Fierro, X. V. Gomes, B. C. Godwin, W. He, S. Helgesen, C. H. Ho, G. P. Irzyk, S. C. Jando, M. L. Alenquer, T. P. Jarvie, K. B. Jirage, J. B. Kim, J. R. Knight, J. R. Lanza, J. H. Leamon, S. M. Lefkowitz, M. Lei, J. Li, K. L. Lohman, H. Lu, V. B. Makhijani, K. E. McDade, M. P. McKenna, E. W. Myers, E. Nickerson, J. R. Nobile, R. Plant, B. P. Puc, M. T. Ronan, G. T. Roth, G. J. Sarkis, J. F. Simons, J. W. Simpson, M. Srinivasan, K. R. Tartaro, A. Tomasz, K. A. Vogt, G. A. Volkmer, S. H. Wang, Y. Wang, M. P. Weiner, P. Yu, R. F. Begley and J. M. Rothberg (2005). "Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors." *Nature* 437(7057): 376-80.
- Marletaz, F., L. Z. Holland, V. Laudet and M. Schubert (2006). "Retinoic acid signaling and the evolution of chordates." *Int J Biol Sci* 2(2): 38-47.
- Marsh, D. J., V. Coulon, K. L. Lunetta, P. Rocca-Serra, P. L. Dahia, Z. Zheng, D. Liaw, S. Caron, B. Duboue, A. Y. Lin, A. L. Richardson, J. M. Bonnetblanc, J. M. Bressieux, A. Cabarrot-Moreau, A. Chompret, L. Demange, R. A. Eeles, A. M. Yahanda, E. R. Fearon, J. P. Fricker, R. J. Gorlin, S. V. Hodgson, S. Huson, D. Lacombe, C. Eng and et al. (1998a). "Mutation spectrum and genotype-phenotype analyses in Cowden disease and Bannayan-Zonana syndrome, two hamartoma syndromes with germline PTEN mutation." *Hum Mol Genet* 7(3): 507-15.
- Marsh, D. J., P. L. Dahia, V. Coulon, Z. Zheng, F. Dorion-Bonnet, K. M. Call, R. Little, A. Y. Lin, R. A. Eeles, A. M. Goldstein, S. V. Hodgson, A. L. Richardson, B. G. Robinson, H. C. Weber, M. Longy and C. Eng (1998b). "Allelic imbalance, including deletion of PTEN/MMAC1, at the Cowden disease locus on 10q22-23, in hamartomas from patients with Cowden syndrome and germline PTEN mutation." *Genes Chromosomes Cancer* 21(1): 61-9.
- Marshall, L., N. S. Kenneth and R. J. White (2008). "Elevated tRNA(iMet) synthesis can drive cell

- proliferation and oncogenic transformation." *Cell* 133(1): 78-89.
- Martin, A. and M. D. Scharff (2002). "AID and mismatch repair in antibody diversification." *Nat Rev Immunol* 2(8): 605-14.
- Martinez-Delgado, B., M. Gallardo, M. Tanic, K. Yanowsky, L. Inglada-Perez, A. Barroso, M. Rodriguez-Pinilla, M. Canamero, M. A. Blasco and J. Benitez (2013). "Short telomeres are frequent in hereditary breast tumors and are associated with high tumor grade." *Breast Cancer Res Treat* 141(2): 231-42.
- Martinez-Delgado, B., K. Yanowsky, L. Inglada-Perez, M. de la Hoya, T. Caldes, A. Vega, A. Blanco, T. Martin, R. Gonzalez-Sarmiento, M. Blasco, M. Robledo, M. Urioste, H. Song, P. Pharoah and J. Benitez (2012). "Shorter telomere length is associated with increased ovarian cancer risk in both familial and sporadic cases." *J Med Genet* 49(5): 341-4.
- Maxam, A. M. and W. Gilbert (1977). "A new method for sequencing DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(2): 560-4.
- Maxwell, F., L. M. McGlynn, H. C. Muir, D. Talwar, M. Benzeval, T. Robertson, C. S. Roxburgh, D. C. McMillan, P. G. Horgan and P. G. Shiels (2011). "Telomere attrition and decreased fetuin-A levels indicate accelerated biological aging and are implicated in the pathogenesis of colorectal cancer." *Clin Cancer Res* 17(17): 5573-81.
- Mazzoni, S. M. and E. R. Fearon (2014). "AXIN1 and AXIN2 variants in gastrointestinal cancers." *Cancer Lett* 355(1): 1-8.
- McCarthy, E. E., J. T. Celebi, R. Baer and T. Ludwig (2003). "Loss of Bard1, the heterodimeric partner of the Brca1 tumor suppressor, results in early embryonic lethality and chromosomal instability." *Mol Cell Biol* 23(14): 5056-63.
- Meeker, A. K., J. L. Hicks, C. A. Iacobuzio-Donahue, E. A. Montgomery, W. H. Westra, T. Y. Chan, B. M. Ronnett and A. M. De Marzo (2004). "Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis." *Clin Cancer Res* 10(10): 3317-26.
- Melin, B. S., K. Nordfjall, U. Andersson and G. Roos (2012). "hTERT cancer risk genotypes are associated with telomere length." *Genet Epidemiol* 36(4): 368-72.
- Mester, J. and C. Eng (2013). "When overgrowth bumps into cancer: the PTENopathies." *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 163C(2): 114-21.
- Middeldorp, A., S. Jagmohan-Changur, R. van Eijk, C. Tops, P. Devilee, H. F. Vasen, F. J. Hes, R. Houlston, I. Tomlinson, J. J. Houwing-Duistermaat, J. T. Wijnen, H. Morreau and T. van Wezel (2009). "Enrichment of low penetrance susceptibility loci in a Dutch familial colorectal cancer cohort." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(11): 3062-7.
- Middeldorp, A., S. C. Jagmohan-Changur, H. M. van der Klift, M. van Puijenbroek, J. J. Houwing-Duistermaat, E. Webb, R. Houlston, C. Tops, H. F. Vasen, P. Devilee, H. Morreau, T. van Wezel and J. Wijnen (2010). "Comprehensive genetic analysis of seven large families with mismatch repair proficient colorectal cancer." *Genes Chromosomes Cancer* 49(6): 539-48.
- Middeldorp, A., R. van Eijk, J. Oosting, G. I. Forte, M. van Puijenbroek, M. van Nieuwenhuizen, W. E. Corver, D. Ruano, T. Caldes, J. Wijnen, H. Morreau and T. van Wezel (2012). "Increased frequency of 20q gain and copy-neutral loss of heterozygosity in mismatch repair proficient familial colorectal carcinomas." *Int J Cancer* 130(4): 837-46.
- Mills, A. M., S. Liou, J. M. Ford, J. S. Berek, R. K. Pai and T. A. Longacre (2014). "Lynch syndrome screening should be considered for all patients with newly diagnosed endometrial cancer." *Am J Surg Pathol* 38(11): 1501-9.
- Mital, R., R. Kobayashi and N. Hernandez (1996). "RNA polymerase III transcription from the human U6 and adenovirus type 2 VAI promoters has different requirements for human BRF, a subunit of human TFIIIB." *Mol Cell Biol* 16(12): 7031-42.
- Miyaki, M., M. Konishi, K. Tanaka, R. Kikuchi-Yanoshita, M. Muraoka, M. Yasuno, T. Igari, M. Koike, M. Chiba and T. Mori (1997). "Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer." *Nat Genet* 17(3): 271-2.
- Moline, J., H. Mahdi, B. Yang, C. Biscotti, A. A. Roma, B. Heald, P. G. Rose, C. Michener and C. Eng (2013). "Implementation of tumor testing for lynch syndrome in endometrial cancers at a large

- academic medical center." *Gynecol Oncol* 130(1): 121-6.
- Moqtaderi, Z., J. Wang, D. Raha, R. J. White, M. Snyder, Z. Weng and K. Struhl (2010). "Genomic binding profiles of functionally distinct RNA polymerase III transcription complexes in human cells." *Nat Struct Mol Biol* 17(5): 635-40.
- Morak, M., A. Laner, U. Bacher, C. Keiling and E. Holinski-Feder (2010). "MUTYH-associated polyposis - variability of the clinical phenotype in patients with biallelic and monoallelic MUTYH mutations and report on novel mutations." *Clin Genet* 78(4): 353-63.
- Moreira, L., F. Balaguer, N. Lindor, A. de la Chapelle, H. Hampel, L. A. Aaltonen, J. L. Hopper, L. Le Marchand, S. Gallinger, P. A. Newcomb, R. Haile, S. N. Thibodeau, S. Gunawardena, M. A. Jenkins, D. D. Buchanan, J. D. Potter, J. A. Baron, D. J. Ahnen, V. Moreno, M. Andreu, M. Ponz de Leon, A. K. Rustgi and A. Castells (2012). "Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer." *Jama* 308(15): 1555-65.
- Morrison, A., A. L. Johnson, L. H. Johnston and A. Sugino (1993). "Pathway correcting DNA replication errors in *Saccharomyces cerevisiae*." *Embo J* 12(4): 1467-73.
- Morton, J. P., T. Kantidakis and R. J. White (2007). "RNA polymerase III transcription is repressed in response to the tumour suppressor ARF." *Nucleic Acids Res* 35(9): 3046-52.
- Mourra, N., G. Zeitoun, G. Portier, H. Blanche, E. Tubacher, L. Gressin, J. F. Flejou, E. Tiret, G. Thomas and S. Olschwang (2008). "High-resolution genotyping of chromosome 8 in colon adenocarcinomas reveals recurrent break point but no gene mutation in the 8p21 region." *Diagn Mol Pathol* 17(2): 90-3.
- Mu, Y., Q. Zhang, L. Mei, X. Liu, W. Yang and J. Yu (2012). "Telomere shortening occurs early during gastrocarcinogenesis." *Med Oncol* 29(2): 893-8.
- Mueller-Koch, Y., H. Vogelsang, R. Kopp, P. Lohse, G. Keller, D. Aust, M. Muders, M. Gross, J. Daum, U. Schiemann, M. Grabowski, M. Scholz, B. Kerker, I. Becker, G. Henke and E. Holinski-Feder (2005). "Hereditary non-polyposis colorectal cancer: clinical and molecular evidence for a new entity of hereditary colorectal cancer." *Gut* 54(12): 1733-40.
- Murdoch, C., M. Muthana, S. B. Coffelt and C. E. Lewis (2008). "The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis." *Nat Rev Cancer* 8(8): 618-31.
- Murphy, K., H. Darmawan, A. Schultz, E. Fidalgo da Silva and L. J. Reha-Krantz (2006). "A method to select for mutator DNA polymerase deltas in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genome* 49(4): 403-10.

# N

- Nagasaka, T., M. Koi, M. Kloor, J. Gebert, A. Vilkin, N. Nishida, S. K. Shin, H. Sasamoto, N. Tanaka, N. Matsubara, C. R. Boland and A. Goel (2008). "Mutations in both KRAS and BRAF may contribute to the methylator phenotype in colon cancer." *Gastroenterology* 134(7): 1950-60, 1960 e1.
- Nakamura, T. M., G. B. Morin, K. B. Chapman, S. L. Weinrich, W. H. Andrews, J. Lingner, C. B. Harley and T. R. Cech (1997). "Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human." *Science* 277(5328): 955-9.
- Neklason, D. W., R. A. Kerber, D. B. Nilson, H. Anton-Culver, A. G. Schwartz, C. A. Griffin, J. T. Lowery, J. M. Schildkraut, J. P. Evans, G. E. Tomlinson, L. C. Strong, A. R. Miller, J. E. Stopfer, D. M. Finkelstein, P. M. Nadkarni, C. H. Kasten, G. P. Mineau and R. W. Burt (2008). "Common familial colorectal cancer linked to chromosome 7q31: a genome-wide analysis." *Cancer Res* 68(21): 8993-7.
- Ng, S. B., K. J. Buckingham, C. Lee, A. W. Bigham, H. K. Tabor, K. M. Dent, C. D. Huff, P. T. Shannon, E. W. Jabs, D. A. Nickerson, J. Shendure and M. J. Bamshad (2010). "Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder." *Nat Genet* 42(1): 30-5.
- Ngeow, J., B. Heald, L. A. Rybicki, M. S. Orloff, J. L. Chen, X. Liu, L. Yerian, J. Willis, H. J. Lehtonen, R. Lehtonen, J. L. Mester, J. Moline, C. A. Burke, J. Church, L. A. Aaltonen and C. Eng (2013).

- "Prevalence of germline PTEN, BMPR1A, SMAD4, STK11, and ENG mutations in patients with moderate-load colorectal polyps." *Gastroenterology* 144(7): 1402-9, 1409 e1-5.
- Nielsen, M., N. F. de Miranda, M. van Puijenbroek, E. S. Jordanova, A. Middeldorp, T. van Wezel, R. van Eijk, C. M. Tops, H. F. Vasen, F. J. Hes and H. Morreau (2009a). "Colorectal carcinomas in MUTYH-associated polyposis display histopathological similarities to microsatellite unstable carcinomas." *BMC Cancer* 9: 184.
- Nielsen, M., M. C. Joerink-van de Beld, N. Jones, S. Vogt, C. M. Tops, H. F. Vasen, J. R. Sampson, S. Aretz and F. J. Hes (2009b). "Analysis of MUTYH genotypes and colorectal phenotypes in patients With MUTYH-associated polyposis." *Gastroenterology* 136(2): 471-6.
- Nielsen, M., H. Morreau, H. F. Vasen and F. J. Hes (2011). "MUTYH-associated polyposis (MAP)." *Crit Rev Oncol Hematol* 79(1): 1-16.
- Nielsen, M., J. W. Poley, S. Verhoef, M. van Puijenbroek, M. M. Weiss, G. T. Burger, C. J. Dommering, H. F. Vasen, E. J. Kuipers, A. Wagner, H. Morreau and F. J. Hes (2006). "Duodenal carcinoma in MUTYH-associated polyposis." *J Clin Pathol* 59(11): 1212-5.
- Nieminen, T. T., W. M. Abdel-Rahman, A. Ristimäki, M. Lappalainen, P. Lahermo, J. P. Mecklin, H. J. Jarvinen and P. Peltomäki (2011). "BMPR1A mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer without mismatch repair deficiency." *Gastroenterology* 141(1): e23-6.
- Nieminen, T. T., M. F. O'Donohue, Y. Wu, H. Lohi, S. W. Scherer, A. D. Paterson, P. Ellonen, W. M. Abdel-Rahman, S. Valo, J. P. Mecklin, H. J. Jarvinen, P. E. Gleizes and P. Peltomäki (2014). "Germline mutation of RPS20, encoding a ribosomal protein, causes predisposition to hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma without DNA mismatch repair deficiency." *Gastroenterology* 147(3): 595-598 e5.
- Niessen, R. C., R. M. Hofstra, H. Westers, M. J. Ligtenberg, K. Kooi, P. O. Jager, M. L. de Groote, T. Dijkhuizen, M. J. Olderode-Berends, H. Hollema, J. H. Kleibeuker and R. H. Sijmons (2009). "Germline hypermethylation of MLH1 and EPCAM deletions are a frequent cause of Lynch syndrome." *Genes Chromosomes Cancer* 48(8): 737-44.
- Niittymäki, I., E. Kaasinen, S. Tuupanen, A. Karhu, H. Jarvinen, J. P. Mecklin, I. P. Tomlinson, M. C. Di Bernardo, R. S. Houlston and L. A. Aaltonen (2010). "Low-penetrance susceptibility variants in familial colorectal cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19(6): 1478-83.
- Nosho, K., N. Irahara, K. Shima, S. Kure, G. J. Kirkner, E. S. Schernhammer, A. Hazra, D. J. Hunter, J. Quackenbush, D. Spiegelman, E. L. Giovannucci, C. S. Fuchs and S. Ogino (2008a). "Comprehensive biostatistical analysis of CpG island methylator phenotype in colorectal cancer using a large population-based sample." *PLoS One* 3(11): e3698.
- Nosho, K., T. Kawasaki, M. Ohnishi, Y. Suemoto, G. J. Kirkner, D. Zepf, L. Yan, J. A. Longtine, C. S. Fuchs and S. Ogino (2008b). "PIK3CA mutation in colorectal cancer: relationship with genetic and epigenetic alterations." *Neoplasia* 10(6): 534-41.
- Nusse, R. (2012). "Wnt signaling." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(5).

## O

- O'Brien, C. A., A. Kreso and C. H. Jamieson (2007). "Cancer stem cells and self-renewal." *Clin Cancer Res* 16(12): 3113-20.
- Ogino, S., T. Kawasaki, G. J. Kirkner, P. Kraft, M. Loda and C. S. Fuchs (2007). "Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample." *J Mol Diagn* 9(3): 305-14.
- Ogino, S., T. Kawasaki, G. J. Kirkner, M. Loda and C. S. Fuchs (2006). "CpG island methylator phenotype-low (CIMP-low) in colorectal cancer: possible associations with male sex and KRAS mutations." *J Mol Diagn* 8(5): 582-8.
- Ogino, S., R. Nishihara, P. Lochhead, Y. Imamura, A. Kuchiba, T. Morikawa, M. Yamauchi, X. Liao, Z. R.

- Qian, R. Sun, K. Sato, G. J. Kirkner, M. Wang, D. Spiegelman, J. A. Meyerhardt, E. S. Schernhammer, A. T. Chan, E. Giovannucci and C. S. Fuchs (2013). "Prospective study of family history and colorectal cancer risk by tumor LINE-1 methylation level." *J Natl Cancer Inst* 105(2): 130-40.
- Ogino, S., K. Nosho, G. J. Kirkner, T. Kawasaki, A. T. Chan, E. S. Schernhammer, E. L. Giovannucci and C. S. Fuchs (2008). "A cohort study of tumoral LINE-1 hypomethylation and prognosis in colon cancer." *J Natl Cancer Inst* 100(23): 1734-8.
- Ogunbiyi, O. A., P. J. Goodfellow, K. Herfarth, G. Gagliardi, P. E. Swanson, E. H. Birnbaum, T. E. Read, J. W. Fleshman, I. J. Kodner and J. F. Moley (1998). "Confirmation that chromosome 18q allelic loss in colon cancer is a prognostic indicator." *J Clin Oncol* 16(2): 427-33.
- Orrico, A., L. Galli, S. Buoni, A. Orsi, G. Vonella and V. Sorrentino (2009). "Novel PTEN mutations in neurodevelopmental disorders and macrocephaly." *Clin Genet* 75(2): 195-8.
- Ostergaard, J. R., L. Sunde and H. Okkels (2005). "Neurofibromatosis von Recklinghausen type I phenotype and early onset of cancers in siblings compound heterozygous for mutations in MSH6." *Am J Med Genet A* 139A(2): 96-105; discussion 96.

## P

- Pajkos, G., I. Kiss, J. Sandor, I. Ember and P. Kishazi (2000). "The prognostic value of the presence of mutations at the codons 12, 13, 61 of K-ras oncogene in colorectal cancer." *Anticancer Res* 20(3A): 1695-701.
- Palles, C., J. B. Caizer, K. M. Howarth, E. Domingo, A. M. Jones, P. Broderick, Z. Kemp, S. L. Spain, E. Guarino, I. Salguero, A. Sherborne, D. Chubb, L. G. Carvajal-Carmona, Y. Ma, K. Kaur, S. Dobbins, E. Barclay, M. Gorman, L. Martin, M. B. Kovac, S. Humphray, A. Lucassen, C. C. Holmes, D. Bentley, P. Donnelly, J. Taylor, C. Petridis, R. Roylance, E. J. Sawyer, D. J. Kerr, S. Clark, J. Grimes, S. E. Kearsey, H. J. Thomas, G. McVean, R. S. Houlston and I. Tomlinson (2013). "Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas." *Nat Genet* 45(2): 136-44.
- Palomaki, G. E., M. R. McClain, S. Melillo, H. L. Hampel and S. N. Thibodeau (2009). "EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome." *Genet Med* 11(1): 42-65.
- Pande, M., J. Chen, C. I. Amos, P. M. Lynch, R. Broaddus and M. L. Frazier (2007). "Influence of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms C677T and A1298C on age-associated risk for colorectal cancer in a caucasian lynch syndrome population." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16(9): 1753-9.
- Pangon, L., N. D. Sigglekow, M. Larance, S. Al-Sohaily, D. N. Mladenova, C. I. Selinger, E. A. Musgrove and M. R. Kohonen-Corish (2010). "The "Mutated in Colorectal Cancer" Protein Is a Novel Target of the UV-Induced DNA Damage Checkpoint." *Genes Cancer* 1(9): 917-26.
- Park, J. G., H. F. Vasen, K. J. Park, P. Peltomaki, M. Ponz de Leon, M. A. Rodriguez-Bigas, J. Lubinski, N. E. Beck, M. L. Bisgaard, M. Miyaki, J. T. Wijnen, S. Baba and H. T. Lynch (1999). "Suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer: International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC) criteria and results of genetic diagnosis." *Dis Colon Rectum* 42(6): 710-5; discussion 715-6.
- Parry, S., A. K. Win, B. Parry, F. A. Macrae, L. C. Gurrin, J. M. Church, J. A. Baron, G. G. Giles, B. A. Leggett, I. Winship, L. Lipton, G. P. Young, J. P. Young, C. J. Lodge, M. C. Southey, P. A. Newcomb, L. Le Marchand, R. W. Haile, N. M. Lindor, S. Gallinger, J. L. Hopper and M. A. Jenkins (2011). "Metachronous colorectal cancer risk for mismatch repair gene mutation carriers: the advantage of more extensive colon surgery." *Gut* 60(7): 950-7.
- Parsons, M. T., D. D. Buchanan, B. Thompson, J. P. Young and A. B. Spurdle (2012). "Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene

- mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification." *J Med Genet* 49(3): 151-7.
- Parsons, R., L. L. Myeroff, B. Liu, J. K. Willson, S. D. Markowitz, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1995). "Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer." *Cancer Res* 55(23): 5548-50.
- Parthiban, V., M. M. Gromiha and D. Schomburg (2006). "CUPSAT: prediction of protein stability upon point mutations." *Nucleic Acids Res* 34(Web Server issue): W239-42.
- Pavicic, W., E. I. Joensuu, T. Nieminen and P. Peltomaki (2012). "LINE-1 hypomethylation in familial and sporadic cancer." *J Mol Med (Berl)* 90(7): 827-35.
- Pellatt, A. J., R. K. Wolff, A. Lundgreen, R. Cawthon and M. L. Slattery (2012). "Genetic and lifestyle influence on telomere length and subsequent risk of colon cancer in a case control study." *Int J Mol Epidemiol Genet* 3(3): 184-94.
- Pendino, F., C. Dudognon, F. Delhommeau, T. Sahraoui, M. Flexor, A. Bennaceur-Griscelli, M. Lanotte and E. Segal-Bendirdjian (2003). "Retinoic acid receptor alpha and retinoid-X receptor-specific agonists synergistically target telomerase expression and induce tumor cell death." *Oncogene* 22(57): 9142-50.
- Pericleous, M., D. Mandair and M. E. Caplin (2013). "Diet and supplements and their impact on colorectal cancer." *J Gastrointest Oncol* 4(4): 409-23.
- Peters, U., C. M. Hutter, L. Hsu, F. R. Schumacher, D. V. Conti, C. S. Carlson, C. K. Edlund, R. W. Haile, S. Gallinger, B. W. Zanke, M. Lemire, J. Rangrej, R. Vijayaraghavan, A. T. Chan, A. Hazra, D. J. Hunter, J. Ma, C. S. Fuchs, E. L. Giovannucci, P. Kraft, Y. Liu, L. Chen, S. Jiao, K. W. Makar, D. Taverna, S. B. Gruber, G. Rennert, V. Moreno, C. M. Ulrich, M. O. Woods, R. C. Green, P. S. Parfrey, R. L. Prentice, C. Kooperberg, R. D. Jackson, A. Z. Lacroix, B. J. Caan, R. B. Hayes, S. I. Berndt, S. J. Chanock, R. E. Schoen, J. Chang-Claude, M. Hoffmeister, H. Brenner, B. Frank, S. Bezieau, S. Kury, M. L. Slattery, J. L. Hopper, M. A. Jenkins, L. Le Marchand, N. M. Lindor, P. A. Newcomb, D. Seminara, T. J. Hudson, D. J. Duggan, J. D. Potter and G. Casey (2012). "Meta-analysis of new genome-wide association studies of colorectal cancer risk." *Hum Genet* 131(2): 217-34.
- Peters, U., S. Jiao, F. R. Schumacher, C. M. Hutter, A. K. Aragaki, J. A. Baron, S. I. Berndt, S. Bezieau, H. Brenner, K. Butterbach, B. J. Caan, P. T. Campbell, C. S. Carlson, G. Casey, A. T. Chan, J. Chang-Claude, S. J. Chanock, L. S. Chen, G. A. Coetzee, S. G. Coetzee, D. V. Conti, K. R. Curtis, D. Duggan, T. Edwards, C. S. Fuchs, S. Gallinger, E. L. Giovannucci, S. M. Gogarten, S. B. Gruber, R. W. Haile, T. A. Harrison, R. B. Hayes, B. E. Henderson, M. Hoffmeister, J. L. Hopper, T. J. Hudson, D. J. Hunter, R. D. Jackson, S. H. Jee, M. A. Jenkins, W. H. Jia, L. N. Kolonel, C. Kooperberg, S. Kury, A. Z. Lacroix, C. C. Laurie, C. A. Laurie, L. Le Marchand, M. Lemire, D. Levine, N. M. Lindor, Y. Liu, J. Ma, K. W. Makar, K. Matsuo, P. A. Newcomb, J. D. Potter, R. L. Prentice, C. Qu, T. Rohan, S. A. Rosse, R. E. Schoen, D. Seminara, M. Shrubsole, X. O. Shu, M. L. Slattery, D. Taverna, S. N. Thibodeau, C. M. Ulrich, E. White, Y. Xiang, B. W. Zanke, Y. X. Zeng, B. Zhang, W. Zheng and L. Hsu (2013). "Identification of Genetic Susceptibility Loci for Colorectal Tumors in a Genome-Wide Meta-analysis." *Gastroenterology* 144(4): 799-807 e24.
- Petersen, G. M., L. Amundadottir, C. S. Fuchs, P. Kraft, R. Z. Stolzenberg-Solomon, K. B. Jacobs, A. A. Arslan, H. B. Bueno-de-Mesquita, S. Gallinger, M. Gross, K. Helzlsouer, E. A. Holly, E. J. Jacobs, A. P. Klein, A. LaCroix, D. Li, M. T. Mandelson, S. H. Olson, H. A. Risch, W. Zheng, D. Albanes, W. R. Bamlet, C. D. Berg, M. C. Boutron-Ruault, J. E. Buring, P. M. Bracci, F. Canzian, S. Clipp, M. Cotterchio, M. de Andrade, E. J. Duell, J. M. Gaziano, E. L. Giovannucci, M. Goggins, G. Hallmans, S. E. Hankinson, M. Hassan, B. Howard, D. J. Hunter, A. Hutchinson, M. Jenab, R. Kaaks, C. Kooperberg, V. Krogh, R. C. Kurtz, S. M. Lynch, R. R. McWilliams, J. B. Mendelsohn, D. S. Michaud, H. Parikh, A. V. Patel, P. H. Peeters, A. Rajkovic, E. Riboli, L. Rodriguez, D. Seminara, X. O. Shu, G. Thomas, A. Tjonneland, G. S. Tobias, D. Trichopoulos, S. K. Van Den Eeden, J. Virtamo, J. Wactawski-Wende, Z. Wang, B. M. Wolpin, H. Yu, K. Yu, A. Zeleniuch-Jacquotte, J. F. Fraumeni, Jr., R. N. Hoover, P. Hartge and S. J. Chanock (2010). "A genome-wide association study identifies pancreatic cancer susceptibility loci on chromosomes 13q22.1, 1q32.1 and 5p15.33." *Nat Genet* 42(3): 224-8.
- Pflaum, J., S. Schlosser and M. Muller (2014). "p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer."

Front Oncol 4: 285.

- Phipps, A. I., P. J. Limburg, J. A. Baron, A. N. Burnett-Hartman, D. J. Weisenberger, P. W. Laird, F. A. Sinicrope, C. Rosty, D. D. Buchanan, J. D. Potter and P. A. Newcomb (2015). "Association between molecular subtypes of colorectal cancer and patient survival." *Gastroenterology* 148(1): 77-87 e2.
- Pin, E., C. Pastrello, R. Tricarico, L. Papi, M. Quaia, M. Fornasarig, I. Carnevali, C. Oliani, A. Fornasin, M. Agostini, R. Maestro, D. Barana, S. Aretz, M. Genuardi and A. Viel (2013). "MUTYH c.933+3A>C, associated with a severely impaired gene expression, is the first Italian founder mutation in MUTYH-Associated Polyposis." *Int J Cancer* 132(5): 1060-9.
- Pineda, M., S. Gonzalez, C. Lazaro, I. Blanco and G. Capella (2010). "Detection of genetic alterations in hereditary colorectal cancer screening." *Mutat Res* 693(1-2): 19-31.
- Pino, M. S. and D. C. Chung (2010). "The chromosomal instability pathway in colon cancer." *Gastroenterology* 138(6): 2059-72.
- Plaks, V., N. Kong and Z. Werb (2015). "The Cancer Stem Cell Niche: How Essential Is the Niche in Regulating Stemness of Tumor Cells?" *Cell Stem Cell* 16(3): 225-238.
- Ponti, G., E. Castellsague, C. Ruini, A. Percesepe and A. Tomasi (2014). "Mismatch repair genes founder mutations and cancer susceptibility in Lynch syndrome." *Clin Genet*.
- Ponti, G., M. Ponz de Leon, S. Maffei, M. Pedroni, L. Losi, C. Di Gregorio, V. Gismondi, A. Scarselli, P. Benatti, B. Roncari, S. Seidenari, G. Pellacani, C. Varotti, E. Prete, L. Varesco and L. Roncucci (2005). "Attenuated familial adenomatous polyposis and Muir-Torre syndrome linked to compound biallelic constitutional MYH gene mutations." *Clin Genet* 68(5): 442-7.
- Pooley, K. A., M. S. Sandhu, J. Tyrer, M. Shah, K. E. Driver, R. N. Luben, S. A. Bingham, B. A. Ponder, P. D. Pharoah, K. T. Khaw, D. F. Easton and A. M. Dunning (2010). "Telomere length in prospective and retrospective cancer case-control studies." *Cancer Res* 70(8): 3170-6.
- Powell, S. M., N. Zilz, Y. Beazer-Barclay, T. M. Bryan, S. R. Hamilton, S. N. Thibodeau, B. Vogelstein and K. W. Kinzler (1992). "APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis." *Nature* 359(6392): 235-7.
- Preston, B. D., T. M. Albertson and A. J. Herr (2010). "DNA replication fidelity and cancer." *Semin Cancer Biol* 20(5): 281-93.
- Pursell, Z. F., I. Isoz, E. B. Lundstrom, E. Johansson and T. A. Kunkel (2007). "Yeast DNA polymerase epsilon participates in leading-strand DNA replication." *Science* 317(5834): 127-30.

## Q

- Qian, B. Z. and J. W. Pollard (2010). "Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis." *Cell* 141(1): 39-51.
- Qin, Q., J. Sun, J. Yin, L. Liu, J. Chen, Y. Zhang, T. Li, Y. Shi, S. Wei and S. Nie (2014). "Telomere length in peripheral blood leukocytes is associated with risk of colorectal cancer in Chinese population." *PLoS One* 9(2): e88135.
- Quehenberger, F., H. F. Vasen and H. C. van Houtwelingen (2005). "Risk of colorectal and endometrial cancer for carriers of mutations of the hMLH1 and hMSH2 gene: correction for ascertainment." *J Med Genet* 42(6): 491-6.

## R



- Rafnar, T., P. Sulem, S. N. Stacey, F. Geller, J. Gudmundsson, A. Sigurdsson, M. Jakobsdottir, H. Helgadóttir, S. Thorlacius, K. K. Aben, T. Blondal, T. E. Thorgeirsson, G. Thorleifsson, K. Kristjansson, K. Thorisdóttir, R. Ragnarsson, B. Sigurgeirsson, H. Skuladóttir, T. Gudbjartsson, H. J. Isaksson, G. V. Einarsson, K. R. Benediktsdóttir, B. A. Agnarsson, K. Olafsson, A. Salvarsdóttir, H. Bjarnason, M. Asgeirsdóttir, K. T. Kristinsson, S. Matthiasdóttir, S. G. Sveinsdóttir, S. Polidoro, V. Hoiom, R. Botella-Estrada, K. Hemminki, P. Rudnai, D. T. Bishop, M. Campagna, E. Kellen, M. P. Zeegers, P. de Verdier, A. Ferrer, D. Isla, M. J. Vidal, R. Andres, B. Saez, P. Juberias, J. Banzo, S. Navarrete, A. Tres, D. Kan, A. Lindblom, E. Gurzau, K. Koppova, F. de Vegt, J. A. Schalken, H. F. van der Heijden, H. J. Smit, R. A. Termeer, E. Oosterwijk, O. van Hooij, E. Nagore, S. Porru, G. Steineck, J. Hansson, F. Buntinx, W. J. Catalona, G. Matullo, P. Vineis, A. E. Kiltie, J. I. Mayordomo, R. Kumar, L. A. Kiemeny, M. L. Frigge, T. Jonsson, H. Saemundsson, R. B. Barkadóttir, E. Jonsson, S. Jonsson, J. H. Olafsson, J. R. Gulcher, G. Masson, D. F. Gudbjartsson, A. Kong, U. Thorsteinsdóttir and K. Stefansson (2009). "Sequence variants at the TERT-CLPTM1L locus associate with many cancer types." *Nat Genet* 41(2): 221-7.
- Ratajska, M., E. Antoszewska, A. Piskorz, I. Brozek, A. Borg, H. Kusmierk, W. Biernat and J. Limon (2012). "Cancer predisposing BARD1 mutations in breast-ovarian cancer families." *Breast Cancer Res Treat* 131(1): 89-97.
- Raynaud, C. M., L. Sabatier, O. Philipot, K. A. Olaussen and J. C. Soria (2008). "Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process." *Crit Rev Oncol Hematol* 66(2): 99-117.
- Rebeck, T. R., M. E. Martinez, T. A. Sellers, P. G. Shields, C. P. Wild and J. D. Potter (2004). "Genetic variation and cancer: improving the environment for publication of association studies." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13(12): 1985-6.
- Reeves, S., C. Meldrum and R. J. Scott (2006). "Re: IGF-1 gene polymorphism and risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer." *J Natl Cancer Inst* 98(22): 1664-5; author reply 1665.
- Reeves, S. G., C. Meldrum, C. Groombridge, A. Spigelman, J. Suchy, G. Kurzawski, J. Lubinski and R. J. Scott (2012). "DNA repair gene polymorphisms and risk of early onset colorectal cancer in Lynch syndrome." *Cancer Epidemiol* 36(2): 183-9.
- Reeves, S. G., C. Meldrum, C. Groombridge, A. D. Spigelman, J. Suchy, G. Kurzawski, J. Lubinski, P. McElduff and R. J. Scott (2009). "MTHFR 677 C>T and 1298 A>C polymorphisms and the age of onset of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer." *Eur J Hum Genet* 17(5): 629-35.
- Reeves, S. G., D. Rich, C. J. Meldrum, K. Colyvas, G. Kurzawski, J. Suchy, J. Lubinski and R. J. Scott (2008a). "IGF1 is a modifier of disease risk in hereditary non-polyposis colorectal cancer." *Int J Cancer* 123(6): 1339-43.
- Reeves, S. G., D. Mossman, C. J. Meldrum, G. Kurzawski, J. Suchy, J. Lubinski and R. J. Scott (2008b). "The -149C>T SNP within the DeltaDNMT3B gene, is not associated with early disease onset in hereditary non-polyposis colorectal cancer." *Cancer Lett* 265(1): 39-44.
- Reha-Krantz, L. J. (2010). "DNA polymerase proofreading: Multiple roles maintain genome stability." *Biochim Biophys Acta* 1804(5): 1049-63.
- Renan, M. J. (1993). "How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data." *Mol Carcinog* 7(3): 139-46.
- Renkonen, E., Y. Zhang, H. Lohi, R. Salovaara, W. M. Abdel-Rahman, M. Nilbert, K. Aittomaki, H. J. Jarvinen, J. P. Mecklin, A. Lindblom and P. Peltomaki (2003). "Altered expression of MLH1, MSH2, and MSH6 in predisposition to hereditary nonpolyposis colorectal cancer." *J Clin Oncol* 21(19): 3629-37.
- Resnick, K., J. M. Straughn, Jr., F. Backes, H. Hampel, K. S. Matthews and D. E. Cohn (2009). "Lynch syndrome screening strategies among newly diagnosed endometrial cancer patients." *Obstet Gynecol* 114(3): 530-6.
- Rhee, Y. Y., M. J. Kim, J. M. Bae, J. M. Koh, N. Y. Cho, Y. S. Juhn, D. Kim and G. H. Kang (2012). "Clinical outcomes of patients with microsatellite-unstable colorectal carcinomas depend on L1 methylation level." *Ann Surg Oncol* 19(11): 3441-8.
- Rodriguez-Bigas, M. A. and G. Moeslein (2013). "Surgical treatment of hereditary nonpolyposis colorectal

- cancer (HNPCC, Lynch syndrome)." *Fam Cancer* 12(2): 295-300.
- Rodriguez-Soler, M., L. Perez-Carbonell, C. Guarinos, P. Zapater, A. Castillejo, V. M. Barbera, M. Juarez, X. Bessa, R. M. Xicola, J. Clofent, L. Bujanda, F. Balaguer, J. M. Rene, L. de-Castro, J. C. Marin-Gabriel, A. Lanas, J. Cubiella, D. Nicolas-Perez, A. Brea-Fernandez, S. Castellvi-Bel, C. Alenda, C. Ruiz-Ponte, A. Carracedo, A. Castells, M. Andreu, X. Llor, J. L. Soto, A. Paya and R. Jover (2013). "Risk of cancer in cases of suspected lynch syndrome without germline mutation." *Gastroenterology* 144(5): 926-932 e1; quiz e13-4.
- Rosen, C. J., E. S. Kurland, D. Vereault, R. A. Adler, P. J. Rackoff, W. Y. Craig, S. Witte, J. Rogers and J. P. Bilezikian (1998). "Association between serum insulin growth factor-I (IGF-I) and a simple sequence repeat in IGF-I gene: implications for genetic studies of bone mineral density." *J Clin Endocrinol Metab* 83(7): 2286-90.
- Rothman, N., M. Garcia-Closas, N. Chatterjee, N. Malats, X. Wu, J. D. Figueroa, F. X. Real, D. Van Den Berg, G. Matullo, D. Baris, M. Thun, L. A. Kiemeny, P. Vineis, I. De Vivo, D. Albanes, M. P. Purdue, T. Rafnar, M. A. Hildebrandt, A. E. Kiltie, O. Cussenot, K. Golka, R. Kumar, J. A. Taylor, J. I. Mayordomo, K. B. Jacobs, M. Kogevinas, A. Hutchinson, Z. Wang, Y. P. Fu, L. Prokunina-Olsson, L. Burdett, M. Yeager, W. Wheeler, A. Tardon, C. Serra, A. Carrato, R. Garcia-Closas, J. Lloreta, A. Johnson, M. Schwenn, M. R. Karagas, A. Schned, G. Andriole, Jr., R. Grubb, 3rd, A. Black, E. J. Jacobs, W. R. Diver, S. M. Gapstur, S. J. Weinstein, J. Virtamo, V. K. Cortessis, M. Gago-Dominguez, M. C. Pike, M. C. Stern, J. M. Yuan, D. J. Hunter, M. McGrath, C. P. Dinney, B. Czerniak, M. Chen, H. Yang, S. H. Vermeulen, K. K. Aben, J. A. Witjes, R. R. Makkinje, P. Sulem, S. Besenbacher, K. Stefansson, E. Riboli, P. Brennan, S. Panico, C. Navarro, N. E. Allen, H. B. Bueno-de-Mesquita, D. Trichopoulos, N. Caporaso, M. T. Landi, F. Canzian, B. Ljungberg, A. Tjonneland, F. Clavel-Chapelon, D. T. Bishop, M. T. Teo, M. A. Knowles, S. Guarrera, S. Polidoro, F. Ricceri, C. Sacerdote, A. Allione, G. Cancel-Tassin, S. Selinski, J. G. Hengstler, H. Dietrich, T. Fletcher, P. Rudnai, E. Gsur, K. Koppova, S. C. Bolick, A. Godfrey, Z. Xu, J. I. Sanz-Velez, D. G.-P. M, M. Sanchez, G. Valdivia, S. Porru, S. Benhamou, R. N. Hoover, J. F. Fraumeni, Jr., D. T. Silverman and S. J. Chanock (2010). "A multi-stage genome-wide association study of bladder cancer identifies multiple susceptibility loci." *Nat Genet* 42(11): 978-84.
- Rudkjobing, L. A., H. Eiberg, H. B. Mikkelsen, M. L. Binderup and M. L. Bisgaard (2015). "The analysis of a large Danish family supports the presence of a susceptibility locus for adenoma and colorectal cancer on chromosome 11q24." *Fam Cancer*.

## S

- Salas, D., M. Vanaclocha, J. Ibanez, A. Molina-Barcelo, V. Hernandez, J. Cubiella, R. Zubizarreta, M. Andreu, C. Hernandez, F. Perez-Riquelme, J. Cruzado, F. Carballo, L. Bujanda, C. Sarasqueta, I. Portillo, M. de la Vega-Prieto, J. D. Morillas, V. Valentin, A. Lanas, E. Quintero and A. Castells (2014). "Participation and detection rates by age and sex for colonoscopy versus fecal immunochemical testing in colorectal cancer screening." *Cancer Causes Control* 25(8): 985-97.
- Salk, J. J., E. J. Fox and L. A. Loeb (2010). "Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences." *Annu Rev Pathol* 5: 51-75.
- Samowitz, W. S., C. Sweeney, J. Herrick, H. Albertsen, T. R. Levin, M. A. Murtaugh, R. K. Wolff and M. L. Slattery (2005a). "Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers." *Cancer Res* 65(14): 6063-9.
- Samowitz, W. S., H. Albertsen, J. Herrick, T. R. Levin, C. Sweeney, M. A. Murtaugh, R. K. Wolff and M. L. Slattery (2005b). "Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer." *Gastroenterology* 129(3): 837-45.
- Samowitz, W. S., H. Albertsen, C. Sweeney, J. Herrick, B. J. Caan, K. E. Anderson, R. K. Wolff and M. L. Slattery (2006). "Association of smoking, CpG island methylator phenotype, and V600E BRAF mutations in colon cancer." *J Natl Cancer Inst* 98(23): 1731-8.
- Samowitz, W. S., K. Curtin, D. Schaffer, M. Robertson, M. Leppert and M. L. Slattery (2000).

- "Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9(11): 1193-7.
- Samowitz, W. S., M. L. Slattery, C. Sweeney, J. Herrick, R. K. Wolff and H. Albertsen (2007). "APC mutations and other genetic and epigenetic changes in colon cancer." *Mol Cancer Res* 5(2): 165-70.
- Sampson, J. R., S. Dolwani, S. Jones, D. Eccles, A. Ellis, D. G. Evans, I. Frayling, S. Jordan, E. R. Maher, T. Mak, J. Maynard, F. Pigatto, J. Shaw and J. P. Cheadle (2003). "Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH." *Lancet* 362(9377): 39-41.
- Sanchez, J. A., L. Krumroy, S. Plummer, P. Aung, A. Merkulova, M. Skacel, K. L. DeJulius, E. Manilich, J. M. Church, G. Casey and M. F. Kalady (2009). "Genetic and epigenetic classifications define clinical phenotypes and determine patient outcomes in colorectal cancer." *Br J Surg* 96(10): 1196-204.
- Sanchez-de-Abajo, A., M. de la Hoya, M. van Puijenbroek, A. Tosar, J. A. Lopez-Asenjo, E. Diaz-Rubio, H. Morreau and T. Caldes (2007). "Molecular analysis of colorectal cancer tumors from patients with mismatch repair proficient hereditary nonpolyposis colorectal cancer suggests novel carcinogenic pathways." *Clin Cancer Res* 13(19): 5729-35.
- Sanchez-Tome, E., B. Rivera, J. Perea, G. Pita, D. Rueda, F. Mercadillo, A. Canal, A. Gonzalez-Neira, J. Benitez and M. Urioste (2014). "Genome-wide linkage analysis and tumoral characterization reveal heterogeneity in familial colorectal cancer type X." *J Gastroenterol*.
- Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(12): 5463-7.
- Savage, S. A., B. J. Stewart, A. Eckert, M. Kiley, J. S. Liao and S. J. Chanock (2005). "Genetic variation, nucleotide diversity, and linkage disequilibrium in seven telomere stability genes suggest that these genes may be under constraint." *Hum Mutat* 26(4): 343-50.
- Schiemann, U., Y. Muller-Koch, M. Gross, J. Daum, P. Lohse, G. Baretton, M. Muders, T. Mussack, R. Kopp and E. Holinski-Feder (2004). "Extended microsatellite analysis in microsatellite stable, MSH2 and MLH1 mutation-negative HNPCC patients: genetic reclassification and correlation with clinical features." *Digestion* 69(3): 166-76.
- Schmeler, K. M., H. T. Lynch, L. M. Chen, M. F. Munsell, P. T. Soliman, M. B. Clark, M. S. Daniels, K. G. White, S. G. Boyd-Rogers, P. G. Conrad, K. Y. Yang, M. M. Rubin, C. C. Sun, B. M. Slomovitz, D. M. Gershenson and K. H. Lu (2006). "Prophylactic surgery to reduce the risk of gynecologic cancers in the Lynch syndrome." *N Engl J Med* 354(3): 261-9.
- Schulz, E., P. Klampfl, S. Holzapfel, A. R. Janecke, P. Ulz, W. Renner, K. Kashofer, S. Nojima, A. Leitner, A. Zebisch, A. Wolfner, S. Hofer, A. Gerger, S. Lax, C. Beham-Schmid, V. Steinke, E. Heitzer, J. B. Geigl, C. Windpassinger, G. Hoefler, M. R. Speicher, C. Richard Boland, A. Kumanogoh and H. Sill (2014). "Germline variants in the SEMA4A gene predispose to familial colorectal cancer type X." *Nat Commun* 5: 5191.
- Schwartz, R. A. and D. P. Torre (1995). "The Muir-Torre syndrome: a 25-year retrospect." *J Am Acad Dermatol* 33(1): 90-104.
- Scott, R. J., M. McPhillips, C. J. Meldrum, P. E. Fitzgerald, K. Adams, A. D. Spigelman, D. du Sart, K. Tucker and J. Kirk (2001). "Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in 95 families: differences and similarities between mutation-positive and mutation-negative kindreds." *Am J Hum Genet* 68(1): 118-127.
- Segui, N., M. Navarro, M. Pineda, N. Koger, F. Bellido, S. Gonzalez, O. Campos, S. Iglesias, R. Valdes-Mas, A. Lopez-Doriga, M. Gut, I. Blanco, C. Lazaro, G. Capella, X. S. Puente, G. Plotz and L. Valle (2014a). "Exome sequencing identifies MUTYH mutations in a family with colorectal cancer and an atypical phenotype." *Gut* 64(2): 355-6.
- Segui, N., M. Pineda, M. Navarro, C. Lazaro, J. Brunet, M. Infante, M. Duran, J. L. Soto, I. Blanco, G. Capella and L. Valle (2014b). "GALNT12 is not a major contributor of familial colorectal cancer type X." *Hum Mutat* 35(1): 50-2.
- Segui, N., E. Guino, M. Pineda, M. Navarro, F. Bellido, C. Lazaro, I. Blanco, V. Moreno, G. Capella and L. Valle (2014c). "Longer telomeres are associated with cancer risk in MMR-proficient hereditary non-polyposis colorectal cancer." *PLoS One* 9(2): e86063.

- Segui, N., M. Pineda, E. Guino, E. Borrás, M. Navarro, F. Bellido, V. Moreno, C. Lazaro, I. Blanco, G. Capella and L. Valle (2013). "Telomere length and genetic anticipation in Lynch syndrome." *PLoS One* 8(4): e61286.
- Senter, L., M. Clendenning, K. Sotamaa, H. Hampel, J. Green, J. D. Potter, A. Lindblom, K. Lagerstedt, S. N. Thibodeau, N. M. Lindor, J. Young, I. Winship, J. G. Dowty, D. M. White, J. L. Hopper, L. Baglietto, M. A. Jenkins and A. de la Chapelle (2008). "The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations." *Gastroenterology* 135(2): 419-28.
- Shankaran, V., J. Obel and A. B. Benson, 3rd (2010). "Predicting response to EGFR inhibitors in metastatic colorectal cancer: current practice and future directions." *Oncologist* 15(2): 157-67.
- Shay, J. W. and S. Bacchetti (1997). "A survey of telomerase activity in human cancer." *Eur J Cancer* 33(5): 787-91.
- Shcherbakova, P. V. and Y. I. Pavlov (1996). "3'→5' exonucleases of DNA polymerases epsilon and delta correct base analog induced DNA replication errors on opposite DNA strands in *Saccharomyces cerevisiae*." *Genetics* 142(3): 717-26.
- Shen, L., M. Toyota, Y. Kondo, E. Lin, L. Zhang, Y. Guo, N. S. Hernandez, X. Chen, S. Ahmed, K. Konishi, S. R. Hamilton and J. P. Issa (2007). "Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(47): 18654-9.
- Shen, Y., J. Wang, X. Han, H. Yang, S. Wang, D. Lin and Y. Shi (2013). "Effectors of epidermal growth factor receptor pathway: the genetic profiling of KRAS, BRAF, PIK3CA, NRAS mutations in colorectal cancer characteristics and personalized medicine." *PLoS One* 8(12): e81628.
- Shete, S., F. J. Hosking, L. B. Robertson, S. E. Dobbins, M. Sanson, B. Malmer, M. Simon, Y. Marie, B. Boisselier, J. Y. Delattre, K. Hoang-Xuan, S. El Hallani, A. Idbaih, D. Zelenika, U. Andersson, R. Henriksson, A. T. Bergenheim, M. Feychting, S. Lonn, A. Ahlbom, J. Schramm, M. Linnebank, K. Hemminki, R. Kumar, S. J. Hepworth, A. Price, G. Armstrong, Y. Liu, X. Gu, R. Yu, C. Lau, M. Schoemaker, K. Muir, A. Swerdlow, M. Lathrop, M. Bondy and R. S. Houlston (2009). "Genome-wide association study identifies five susceptibility loci for glioma." *Nat Genet* 41(8): 899-904.
- Shi, Z., D. Johnstone, B. A. Talseth-Palmer, T. J. Evans, A. D. Spigelman, C. Groombridge, E. A. Milward, J. K. Olynyk, J. Suchy, G. Kurzawski, J. Lubinski and R. J. Scott (2009). "Haemochromatosis HFE gene polymorphisms as potential modifiers of hereditary nonpolyposis colorectal cancer risk and onset age." *Int J Cancer* 125(1): 78-83.
- Shin, J. H., J. L. Ku, K. H. Shin, Y. K. Shin, S. B. Kang and J. G. Park (2003). "Glutathione S-transferase M1 associated with cancer occurrence in Korean HNPCC families carrying the hMLH1/hMSH2 mutation." *Oncol Rep* 10(2): 483-6.
- Shiovitz, S., W. K. Copeland, M. N. Passarelli, A. N. Burnett-Hartman, W. M. Grady, J. D. Potter, S. Gallinger, D. D. Buchanan, C. Rosty, A. K. Win, M. Jenkins, S. N. Thibodeau, R. Haile, J. A. Baron, L. L. Marchand, P. A. Newcomb and N. M. Lindor (2014). "Characterisation of familial colorectal cancer Type X, Lynch syndrome, and non-familial colorectal cancer." *Br J Cancer* 111(3): 598-602.
- Sieber, O. M., L. Lipton, M. Crabtree, K. Heinemann, P. Fidalgo, R. K. Phillips, M. L. Bisgaard, T. F. Orntoft, L. A. Aaltonen, S. V. Hodgson, H. J. Thomas and I. P. Tomlinson (2003). "Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH." *N Engl J Med* 348(9): 791-9.
- Singh, A. and J. Settleman (2003). "EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer." *Oncogene* 29(34): 4741-51.
- Sjursen, W., B. I. Haukanes, E. M. Grindedal, H. Aarset, A. Stormorken, L. F. Engebretsen, C. Jonsrud, I. Bjornevoll, P. A. Andresen, S. Ariansen, L. A. Lavik, B. Gilde, I. M. Bowitz-Lothe, L. Maehle and P. Moller (2010). "Current clinical criteria for Lynch syndrome are not sensitive enough to identify MSH6 mutation carriers." *J Med Genet* 47(9): 579-85.
- Slatkin, M. (2008). "Linkage disequilibrium--understanding the evolutionary past and mapping the medical future." *Nat Rev Genet* 9(6): 477-85.
- Smith, C. G., M. Naven, R. Harris, J. Colley, H. West, N. Li, Y. Liu, R. Adams, T. S. Maughan, L. Nichols, R. Kaplan, M. J. Wagner, H. L. McLeod and J. P. Cheadle (2013). "Exome resequencing identifies potential tumor-suppressor genes that predispose to colorectal cancer." *Hum Mutat*

- 34(7): 1026-34.
- Sneddon, J. B., H. H. Zhen, K. Montgomery, M. van de Rijn, A. D. Tward, R. West, H. Gladstone, H. Y. Chang, G. S. Morganroth, A. E. Oro and P. O. Brown (2006). "Bone morphogenetic protein antagonist gremlin 1 is widely expressed by cancer-associated stromal cells and can promote tumor cell proliferation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(40): 14842-7.
- Song, M., W. S. Garrett and A. T. Chan (2015). "Nutrients, Foods, and Colorectal Cancer Prevention." *Gastroenterology* 148(6): 1244-1260 e16.
- Sopik, V., C. Phelan, C. Cybulski and S. A. Narod (2015). "BRCA1 and BRCA2 mutations and the risk for colorectal cancer." *Clin Genet* 87(5): 411-8.
- Soreide, K., E. A. Janssen, H. Soiland, H. Korner and J. P. Baak (2006). "Microsatellite instability in colorectal cancer." *Br J Surg* 93(4): 395-406.
- Sotamaa, K., S. Liyanarachchi, J. P. Mecklin, H. Jarvinen, L. A. Aaltonen, P. Peltomaki and A. de la Chapelle (2005). "p53 codon 72 and MDM2 SNP309 polymorphisms and age of colorectal cancer onset in Lynch syndrome." *Clin Cancer Res* 11(19 Pt 1): 6840-4.
- Soussi, T., B. Asselain, D. Hamroun, S. Kato, C. Ishioka, M. Claustres and C. Beroud (2006). "Meta-analysis of the p53 mutation database for mutant p53 biological activity reveals a methodologic bias in mutation detection." *Clin Cancer Res* 12(1): 62-9.
- Spier, I., S. Holzapfel, J. Altmuller, B. Zhao, S. Horpaopan, S. Vogt, S. Chen, M. Morak, S. Raeder, K. Kayser, D. Stienen, R. Adam, P. Nurnberg, G. Plotz, E. Holinski-Feder, R. P. Lifton, H. Thiele, P. Hoffmann, V. Steinke and S. Aretz (2014). "Frequency and phenotypic spectrum of germline mutations in POLE and seven other polymerase genes in 266 patients with colorectal adenomas and carcinomas." *Int J Cancer*.
- Stacey, S. N., P. Sulem, G. Masson, S. A. Gudjonsson, G. Thorleifsson, M. Jakobsdottir, A. Sigurdsson, D. F. Gudbjartsson, B. Sigurgeirsson, K. R. Benediktsdottir, K. Thorisdottir, R. Ragnarsson, D. Scherer, K. Hemminki, P. Rudnai, E. Gurzau, K. Koppova, R. Botella-Estrada, V. Soriano, P. Juberias, B. Saez, Y. Gilaberte, V. Fuentelsaz, C. Corredera, M. Grasa, V. Hoiom, A. Lindblom, J. J. Bonenkamp, M. M. van Rossum, K. K. Aben, E. de Vries, M. Santinami, M. G. Di Mauro, A. Maurichi, J. Wendt, P. Hochleitner, H. Pehamberger, J. Gudmundsson, D. N. Magnusdottir, S. Gretarsdottir, H. Holm, V. Steinthorsdottir, M. L. Frigge, T. Blondal, J. Saemundsdottir, H. Bjarnason, K. Kristjansson, G. Bjornsdottir, I. Okamoto, L. Rivoltini, M. Rodolfo, L. A. Kiemeny, J. Hansson, E. Nagore, J. I. Mayordomo, R. Kumar, M. R. Karagas, H. H. Nelson, J. R. Gulcher, T. Rafnar, U. Thorsteinsdottir, J. H. Olafsson, A. Kong and K. Stefansson (2009). "New common variants affecting susceptibility to basal cell carcinoma." *Nat Genet* 41(8): 909-14.
- Stein, T., D. Crighton, L. J. Warnock, J. Milner and R. J. White (2002). "Several regions of p53 are involved in repression of RNA polymerase III transcription." *Oncogene* 21(36): 5540-7.
- Stoffel, E. M., P. B. Mangu and P. J. Limburg (2015). "Hereditary Colorectal Cancer Syndromes: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Endorsement of the Familial Risk-Colorectal Cancer: European Society for Medical Oncology Clinical Practice Guidelines." *J Oncol Pract*.
- Stracci, F., M. Zorzi and G. Grazzini (2014). "Colorectal cancer screening: tests, strategies, and perspectives." *Front Public Health* 2: 210.
- Stupart, D. A., P. A. Goldberg, U. Algar and R. Ramesar (2009). "Surveillance colonoscopy improves survival in a cohort of subjects with a single mismatch repair gene mutation." *Colorectal Dis* 11(2): 126-30.
- Sugaya, K., S. Nishijima, T. Yamada, M. Miyazato, T. Hatano and Y. Ogawa (2002). "Molecular analysis of adrenergic receptor genes and interleukin-4/interleukin-4 receptor genes in patients with interstitial cystitis." *J Urol* 168(6): 2668-71.
- Sukowati, C. H., B. Anfusio, L. S. Croce and C. Tiribelli (2015). "The role of multipotent cancer associated fibroblasts in hepatocarcinogenesis." *BMC Cancer* 15: 188.
- Sutcliffe, J. E., T. R. Brown, S. J. Allison, P. H. Scott and R. J. White (2000). "Retinoblastoma protein disrupts interactions required for RNA polymerase III transcription." *Mol Cell Biol* 20(24): 9192-202.

Sutcliffe, J. E., C. A. Cairns, A. McLees, S. J. Allison, K. Tosh and R. J. White (1999). "RNA polymerase III transcription factor IIIB is a target for repression by pocket proteins p107 and p130." *Mol Cell Biol* 19(6): 4255-61.

Sweet, K., J. Willis, X. P. Zhou, C. Gallione, T. Sawada, P. Alhopuro, S. K. Khoo, A. Patocs, C. Martin, S. Bridgeman, J. Heinz, R. Pilarski, R. Lehtonen, T. W. Prior, T. Frebourg, B. T. Teh, D. A. Marchuk, L. A. Aaltonen and C. Eng (2005). "Molecular classification of patients with unexplained hamartomatous and hyperplastic polyposis." *Jama* 294(19): 2465-73.

## T

Talseth, B. A., C. Meldrum, J. Suchy, G. Kurzawski, J. Lubinski and R. J. Scott (2006a). "Genetic polymorphisms in xenobiotic clearance genes and their influence on disease expression in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15(11): 2307-10.

Talseth, B. A., C. Meldrum, J. Suchy, G. Kurzawski, J. Lubinski and R. J. Scott (2006b). "Age of diagnosis of colorectal cancer in HNPCC patients is more complex than that predicted by R72P polymorphism in TP53." *Int J Cancer* 118(10): 2479-84.

Talseth, B. A., C. Meldrum, J. Suchy, G. Kurzawski, J. Lubinski and R. J. Scott (2007). "Lack of association between genetic polymorphisms in cytokine genes and disease expression in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer." *Scand J Gastroenterol* 42(5): 628-32.

Talseth-Palmer, B. A., I. S. Brenne, K. A. Ashton, T. J. Evans, M. McPhillips, C. Groombridge, J. Suchy, G. Kurzawski, A. Spigelman, J. Lubinski and R. J. Scott (2011). "Colorectal cancer susceptibility loci on chromosome 8q23.3 and 11q23.1 as modifiers for disease expression in Lynch syndrome." *J Med Genet* 48(4): 279-84.

Talseth-Palmer, B. A., J. T. Wijnen, D. M. Grice and R. J. Scott (2013). "Genetic modifiers of cancer risk in Lynch syndrome: a review." *Fam Cancer* 12(2): 207-16.

Tammela, T. and K. Alitalo (2010). "Lymphangiogenesis: Molecular mechanisms and future promise." *Cell* 140(4): 460-76.

Tan, M. H., J. Mester, C. Peterson, Y. Yang, J. L. Chen, L. A. Rybicki, K. Milas, H. Pederson, B. Remzi, M. S. Orloff and C. Eng (2011). "A clinical scoring system for selection of patients for PTEN mutation testing is proposed on the basis of a prospective study of 3042 probands." *Am J Hum Genet* 88(1): 42-56.

Tan, M. H., J. L. Mester, J. Ngeow, L. A. Rybicki, M. S. Orloff and C. Eng (2012). "Lifetime cancer risks in individuals with germline PTEN mutations." *Clin Cancer Res* 18(2): 400-7.

Tanskanen, T., A. E. Gylfe, R. Katainen, M. Taipale, L. Renkonen-Sinisalo, H. Jarvinen, J. P. Mecklin, J. Bohm, O. Kilpivaara, E. Pitkanen, K. Palin, P. Vahteristo, S. Tuupanen and L. A. Aaltonen (2015). "Systematic search for rare variants in Finnish early-onset colorectal cancer patients." *Cancer Genet* 208(1-2): 35-40.

ten Broeke, S. W., R. M. Brohet, C. M. Tops, H. M. van der Klift, M. E. Velthuisen, I. Bernstein, G. Capella Munar, E. Gomez Garcia, N. Hoogerbrugge, T. G. Letteboer, F. H. Menko, A. Lindblom, A. R. Mensenkamp, P. Moller, T. A. van Os, N. Rahner, B. J. Redeker, R. H. Sijmons, L. Spruijt, M. Suerink, Y. J. Vos, A. Wagner, F. J. Hes, H. F. Vasen, M. Nielsen and J. T. Wijnen (2015). "Lynch syndrome caused by germline PMS2 mutations: delineating the cancer risk." *J Clin Oncol* 33(4): 319-25.

Tenesa, A., S. M. Farrington, J. G. Prendergast, M. E. Porteous, M. Walker, N. Haq, R. A. Barnetson, E. Theodoratou, R. Cetnarskyj, N. Cartwright, C. Semple, A. J. Clark, F. J. Reid, L. A. Smith, K. Kavoussanakis, T. Koessler, P. D. Pharoah, S. Buch, C. Schafmayer, J. Tepel, S. Schreiber, H. Volzke, C. O. Schmidt, J. Hampe, J. Chang-Claude, M. Hoffmeister, H. Brenner, S. Wilkening, F. Canzian, G. Capella, V. Moreno, I. J. Deary, J. M. Starr, I. P. Tomlinson, Z. Kemp, K. Howarth, L. Carvajal-Carmona, E. Webb, P. Broderick, J. Vijaykrishnan, R. S. Houlston, G. Rennert, D.

- Ballinger, L. Rozek, S. B. Gruber, K. Matsuda, T. Kidokoro, Y. Nakamura, B. W. Zanke, C. M. Greenwood, J. Rangrej, R. Kustra, A. Montpetit, T. J. Hudson, S. Gallinger, H. Campbell and M. G. Dunlop (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.
- Teodoridis, J. M., C. Hardie and R. Brown (2008). "CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: causes and implications." *Cancer Lett* 268(2): 177-86.
- Teutsch, S. (2009). "Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives." *Genet Med* 11(1): 35-41.
- Therkildsen, C., T. K. Bergmann, T. Henrichsen-Schnack, S. Ladelund and M. Nilbert (2014). "The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis." *Acta Oncol* 53(7): 852-64.
- Therkildsen, C., G. Jonsson, M. Dominguez-Valentin, A. Nissen, E. Rambech, B. Halvarsson, I. Bernstein, K. Borg and M. Nilbert (2013). "Gain of chromosomal region 20q and loss of 18 discriminates between Lynch syndrome and familial colorectal cancer." *Eur J Cancer* 49(6): 1226-35.
- Tomasetti, C., B. Vogelstein and G. Parmigiani (2013). "Half or more of the somatic mutations in cancers of self-renewing tissues originate prior to tumor initiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(6): 1999-2004.
- Tomlinson, I., N. Rahman, I. Frayling, J. Mangion, R. Barfoot, R. Hamoudi, S. Seal, J. Northover, H. J. Thomas, K. Neale, S. Hodgson, I. Talbot, R. Houlston and M. R. Stratton (1999). "Inherited susceptibility to colorectal adenomas and carcinomas: evidence for a new predisposition gene on 15q14-q22." *Gastroenterology* 116(4): 789-95.
- Tomlinson, I., E. Webb, L. Carvajal-Carmona, P. Broderick, Z. Kemp, S. Spain, S. Penegar, I. Chandler, M. Gorman, W. Wood, E. Barclay, S. Lubbe, L. Martin, G. Sellick, E. Jaeger, R. Hubner, R. Wild, A. Rowan, S. Fielding, K. Howarth, A. Silver, W. Atkin, K. Muir, R. Logan, D. Kerr, E. Johnstone, O. Sieber, R. Gray, H. Thomas, J. Peto, J. B. Cazier and R. Houlston (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, I. P., E. Webb, L. Carvajal-Carmona, P. Broderick, K. Howarth, A. M. Pittman, S. Spain, S. Lubbe, A. Walther, K. Sullivan, E. Jaeger, S. Fielding, A. Rowan, J. Vijayakrishnan, E. Domingo, I. Chandler, Z. Kemp, M. Qureshi, S. M. Farrington, A. Tenesa, J. G. Prendergast, R. A. Barnetson, S. Penegar, E. Barclay, W. Wood, L. Martin, M. Gorman, H. Thomas, J. Peto, D. T. Bishop, R. Gray, E. R. Maher, A. Lucassen, D. Kerr, D. G. Evans, C. Schafmayer, S. Buch, H. Volzke, J. Hampe, S. Schreiber, U. John, T. Koessler, P. Pharoah, T. van Wezel, H. Morreau, J. T. Wijnen, J. L. Hopper, M. C. Southey, G. G. Giles, G. Severi, S. Castellvi-Bel, C. Ruiz-Ponte, A. Carracedo, A. Castells, A. Forsti, K. Hemminki, P. Vodicka, A. Naccarati, L. Lipton, J. W. Ho, K. K. Cheng, P. C. Sham, J. Luk, J. A. Agundez, J. M. Ladero, M. de la Hoya, T. Caldes, I. Niittymaki, S. Tuupanen, A. Karhu, L. Aaltonen, J. B. Cazier, H. Campbell, M. G. Dunlop and R. S. Houlston (2008). "A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3." *Nat Genet* 40(5): 623-30.
- Torre, L. A., F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent and A. Jemal (2015). "Global cancer statistics, 2012." *CA Cancer J Clin* 65(2): 87-108.
- Toyota, M. and J. P. Issa (1999). "CpG island methylator phenotypes in aging and cancer." *Semin Cancer Biol* 9(5): 349-57.
- Turcot, J., J. P. Despres and F. St Pierre (1959). "Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: report of two cases." *Dis Colon Rectum* 2: 465-8.
- Turnbull, C., E. A. Rapley, S. Seal, D. Pernet, A. Renwick, D. Hughes, M. Ricketts, R. Linger, J. Nsengimana, P. Deloukas, R. A. Huddart, D. T. Bishop, D. F. Easton, M. R. Stratton and N. Rahman (2010). "Variants near DMRT1, TERT and ATF7IP are associated with testicular germ cell cancer." *Nat Genet* 42(7): 604-7.
- Tutlewska, K., J. Lubinski and G. Kurzawski (2013). "Germline deletions in the EPCAM gene as a cause of Lynch syndrome - literature review." *Hered Cancer Clin Pract* 11(1): 9.

## U

- Umar, A., C. R. Boland, J. P. Terdiman, S. Syngal, A. de la Chapelle, J. Ruschoff, R. Fishel, N. M. Lindor, L. J. Burgart, R. Hamelin, S. R. Hamilton, R. A. Hiatt, J. Jass, A. Lindblom, H. T. Lynch, P. Peltomaki, S. D. Ramsey, M. A. Rodriguez-Bigas, H. F. Vasen, E. T. Hawk, J. C. Barrett, A. N. Freedman and S. Srivastava (2004). "Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability." *J Natl Cancer Inst* 96(4): 261-8.
- Uppal, S., D. Mistry and A. P. Coatesworth (2007). "Cowden disease: a review." *Int J Clin Pract* 61(4): 645-52.

## V

- Valle, L. (2014a). "Genetic predisposition to colorectal cancer: where we stand and future perspectives." *World J Gastroenterol* 20(29): 9828-49.
- Valle, L., P. Carbonell, V. Fernandez, A. M. Dotor, M. Sanz, J. Benitez and M. Urioste (2007a). "MLH1 germline epimutations in selected patients with early-onset non-polyposis colorectal cancer." *Clin Genet* 71(3): 232-7.
- Valle, L., E. Hernandez-Illan, F. Bellido, G. Aiza, A. Castillejo, M. I. Castillejo, M. Navarro, N. Segui, G. Vargas, C. Guarinos, M. Juarez, X. Sanjuan, S. Iglesias, C. Alenda, C. Egoavil, A. Segura, M. J. Juan, M. Rodriguez-Soler, J. Brunet, S. Gonzalez, R. Jover, C. Lazaro, G. Capella, M. Pineda, J. L. Soto and I. Blanco (2014b). "New insights into POLE and POLD1 germline mutations in familial colorectal cancer and polyposis." *Hum Mol Genet* 23(13): 3506-12.
- Valle, L., J. Perea, P. Carbonell, V. Fernandez, A. M. Dotor, J. Benitez and M. Urioste (2007b). "Clinicopathologic and pedigree differences in amsterdam I-positive hereditary nonpolyposis colorectal cancer families according to tumor microsatellite instability status." *J Clin Oncol* 25(7): 781-6.
- Van Cutsem, E., C. H. Kohne, I. Lang, G. Folprecht, M. P. Nowacki, S. Cascinu, I. Shchepotin, J. Maurel, D. Cunningham, S. Tejpar, M. Schlichting, A. Zubel, I. Celik, P. Rougier and F. Ciardiello (2011). "Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status." *J Clin Oncol* 29(15): 2011-9.
- van Dijk, E. L., H. Auger, Y. Jaszczyszyn and C. Thermes (2014). "Ten years of next-generation sequencing technology." *Trends Genet* 30(9): 418-26.
- Van Dyke, A. L., M. L. Cote, A. S. Wenzlaff, J. Abrams, S. Land, P. Iyer and A. G. Schwartz (2009). "Chromosome 5p Region SNPs Are Associated with Risk of NSCLC among Women." *J Cancer Epidemiol* 2009: 242151.
- van Lier, M. G., A. Wagner, E. M. Mathus-Vliegen, E. J. Kuipers, E. W. Steyerberg and M. E. van Leerdam (2010). "High cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and surveillance recommendations." *Am J Gastroenterol* 105(6): 1258-64; author reply 1265.
- Varga, E. A., M. Pastore, T. Prior, G. E. Herman and K. L. McBride (2009). "The prevalence of PTEN mutations in a clinical pediatric cohort with autism spectrum disorders, developmental delay, and macrocephaly." *Genet Med* 11(2): 111-7.
- Vasen, H. F. (2005). "Clinical description of the Lynch syndrome [hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)]." *Fam Cancer* 4(3): 219-25.
- Vasen, H. F., Z. Ghorbanoghli, F. Bourdeaut, O. Cabaret, O. Caron, A. Duval, N. Entz-Werle, Y. Goldberg, D. Ilencikova, C. P. Kratz, N. Lavoine, J. Loeffen, F. H. Menko, M. Muleris, G. Sebillé, C. Colas, B. Burkhardt, L. Brugieres and K. Wimmer (2013). "Guidelines for surveillance of individuals with



- constitutional mismatch repair-deficiency proposed by the European Consortium "Care for CMMR-D" (C4CMMR-D)." *J Med Genet* 51(5): 283-93.
- Vasen, H. F., J. P. Mecklin, P. M. Khan and H. T. Lynch (1991). "The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC)." *Dis Colon Rectum* 34(5): 424-5.
- Vasovcak, P., K. Pavlikova, Z. Sedlacek, P. Skapa, M. Kouida, J. Hoch and A. Krepelova (2011). "Molecular genetic analysis of 103 sporadic colorectal tumours in Czech patients." *PLoS One* 6(8): e24114.
- Venkatachalam, R., M. J. Ligtenberg, N. Hoogerbrugge, H. K. Schackert, H. Gorgens, M. M. Hahn, E. J. Kamping, L. Vreede, E. Hoenselaar, E. van der Looij, M. Goossens, M. Churchman, L. Carvajal-Carmona, I. P. Tomlinson, D. R. de Bruijn, A. G. Van Kessel and R. P. Kuiper (2010). "Germline epigenetic silencing of the tumor suppressor gene PTPRJ in early-onset familial colorectal cancer." *Gastroenterology* 139(6): 2221-4.
- Venkatachalam, R., E. T. Verwiel, E. J. Kamping, E. Hoenselaar, H. Gorgens, H. K. Schackert, J. H. van Krieken, M. J. Ligtenberg, N. Hoogerbrugge, A. G. van Kessel and R. P. Kuiper (2011). "Identification of candidate predisposing copy number variants in familial and early-onset colorectal cancer patients." *Int J Cancer* 129(7): 1635-42.
- Venter, J. C., M. D. Adams, E. W. Myers, P. W. Li, R. J. Mural, G. G. Sutton, H. O. Smith, M. Yandell, C. A. Evans, R. A. Holt, J. D. Gocayne, P. Amanatides, R. M. Ballew, D. H. Huson, J. R. Wortman, Q. Zhang, C. D. Kodira, X. H. Zheng, L. Chen, M. Skupski, G. Subramanian, P. D. Thomas, J. Zhang, G. L. Gabor Miklos, C. Nelson, S. Broder, A. G. Clark, J. Nadeau, V. A. McKusick, N. Zinder, A. J. Levine, R. J. Roberts, M. Simon, C. Slayman, M. Hunkapiller, R. Bolanos, A. Delcher, I. Dew, D. Fasulo, M. Flanigan, L. Florea, A. Halpern, S. Hannenhalli, S. Kravitz, S. Levy, C. Mobarry, K. Reinert, K. Remington, J. Abu-Threideh, E. Beasley, K. Biddick, V. Bonazzi, R. Brandon, M. Cargill, I. Chandramouliswaran, R. Charlab, K. Chaturvedi, Z. Deng, V. Di Francesco, P. Dunn, K. Eilbeck, C. Evangelista, A. E. Gabrielian, W. Gan, W. Ge, F. Gong, Z. Gu, P. Guan, T. J. Heiman, M. E. Higgins, R. R. Ji, Z. Ke, K. A. Ketchum, Z. Lai, Y. Lei, Z. Li, J. Li, Y. Liang, X. Lin, F. Lu, G. V. Merkulov, N. Milshina, H. M. Moore, A. K. Naik, V. A. Narayan, B. Neelam, D. Nusskern, D. B. Rusch, S. Salzberg, W. Shao, B. Shue, J. Sun, Z. Wang, A. Wang, X. Wang, J. Wang, M. Wei, R. Wides, C. Xiao, C. Yan, A. Yao, J. Ye, M. Zhan, W. Zhang, H. Zhang, Q. Zhao, L. Zheng, F. Zhong, W. Zhong, S. Zhu, S. Zhao, D. Gilbert, S. Baumhueter, G. Spier, C. Carter, A. Cravchik, T. Woodage, F. Ali, H. An, A. Awe, D. Baldwin, H. Baden, M. Barnstead, I. Barrow, K. Beeson, D. Busam, A. Carver, A. Center, M. L. Cheng, L. Curry, S. Danaher, L. Davenport, R. Desilets, S. Dietz, K. Dodson, L. Doup, S. Ferriera, N. Garg, A. Gluecksmann, B. Hart, J. Haynes, C. Haynes, C. Heiner, S. Hladun, D. Hostin, J. Houck, T. Howland, C. Ibegwam, J. Johnson, F. Kalush, L. Kline, S. Koduru, A. Love, F. Mann, D. May, S. McCawley, T. McIntosh, I. McMullen, M. Moy, L. Moy, B. Murphy, K. Nelson, C. Pfannkoch, E. Pratts, V. Puri, H. Qureshi, M. Reardon, R. Rodriguez, Y. H. Rogers, D. Romblad, B. Ruhfel, R. Scott, C. Sitter, M. Smallwood, E. Stewart, R. Strong, E. Suh, R. Thomas, N. N. Tint, S. Tse, C. Vech, G. Wang, J. Wetter, S. Williams, M. Williams, S. Windsor, E. Winn-Deen, K. Wolfe, J. Zaveri, K. Zaveri, J. F. Abril, R. Guigo, M. J. Campbell, K. V. Sjolander, B. Karlak, A. Kejariwal, H. Mi, B. Lazareva, T. Hatton, A. Narechania, K. Diemer, A. Muruganujan, N. Guo, S. Sato, V. Bafna, S. Istrail, R. Lippert, R. Schwartz, B. Walenz, S. Yooseph, D. Allen, A. Basu, J. Baxendale, L. Blick, M. Caminha, J. Carnes-Stine, P. Caulk, Y. H. Chiang, M. Coyne, C. Dahlke, A. Mays, M. Dombroski, M. Donnelly, D. Ely, S. Esparham, C. Fosler, H. Gire, S. Glanowski, K. Glasser, A. Glodek, M. Gorokhov, K. Graham, B. Gropman, M. Harris, J. Heil, S. Henderson, J. Hoover, D. Jennings, C. Jordan, J. Jordan, J. Kasha, L. Kagan, C. Kraft, A. Levitsky, M. Lewis, X. Liu, J. Lopez, D. Ma, W. Majoros, J. McDaniel, S. Murphy, M. Newman, T. Nguyen, N. Nguyen, M. Nodell, S. Pan, J. Peck, M. Peterson, W. Rowe, R. Sanders, J. Scott, M. Simpson, T. Smith, A. Sprague, T. Stockwell, R. Turner, E. Venter, M. Wang, M. Wen, D. Wu, M. Wu, A. Xia, A. Zandieh and X. Zhu (2001). "The sequence of the human genome." *Science* 291(5507): 1304-51.
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, S. R. Hamilton, S. E. Kern, A. C. Preisinger, M. Leppert, Y. Nakamura, R. White, A. M. Smits and J. L. Bos (1988). "Genetic alterations during colorectal-tumor development." *N Engl J Med* 319(9): 525-32.
- Vogelstein, B., N. Papadopoulos, V. E. Velculescu, S. Zhou, L. A. Diaz, Jr. and K. W. Kinzler (2013). "Cancer genome landscapes." *Science* 339(6127): 1546-58.
- Vogt, S., N. Jones, D. Christian, C. Engel, M. Nielsen, A. Kaufmann, V. Steinke, H. F. Vasen, P. Propping,

J. R. Sampson, F. J. Hes and S. Aretz (2009). "Expanded extracolonic tumor spectrum in MUTYH-associated polyposis." *Gastroenterology* 137(6): 1976-85 e1-10.

# W

- Wallace, K., M. V. Grau, D. Ahnen, D. C. Snover, D. J. Robertson, D. Mahnke, J. Gui, E. L. Barry, R. W. Summers, G. McKeown-Eyssen, R. W. Haile and J. A. Baron (2009). "The association of lifestyle and dietary factors with the risk for serrated polyps of the colorectum." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(8): 2310-7.
- Walpole, I. R. and G. Cullity (1989). "Juvenile polyposis: a case with early presentation and death attributable to adenocarcinoma of the pancreas." *Am J Med Genet* 32(1): 1-8.
- Walsh, T., M. K. Lee, S. Casadei, A. M. Thornton, S. M. Stray, C. Pennil, A. S. Nord, J. B. Mandell, E. M. Swisher and M. C. King (2010). "Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(28): 12629-33.
- Wang, J. Y., Y. H. Wang, S. W. Jao, C. Y. Lu, C. H. Kuo, H. M. Hu, J. S. Hsieh, I. W. Chong, T. L. Cheng and S. R. Lin (2006). "Molecular mechanisms underlying the tumorigenesis of colorectal adenomas: correlation to activated K-ras oncogene." *Oncol Rep* 16(6): 1245-52.
- Wang, W., G. Q. Wang, X. W. Sun, G. Chen, Y. F. Li, L. Y. Zhang, H. B. Qiu, C. Y. Huang, Y. Q. Zhan and Z. W. Zhou (2010a). "Prognostic values of chromosome 18q microsatellite alterations in stage II colonic carcinoma." *World J Gastroenterol* 16(47): 6026-34.
- Wang, K., M. Li and H. Hakonarson (2010b). "ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data." *Nucleic Acids Res* 38(16): e164.
- Wang, Y. and W. E. Stumph (1995). "RNA polymerase II/III transcription specificity determined by TATA box orientation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(19): 8606-10.
- Wang, Z., B. Zhu, M. Zhang, H. Parikh, J. Jia, C. C. Chung, J. N. Sampson, J. W. Hoskins, A. Hutchinson, L. Burdette, A. Ibrahim, C. Hautman, P. S. Raj, C. C. Abnet, A. A. Adjei, A. Ahlbom, D. Albanes, N. E. Allen, C. B. Ambrosone, M. Aldrich, P. Amiano, C. Amos, U. Andersson, G. Andriole, Jr., I. L. Andrulis, C. Arici, A. A. Arslan, M. A. Austin, D. Baris, D. A. Barkauskas, B. A. Bassig, L. E. Beane Freeman, C. D. Berg, S. I. Berndt, P. A. Bertazzi, R. B. Biritwum, A. Black, W. Blot, H. Boeing, P. Boffetta, K. Bolton, M. C. Boutron-Ruault, P. M. Bracci, P. Brennan, L. A. Brinton, M. Brotzman, H. B. Bueno-de-Mesquita, J. E. Buring, M. A. Butler, Q. Cai, G. Cancel-Tassin, F. Canzian, G. Cao, N. E. Caporaso, A. Carrato, T. Carreon, A. Carta, G. C. Chang, I. S. Chang, J. Chang-Claude, X. Che, C. J. Chen, C. Y. Chen, C. H. Chen, C. Chen, K. Y. Chen, Y. M. Chen, A. P. Chokkalingam, L. W. Chu, F. Clavel-Chapelon, G. A. Colditz, J. S. Colt, D. Conti, M. B. Cook, V. K. Cortessis, E. D. Crawford, O. Cussenot, F. G. Davis, I. De Vivo, X. Deng, T. Ding, C. P. Dinney, A. L. Di Stefano, W. R. Diver, E. J. Duell, J. W. Elena, J. H. Fan, H. S. Feigelson, M. Feychting, J. D. Figueroa, A. M. Flanagan, J. F. Fraumeni, Jr., N. D. Freedman, B. L. Fridley, C. S. Fuchs, M. Gago-Dominguez, S. Gallinger, Y. T. Gao, S. M. Gapstur, M. Garcia-Closas, R. Garcia-Closas, J. M. Gastier-Foster, J. M. Gaziano, D. S. Gerhard, C. A. Giffen, G. G. Giles, E. M. Gillanders, E. L. Giovannucci, M. Goggins, N. Gokgoz, A. M. Goldstein, C. Gonzalez, R. Gorlick, M. H. Greene, M. Gross, H. B. Grossman, R. Grubb, 3rd, J. Gu, P. Guan, C. A. Haiman, G. Hallmans, S. E. Hankinson, C. C. Harris, P. Hartge, C. Hattinger, R. B. Hayes, Q. He, L. Helman, B. E. Henderson, R. Henriksson, J. Hoffman-Bolton, C. Hohensee, E. A. Holly, Y. C. Hong, R. N. Hoover, H. D. Hosgood, 3rd, C. F. Hsiao, A. W. Hsing, C. A. Hsiung, N. Hu, W. Hu, Z. Hu, M. S. Huang, D. J. Hunter, P. D. Inskip, H. Ito, E. J. Jacobs, K. B. Jacobs, M. Jenab, B. T. Ji, C. Johansen, M. Johansson, A. Johnson, R. Kaaks, A. M. Kamat, A. Kamineni, M. Karagas, C. Khanna, K. T. Khaw, C. Kim, I. S. Kim, J. H. Kim, Y. H. Kim, Y. C. Kim, Y. T. Kim, C. H. Kang, Y. J. Jung, C. M. Kitahara, A. P. Klein, R. Klein, M. Kogevinas, W. P. Koh, T. Kohno, L. N. Kolonel, C. Kooperberg, C. P. Kratz, V. Krogh, H. Kunitoh, R. C. Kurtz, N. Kurucu, Q. Lan, M. Lathrop, C. C. Lau, F. Lecanda, K. M. Lee, M. P. Lee, L. Le Marchand, S. P. Lerner, D. Li, L. M. Liao, W. Y. Lim, D. Lin, J. Lin, S. Lindstrom, M. S. Linet, J. Lissowska, J. Liu, B. Ljungberg, J. Lloreta, D. Lu,

- J. Ma, N. Malats, S. Mannisto, N. Marina, G. Mastrangelo, K. Matsuo, K. A. McGlynn, R. McKean-Cowdin, L. H. McNeill, R. R. McWilliams, B. S. Melin, P. S. Meltzer, J. E. Mensah, X. Miao, D. S. Michaud, A. M. Mondul, L. E. Moore, K. Muir, S. Niwa, S. H. Olson, N. Orr, S. Panico, J. Y. Park, A. V. Patel, A. Patino-Garcia, S. Pavanello, P. H. Peeters, B. Peplonska, U. Peters, G. M. Petersen, P. Picci, M. C. Pike, S. Porru, J. Prescott, X. Pu, M. P. Purdue, Y. L. Qiao, P. Rajaraman, E. Riboli, H. A. Risch, R. J. Rodabough, N. Rothman, A. M. Ruder, J. S. Ryu, M. Sanson, A. Schned, F. R. Schumacher, A. G. Schwartz, K. L. Schwartz, M. Schwenn, K. Scotlandi, A. Seow, C. Serra, M. Serra, H. D. Sesso, G. Severi, H. Shen, M. Shen, S. Shete, K. Shiraishi, X. O. Shu, A. Siddiq, L. Sierrasesumaga, S. Sierri, A. D. Loon Sihoe, D. T. Silverman, M. Simon, M. C. Southey, L. Spector, M. Spitz, M. Stampfer, P. Stattin, M. C. Stern, V. L. Stevens, R. Z. Stolzenberg-Solomon, D. O. Stram, S. S. Strom, W. C. Su, M. Sund, S. W. Sung, A. Swerdlow, W. Tan, H. Tanaka, W. Tang, Z. Z. Tang, A. Tardon, E. Tay, P. R. Taylor, Y. Tettey, D. M. Thomas, R. Tirabosco, A. Tjonneland, G. S. Tobias, J. R. Toro, R. C. Travis, D. Trichopoulos, R. Troisi, A. Truvelo, Y. H. Tsai, M. A. Tucker, R. Tumino, D. Van Den Berg, S. K. Van Den Eeden, R. Vermeulen, P. Vineis, K. Visvanathan, U. Vogel, C. Wang, C. Wang, J. Wang, S. S. Wang, E. Weiderpass, S. J. Weinstein, N. Wentzensen, W. Wheeler, E. White, J. K. Wiencke, A. Wolk, B. M. Wolpin, M. P. Wong, M. Wrensch, C. Wu, T. Wu, X. Wu, Y. L. Wu, J. S. Wunder, Y. B. Xiang, J. Xu, H. P. Yang, P. C. Yang, Y. Yatabe, Y. Ye, E. D. Yeboah, Z. Yin, C. Ying, C. J. Yu, K. Yu, J. M. Yuan, K. A. Zanetti, A. Zeleniuch-Jacquotte, W. Zheng, B. Zhou, L. Mirabello, S. A. Savage, P. Kraft, S. J. Chanock, M. Yeager, M. T. Landi, J. Shi, N. Chatterjee and L. T. Amundadottir (2014). "Imputation and subset-based association analysis across different cancer types identifies multiple independent risk loci in the TERT-CLPTM1L region on chromosome 5p15.33." *Hum Mol Genet* 23(24): 6616-33.
- Ward, R. L., T. Dobbins, N. M. Lindor, R. W. Rapkins and M. P. Hitchins (2013). "Identification of constitutional MLH1 epimutations and promoter variants in colorectal cancer patients from the Colon Cancer Family Registry." *Genet Med* 15(1): 25-35.
- Ward, R. L., S. Hicks and N. J. Hawkins (2013). "Population-based molecular screening for Lynch syndrome: implications for personalized medicine." *J Clin Oncol* 31(20): 2554-62.
- Watson, J. D. and F. H. Crick (1953). "Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid." *Nature* 171(4356): 737-8.
- Watson, P., H. F. Vasen, J. P. Mecklin, I. Bernstein, M. Aarnio, H. J. Jarvinen, T. Myrhoj, L. Sunde, J. T. Wijnen and H. T. Lynch (2008). "The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome." *Int J Cancer* 123(2): 444-9.
- Weisenberger, D. J., A. J. Levine, T. I. Long, D. D. Buchanan, R. Walters, M. Clendenning, C. Rosty, A. D. Joshi, M. C. Stern, L. Le Marchand, N. M. Lindor, D. Daftary, S. Gallinger, T. Selander, B. Bapat, P. A. Newcomb, P. T. Campbell, G. Casey, D. J. Ahnen, J. A. Baron, R. W. Haile, J. L. Hopper, J. P. Young, P. W. Laird and K. D. Siegmund (2015). "Association of the colorectal CpG island methylator phenotype with molecular features, risk factors, and family history." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 24(3): 512-9.
- Weisenberger, D. J., K. D. Siegmund, M. Campan, J. Young, T. I. Long, M. A. Faasse, G. H. Kang, M. Widschwendter, D. Weener, D. Buchanan, H. Koh, L. Simms, M. Barker, B. Leggett, J. Levine, M. Kim, A. J. French, S. N. Thibodeau, J. Jass, R. Haile and P. W. Laird (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.
- Weren, R. D., R. Venkatachalam, J. B. Cazier, H. F. Farin, C. M. Kets, R. M. de Voer, L. Vreede, E. T. Verwiel, M. van Asseldonk, E. J. Kamping, L. A. Kiemeny, K. Neveling, K. K. Aben, L. Carvajal-Carmona, I. D. Nagtegaal, H. K. Schackert, H. Clevers, M. van de Wetering, I. P. Tomlinson, M. J. Ligtenberg, N. Hoogerbrugge, A. Geurts van Kessel and R. P. Kuiper (2015). "Germline deletions in the tumour suppressor gene FOCAD are associated with polyposis and colorectal cancer development." *J Pathol*.
- Wheeler, D. A., M. Srinivasan, M. Egholm, Y. Shen, L. Chen, A. McGuire, W. He, Y. J. Chen, V. Makhijani, G. T. Roth, X. Gomes, K. Tartaro, F. Niazi, C. L. Turcotte, G. P. Irzyk, J. R. Lupski, C. Chinault, X. Z. Song, Y. Liu, Y. Yuan, L. Nazareth, X. Qin, D. M. Muzny, M. Margulies, G. M. Weinstock, R. A. Gibbs and J. M. Rothberg (2008). "The complete genome of an individual by massively parallel DNA sequencing." *Nature* 452(7189): 872-6.
- White, R. J., T. M. Gottlieb, C. S. Downes and S. P. Jackson (1995). "Cell cycle regulation of RNA

- polymerase III transcription." *Mol Cell Biol* 15(12): 6653-62.
- White, R. J., D. Trouche, K. Martin, S. P. Jackson and T. Kouzarides (1996). "Repression of RNA polymerase III transcription by the retinoblastoma protein." *Nature* 382(6586): 88-90.
- Whitelaw, S. C., V. A. Murday, I. P. Tomlinson, H. J. Thomas, S. Cottrell, A. Ginsberg, S. Bukofzer, S. V. Hodgson, R. B. Skudowitz, J. R. Jass, I. C. Talbot, J. M. Northover, W. F. Bodmer and E. Solomon (1997). "Clinical and molecular features of the hereditary mixed polyposis syndrome." *Gastroenterology* 112(2): 327-34.
- Wiesner, G. L., D. Daley, S. Lewis, C. Ticknor, P. Platzer, J. Lutterbaugh, M. MacMillen, B. Baliner, J. Willis, R. C. Elston and S. D. Markowitz (2003). "A subset of familial colorectal neoplasia kindreds linked to chromosome 9q22.2-31.2." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(22): 12961-5.
- Wijnen, J. T., R. M. Brohet, R. van Eijk, S. Jagmohan-Changur, A. Middeldorp, C. M. Tops, M. van Puijenbroek, M. G. Ausems, E. Gomez Garcia, F. J. Hes, N. Hoogerbrugge, F. H. Menko, T. A. van Os, R. H. Sijmons, S. Verhoef, A. Wagner, F. M. Nagengast, J. H. Kleibeuker, P. Devilee, H. Morreau, D. Goldgar, I. P. Tomlinson, R. S. Houlston, T. van Wezel and H. F. Vasen (2009). "Chromosome 8q23.3 and 11q23.1 variants modify colorectal cancer risk in Lynch syndrome." *Gastroenterology* 136(1): 131-7.
- Willeit, P., J. Willeit, A. Kloss-Brandstatter, F. Kronenberg and S. Kiechl (2011). "Fifteen-year follow-up of association between telomere length and incident cancer and cancer mortality." *Jama* 306(1): 42-4.
- Wimmer, K. and J. Etzler (2008). "Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg?" *Hum Genet* 124(2): 105-22.
- Wimmer, K., C. P. Kratz, H. F. Vasen, O. Caron, C. Colas, N. Entz-Werle, A. M. Gerdes, Y. Goldberg, D. Ilencikova, M. Muleris, A. Duval, N. Lavoine, C. Ruiz-Ponte, I. Slavc, B. Burkhardt and L. Brugieres (2014). "Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: suggestions of the European consortium 'care for CMMRD' (C4CMMRD)." *J Med Genet* 51(6): 355-65.
- Win, A. K., N. M. Lindor, J. P. Young, F. A. Macrae, G. P. Young, E. Williamson, S. Parry, J. Goldblatt, L. Lipton, I. Winship, B. Leggett, K. M. Tucker, G. G. Giles, D. D. Buchanan, M. Clendenning, C. Rosty, J. Arnold, A. J. Levine, R. W. Haile, S. Gallinger, L. Le Marchand, P. A. Newcomb, J. L. Hopper and M. A. Jenkins (2012). "Risks of primary extracolonic cancers following colorectal cancer in lynch syndrome." *J Natl Cancer Inst* 104(18): 1363-72.
- Win, A. K., S. Parry, B. Parry, M. F. Kalady, F. A. Macrae, D. J. Ahnen, G. P. Young, L. Lipton, I. Winship, A. Boussioutas, J. P. Young, D. D. Buchanan, J. Arnold, L. Le Marchand, P. A. Newcomb, R. W. Haile, N. M. Lindor, S. Gallinger, J. L. Hopper and M. A. Jenkins (2013a). "Risk of metachronous colon cancer following surgery for rectal cancer in mismatch repair gene mutation carriers." *Ann Surg Oncol* 20(6): 1829-36.
- Win, A. K., J. L. Hopper, D. D. Buchanan, J. P. Young, A. Tenesa, J. G. Dowty, G. G. Giles, J. Goldblatt, I. Winship, A. Boussioutas, G. P. Young, S. Parry, J. A. Baron, D. Duggan, S. Gallinger, P. A. Newcomb, R. W. Haile, L. Le Marchand, N. M. Lindor and M. A. Jenkins (2013b). "Are the common genetic variants associated with colorectal cancer risk for DNA mismatch repair gene mutation carriers?" *Eur J Cancer* 49(7): 1578-87.
- Woiwode, A., S. A. Johnson, S. Zhong, C. Zhang, R. G. Roeder, M. Teichmann and D. L. Johnson (2008). "PTEN represses RNA polymerase III-dependent transcription by targeting the TFIIIB complex." *Mol Cell Biol* 28(12): 4204-14.
- Wong, J. J., N. J. Hawkins, R. L. Ward and M. P. Hitchins (2011). "Methylation of the 3p22 region encompassing MLH1 is representative of the CpG island methylator phenotype in colorectal cancer." *Mod Pathol* 24(3): 396-411.
- Woods, M. O., A. J. Hyde, F. K. Curtis, S. Stuckless, J. S. Green, A. F. Pollett, J. D. Robb, R. C. Green, M. E. Croitoru, A. Careen, J. A. Chaulk, J. Jegathesan, J. R. McLaughlin, S. S. Gallinger, H. B. Younghusband, B. V. Bapat and P. S. Parfrey (2005). "High frequency of hereditary colorectal cancer in Newfoundland likely involves novel susceptibility genes." *Clin Cancer Res* 11(19 Pt 1): 6853-61.
- Wu, D., H. Yu, J. Sun, J. Qi, Q. Liu, R. Li, S. L. Zheng, J. Xu and J. Kang (2015). "Association of genetic

polymorphisms in the telomerase reverse transcriptase gene with prostate cancer aggressiveness." *Mol Med Rep* 12(1): 489-97.

# X

Xiao, H., C. Lasser, G. V. Shelke, J. Wang, M. Radinger, T. R. Lunavat, C. Malmhall, L. H. Lin, J. Li, L. Li and J. Lotvall (2014). "Mast cell exosomes promote lung adenocarcinoma cell proliferation - role of KIT-stem cell factor signaling." *Cell Commun Signal* 12: 64.

Xue, W., R. A. Irvine, M. C. Yu, R. K. Ross, G. A. Coetzee and S. A. Ingles (2000). "Susceptibility to prostate cancer: interaction between genotypes at the androgen receptor and prostate-specific antigen loci." *Cancer Res* 60(4): 839-41.

# Y

Yamaguchi, S., H. Ogata, D. Katsumata, M. Nakajima, T. Fujii, S. Tsutsumi, T. Asao, K. Sasaki, H. Kuwano and H. Kato (2014). "MUTYH-associated colorectal cancer and adenomatous polyposis." *Surg Today* 44(4): 593-600.

Yamaguchi, T., Y. Furukawa, Y. Nakamura, N. Matsubara, H. Ishikawa, M. Arai, N. Tomita, K. Tamura, K. Sugano, C. Ishioka, T. Yoshida, Y. Moriya, H. Ishida, T. Watanabe and K. Sugihara (2015). "Comparison of clinical features between suspected familial colorectal cancer type X and Lynch syndrome in Japanese patients with colorectal cancer: a cross-sectional study conducted by the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum." *Jpn J Clin Oncol* 45(2): 153-9.

Yang, A. S., M. R. Estecio, K. Doshi, Y. Kondo, E. H. Tajara and J. P. Issa (2004). "A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements." *Nucleic Acids Res* 32(3): e38.

Yang, X., B. Yang, B. Li and Y. Liu (2013a). "Association between TERT-CLPTM1L rs401681[C] allele and NMSC cancer risk: a meta-analysis including 45,184 subjects." *Arch Dermatol Res* 305(1): 49-52.

Yang, B., L. Cao, B. Liu, C. D. McCaig and J. Pu (2013b). "The transition from proliferation to differentiation in colorectal cancer is regulated by the calcium activated chloride channel A1." *PLoS One* 8(4): e60861.

Yang, B., L. Cao, J. Liu, Y. Xu, G. Milne, W. Chan, S. D. Heys, C. D. McCaig and J. Pu (2015). "Low expression of chloride channel accessory 1 predicts a poor prognosis in colorectal cancer." *Cancer*.

Yin, S., F. Ding and N. V. Dokholyan (2007). "Eris: an automated estimator of protein stability." *Nat Methods* 4(6): 466-7.

Yoshida, R., K. Miyashita, M. Inoue, A. Shimamoto, Z. Yan, A. Egashira, E. Oki, Y. Kakeji, S. Oda and Y. Maehara (2011). "Concurrent genetic alterations in DNA polymerase proofreading and mismatch repair in human colorectal cancer." *Eur J Hum Genet* 19(3): 320-5.

# Z

- Zanke, B. W., C. M. Greenwood, J. Rangrej, R. Kustra, A. Tenesa, S. M. Farrington, J. Prendergast, S. Olschwang, T. Chiang, E. Crowdy, V. Ferretti, P. Laflamme, S. Sundararajan, S. Roumy, J. F. Olivier, F. Robidoux, R. Sladek, A. Montpetit, P. Campbell, S. Bezieau, A. M. O'Shea, G. Zogopoulos, M. Cotterchio, P. Newcomb, J. McLaughlin, B. Younghusband, R. Green, J. Green, M. E. Porteous, H. Campbell, H. Blanche, M. Sahbatou, E. Tubacher, C. Bonaiti-Pellie, B. Buecher, E. Riboli, S. Kury, S. J. Chanock, J. Potter, G. Thomas, S. Gallinger, T. J. Hudson and M. G. Dunlop (2007). "Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on chromosome 8q24." *Nat Genet* 39(8): 989-94.
- Zecevic, M., C. I. Amos, X. Gu, I. M. Campos, J. S. Jones, P. M. Lynch, M. A. Rodriguez-Bigas and M. L. Frazier (2006). "IGF1 gene polymorphism and risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer." *J Natl Cancer Inst* 98(2): 139-43.
- Zee, R. Y., A. J. Castonguay, N. S. Barton and J. E. Buring (2009). "Mean telomere length and risk of incident colorectal carcinoma: a prospective, nested case-control approach." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18(8): 2280-2.
- Zhang, B., W. H. Jia, K. Matsuo, A. Shin, Y. B. Xiang, K. Matsuda, S. H. Jee, D. H. Kim, P. Y. Cheah, Z. Ren, Q. Cai, J. Long, J. Shi, W. Wen, G. Yang, B. T. Ji, Z. Z. Pan, F. Matsuda, Y. T. Gao, J. H. Oh, Y. O. Ahn, M. Kubo, L. F. Thean, E. J. Park, H. L. Li, J. W. Park, J. Jo, J. Y. Jeong, S. Hosono, Y. Nakamura, X. O. Shu, Y. X. Zeng and W. Zheng (2014). "Genome-wide association study identifies a new SMAD7 risk variant associated with colorectal cancer risk in East Asians." *Int J Cancer* 135(4): 948-55.
- Zogopoulos, G., C. Jorgensen, J. Bacani, A. Montpetit, P. Lepage, V. Ferretti, L. Chad, S. Selvarajah, B. Zanke, T. J. Hudson, T. Pawson and S. Gallinger (2008). "Germline EPHB2 receptor variants in familial colorectal cancer." *PLoS One* 3(8): e2885.



**ANEXOS**

---





# **ANEXO 1:**

# **Otras publicaciones**

---



## **ARTÍCULO ANEXO 1**

### **Telomere length and genetic anticipation in Lynch syndrome**

Nuria Seguí, Marta Pineda, Elisabet Guinó, Ester Borràs, Matilde Navarro, **Fernando Bellido**, Victor Moreno, Conxi Lázaro, Ignacio Blanco, Gabriel Capellá, Laura Valle.

PLoS One 23;8(4):e61286; 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0061286.

#### **Resumen:**

La presencia de variaciones en la longitud telomérica ha sido asociada con incrementos de riesgo a desarrollar diferentes tipos de tumores. Por otro lado, el acortamiento telomérico se ha relacionado con la anticipación genética en cierto número de enfermedades hereditarias, incluyendo síndromes de cáncer hereditario. Ningún estudio concluyente ha sido realizado para el síndrome de Lynch (SL), un síndrome de cáncer colorrectal causado por fallos germinales en el sistema reparador de bases desapareadas. En el presente estudio realizamos la evaluación de la longitud telomérica en el SL como factor de riesgo y como potencial mecanismo asociado a la anticipación en la aparición de cáncer observado en generaciones sucesivas en algunas familias con síndrome de Lynch. La longitud telomérica leucocítica fue medida en 244 afectos de SL pertenecientes a 96 familias y en 234 controles utilizando un método de PCR monocroma cuantitativa multiplex. Los pacientes con SL afectos de cáncer mostraron telómeros significativamente más cortos y un acortamiento telomérico acelerado con la edad respecto a los individuos con SL sin cáncer. La anticipación en el edad de aparición de cáncer observada en generaciones sucesivas no fue asociada con el acortamiento telomérico, aunque llamó la atención que todas las parejas madre-hijo con anticipación genética presentaron acortamiento telomérico. En conclusión, los afectos de cáncer con SL presentan longitudes y dinámica telomérica diferente. Sin embargo, el fenómeno de anticipación en la edad de aparición de cáncer no pudo ser explicado en base al acortamiento telomérico. Quedando pendiente de su estudio en mayor profundidad, nuestros resultados sugieren que el acortamiento telomérico podría explicar este fenómeno en función del sexo del padre transmisor de la mutación asociada al SL a la siguiente generación afectada.



# Telomere Length and Genetic Anticipation in Lynch Syndrome

Nuria Seguí<sup>1</sup>, Marta Pineda<sup>1</sup>, Elisabet Guinó<sup>2</sup>, Ester Borràs<sup>1</sup>, Matilde Navarro<sup>1</sup>, Fernando Bellido<sup>1</sup>, Victor Moreno<sup>2,3</sup>, Conxi Lázaro<sup>1</sup>, Ignacio Blanco<sup>1</sup>, Gabriel Capellá<sup>1</sup>, Laura Valle<sup>1\*</sup>

**1** Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, **2** Unit of Biomarkers and Susceptibility, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL and CIBERESP, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, **3** Department of Clinical Sciences, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

## Abstract

Telomere length variation has been associated with increased risk of several types of tumors, and telomere shortening, with genetic anticipation in a number of genetic diseases including hereditary cancer syndromes. No conclusive studies have been performed for Lynch syndrome, a hereditary colorectal cancer syndrome caused by germline mutations in the DNA mismatch repair genes. Here we evaluate telomere length in Lynch syndrome, both as a cancer risk factor and as a mechanism associated with anticipation in the age of cancer onset observed in successive generations of Lynch syndrome families. Leukocyte telomere length was measured in 244 mismatch repair gene mutation carriers from 96 Lynch syndrome families and in 234 controls using a monochrome multiplex quantitative PCR method. Cancer-affected mutation carriers showed significantly shorter telomeres than cancer-free mutation carriers. In addition, cancer-affected carriers showed the most pronounced shortening of telomere length with age, compared with unaffected carriers. The anticipation in the age of cancer onset observed in successive generations was not associated with telomere shortening, although, interestingly, all mother-son pairs showed telomere shortening. In conclusion, cancer-affected mismatch repair gene mutation carriers have distinct telomere-length pattern and dynamics. However, anticipation in the age of onset is not explained by telomere shortening. Pending further study, our findings suggest that telomere attrition might explain the previously reported dependence of cancer risk on the parent-of-origin of mismatch repair gene mutations.

**Citation:** Seguí N, Pineda M, Guinó E, Borràs E, Navarro M, et al. (2013) Telomere Length and Genetic Anticipation in Lynch Syndrome. PLoS ONE 8(4): e61286. doi:10.1371/journal.pone.0061286

**Editor:** Paolo Peterlongo, IFOM, Fondazione Istituto FIRC di Oncologia Molecolare, Italy

**Received:** January 15, 2013; **Accepted:** March 8, 2013; **Published:** April 23, 2013

**Copyright:** © 2013 Seguí et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was funded by the Spanish Ministry of Economy (State Secretariat for Research, Development and Innovation) (BFU2009-10281), Carlos III Health Institute (FIS PI08/1635, FIS PI08/1359 and RETIC RD06/0020/1050 and RD06/0020/1051), the Scientific Foundation Asociación Española Contra el Cáncer, the Catalan Government (2009SGR290), and CIBERESP (CB07/02/2005). Nuria Seguí is supported by a fellowship from the Carlos III Health Institute and Laura Valle holds a contract "Ramón y Cajal". The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: lvalle@iconcologia.net

## Introduction

Lynch syndrome (LS) (MIM 120435) is the most common hereditary syndrome that predisposes to colorectal cancer (CRC) and other extracolonic tumors, accounting for 2%–5% of the total burden of CRC. It is caused by germline mutations in the DNA mismatch repair (*MMR*) genes *MLH1* (MIM 120436), *MSH2* (MIM 609309), *MSH6* (MIM 600678) and *PMS2* (MIM 600259), as well as in *EPCAM* (MIM 185535). There is large phenotypic variation in the age of onset among and within families [1,2]. Progressively earlier age of cancer onset in successive generations has been reported [3–10]. However, the underlying molecular mechanisms of both the overall phenotypic variation and the anticipation in the age of onset are still unknown.

Telomere shortening has gained considerable interest as a potential biomarker of cancer risk and as a mechanism associated with genetic anticipation. Moreover, we have recently shown that a common genetic variant located in the telomerase gene (*hTERT*; MIM 187270) increases cancer risk in LS patients at early ages, and that this SNP is associated with shortened telomere length in cancer-affected *MMR* gene mutation carriers [11]. Telomeres consist of multiple short repeats (TTTAGG) at the ends of

chromosomes and protect them against large-scale genomic rearrangements. In most somatic cells, telomeres shorten with each replication cycle, eventually leading to cellular senescence or apoptosis. Interestingly, telomere length anomaly appears to be one of the earliest and most prevalent genetic alterations in the process of malignant transformation [12,13]. Given the proposed role of telomere shortening in early processes of carcinogenesis, attention has been directed to its potential role as a cancer risk biomarker. With this purpose, a number of retrospective and prospective observational studies have been conducted, although results are inconsistent among studies and tumor types [14–16]. With respect to CRC, despite the conflicting results obtained in retrospective studies, prospective studies have not found a convincing association between leukocyte telomere length and CRC risk [16–18].

Telomere length attrition has also been proposed as a mechanism of anticipation in different inherited diseases, being associated with early onset and/or severity of disease in genetic disorders such as dyskeratosis congenita [19–21], Li-Fraumeni [22,23], and familial breast and ovarian cancer [24,25].

Here we aim to elucidate the role of telomere length in LS-associated cancer risk and to study its implication in anticipation in the age of onset observed in successive generations of LS families.

## Materials and Methods

### Ethics statement

Written informed consent was obtained from all subjects. The study received the approval of the IDIBELL Ethics Committee (ref. PR221/09).

### Study participants

A total of 388 individuals, 244 *MMR* gene mutation carriers and 144 non-carriers, from 96 LS families were included in the study. They were assessed through the Hereditary Cancer Program at the Catalan Institute of Oncology, ICO-IDIBELL, from 1998 to 2012. *MMR* gene mutation analysis was performed on genomic DNA extracted from peripheral blood. Large genomic alterations in the genes were studied using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) (SALSA MLPA Kits, MRC-Holland, The Netherlands). Mutation screening was carried out by direct sequencing after PCR amplification (primers and conditions available upon request). Ninety cancer-free individuals were included as controls. All individuals are of Caucasian origin. Informed consent was obtained from all subjects, although data were analyzed anonymously. Table 1 shows a summary of the genetic and clinical characteristics of the groups studied.

Cases and controls were recruited from the same homogeneous population, and storage and DNA extraction from peripheral blood were performed at the same facility and using the same extraction methods. We have observed that blood DNA samples from different sources (i.e., extracted at different laboratories, using different extraction methods, etc.) show large non-genetic variation in telomere length (data not shown). Thus, only samples (cases and controls) that underwent the exact same DNA extraction protocol (Flexigene DNA kit, Qiagen, Hilden, Germany) performed by the personnel of the Unit of Molecular Diagnostics of the Hereditary Cancer Program at ICO-IDIBELL,

and that were stored under the same conditions, were included in the study, as recommended by Prescott et al. for retrospective studies [16].

### Telomere length assessment

Telomere length quantification was performed using the monochrome multiplex quantitative PCR method described by Cawthon et al. [26], which has been found to provide greater consistency than other methods used to measure telomere length [17]. The assays were performed using the Quantifast SybrGreen PCR Master Mix (Qiagen, Hamburg, Germany), beta-globin as single copy gene, and the LightCycler 480 real-time PCR detection system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). All samples were assayed in triplicate. A standard curve with 7 concentrations spanning an 81-fold range (60 ng, 40 ng, 20 ng, 6.7 ng, 4 ng, 2.2 ng and 0.74 ng), also in triplicate, of an anonymous standard DNA (healthy and cancer-free 45 year-old individual) was included in every 384-well plate. Good replicates of the standard curves (for telomeres (T) and single copy gene (S)) and subsequent fitted linear regression lines were obtained among plates. Whenever possible, equal numbers of samples from different clinical groups were run in each 384-well plate. The relative telomere length (RTL) value for each sample was calculated according to the standard lines (for T and S) of the corresponding plate. Therefore, the value obtained was relative to the value of the anonymous standard DNA in the same plate (inter-run calibration). The average telomere length of each sample is expected to be proportional to its RTL.

### Statistical analyses

Shortening of telomere length is observed with increasing age in cancer-free individuals [27]. In our control set (controls plus non-carriers,  $n=234$ ), RTL was inversely correlated with age (Pearson's correlation  $r=-0.187$ ;  $p=0.004$ ). As previously described, RTL measurements were adjusted for age using the line of best fit for controls [25]. Thus, the difference between the observed and the predicted value was calculated for each sample and is represented as "age-adjusted RTL". There were no

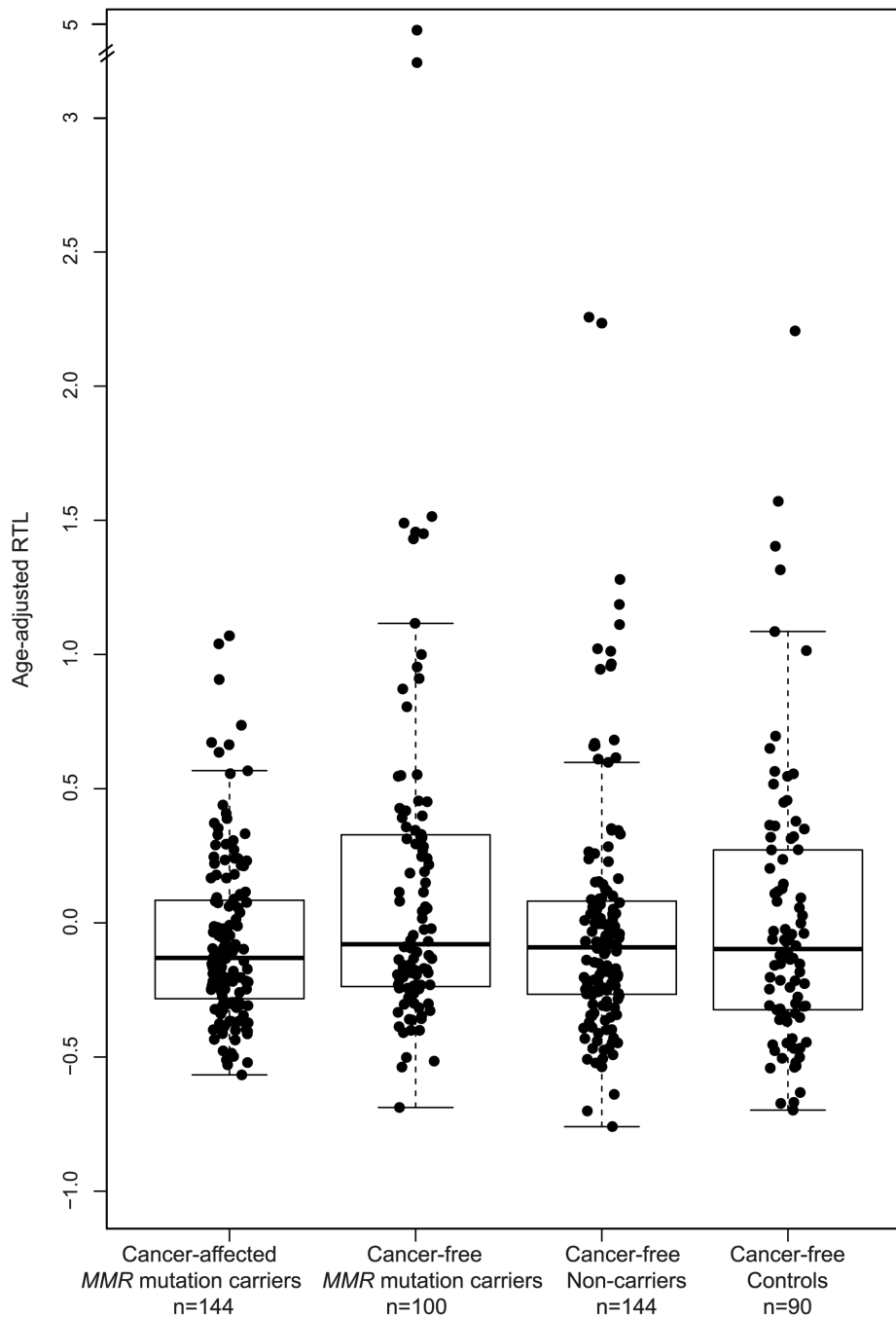
**Table 1.** Genetic and clinical characteristics of the studied groups.

	Lynch syndrome families (n = 96)		Controls (n = 234)	
	<i>MMR</i> gene mutation carriers (244)		Non-carriers	Unrelated controls
	*Cancer	Cancer-free		
N	144	100	144	90
<i>MMR</i> gene mutated: n (%)	<i>MLH1</i> : 87 (60.4)	<i>MLH1</i> : 62 (62.0)	-	-
	<i>MSH2</i> : 42 (29.2)	<i>MSH2</i> : 29 (29.0)	-	-
	<i>MSH6</i> : 9 (6.3)	<i>MSH6</i> : 9 (9.0)	-	-
	<i>PMS2</i> : 5 (3.5)	<i>PMS2</i> : 0	-	-
	<i>EpCAM</i> : 1 (0.7)	<i>EpCAM</i> : 0	-	-
Median age at blood draw ( $\pm$ SD)	51.5 ( $\pm$ 13.4)	35.0 ( $\pm$ 11.5)	42.0 ( $\pm$ 14.9)	41.5 ( $\pm$ 15.1)
Sex: n (%)	M: 74 (51.4)	M: 40 (40.0)	M: 64 (44.4)	M: 28 (31.1)
	F: 70 (48.6)	F: 60 (60.0)	F: 80 (55.6)	F: 62 (68.9)
Median age at cancer diagnosis ( $\pm$ SD)	43.0 ( $\pm$ 12.9)			

N: number of subjects; SD: standard deviation; M: male; F: female.

\*Cancer: Individual affected with a LS-associated cancer: CRC and/or cancer of the endometrium, ovary, stomach, small bowel, hepatobiliary tract, pancreas, upper uro-epithelial tract or brain.

doi:10.1371/journal.pone.0061286.t001



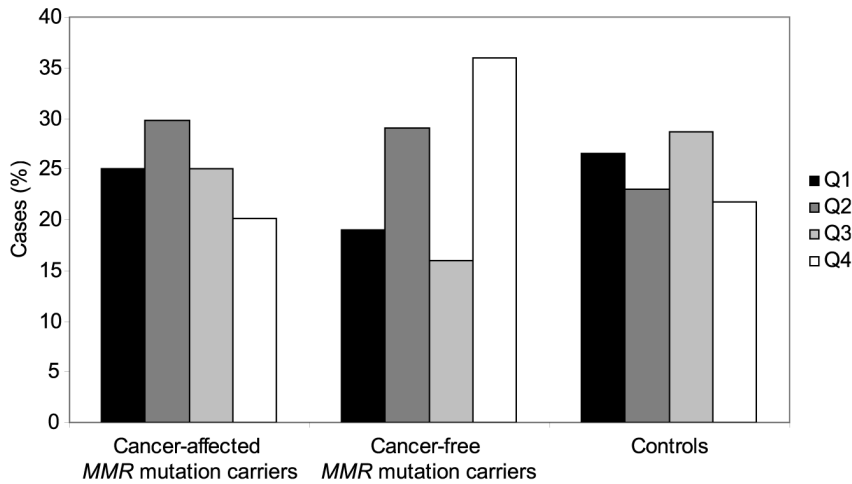
**Figure 1. Age-adjusted relative telomere length.** In subjects belonging to LS families: *MMR* gene mutation carriers affected with cancer (median:  $-0.131$ ), *MMR* gene mutation carriers with no diagnosed cancer (median:  $-0.079$ ) and cancer-free non-carriers (median:  $-0.091$ ); and in cancer-free controls (median:  $-0.097$ ). The boxes represent the interquartile range of distributions (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles); the horizontal lines within the boxes, the medians; and the vertical lines, the 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles. doi:10.1371/journal.pone.0061286.g001

telomere length differences between sexes (data not shown); therefore, sex was not included as a confounding factor in the statistical tests.

Differences in age-adjusted telomere lengths were analyzed using the Wilcoxon rank sum test (Mann-Whitney U). Pearson's test was used to assess the correlation between telomere length and age (telomere length dynamics). To measure the significance of the difference between two correlation coefficients (Pearson's  $r$ ),

Fisher's  $r$ -to- $z$  transformation was performed. Anticipation was represented by Kaplan-Meier curves and the differences between survival curves were studied using a log-rank test. Proportions were compared by Fisher's exact test (expected cell count  $<5$ ) or Chi-square. All tests were two-sided and  $p$ -values below 0.05 were considered statistically significant. The analyses were performed using R.





**Figure 2. Distribution of cancer-affected and cancer-free *MMR* gene mutation cases and controls by quartiles of age-adjusted telomere length.**

doi:10.1371/journal.pone.0061286.g002

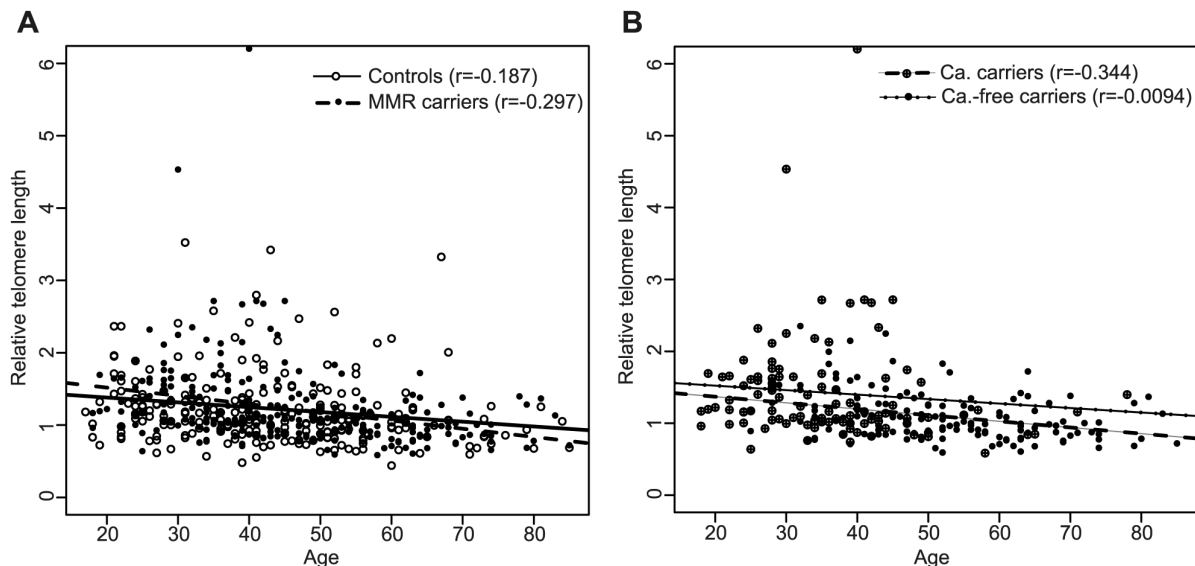
## Results

### Telomere length and shortening dynamics

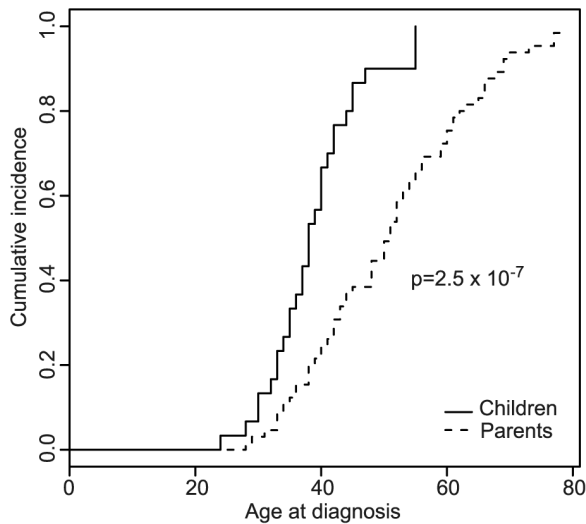
Relative telomere length was assessed in 244 *MMR* gene mutation carriers, both cancer-affected ( $n = 144$ ) and unaffected ( $n = 100$ ), and in 234 controls, including non-carriers from the same LS families ( $n = 144$ ) and unrelated cancer-free controls ( $n = 90$ ) (Figure 1). Relative telomere length values were adjusted for age as indicated in the Materials and Methods section (see statistical analyses). We found that among mutation carriers, cancer cases had significantly shorter age-adjusted telomeres than unaffected individuals ( $p = 0.032$ ). It is worth noting that unaffected mutation carriers have longer telomeres than unaffected controls: a significant increase of the fourth quartile (longest telomeres) is observed in cancer-free *MMR* mutation carriers

(36.0%) compared with controls (21.8%;  $p = 0.010$ ) and cancer-affected carriers (20.1%;  $p = 0.009$ ) (Figure 2).

As expected, the negative slope of the linear regression line that best fit the RTL data for the controls indicated that telomere length shortened with age (Pearson's correlation coefficient  $r = -0.187$ ;  $p = 0.004$ ); the same was observed for the *MMR* gene mutation carriers ( $r = -0.297$ ;  $p = 2.37 \times 10^{-6}$ ). No differences were observed between both groups ( $p = 0.204$ ) (Figure 3A). Among *MMR* gene mutation carriers, cancer-affected individuals showed faster telomere attrition with age ( $r = -0.344$ ;  $p = 2.4 \times 10^{-5}$ ) than cancer-free carriers ( $r = -0.094$ ;  $p = 0.351$ ) (for the difference,  $p = 0.045$ ) (Figure 3B). No differences were observed between *MSH2* ( $r = -0.446$ ;  $p = 0.003$ ) and *MLH1* ( $r = -0.318$ ;  $p = 0.003$ ) mutation carriers (for the difference,  $p = 0.435$ ).



**Figure 3. Correlation of relative telomere length (RTL) with age at blood draw.** (A) RTL distribution as a function of age for controls ( $n = 234$ ; white circles) and all *MMR* gene mutation carriers ( $n = 244$ ; black circles). (B) RTL distribution as a function of age for cancer-affected *MMR* gene mutation carriers ( $n = 144$ ; black circles) and cancer-free *MMR* gene mutation carriers ( $n = 100$ ; crossed circles).  $r$ : Pearson's correlation coefficient. doi:10.1371/journal.pone.0061286.g003

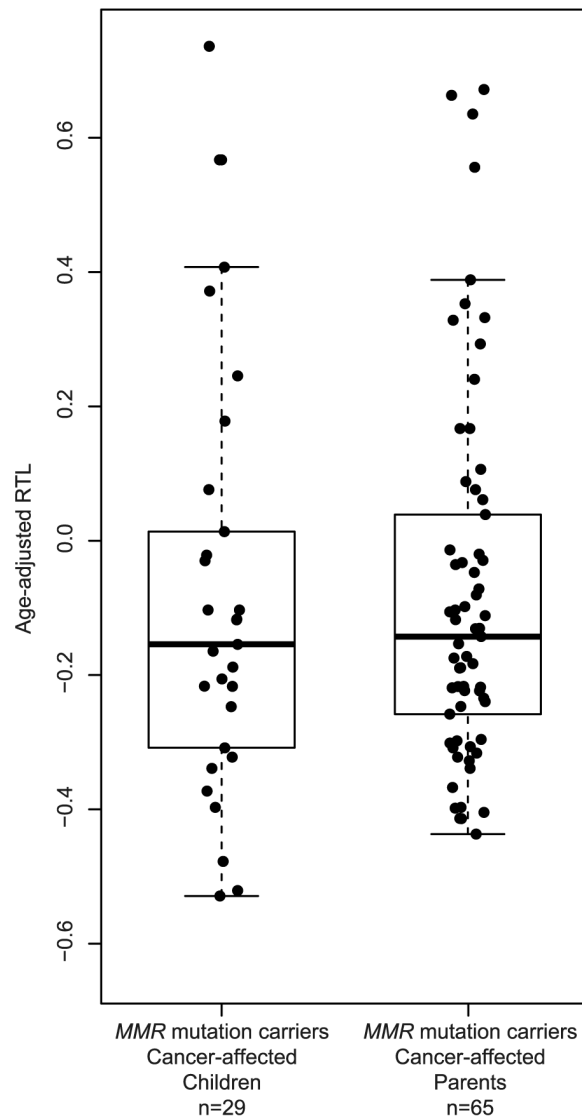


**Figure 4. Anticipation in age of cancer onset in LS families.** Kaplan-Meier curves and associated p-values showing the differences in age of cancer onset between parents and children, all of them cancer-affected *MMR* gene mutation carriers. doi:10.1371/journal.pone.0061286.g004

**Telomere length and anticipation in the age of cancer onset**

The occurrence of age anticipation in cancer-affected mutation carriers was analyzed in 59 LS families, harbouring *MLH1* (32 families), *MSH2* (20 families) and *MSH6* (7 families) mutations. The distribution of age at cancer diagnosis in parents and children showed a consistent shift to early ages in children ( $p = 2.5 \times 10^{-7}$ ) (Figure 4). On average, cancer was diagnosed 12 years earlier in children (Table 2). Five out of 65 parents and 3 out of 30 children had been diagnosed with cancer (1<sup>st</sup> LS-related cancer diagnosed) during the follow-up period or clinical surveillance of mutation carriers. Their exclusion from the analysis did not alter the results (data not shown). The information available from polyp removal and surveillance time across generations was incomplete and was not included in the study.

The relationship between telomere length and anticipation in LS was next investigated. No differences between parents and children were observed in cancer-affected *MMR* gene mutation carriers ( $p = 0.867$ ) (Figure 5). Similarly, no association was found when *MLH1* and *MSH2* gene mutation cases were analyzed



**Figure 5. Changes in age-adjusted RTL between parents and children.** Box plots representing age-adjusted RTL distributions in cancer-affected parents and children with *MMR* gene mutations. The boxes represent the interquartile range of distributions (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles); the horizontal lines within the boxes, the medians; and the vertical lines, the 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles. doi:10.1371/journal.pone.0061286.g005

**Table 2. Differences in average age of onset of cancer (1<sup>st</sup> LS-related tumor diagnosed) between parents and children with Lynch syndrome.**

	Parents			Children			Mean age difference	t-statistic	p-value		
	N	Age of onset		N	Age of onset						
		Median	Mean		SD	Median				Mean	SD
All	65	51.0	50.9	12.8	30	38.0	38.9	7.6	12.0	4.74	$7.5 \times 10^{-6}$
<i>MLH1</i>	36	50.5	50.9	11.7	20	38.0	38.0	6.8	12.9	4.53	$3.3 \times 10^{-5}$
<i>MSH2</i>	21	53.0	51.4	15.4	7	37.0	41.4	10.4	10	1.59	0.124
<i>MSH6</i>	8	44.0	49.6	11.5	2	37.5	37.5	6.4	12.1	1.40	0.200

N: number of subjects; SD: standard deviation. doi:10.1371/journal.pone.0061286.t002

**Table 3.** Age-adjusted RTL and anticipation in age at cancer diagnosis in parent-child pairs.

Family	MMR gene	PARENT			CHILD			Age-adjusted RTL	**Tel <sub>child</sub> <Tel <sub>parent</sub>	
		Tumor	*Age	Sex	Age-adjusted RTL	Tumor	*Age			Sex
<i>Cancer-affected carriers</i>										
Fam-1	MSH2	CRC	73	F	-0.172	CRC	45	M	-0.216	yes
Fam-2	MSH2	EC	78	F	0.167	CRC	55	F	-0.339	yes
Fam-2	MSH2	CRC	55	F	-0.339	CRC	33	F	-0.188	no
Fam-2	MSH2	EC	78	F	0.167	CRC	55	F	-0.217	yes
Fam-3	MSH2	CRC	60	F	-0.098	CRC	35	F	0.407	no
Fam-4	MLH1	CRC	53	F	-0.143	CRC	40 (in surv)	F	0.372	no
Fam-4	MLH1	CRC	53	F	-0.143	CRC	32	M	-0.521	yes
Fam-5	MLH1	CRC	48	M	0.328	CRC	35	M	0.567	no
Fam-6	MLH1	CRC	52	F	0.635	CRC	34	F	0.736	no
Fam-7	MLH1	CRC	50	F	0.388	CRC	55 (in surv)	F	-0.103	yes
Fam-8	MLH1	CRC	51	M	-0.240	CRC	28	F	-0.022	no
Fam-9	MLH1	CRC	51	M	0.332	CRC	45	F	0.178	yes
Fam-10	MLH1	CRC	33	M	-0.398	CRC	24	F	-0.154	no
Fam-11	MLH1	CRC	69 (in surv)	M	-0.298	CRC	37	F	-0.206	no
Fam-11	MLH1	CRC	69 (in surv)	M	-0.298	CRC	41 (in surv)	F	-0.247	no
Fam-12	MLH1	CRC	66	F	-0.014	CRC	47	M	-0.373	yes
Fam-12	MLH1	CRC	66	F	-0.014	CRC	39	M	-0.322	yes
Fam-12	MLH1	CRC	66	F	-0.014	CRC	40	M	-0.103	yes
Fam-13	MLH1	CRC	60	F	-0.081	CRC	38	F	-0.030	no
Fam-14	MLH1	CRC	77	F	-0.235	CRC	38	F	-0.076	no
Fam-15	MSH6	UC	69	M	-0.032	CRC	33	M	-0.478	yes
<i>Cancer-free carriers</i>										
Fam-16	MLH1	-	48	M	-0.347	-	24	M	-0.327	no
Fam-16	MLH1	-	48	M	-0.347	-	25	F	-0.688	yes
Fam-17	MLH1	-	47	M	-0.121	-	27	F	-0.387	yes
Fam-18	MLH1	-	64	F	-0.244	-	36	M	-0.095	no
Fam-18	MLH1	-	64	F	-0.244	-	39	M	-0.134	no
Fam-19	MLH1	-	45	F	0.048	-	18	M	-0.202	yes
Fam-20	MLH1	-	78	M	0.399	-	37	F	-0.186	yes
Fam-21	MSH2	-	47	F	0.552	-	22	M	-0.021	yes
Fam-22	MSH6	-	65	F	-0.230	-	30	M	-0.300	yes
<i>***Cancer-free non-carriers</i>										
Fam-23	-	-	71	F	-0.336	-	45	M	0.000	no
Fam-20	-	-	74	F	-0.284	-	50	M	-0.181	no
Fam-24	-	-	85	F	-0.268	-	53	F	-0.432	yes

MMR: DNA mismatch repair; RTL: relative telomere length; CRC: colorectal cancer; EC: endometrial cancer; UC: urinary tract cancer; M: male; F: female; in surv: cancer diagnosed as a consequence of extensive clinical surveillance of LS families.

\*Age: Age at cancer diagnosis for cancer-affected carriers, and age at blood draw for cancer-free carriers and non-carriers

\*\*Tel<sub>child</sub><Tel<sub>parent</sub>, age-adjusted telomere length is shorter in the child than in the parent. "Yes" indicates that age-adjusted RTL is smaller in the child than in the parent, therefore indicating association with anticipation when cancer-affected carriers are studied.

\*\*\*Cancer-free non-carriers are individuals who belong to Lynch syndrome families but do not carry the pathogenic MMR gene mutation.

doi:10.1371/journal.pone.0061286.t003

separately (Figure S1). Next, we compared changes in telomere length in individual parent-child pairs (Table 3). In all instances, the child was diagnosed with cancer at an earlier age than the corresponding LS parent. Children showed shorter telomeres than their parents in 10 out of 21 (47.6%) cancer-affected carrier pairs, in 6 out of 9 (66.7%) cancer-free carrier pairs, and in 1 out of 3

(33.3%) cancer-free non-carriers evaluated, although these differences were not statistically significant ( $p = 0.562$ ).

Anticipation was associated with shorter telomeres in all (5/5) mother-son cancer-affected MMR gene mutation carriers, whereas this association was only observed in 31% (5/16) of the other cancer-affected carrier pair combinations ( $p = 0.012$ ) (Table 3).

## Discussion

In this study we found that cancer-affected *MMR* gene mutation carriers have shorter telomeres and faster telomere attrition rates (accelerated telomere shortening with age) than unaffected mutation carriers and controls, and that telomere shortening is not associated with anticipation in the age of cancer onset in successive generations.

In line of recent retrospective and prospective studies on sporadic CRC risk and leukocyte telomere length, it has been suggested that the shorter telomere length observed in retrospectively collected samples from CRC patients is not a cancer risk factor, but rather a consequence of the disease (from treatment or disease burden) [16,17]. However, a recent prospective study has shown that both extremely long and extremely short telomeres increase CRC risk [18]. In hereditary cases, we observe shorter telomeres in cancer-affected *MMR* gene mutation carriers than in cancer-free carriers, suggesting either that the shortened telomeres are a result of the disease, or that shorter telomere length is an additional risk factor for LS patients, i.e. a risk modifier. This is supported by our recent observation that a variant in the telomerase gene, *hTERT*, increases cancer risk in young LS patients (<45 years of age), as it is associated with shortened telomeres in cancer-affected *MMR* gene mutation carriers [11]. Further studies assessing telomere length before and after cancer diagnosis in CRC patients will provide a definitive answer regarding the suggested effect of cancer on telomere length in blood cells. Unfortunately, samples from sporadic CRC cases that underwent the same DNA extraction and storage than the hereditary cases and controls herein studied were not available, precluding a direct comparison. This study will be critical to clarify whether telomere shortening is specific to cancer-affected LS patients or if it occurs in all CRC-affected patients.

Our data show longer telomeres in cancer-free *MMR* gene mutation carriers compared to cancer-free controls. A plausible explanation for this observation, and consistent with the fact that short telomeres act as factors of increased cancer risk, is that longer telomeres protect *MMR* gene mutation carriers from developing cancer. On the other hand, Jones et al. proposed that certain genetic factors that increase CRC risk may cause longer telomeres [17]. Alternatively, and in line with this model, our results might suggest that *MMR* haploinsufficiency, as a genetic factor of CRC risk, can exert a lengthening effect on the telomeres. Additional studies to assess the effect of *MMR* haploinsufficiency on telomere lengthening are needed to validate this hypothesis.

We also observed that leukocyte telomere dynamics differ between cancer-free mutation carriers and cancer-affected carriers, the latter group showing faster telomere shortening with age. Bozzao et al. found that affected carriers showed accelerated attrition rate compared to controls [28]. Based on previously published data on *MMR*-deficiency and telomeres [29–33], they suggested that *MMR* haploinsufficiency in LS individuals may lead to tolerance of short telomeres, causing faster telomere shortening over the course of life. However, our results show that this increased shortening rate does not occur in cancer-free carriers, thus invalidating the hypothesis. Therefore, this effect may be either the result of telomere shortening in cancer-affected individuals, or a marker of increased cancer risk among *MMR* gene mutation carriers, supporting the idea that short telomere length or accelerated telomere attrition rate are factors of increased cancer risk in LS. Identifying the dynamics of leukocyte telomere length with age in sporadic cases from retrospective and prospective studies may resolve this question.

No association was found between the anticipation in the age of onset observed in successive generations and telomere length. For years, and despite the numerous reports identifying anticipation in LS, it was uncertain whether true genetic anticipation contributed to the early diagnosis age observed in LS. Recently, a Bayesian method that corrects for random effects, isolating the confounding effect of changes in secular trends, screening, and medical practices, and adjusting for changes in age-specific incidence across birth cohorts, confirmed the anticipation in the age of onset between successive generations of LS families [10]. Nevertheless, the molecular mechanism underlying this observation has not been yet identified. Due to the lack of information on surveillance time in parents and children, polyp removal, and other confounding factors, as well as the insufficient sample size for an accurate assessment of genetic anticipation, it is certain that the measurement obtained in our series (12 years) is clearly overestimated. Nevertheless, we accept the results of previous reports on this matter in which accurate statistical methodologies were used and anticipation was still confirmed [8–10], and our series was used to assess the involvement of telomere attrition in anticipation. Our data rule out the role of telomere shortening in anticipation in LS. As previously suggested, other molecular mechanisms such as the accumulation of mismatch repair slippage events through generations or other genetic or environmental factors might explain age anticipation in successive generations of LS families [34,35]. Considering the limitations of our study regarding sample size, and the inconclusive results obtained when studying telomere length in cancer patients, further studies on larger LS series should be performed to validate these results.

Van Vliet et al. recently suggested that CRC risk in carriers of *MMR* gene mutations depends on the parent-of-origin of the mutation. In particular, they suggested a maternally transmitted mechanism modifying cancer risk in male *MMR* gene mutation carriers [36]. Here we observe anticipation associated with shorter telomeres in all mother-son cancer-affected *MMR* gene mutation carriers, whereas the same association is only found in 31% of the other cancer-affected carrier pair combinations. Although the sample size of parent-child pairs is very limited, this observation might suggest that the maternally transmitted risk mechanism is shortened telomeres. Studies assessing whether telomere shortening occurs in the female germline, as recently demonstrated in other mammals [37], together with the analysis of larger samples of LS parent-child pairs, are required to verify this hypothesis.

In conclusion, our findings indicate that cancer-affected *MMR* gene mutation carriers show distinct features and dynamics of telomere length measured in blood DNA, to controls and unaffected mutation carriers. While we rule out telomere length attrition as the common cause of anticipation in LS, it may account for the dependence of cancer risk on the parent-of-origin of *MMR* gene mutations previously observed.

## Supporting Information

**Figure S1 Age-adjusted RTL distributions in cancer-affected parents and children with *MLH1* and *MSH2* gene mutations.** The boxes represent the interquartile range of distributions (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles); the horizontal lines within the boxes, the medians; and the vertical lines, the 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles. Pairwise comparisons using Wilcoxon rank sum test showed no differences in RTL distributions between cancer-affected parents and children with germline mutations in *MLH1* ( $p = 0.65$ ), and between parents and children with mutations in *MSH2* ( $p = 0.67$ ). (TIF)

## Acknowledgments

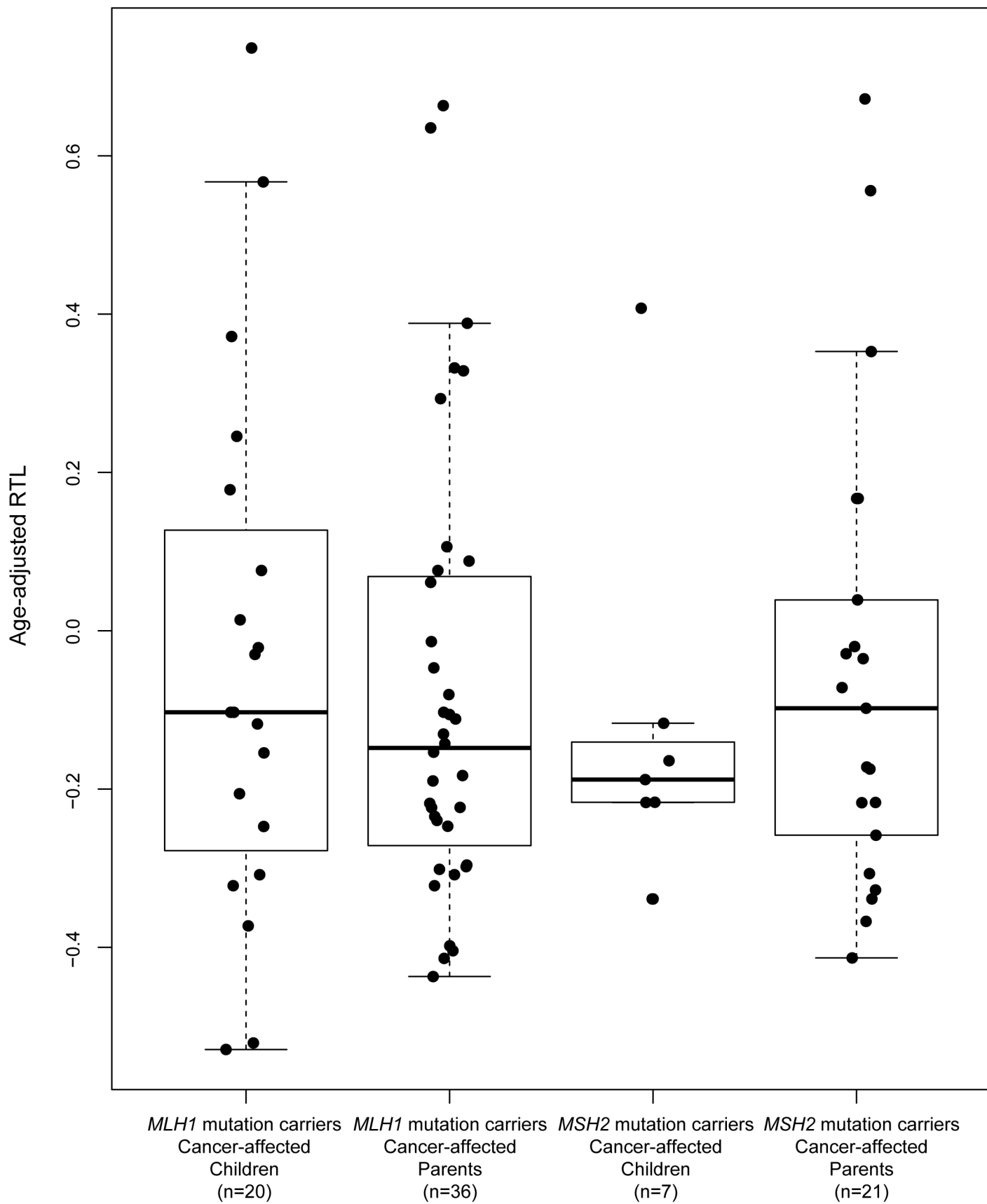
We thank all those responsible for genetic counselling and genetic testing as part of the ICO-IDIBELL Hereditary Cancer Program.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LV NS GC. Performed the experiments: NS LV FB. Analyzed the data: LV EG VM NS. Contributed reagents/materials/analysis tools: MP EG EB MN CL IB VM. Wrote the paper: LV. Revised the article critically for important intellectual content: GC IB MP VM MN NS EB EG CL FB. Final approval of the article: GC IB MP VM MN NS EB EG CL FB.

## References

- Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, et al. (1993) Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 104: 1535–1549.
- Scott RJ, McPhillips M, Meldrum CJ, Fitzgerald PE, Adams K, et al. (2001) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in 95 families: differences and similarities between mutation-positive and mutation-negative kindreds. *Am J Hum Genet* 68: 118–127.
- Vasen HF, Taal BG, Griffioen G, Nagengast FM, Cats A, et al. (1994) Clinical heterogeneity of familial colorectal cancer and its influence on screening protocols. *Gut* 35: 1262–1266.
- Rodriguez-Bigas MA, Lee PH, O'Malley L, Weber TK, Suh O, et al. (1996) Establishment of a hereditary nonpolyposis colorectal cancer registry. *Dis Colon Rectum* 39: 649–653.
- Westphalen AA, Russell AM, Buser M, Berthod CR, Hutter P, et al. (2005) Evidence for genetic anticipation in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Genet* 116: 461–465.
- Stella A, Surdo NC, Lastella P, Barana D, Oliani C, et al. (2007) Germline novel MSH2 deletions and a founder MSH2 deletion associated with anticipation effects in HNPCC. *Clin Genet* 71: 130–139.
- Nilbert M, Timshel S, Bernstein I, Larsen K (2009) Role for genetic anticipation in Lynch syndrome. *J Clin Oncol* 27: 360–364.
- Larsen K, Petersen J, Bernstein I, Nilbert M (2009) A parametric model for analyzing anticipation in genetically predisposed families. *Stat Appl Genet Mol Biol* 8: Article26.
- Boonstra PS, Gruber SB, Raymond VM, Huang SC, Timshel S, et al. (2010) A review of statistical methods for testing genetic anticipation: looking for an answer in Lynch syndrome. *Genet Epidemiol* 34: 756–768.
- Boonstra PS, Mukherjee B, Taylor JM, Nilbert M, Moreno V, et al. (2011) Bayesian modeling for genetic anticipation in presence of mutational heterogeneity: a case study in Lynch syndrome. *Biometrics* 67: 1627–1637.
- Bellido F, Guino E, Jagmohan-Changur S, Segui N, Pineda M, et al. (2012) Genetic variant in the telomerase gene modifies cancer risk in Lynch syndrome. *Eur J Hum Genet*.
- Londono-Vallejo JA (2004) Telomere length heterogeneity and chromosome instability. *Cancer Lett* 212: 135–144.
- Meeker AK, Hicks JL, Iacobuzio-Donahue CA, Montgomery EA, Westra WH, et al. (2004) Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 10: 3317–3326.
- Ma H, Zhou Z, Wei S, Liu Z, Pooley KA, et al. (2011) Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 6: e20466.
- Wentzensen IM, Mirabello L, Pfeiffer RM, Savage SA (2011) The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 20: 1238–1250.
- Prescott J, Wentzensen IM, Savage SA, De Vivo I (2012) Epidemiologic evidence for a role of telomere dysfunction in cancer etiology. *Mutat Res* 730: 75–84.
- Jones AM, Beggs AD, Carvajal-Carmona L, Farrington S, Tenesa A, et al. (2012) TERC polymorphisms are associated both with susceptibility to colorectal cancer and with longer telomeres. *Gut* 61: 248–254.
- Cui Y, Cai Q, Qu S, Chow WH, Wen W, et al. (2012) Association of Leukocyte Telomere Length with Colorectal Cancer Risk: Nested Case-Control Findings from the Shanghai Women's Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21: 1807–1813.
- Vulliamy T, Marrone A, Szydlo R, Walne A, Mason PJ, et al. (2004) Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. *Nat Genet* 36: 447–449.
- Marrone A, Walne A, Dokal I (2005) Dyskeratosis congenita: telomerase, telomeres and anticipation. *Curr Opin Genet Dev* 15: 249–257.
- Armanios M, Chen JL, Chang YP, Brodsky RA, Hawkins A, et al. (2005) Haploinsufficiency of telomerase reverse transcriptase leads to anticipation in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 15960–15964.
- Tabori U, Nanda S, Druker H, Lees J, Malkin D (2007) Younger age of cancer initiation is associated with shorter telomere length in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res* 67: 1415–1418.
- Trkova M, Prochazkova K, Krutilkova V, Sumerauer D, Sedlacek Z (2007) Telomere length in peripheral blood cells of germline TP53 mutation carriers is shorter than that of normal individuals of corresponding age. *Cancer* 110: 694–702.
- Gramatges MM, Telli ML, Balise R, Ford JM (2010) Longer relative telomere length in blood from women with sporadic and familial breast cancer compared with healthy controls. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19: 605–613.
- Martinez-Delgado B, Yanowsky K, Inglada-Perez L, Domingo S, Urioste M, et al. (2011) Genetic anticipation is associated with telomere shortening in hereditary breast cancer. *PLoS Genet* 7: e1002182.
- Cawthon RM (2009) Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res* 37: e21.
- Iwama H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Hayashi S, Yahata N, et al. (1998) Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Hum Genet* 102: 397–402.
- Bozzao C, Lastella P, Ponz de Leon M, Pedroni M, Di Gregorio C, et al. (2011) Analysis of telomere dynamics in peripheral blood cells from patients with Lynch syndrome. *Cancer* 117: 4325–4335.
- Pickett HA, Baird DM, Hoff-Olsen P, Meling GI, Rognum TO, et al. (2004) Telomere instability detected in sporadic colon cancers, some showing mutations in a mismatch repair gene. *Oncogene* 23: 3434–3443.
- Mendez-Bermudez A, Hills M, Pickett HA, Phan AT, Mergny JL, et al. (2009) Human telomeres that contain (CTAGGG)<sub>n</sub> repeats show replication dependent instability in somatic cells and the male germline. *Nucleic Acids Res* 37: 6225–6238.
- Martinez P, Siegl-Cachedenier I, Flores JM, Blasco MA (2009) MSH2 deficiency abolishes the anticancer and pro-aging activity of short telomeres. *Aging Cell* 8: 2–17.
- Rampazzo E, Bertorelle R, Serra L, Terrin L, Candiotti C, et al. (2010) Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers. *Br J Cancer* 102: 1300–1305.
- Mendez-Bermudez A, Royle NJ (2011) Deficiency in DNA mismatch repair increases the rate of telomere shortening in normal human cells. *Hum Mutat* 32: 939–946.
- Gruber SB, Mukherjee B (2009) Anticipation in lynch syndrome: still waiting for the answer. *J Clin Oncol* 27: 326–327.
- Coolbaugh-Murphy MI, Xu JP, Ramagli LS, Ramagli BC, Brown BW, et al. (2010) Microsatellite instability in the peripheral blood leukocytes of HNPCC patients. *Hum Mutat* 31: 317–324.
- Van Vliet CM, Dowty JG, van Vliet JL, Smith L, Mead IJ, et al. (2011) Dependence of colorectal cancer risk on the parent-of-origin of mutations in DNA mismatch repair genes. *Hum Mutat* 32: 207–212.
- Bender HS, Murchison EP, Pickett HA, Deakin JE, Strong MA, et al. (2012) Extreme telomere length dimorphism in the tasmanian devil and related marsupials suggests parental control of telomere length. *PLoS One* 7: e46195.





## **ARTÍCULO ANEXO 2**

### **Longer Telomeres Are Associated with Cancer Risk in MMR-Proficient Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer**

Nuria Seguí, Elisabet Guinó, Marta Pineda, Matilde Navarro, **Fernando Bellido**, Conxi Lázaro, Ignacio Blanco, Víctor Moreno, Gabriel Capellá, Laura Valle.

PLoS One 3;9(2):e86063; 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0086063.

#### **Resumen:**

La longitud telomérica aberrante medida en sangre ha sido asociada con un incremento de riesgo a varios tipos de cáncer. En el campo del cáncer colorrectal (CCR) hereditario no polipósico, y especialmente en el síndrome de Lynch (SL) –causado por mutaciones en los genes del sistema reparador de bases desapareadas (MMR, del inglés *mismatch repair*)–, identificamos recientemente que los afectados de CCR con SL tenían telómeros más cortos y acortamiento telomérico más rápido con la edad que los controles y los afectados de SL sin cáncer. En el presente artículo, evaluamos la longitud telomérica de un total de 57 afectados de cáncer y 57 pacientes no afectados provenientes de 34 familias Ámsterdam pertenecientes al CCR familiar de tipo X (CCRFx), comparando además los resultados obtenidos con los datos previamente publicados acerca de 244 pacientes con SL (144 afectados de cáncer y 100 no afectados) y 234 controles. La longitud telomérica relativa fue medida utilizando el método de PCR monocroma cuantitativa multiplex, aplicando medidas preventivas para evitar la inclusión de sesgos y ajustando por edad. A pesar de la naturaleza retrospectiva de nuestro estudio, los resultados mostraron que los telómeros más largos se asociaban a incrementos de riesgo en el CCRFx, identificando por tanto diferentes patrones de longitud telomérica para el riesgo de CCR en base al estado del sistema MMR.





# Longer Telomeres Are Associated with Cancer Risk in MMR-Proficient Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer

Nuria Seguí<sup>1</sup>, Elisabet Guinó<sup>2</sup>, Marta Pineda<sup>1</sup>, Matilde Navarro<sup>1</sup>, Fernando Bellido<sup>1</sup>, Conxi Lázaro<sup>1</sup>, Ignacio Blanco<sup>1</sup>, Victor Moreno<sup>2,3</sup>, Gabriel Capellá<sup>1</sup>, Laura Valle<sup>1\*</sup>

**1** Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, **2** Unit of Biomarkers and Susceptibility, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL and CIBERESP, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, **3** Department of Clinical Sciences, Faculty of Medicine, University of Barcelona, Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

## Abstract

Aberrant telomere length measured in blood has been associated with increased risk of several cancer types. In the field of hereditary non-polyposis colorectal cancer (CRC), and more particularly in Lynch syndrome, caused by germline mutations in the mismatch repair (*MMR*) genes, we recently found that cancer-affected *MMR* gene mutation carriers had shorter telomeres and more pronounced shortening of telomere length with age than controls and unaffected *MMR* gene mutation carriers. Here we evaluate blood telomere length in *MMR*-proficient hereditary non-polyposis CRC, i.e. familial CRC type X (fCRC-X). A total of 57 cancer-affected and 57 cancer-free individuals from 34 Amsterdam-positive fCRC-X families were analyzed and compared to the data previously published on 144 cancer-affected and 100 cancer-free *MMR* gene mutation carriers, and 234 controls. Relative telomere length was measured using a monochrome multiplex quantitative PCR method, following strict measures to avoid sources of bias and adjusting by age. Despite the retrospective nature of our study, the results show that longer telomeres associate with cancer risk in fCRC-X, thus identifying different patterns of telomere length according to the status of the *MMR* system.

**Citation:** Seguí N, Guinó E, Pineda M, Navarro M, Bellido F, et al. (2014) Longer Telomeres Are Associated with Cancer Risk in MMR-Proficient Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer. PLoS ONE 9(2): e86063. doi:10.1371/journal.pone.0086063

**Editor:** Amanda Ewart Toland, Ohio State University Medical Center, United States of America

**Received:** October 8, 2013; **Accepted:** December 9, 2013; **Published:** February 3, 2014

**Copyright:** © 2014 Seguí et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work has been funded by the Spanish Ministry of Economy (State Secretariat for Research, Development and Innovation) (grants SAF2012-38885 to LV and SAF2012-33636 to GC; and Ramón y Cajal contract to LV); L'Oréal-UNESCO "For Women in Science"; the Scientific Foundation Asociación Española Contra el Cáncer; the Catalan Government (grant 2009SGR290); and Carlos III Health Institute (fellowship to NS). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: lvalle@iconcologia.net

## Introduction

Family history is one of the strongest risk factors for the development of colorectal cancer (CRC) and is involved in approximately 20% of all CRC cases. However, only 2–6% of all CRCs are explained by germline mutations in known high-penetrance CRC genes. The Amsterdam criteria were defined to identify hereditary non-polyposis CRC cases, considering young age (<50 years) at cancer diagnosis and high familial aggregation of CRC (Amsterdam I) or other related tumors (Amsterdam II). Approximately 60% of the families that fulfill the Amsterdam criteria show DNA mismatch repair (*MMR*) deficiency as a consequence of a germline mutation or epimutation in a *MMR* gene, i.e. *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* or *PMS2* (Lynch syndrome; LS). The remaining 40% do not show *MMR* defects and the genetic cause of the familial CRC aggregation is still unknown, having been grouped as familial CRC type X (fCRC-X) [1,2].

Chromosome telomeres consist of multiple short repeats (TTTAGG) that protect against large-scale genomic rearrangements. Telomeres shorten with cell division, eventually leading to cellular senescence. On rare occasions, cells that aberrantly bypass replicative senescence with critically short telomeres may develop genomic instability and potentially become tumorigenic. In cancer

cells, however, as in stem cells, telomerase, the enzyme that adds telomeric repeats to the chromosome ends, is expressed, compensating for telomere erosion and preventing senescence/apoptosis [3–5].

Germline mutations in the components of the telomerase complex cause dyskeratosis congenita. Patients with this disorder have short telomeres, which lead to bone marrow failure and increased cancer risk [6]. Likewise, mouse models with telomerase deficiency and short telomeres have high risk of cancer [7]. Recent epidemiological studies have evaluated telomere length measured in peripheral blood DNA as a potential biomarker of cancer risk. Several studies have reported associations between telomere length and cancer risk, although the data are inconsistent among studies and tumor types [8]. In CRC studies, contradictory results have been observed, apparently due to differences in study population, study design, analytical approach, sample size, or exposure to environmental factors [9–15].

Regarding hereditary CRC, our group recently reported that cancer-affected *MMR* gene mutation carriers had shorter telomeres and showed faster telomere attrition with age, measured in blood, than controls and cancer-free *MMR* gene mutation carriers [16]. Nevertheless, the role of telomere length as cancer

risk modifier in LS could not be asserted since it had been argued that the shortened telomeres observed in retrospectively collected samples from cancer-affected individuals might be a consequence of the disease [8,14]. However, the fact that cancer-free mutation carriers had longer telomeres than cancer-free controls provided additional evidence in support to the hypothesis that telomere length might act as a cancer risk modifier in LS [16].

Here we report the first study of the behavior of blood telomere length in MMR-proficient hereditary non-polyposis CRC, i.e. fCRC-X, and compare it to the behavior observed in controls and in hereditary non-polyposis CRC with a MMR defect, i.e. LS (previously published [16]).

## Materials and Methods

### Ethics Statement

Written informed consent was obtained from all subjects. The study was approved by the Ethics Committee of IDIBELL (ref. PR221/09).

### Study Participants

A total of 114 individuals, 57 cancer-affected and 57 cancer-free, from 34 fCRC-X families were included in the study. These families fulfilled the Amsterdam criteria but did not show MMR defects (microsatellite instability or loss of expression of the MMR proteins MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2). In all, 76.5% (26/34) of the families fulfilled Amsterdam I criteria and 23.5% (8/34) Amsterdam II. For comparative purposes, previously published telomere length data from individuals belonging to LS families and from controls were included in the analyses [16]. Familial CRC-X, LS and control samples were all of Caucasian origin and recruited from the same homogeneous population (the Spanish region of Catalonia) through the Hereditary Cancer Program of the Catalan Institute of Oncology, IDIBELL. Table 1 shows the characteristics of the fCRC-X cases studied, comparing them to the LS individuals and controls previously analyzed [16].

### Relative Telomere Length Measurement

Relative telomere length (RTL) was assessed using a mono-chrome multiplex quantitative PCR method [17], under the same conditions as in Segui et al. [16]. Moreover, MMR-proficient hereditary cases were run together with LS cases and controls. In

order to rule out artifacts or technical sources of variation, a standard curve was included in each run (384-well plate), each sample was assayed in triplicate, and whenever possible, equal numbers of samples from different clinical groups were run in the same plate. Storage and DNA extraction from peripheral blood were performed at the same facility and using the same extraction methods, as recommended for retrospective telomere length studies [8].

### Statistical Analyses

RTL was adjusted by age based on the telomere length shortening occurring with age in the general population (controls), as previously reported [16,18]. Differences in age-adjusted telomere lengths were analyzed using the Wilcoxon rank sum test (Mann-Whitney U). The Kruskal-Wallis rank sum test was used to compare the demographic characteristics among groups. All tests were two-sided and p-values below 0.05 were considered statistically significant. The analyses were performed using R statistical software.

## Results

Age-adjusted RTL was evaluated in 57 cancer-affected fCRC-X patients and 57 unaffected individuals from 34 fCRC-X families. The results were compared to the results we published in a previous study of 144 cancer-affected *MMR* gene mutation carriers, 100 unaffected *MMR* gene mutation carriers and 234 controls [16].

Cancer-affected fCRC-X cases showed significantly longer telomeres than unaffected fCRC-X individuals ( $p = 0.009$ ) and cancer-free controls ( $p = 0.013$ ) (Fig. 1). These results were in sharp contrast to those previously observed in LS, where telomere lengths detected in cancer-affected *MMR* gene mutation carriers were shorter than those in unaffected mutation carriers ( $p = 0.032$ ) [16]. On the other hand, cancer-free fCRC-X cases showed shorter telomeres than cancer-free *MMR* gene mutation carriers ( $p = 0.015$ ), but of similar length to controls (Fig. 1).

## Discussion

We found that longer telomeres are associated with cancer in fCRC-X. Moreover, based on data previously published by our

**Table 1.** Characteristics of the hereditary non-polyposis CRC and control groups studied. Data on Lynch syndrome families and controls were published previously [16].

	fCRC-X families (n = 34)		Lynch syndrome families (n = 96) <i>MMR</i> gene mutation carriers		<sup>2</sup> Controls	<sup>3</sup> P-value
	<sup>1</sup> Cancer	Cancer-free	<sup>1</sup> Cancer	Cancer-free		
N	57	57	144	100	234	
Median age at blood draw (± SD)	56.0 (±13.9)	50.0 (±20.3)	51.5 (±13.4)	35.0 (±11.5)	42.0 (±14.9)	0.037
Sex: n (%)	M: 27 (47.4) F: 30 (52.6)	M: 28 (49.1) F: 29 (50.9)	M: 74 (51.4) F: 70 (48.6)	M: 40 (40.0) F: 60 (60.0)	M: 92 (39.3) F: 142 (60.7)	0.968
Median age at cancer diagnosis (± SD)	49.0 (±13.4)	–	43.0 (±12.9)	–	–	0.278

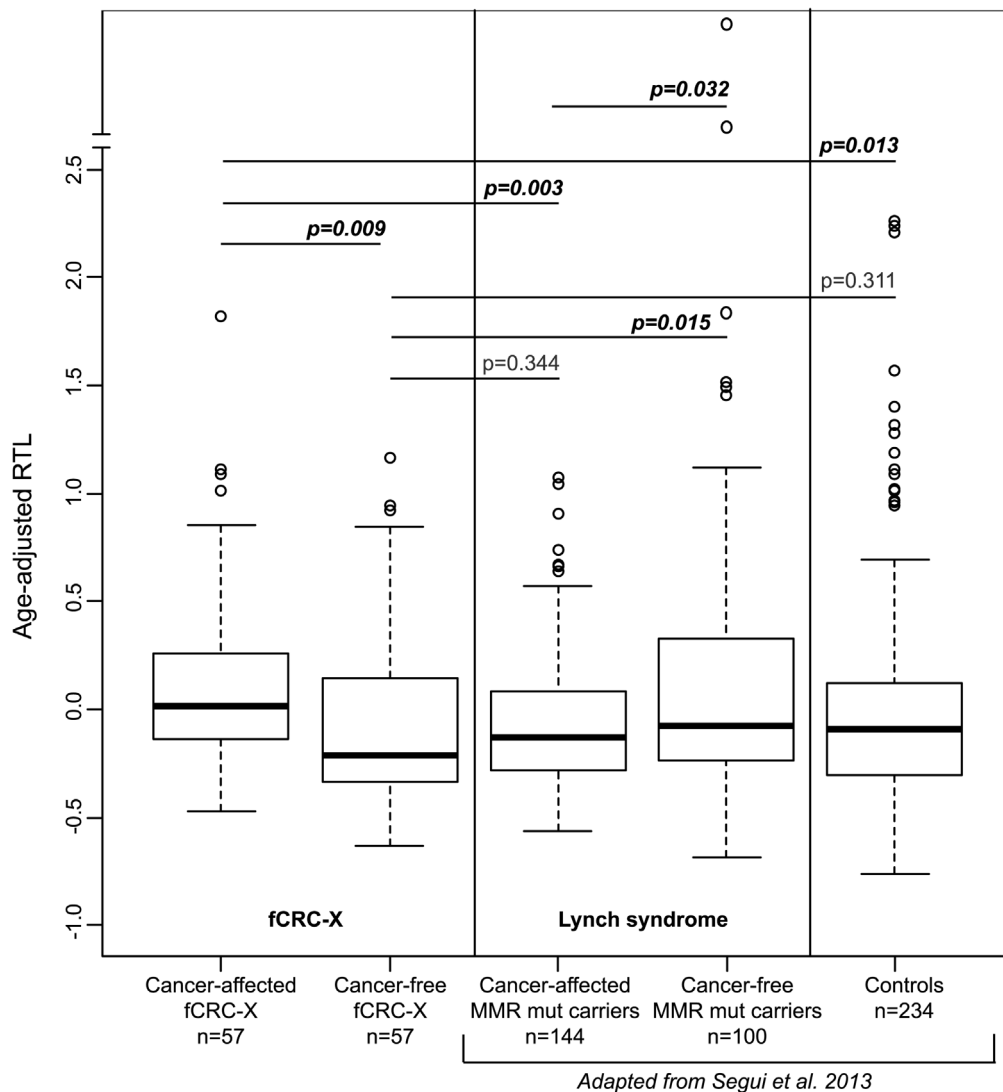
N, number of subjects; SD, standard deviation; M, male; F, female.

<sup>1</sup>Cancer: Individuals affected with a LS-associated cancer: CRC and/or cancer of the endometrium, ovary, stomach, small bowel, hepatobiliary tract, pancreas, upper uro-epithelial tract or brain.

<sup>2</sup>Controls include non-carriers from LS families (n = 144) and unrelated cancer-free controls (n = 90).

<sup>3</sup>Kruskal-Wallis rank sum test.

doi:10.1371/journal.pone.0086063.t001



**Figure 1. Age-adjusted RTL in subjects belonging to fCRC-X and LS families.** The different groups correspond to: cancer-affected fCRC-X cases (median age-adjusted RTL: 0.017); cancer-free individuals from fCRC-X families (median:  $-0.215$ ); cancer-affected *MMR* gene mutation carriers (median:  $-0.131$ ); cancer-free *MMR* gene mutation carriers (median:  $-0.079$ ); and cancer-free controls (median:  $-0.092$ ). Differences in age-adjusted RTL were analyzed using the Wilcoxon rank sum test (Mann-Whitney U). The boxes represent the interquartile range of distributions (25<sup>th</sup> and 75<sup>th</sup> percentiles); the horizontal lines within the boxes, the medians; and the vertical lines, the 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles. Data from LS families and controls were published previously [16].

doi:10.1371/journal.pone.0086063.g001

group [16], *MMR*-deficient and -proficient non-polyposis hereditary cases show distinct patterns of blood telomere length, suggesting that the status of the *MMR* system is key in defining telomere length in hereditary cases.

Several epidemiological studies have investigated the association of telomere length with CRC risk in the general population, producing conflicting results [19]. Evidence from retrospective studies indicates that telomeres in peripheral blood cells are shorter in CRC cases than controls. However, this association has not been replicated in prospective studies, suggesting that the association between short telomeres and CRC in retrospective studies is somehow the result of disease, treatment or differential survival rather than the cause (effect of reverse causation) [14]. Regarding prospective studies, no association was found in three relatively small studies (134–191 cases vs. 306–406 controls) [9–11]. However, more recently, larger prospective studies found that

longer telomeres were associated with higher CRC risk (cases/controls = 2,157/3,921) [14], or that both long and short telomeres increased CRC risk (cases/controls = 441/549) [15].

Despite the retrospective nature of our study, we found that cancer-affected fCRC-X individuals had longer telomeres than cancer-free members of the same type X families, controls, and cancer-affected members of LS families (*MMR* gene mutation carriers). Therefore, longer telomeres are associated with cancer risk in *MMR*-proficient hereditary non-polyposis CRC, as observed in large prospective population-based CRC series [14,15]. Further studies assessing telomere length before and after cancer diagnosis in fCRC-X cases will be crucial to demonstrate the precise effect of cancer on blood telomere length in this group of patients.

Previous evidence supports the hypothesis that long telomeres might increase cancer risk: first, long telomeres may delay cellular

senescence and apoptosis, increasing the chance that genetic abnormalities will accumulate [5,20]; secondly, a subset of colorectal tumors has longer telomeres than the adjacent non-tumor colon mucosa [21]. Telomere length assessment in fCRC-X tumors will provide additional insight into whether MMR-proficient hereditary tumors also have elongated telomeres. Similarly, knowing the levels of telomerase expression or of enzymatic activity in peripheral blood and tumor samples might aid the design of specific therapeutic and/or preventive approaches for fCRC-X patients in the future [22].

Our findings, together with those observed in large population-based CRC series [14,15], suggest that longer telomeres are a risk factor for hereditary and sporadic MMR-proficient CRC. Following this observation, it is plausible to hypothesize that

longer telomeres also act as modifiers of the age of onset of cancer and/or polyposis in other MMR-proficient CRC syndromes.

In conclusion, in contrast to in the observations for LS but in line with the results of large CRC prospective studies, elongated telomeres are associated with increased cancer risk in Amsterdam-positive MMR-proficient hereditary non-polyposis CRC.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: LV NS. Performed the experiments: NS LV. Analyzed the data: EG NS LV VM. Contributed reagents/materials/analysis tools: MP MN FB CL IB GC. Wrote the paper: LV NS. Critically revised the manuscript: MP IB GC VM.

## References

- Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, et al. (2009) Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet* 76: 1–18.
- Ku CS, Cooper DN, Wu M, Roukos DH, Pawitan Y, et al. (2012) Gene discovery in familial cancer syndromes by exome sequencing: prospects for the elucidation of familial colorectal cancer type X. *Mod Pathol* 25: 1055–1068.
- Blasco MA (2005) Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 6: 611–622.
- Stewart JA, Chaiken MF, Wang F, Price CM (2012) Maintaining the end: roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. *Mutat Res* 730: 12–19.
- Hou L, Zhang X, Gawron AJ, Liu J (2012) Surrogate tissue telomere length and cancer risk: shorter or longer? *Cancer Lett* 319: 130–135.
- Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS (2009) Cancer in dyskeratosis congenita. *Blood* 113: 6549–6557.
- Blasco MA (2005) Mice with bad ends: mouse models for the study of telomeres and telomerase in cancer and aging. *Embo J* 24: 1095–1103.
- Prescott J, Wentzensen IM, Savage SA, De Vivo I (2012) Epidemiologic evidence for a role of telomere dysfunction in cancer etiology. *Mutat Res* 730: 75–84.
- Zee RY, Castonguay AJ, Barton NS, Buring JE (2009) Mean telomere length and risk of incident colorectal carcinoma: a prospective, nested case-control approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18: 2280–2282.
- Pooley KA, Sandhu MS, Tyrer J, Shah M, Driver KE, et al. (2010) Telomere length in prospective and retrospective cancer case-control studies. *Cancer Res* 70: 3170–3176.
- Lee IM, Lin J, Castonguay AJ, Barton NS, Buring JE, et al. (2010) Mean leukocyte telomere length and risk of incident colorectal carcinoma in women: a prospective, nested case-control study. *Clin Chem Lab Med* 48: 259–262.
- Bozzao C, Lastella P, Ponz de Leon M, Pedroni M, Di Gregorio C, et al. (2011) Analysis of telomere dynamics in peripheral blood cells from patients with Lynch syndrome. *Cancer* 117: 4325–4335.
- Maxwell F, McGlynn LM, Muir HC, Talwar D, Benzeval M, et al. (2011) Telomere attrition and decreased fetuin-A levels indicate accelerated biological aging and are implicated in the pathogenesis of colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 17: 5573–5581.
- Jones AM, Beggs AD, Carvajal-Carmona L, Farrington S, Tenesa A, et al. (2012) TERC polymorphisms are associated both with susceptibility to colorectal cancer and with longer telomeres. *Gut* 61: 248–254.
- Cui Y, Cai Q, Qu S, Chow WH, Wen W, et al. (2012) Association of leukocyte telomere length with colorectal cancer risk: nested case-control findings from the Shanghai Women's Health Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21: 1807–1813.
- Segui N, Pineda M, Guino E, Borrás E, Navarro M, et al. (2013) Telomere length and genetic anticipation in lynch syndrome. *PLoS One* 8: e61286.
- Cawthon RM (2009) Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res* 37: e21.
- Martinez-Delgado B, Yanowsky K, Inglada-Perez L, Domingo S, Urioste M, et al. (2011) Genetic anticipation is associated with telomere shortening in hereditary breast cancer. *PLoS Genet* 7: e1002182.
- Savage SA, Gadalla SM, Chanock SJ (2013) The long and short of telomeres and cancer association studies. *J Natl Cancer Inst* 105: 448–449.
- Lan Q, Cawthon R, Shen M, Weinstein SJ, Virtamo J, et al. (2009) A prospective study of telomere length measured by monochrome multiplex quantitative PCR and risk of non-Hodgkin lymphoma. *Clin Cancer Res* 15: 7429–7433.
- Bisoffi M, Heaphy CM, Griffith JK (2006) Telomeres: prognostic markers for solid tumors. *Int J Cancer* 119: 2255–2260.
- Hu J, Hwang SS, Liesa M, Gan B, Sahin E, et al. (2012) Antitelomerase therapy provokes ALT and mitochondrial adaptive mechanisms in cancer. *Cell* 148: 651–663.

### **ARTÍCULO ANEXO 3**

#### **New insights into *POLE* and *POLD1* germline mutations in familial colorectal cancer and polyposis.**

Laura Valle, Eva Hernández-Illán, **Fernando Bellido**, Gemma Aiza, Adela Castillejo, María-Isabel Castillejo, Matilde Navarro, Nuria Seguí, Gardenia Vargas, Carla Guarinos, Miriam Juárez, Xavier Sanjuán, Silvia Iglesias, Cristina Alenda, Cecilia Egoavil, Ángel Segura, María-José Juan, María Rodríguez-Soler, Joan Brunet, Sara González, Rodrigo Jover, Conxi Lázaro, Gabriel Capellá, Marta Pineda, José Luís Soto y Ignacio Blanco.

Human Molecular Genetics, 2014, Vol. 23, No. 13. doi:10.1093/hmg/ddu058.

#### **Resumen:**

Mutaciones germinales en la ADN polimerasa  $\epsilon$  (*POLE*) y  $\delta$  (*POLD1*) han sido recientemente identificadas en familias con múltiples adenomas colorrectales y cáncer colorrectal (CCR). Todos los casos identificados portaban las mutaciones *POLE* c.1270C>G (p.Leu424Val) o *POLD1* c.1433G>A (p.Ser478Asn). Debido a la escasez de casos identificados hasta la fecha, no ha podido definirse un fenotípico clínico específico asociado a este tipo de mutaciones. Nuestra intención fue evaluar la prevalencia de estos cambios recurrentes en una serie de casos de CCR de aparición temprana y poliposis de etiología desconocida, así como aumentar el conocimiento disponible sobre el fenotipo clínico de los casos mutados. Un total de 858 casos de CCR de aparición temprana o familiar y poliposis fueron estudiados: 581 casos de CCR familiar y/o de aparición temprana sin fallos en el sistema reparador de bases desapareadas, 86 casos con fallos germinales en este mismo sistema de reparación y 191 casos de poliposis. La búsqueda de mutaciones fue realizada utilizando sondas de genotipado KASPar y/o secuenciación Sanger de los exones implicados. La mutación *POLE* p.L424V fue identificada en un paciente de 28 años con CCR y poliposis, tratándose de un cambio *de novo*. En ninguno de los 858 casos estudiados se identificó el cambio p.S478N. Una nueva mutación, *POLD1* c.1421T>C (p.Leu474Pro), fue identificada en una familia Amsterdam II. Su patogenicidad se apoyó en la cosegregación de la variante con los casos de CCR en la familia, las predicciones *in silico* y experimentos en levaduras descritos en la literatura. Las mutaciones en *POLE* y *POLD1* explican por tanto una fracción del CCR familiar y de la poliposis. La secuenciación de los dominios exonucleasa de *POLE* y *POLD1* debería ser considerada en la rutina de diagnóstico genética. Por el momento, hasta la identificación de portadores adicionales, el análisis genético de *POLE* y *POLD1* no debería restringirse a los casos polipósicos, así como también debería tenerse en cuenta la posible presencia de mutaciones *de novo*.



# New insights into POLE and POLD1 germline mutations in familial colorectal cancer and polyposis

Laura Valle<sup>1,†,\*</sup>, Eva Hernández-Illán<sup>3,†</sup>, Fernando Bellido<sup>1</sup>, Gemma Aiza<sup>2</sup>, Adela Castillejo<sup>6</sup>, María-Isabel Castillejo<sup>6</sup>, Matilde Navarro<sup>1</sup>, Nuria Seguí<sup>1</sup>, Gardenia Vargas<sup>1</sup>, Carla Guarinos<sup>3</sup>, Miriam Juárez<sup>3</sup>, Xavier Sanjuán<sup>7</sup>, Silvia Iglesias<sup>1</sup>, Cristina Alenda<sup>4</sup>, Cecilia Egoavil<sup>4</sup>, Ángel Segura<sup>8</sup>, María-José Juan<sup>9</sup>, María Rodríguez-Soler<sup>5</sup>, Joan Brunet<sup>10</sup>, Sara González<sup>1</sup>, Rodrigo Jover<sup>5</sup>, Conxi Lázaro<sup>1</sup>, Gabriel Capellá<sup>1</sup>, Marta Pineda<sup>1</sup>, José Luís Soto<sup>6</sup> and Ignacio Blanco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hereditary Cancer Program and <sup>2</sup>Translational Research Laboratory, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Spain, <sup>3</sup>Research Laboratory, <sup>4</sup>Department of Pathology and <sup>5</sup>Department of Gastroenterology, Alicante University Hospital, Alicante, Spain, <sup>6</sup>Molecular Genetics Laboratory, Elche University Hospital, Elche, Spain, <sup>7</sup>Department of Pathology, Bellvitge University Hospital, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Spain, <sup>8</sup>Hereditary Cancer Unit, La Fe University Hospital, Valencia, Spain, <sup>9</sup>Hereditary Cancer Unit, Valencian Institute of Oncology, Valencia, Spain and <sup>10</sup>Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBGi, Girona, Spain

Received January 8, 2014; Revised and Accepted January 31, 2014

**Germline mutations in DNA polymerase  $\epsilon$  (*POLE*) and  $\delta$  (*POLD1*) have been recently identified in families with multiple colorectal adenomas and colorectal cancer (CRC). All reported cases carried *POLE* c.1270C>G (p.Leu424Val) or *POLD1* c.1433G>A (p.Ser478Asn) mutations. Due to the scarcity of cases reported so far, an accurate clinical phenotype has not been defined. We aimed to assess the prevalence of these recurrent mutations in unexplained familial and early-onset CRC and polyposis, and to add additional information to define the clinical characteristics of mutated cases. A total of 858 familial/early onset CRC and polyposis patients were studied: 581 familial and early-onset CRC cases without mismatch repair (MMR) deficiency, 86 cases with MMR deficiency and 191 polyposis cases. Mutation screening was performed by KASPar genotyping assays and/or Sanger sequencing of the involved exons. *POLE* p.L424V was identified in a 28-year-old polyposis and CRC patient, as a *de novo* mutation. None of the 858 cases studied carried *POLD1* p.S478N. A new mutation, *POLD1* c.1421T>C (p.Leu474Pro), was identified in a mismatch repair proficient Amsterdam II family. Its pathogenicity was supported by cosegregation in the family, *in silico* predictions, and previously published yeast assays. *POLE* and *POLD1* mutations explain a fraction of familial CRC and polyposis. Sequencing the proofreading domains of *POLE* and *POLD1* should be considered in routine genetic diagnostics. Until additional evidence is gathered, *POLE* and *POLD1* genetic testing should not be restricted to polyposis cases, and the presence of *de novo* mutations, considered.**

## INTRODUCTION

Estimates indicate that familial colorectal cancer (CRC) defined by the presence of two or more first-degree relatives affected with CRC involves over 20% of all cases (1–3). Nevertheless,

CRC syndromes caused by known high-penetrance CRC genes collectively account for only 2–6% of all CRC cases. Germline mutations and epimutations in the DNA mismatch repair (MMR) genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2* cause Lynch syndrome, explaining a proportion of hereditary non-polyposis CRC cases;

\*To whom correspondence should be addressed at: Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, Av. Gran Vía 199-203, 08908 Hospitalet de Llobregat Barcelona, Spain. Tel: +34 932607145; Fax: +34 932607466; Email: lvalle@iconcologia.net

†These authors contributed equally to this work.



mutations in *APC* and *MUTYH* primarily predispose to multiple colonic adenomas, a benign precursor of CRC; a 40 kb upstream duplication in *GREM1* cause hereditary mixed polyposis; and several types of hamartomatous polyposis are explained by mutations in *SMAD4*, *BMPRIA*, *STK11* and *PTEN* (4–9). Nevertheless, there are still a number of CRC families suggestive of carrying a mutation in a high-penetrance predisposition gene, but without mutations in the known genes. Among these, a number of familial adenomatous polyposis cases are not explained by germline mutations in *APC* or *MUTYH*.

Recently, using a combination of whole-exome sequencing and linkage analysis in probands with > 10 adenomas by age 60 but no germline mutations in *APC*, *MUTYH* or the *MMR* genes, Palles *et al.* identified DNA polymerase  $\epsilon$  (*POLE*; MIM #174762) and  $\delta$  (*POLD1*; MIM #174761) mutations in individuals/families with multiple colorectal adenomas and CRC (10). In all, two pathogenic variants, *POLE* c.1270C>G (p.Leu424Val) (NM\_006231) and *POLD1* c.1433G>A (p.Ser478Asn) (NM\_002691), and an additional variant whose pathogenicity has not yet been determined, *POLD1* c.981C>G (p.Pro327Leu), were identified. All three genetic changes affect the proofreading (exonuclease) domain of the respective polymerase, suggesting deficient proofreading repair during DNA replication (10–13).

After a comprehensive screening of the identified pathogenic mutations in over 3800 CRC patients of European ancestry enriched for a familial CRC history, multiple adenomas and early-onset disease, a total of 13 families with *POLE* p.L424V and 3 with *POLD1* p.S478N were identified (10). To date, no additional *POLE/POLD1* mutated families have been reported in the literature. Clinical data from the reported families indicate that the two pathogenic mutations show dominant inheritance and confer high risk to multiple colorectal adenomas, large adenomas, early-onset CRC or multiple CRCs. *POLD1* p.S478N also confers increased risk to endometrial cancer in female carriers. Nevertheless, the phenotype varies among carriers, and until additional cases are identified, an accurate description of the clinical characteristics of this syndrome cannot be provided (13).

In this study, we aimed to assess the prevalence of *POLE* p.L424V and *POLD1* p.S478N in polyposis and non-polyposis familial and early-onset CRC cases, and to add additional information to help define the phenotypic/clinical characteristics of mutated cases.

## RESULTS

Neither *POLE* p.L424V nor *POLD1* p.S478N was identified in genetically uncharacterized familial non-polyposis CRC cases, including 581 MMR-proficient and 86 MMR-deficient cases. Likewise, *POLD1* p.S478N was not detected in 191 polyposis cases.

*POLE* p.L424V was identified in a polyposis family (Series no. 1) (Fig. 1A). The index case was a female patient diagnosed with CRC (pT2pN0pM0) and > 35 colonic polyps at age 28. From a total of 33 polyps analyzed, 31 were adenomas, 1 a hyperplastic polyp and 1 a mixed polyp. At 30 years old, 2 years after the surgery, she had developed 8 additional adenomas. No genetic alterations in *APC* and absence of the common *MUTYH* variants had been identified. No loss of heterozygosity (LOH) of the *POLE* chromosomal region, analyzed with two informative

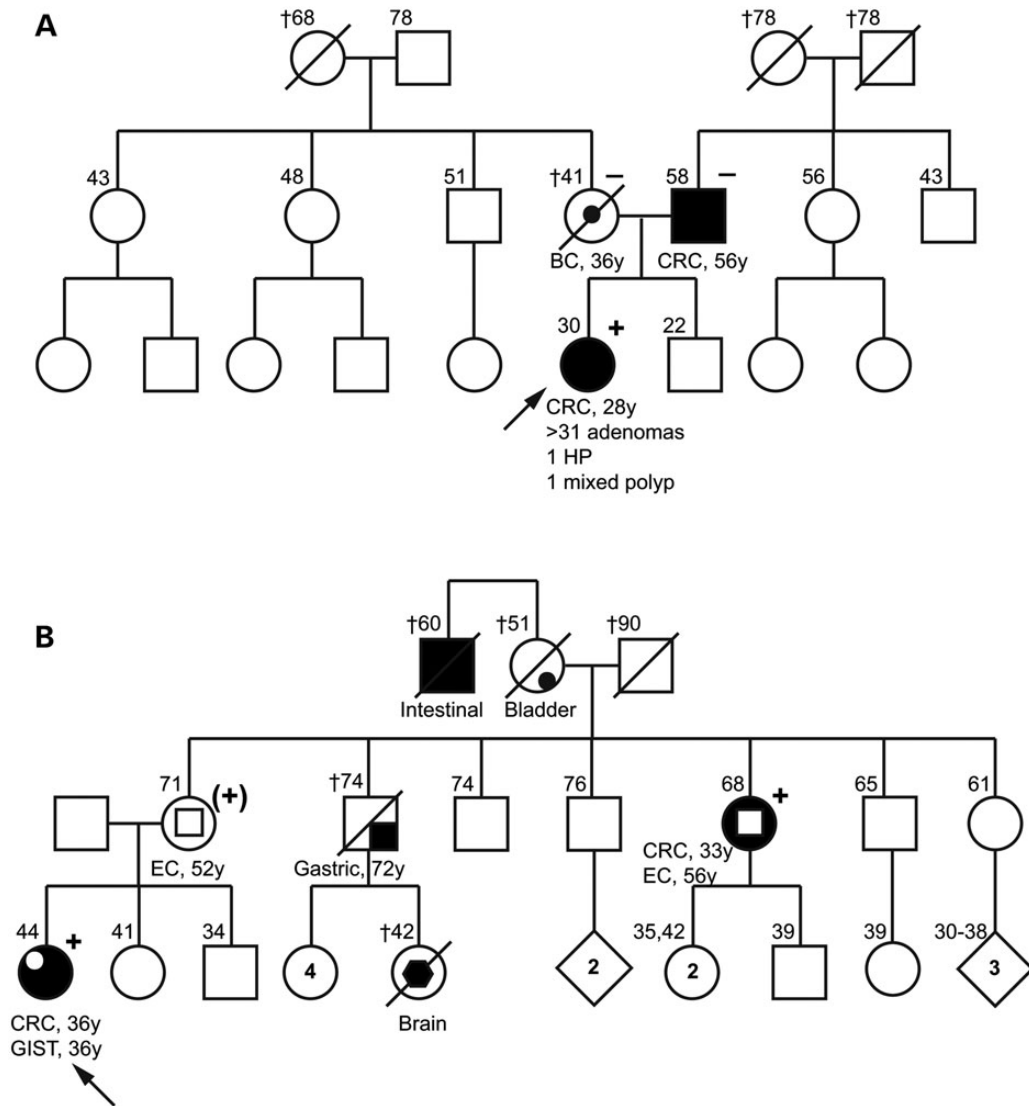
microsatellites 1.13 Mb apart, and studying the allelic abundance of the mutated and wild-type alleles by SNaPshot, was detected in tumor DNA extracted from the colon tumor developed by the mutation carrier (Supplementary Material, Fig. S1).

Based on the clinical findings of the proband, her father was subjected to a colonoscopy at age 56, which revealed a pT2pN0pM0 tumor (adenocarcinoma arising from a tubulovillous adenoma) at the proximal colon and one hyperplastic polyp. Her mother was diagnosed with breast cancer at age 36 and died at 41. No information on gastrointestinal clinical findings in the mother had been reported, and no colon cancer surveillance measures were followed in the maternal family branch. The study of cosegregation revealed that the father did not carry the p.L424V mutation, suggesting a different etiology for his CRC. Paternity was confirmed by microsatellite analysis (data not shown). Likewise, p.L424V was not identified in the DNA extracted from an archived cytology sample obtained from an affected node (metastasis) of the mother's breast cancer. Therefore, these findings indicated that *POLE* p.L424V occurred as a *de novo* germline mutation in the index case.

On account of the mutation-screening method used in the Series no.2, consisting of sequencing exons 13 and 11 of *POLE* and *POLD1*, respectively, a novel genetic change, *POLD1* c.1421T>C (p.Leu474Pro), was detected in an Amsterdam II MMR-proficient family. The index case was a female patient diagnosed with a well-differentiated left colon cancer (pT2pN0pM0) and a synchronous gastrointestinal stromal tumor (GIST) in the large bowel at age 36. No polyps were ever found during surgical removal or follow-up. Her mother was diagnosed with endometrial cancer at age 52. A maternal aunt was diagnosed with metachronous CRC (pT3pN0pM0) and endometrial cancer (Stage IB) at ages 33 and 56, respectively, and no polyps were found in the intestinal tract during surgical intervention and follow-up. A maternal uncle was diagnosed with a gastric cancer at age 72, and his daughter died of a brain tumor at age 42. The maternal grandmother died from a bladder cancer at age 51 (Fig. 1B). Cosegregation analysis performed in the maternal aunt, diagnosed with CRC (33 years) and endometrial cancer (56 years), confirmed her status of heterozygous carrier. Therefore, the mother of the index case was an obligate mutation carrier.

The variant *POLD1* p.L474P is localized in a highly conserved residue located within the proofreading domain of DNA polymerase  $\delta$ . *In silico* analysis using SNPs3D, PolyPhen-2, Condel and SIFT algorithms predicted relevant functional effects with scores of  $-3.36$  (deleterious), 1 (probably damaging), 1 (deleterious) and 0 (damaging), respectively. Human *POLD1* p.L474 is the homologous residue of p.L479 in *Saccharomyces cerevisiae*. The mutation p.L479S Pol3 in this organism has been shown to cause a mutator phenotype (14). Moreover, human *POLD1* p.L474 is the paralogous residue of the human *POLE* p.L424, the residue where the recurrent *POLE* p.L424V mutation occurs (10). In summary, evidence from cosegregation, *in silico* predictions of the variant's functionality and yeast functional assays strongly suggests a pathogenic nature for *POLD1* p.L474P.

Mutation screening of the driver genes *KRAS* (codons 12 and 13, and exons 3 and 4), *NRAS* (exons 2–4), and *BRAF* p.V600E in the colorectal tumor developed by the index case and in the endometrial tumors developed by her maternal aunt revealed no somatic mutations.



**Figure 1.** Pedigrees of the families with *POLE* p.L424V (A) and *POLD1* p.L474P (B) mutations. Filled symbol, CRC; centered filled circle, breast cancer; bottom-right filled circle, bladder cancer; centered unfilled square, endometrial cancer; top-left unfilled circle, GIST; bottom-right filled square, gastric cancer; filled hexagon, tumor of the central nervous system; +, mutation carrier; (+) oblige mutation carrier; -, wild-type; arrow, index case. Ages at information gathering or at death, when available, are indicated on the top-right corner of each individual's symbol. CRC, colorectal cancer; BC, breast cancer; EC, endometrial cancer; GIST, gastrointestinal stromal tumor; HP, hyperplastic polyp; y, years.

**DISCUSSION**

*POLE* p.L424V and *POLD1* p.S478N mutation screening in 858 Caucasian (Spanish) patients with CRC and/or colonic polyposis, enriched for a family history of colorectal tumors, multiple colonic polyps and/or early-onset disease, identified one carrier of *POLE* p.L424V. This accounts for 0.12% (1/858) of the total, 0.52% (1/191) of the polyposis cases, and 0.86% (1/116) of the adenomatous polyposes studied. Despite its infrequency and based on the simplicity of the test, our findings provide further evidence to advise that at least *POLE* p.L424V, as a recurrent mutation, should be tested in adenomatous polyposis cases without mutations in *APC* and *MUTYH*.

Together with the family identified in our series, a total of 14 families carrying the *POLE* p.L424V mutation have been

reported and described in the literature (10). Eleven of them were CRC-only and/or polyposis families. Of the other two families previously described, an astrocytoma and tumors of the ureter, ovary and breast were reported in mutation carriers, or probable mutation carriers, who had also been diagnosed with at least two additional colorectal tumors (10). Recently, an additional carrier of a *POLE* mutation, the deletion c.5621\_5622delGT, has been identified in a patient diagnosed with CRC at 26 years of age, with no further information reported about family history of cancer or polyposis (15). In our family, the p.L424V mutation occurred *de novo* and caused early-onset CRC (28 years) and adenomatous polyposis. To date, this is the first *de novo* case reported for *POLE/POLD1* germline mutations. Nevertheless, as occurs in 20% *APC* mutation carriers

with an apparent *de novo* mutation (16), it could also be a consequence of a somatic mosaicism in one parent. Being *POLE* p.L424V a recurrently found mutation, it can be hypothesized that its recurrent nature may be the result of a founder effect. Even though this could still be true for certain instances, the existence of *de novo* p.L424 V mutations supports the idea of a mutation hotspot, which may also originate non-founder recurrent mutated cases.

In this study, we also report a novel mutation, *POLD1* p.L474P, identified in an Amsterdam II family without defects in the MMR system. This finding suggests that polymerase proofreading mutations in *POLD1* explain a proportion of the uncharacterized hereditary non-polyposis CRC cases. This finding supports the screening of the genes, at least of *POLD1*, in non-polyposis CRC cases. In this regard, the term 'polymerase proofreading-associated polyposis' may be misleading and should be carefully used, at least until more *POLE/POLD1* families are described and the full phenotypic spectrum of this syndrome is refined.

In addition to the family herein identified, carrying *POLD1* p.L474P, three additional families with germline *POLD1* mutations have been previously described, all of them carrier of p.S478N (10). In three of the four *POLD1* families reported, including the one described here, two or more endometrial tumors have been diagnosed, indicating the importance of cancer surveillance of this type of tumor in *POLD1* mutation carriers (10,17).

Tumors developed in the context of polymerase proofreading mutations, both germline and somatic, show an ultramutated, apparently microsatellite-stable phenotype, sometimes leading to over a million base substitutions per tumor. In these tumors, the mutation spectrum is changed, with a particular increase in the proportion of G : C to T : A and A : T to C : G transversions. Therefore, it would be expected to find numerous mutations in common CRC genes. However, except for rare mutations in *APC*, the frequency of mutations in other driver genes is low (13). Here, the screening of common *KRAS*, *NRAS* and *BRAF* mutations in two tumors (1 colorectal and 1 endometrial cancer) from two *POLD1* p.L474P carriers, which also showed MMR proficiency, revealed no mutations, even when some of the most common mutations found in those genes in colorectal cancer, such as *KRAS* c.34G>T (p.G12C) or *BRAF* c.1799T>A (p.V600E), are transversions. This agrees with the results obtained by Palles *et al.* (10), where no mutations in driver genes were identified in 4 of 6 tumors from five *POLD1* mutation carriers, and in 5 of 10 tumors from three *POLE* mutation carriers. Additional studies analyzing the mutation burden and the presence of mutations in additional known driver genes in the tumors developed by *POLE* and *POLD1* mutation carriers, both CRC and endometrial, will provide a clearer picture of the somatic molecular landscape of this syndrome.

Our results, together with the information gathered so far, support the recommendation of sequencing the exons encoding the proofreading domains of *POLE* and *POLD1* in all familial CRC and polyposis cases without mutations in the known predisposing genes. Based on our findings, *POLE* and *POLD1* mutation screening should not be restricted to polyposis cases, and the presence of *de novo* mutations should be taken into account. Also, whenever endometrial cancer cases are reported in the family, genetic testing of *POLD1* should be prioritized.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

A total of 858 familial/early-onset CRC and polyposis patients from 840 families were included in the analysis. Written informed consent was obtained from all subjects and the study received the approval of the Ethics Committees of the involved institutions.

#### Series no.1

A total of 612 familial and/or early-onset colorectal cancer and/or polyposis patients from 594 families without identified mutations in the known CRC or polyposis genes were included in the study. All had been referred to the Genetic Counseling Units of the Catalan Institute of Oncology in the Spanish region of Catalonia between 1999 and 2012. Referral was based on familial history of colorectal cancer or polyps, presence of early-onset colorectal cancer and/or personal history of polyposis at early age.

All non-polyposis cases ( $n = 524$ ) had been previously tested for MMR deficiency, either by immunohistochemistry of the MMR proteins *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2*, and/or by PCR-based microsatellite instability analysis. MMR-deficient tumors ( $n = 86$ ) did not present somatic *MLH1* promoter methylation and/or the *BRAF* V600E mutation, thus suggesting a hereditary component. Nevertheless, no germline mutations were identified in the candidate MMR genes, according to the MMR protein expression pattern in the tumor. Clinical features of non-polyposis cases are shown in Table 1.

All polyposis patients ( $n = 88$ ) had undergone *MUTYH* genetic testing of the three most recurrent genetic variants in Spanish population, i.e. p.Tyr179Cys, p.Gly396Asp and p.Glu410Glyfs\*43 (NM 001128425.1) (18). If one of these three was detected, all the coding regions of *MUTYH* were subsequently sequenced. When the number of adenomas was  $>20$ , the *APC* gene, including exons and flanking regions, was also sequenced. Clinical features of polyposis cases are shown in Table 2.

#### Series no.2

Series no.2 consisted of 246 uncharacterized hereditary CRC and/or polyposis index patients. The 143 non-polyposis CRC patients included in the study were recruited through the Cancer Genetic Counseling Units of the Spanish region of Valencia between 2005 and 2013. Of them, 63 cases fulfilled the Amsterdam criteria (I or II) and were MMR-proficient. The remaining 80 cases were diagnosed with MMR-proficient non-polyposis CRC and had two or more first or second-degree relatives diagnosed with a Lynch syndrome-related tumor, regardless of age (Bethesda criterion no. 5) (Table 1). The status of MMR deficiency was assessed either by immunohistochemistry of the MMR proteins and/or by PCR-based microsatellite instability analysis. Biological samples and clinicopathological information were obtained from the Valencian Biobank Network and from the Hereditary Cancer Program of the Valencia Region, both in Spain.

A total of 103 polyposis cases were recruited through the EPI-POLIP project, which comprises a multicentric Spanish series (19). All cases were diagnosed with attenuated polyposis with  $>10$  polyps and at least one first-degree relative affected with

**Table 1.** Characteristics of the non-polyposis CRC cases analyzed

	<i>N</i> (fam.)	Criteria <i>n</i> (%) Ams. I	Ams. II	Beth.	n.a.	Age at cancer diagnosis Mean (± SD)
Series no.1 (506 families) <sup>a</sup>						
MMR-proficient <sup>b</sup>	438 (423)	31 (7.1%)	11 (2.5%)	390 (89.0%)	6 (1.4%)	49.0 (± 12.6)
MMR-deficient <sup>c</sup>	86 (86)	1 (1.2%)	4 (4.7%)	63 (73.3%)	18 (20.9%) <sup>d</sup>	51.4 (± 13.3)
Series no.2 (143 families)						
MMR-proficient <sup>b</sup>	143 (143)	17 (11.9%)	46 (32.2%)	80 (55.9%)	0	49.4 (± 11.6)
Total	667 (649)	49 (7.4%)	61 (9.1%)	533 (79.9%)	24 (3.6%)	–

MMR, mismatch repair; *N*, number of individuals; fam., number of families; Ams., Amsterdam criteria (I or II); Beth., Bethesda criteria; n.a., not available data; SD, standard deviation.

<sup>a</sup>Three families shared MMR-proficient and MMR-deficient cases.

<sup>b</sup>Non-polyposis cases whose tumors showed microsatellite stability and intact expression of the MMR proteins MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2.

<sup>c</sup>Non-polyposis cases whose tumors showed microsatellite instability and/or loss of expression of at least one MMR protein.

<sup>d</sup>Cases referred from the Department of Pathology (CSUB, IDIBELL) to the Hereditary Cancer Program (ICO, IDIBELL) based on tumor histopathological features suggestive of MMR deficiency, which was subsequently confirmed. Somatic promoter *MLH1* methylation was discarded and/or the presence of *BRAF* V600E confirmed. No information on familial cancer history was available.

**Table 2.** Characteristics of the polyposis cases analyzed

	Adenomatous polyposis <sup>a</sup>	Attenuated adenomatous polyposis <sup>b</sup>	Non-adenomatous polyposis <sup>c</sup>	n.a. <sup>d</sup>
Series no.1 (n = 88)				
<i>N</i> (%)	15 (17.0%)	42 (47.7%)	14 (15.9%)	17 (19.3)
Mean age at polyposis diagnosis (± SD)	43.0 (± 11.1)	53.3 (± 13.3)	51.8 (± 8.5)	–
CRC; <i>n</i> (%)	9 (60.0%)	31 (73.8%)	8 (57.1%)	–
Polyposis family history; <i>n</i> (%)	4 (26.7%)	14 (33.3%)	3 (21.4%)	–
CRC family history; <i>n</i> (%)	2 (13.3%)	11 (26.2%)	4 (28.6%)	–
Series no.2 (n = 103)				
<i>N</i> (%)	0	58 (56.3%)	42 (40.8%)	3 (2.9%)
Mean age at polyposis diagnosis (± SD)	0	60.6 (± 10.5)	50.9 (± 9.7)	–
CRC <i>n</i> (%)	0	21 (36.2%)	9 (21.4%)	–
Polyposis family history; <i>n</i> (%)	0	16 (27.6%)	40 (95.2%)	–
CRC family history; <i>n</i> (%)	0	54 (93.1%)	13 (31.0%)	–
TOTAL (n = 191)	15 (7.8%)	100 (52.4%)	56 (29.3%)	20 (10.5%)

*N*, number of individuals; SD, standard deviation; CRC, colorectal cancer; n.a., not available data.

<sup>a</sup>Adenomatous polyposis: > 100 adenomatous polyps.

<sup>b</sup>Attenuated adenomatous polyposis: 10–100 adenomatous polyps.

<sup>c</sup>Non-adenomatous polyposis includes hyperplastic, serrated and mixed polyposis.

<sup>d</sup>Referred to the corresponding unit of genetic diagnosis as ‘polyposis’ but with no specific clinical information available.

CRC. All cases had previously undergone genetic testing of the three most frequent *MUTYH* genetic variants in Spanish population, by sequencing exons 7 and 13 of the gene. If one of these three was detected, all the coding regions of *MUTYH* were subsequently sequenced. The APC gene was analyzed by Sanger sequencing in all individuals with > 10 adenomas.

### ***POLE* p.L424V and *POLD1* p.S478N screening**

In Series no.1, KASPar assays (KASP-By-Design genotyping assays, LGC group, Teddington, UK) were used to genotype the two mutations. Reactions were carried out in the LightCycler 480 real-time PCR detection system (Roche Diagnostics GmbH, Germany), including a corresponding positive control in each run. Positive controls for *POLE* p.L424V and *POLD1* p.S478N were kindly provided by Professor Ian Tomlinson (The Wellcome Trust Center for Human Genetics, Oxford, UK). Genotype calling was performed automatically by the LightCycler 480 II software. Validation of genotyping results deviated from the wild-type cluster, analysis of samples that had failed (no amplification) the genotyping experiment, and

cosegregation studies, were carried out by direct automated sequencing. Primers and PCR conditions are shown in Supplementary Material, Table S1. Sequencing was performed on an ABI Sequencer 3730 and data analyzed using Mutation Surveyor v.3.10.

In Series no.2, Sanger sequencing was used to screen for mutations in exon 13 of *POLE*, where *POLE* p.L424V is located, and in exon 11 of *POLD1*, where *POLD1* p.S478N is located. Primers and PCR conditions are shown in Supplementary Material, Table S1. Sequencing was performed on a 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and data were analyzed using Sequencing Analysis v.5.1 and Variant Reporter v.1.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

### **Loss of heterozygosity**

Microsatellites mapping close to *POLE* and expanding 1.356 Mb, D12S1723, D12S1628, D12S357 and D12S1638, were analyzed to assess LOH in DNA extracted from formalin-fixed paraffin-embedded tissue (10). Also, SNaPshot targeting the

mutation p.L424V was used to assess LOH and to discriminate wild-type and mutated alleles. Primers and conditions are shown in Supplementary Material, Table S1. LOH was scored if the intensity of any allele was reduced by  $\geq 50\%$  relative to the other allele after taking account of the relative allelic intensities in paired constitutional DNA.

### KRAS, NRAS and BRAF mutation screening

Analysis of KRAS mutations at codons 12 and 13 was performed using KRAS StripAssay (VienaLab Diagnostics GmbH, Vienna, Austria), following manufacturer's instructions. Exons 3 and 4 of KRAS, exons 2, 3 and 4 of NRAS, and BRAF V600E were assessed by direct automated (Sanger) sequencing. Primers, and PCR and sequencing conditions are available upon request.

### In silico prediction analysis

In silico studies to assess the impact of amino acid substitutions (missense variants) on protein structure, function and evolutionary conservation were performed with SNPs3D, PolyPhen-2, SIFT and CONDEL algorithms (20–23).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary Material is available at HMG online.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank all the people responsible for genetic counseling and genetic testing in hereditary cancer from all involved institutions; the Spanish Epidemiological Polyposis Study, EPIPOLIP; Isabel Català, director of the Cytology Unit at Bellvitge University Hospital; and Amelia Rodríguez and Angel Carracedo from the Institute of Legal Medicine at University of Santiago de Compostela.

*Conflict of Interest statement.* None declared.

## FUNDING

This work was supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (State Secretariat for Research, Development and Innovation) (SAF2012-38885 to L.V.); the Spanish Ministry of Health and the Carlos III Health Institute (FIS PI08/0726 to R.J.); L'Oréal-UNESCO 'For Women in Science'; the Scientific Foundation Asociación Española Contra el Cáncer; and the Government of Catalonia (2009SGR290). L.V. is a recipient of a Ramón y Cajal contract and F.B. of a fellowship both from the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. E.H.-I. and N.S. hold fellowships from the Carlos III Health Institute and C.G. from the Conselleria d'Educació of the Valencian Autonomous Community.

## REFERENCES

- Lichtenstein, P., Holm, N.V., Verkasalo, P.K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., Pukkala, E., Skytthe, A. and Hemminki, K. (2000)

- Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N. Engl. J. Med.*, **343**, 78–85.
- Aaltonen, L., Johns, L., Jarvinen, H., Mecklin, J.P. and Houlston, R. (2007) Explaining the familial colorectal cancer risk associated with mismatch repair (MMR)-deficient and MMR-stable tumors. *Clin. Cancer Res.*, **13**, 356–361.
  - Abdel-Rahman, W.M. and Peltomaki, P. (2008) Lynch syndrome and related familial colorectal cancers. *Crit. Rev. Oncog.*, **14**, 1–22; discussion 23–31.
  - Lynch, H.T., Lynch, P.M., Lanspa, S.J., Snyder, C.L., Lynch, J.F. and Boland, C.R. (2009) Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin. Genet.*, **76**, 1–18.
  - Sieber, O.M., Lipton, L., Crabtree, M., Heinemann, K., Fidalgo, P., Phillips, R.K., Bisgaard, M.L., Orntoft, T.F., Aaltonen, L.A., Hodgson, S.V. *et al.* (2003) Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N. Engl. J. Med.*, **348**, 791–799.
  - Jaeger, E., Leedham, S., Lewis, A., Segditsas, S., Becker, M., Cuadrado, P.R., Davis, H., Kaur, K., Heinemann, K., Howarth, K. *et al.* (2012) Hereditary mixed polyposis syndrome is caused by a 40-kb upstream duplication that leads to increased and ectopic expression of the BMP antagonist GREM1. *Nat. Genet.*, **44**, 699–703.
  - Howe, J.R., Sayed, M.G., Ahmed, A.F., Ringold, J., Larsen-Haidle, J., Merg, A., Mitros, F.A., Vaccaro, C.A., Petersen, G.M., Giardiello, F.M. *et al.* (2004) The prevalence of MADH4 and BMPRIA mutations in juvenile polyposis and absence of BMPR2, BMPR1B, and ACVR1 mutations. *J. Med. Genet.*, **41**, 484–491.
  - Beggs, A.D., Latchford, A.R., Vasen, H.F., Moslein, G., Alonso, A., Aretz, S., Bertario, L., Blanco, I., Bulow, S., Burn, J. *et al.* (2010) Peutz-Jeghers syndrome: a systematic review and recommendations for management. *Gut*, **59**, 975–986.
  - Mester, J. and Eng, C. (2013) When overgrowth bumps into cancer: the PTENopathies. *Am. J. Med. Genet. C Semin. Med. Genet.*, **163**, 114–121.
  - Palles, C., Cazier, J.B., Howarth, K.M., Domingo, E., Jones, A.M., Broderick, P., Kemp, Z., Spain, S.L., Guarino, E., Salguero, I. *et al.* (2013) Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat. Genet.*, **45**, 136–144.
  - Donehower, L.A., Creighton, C.J., Schultz, N., Shinbrot, E., Chang, K., Gunaratne, P.H., Muzny, D., Sander, C., Hamilton, S.R., Gibbs, R.A. *et al.* (2013) MLH1-silenced and non-silenced subgroups of hypermutated colorectal carcinomas have distinct mutational landscapes. *J. Pathol.*, **229**, 99–110.
  - Church, D.N., Briggs, S.E., Palles, C., Domingo, E., Kearsey, S.J., Grimes, J.M., Gorman, M., Martin, L., Howarth, K.M., Hodgson, S.V. *et al.* (2013) DNA polymerase epsilon and delta exonuclease domain mutations in endometrial cancer. *Hum. Mol. Genet.*, **22**, 2820–2828.
  - Briggs, S. and Tomlinson, I. (2013) Germline and somatic polymerase epsilon and delta mutations define a new class of hypermutated colorectal and endometrial cancers. *J. Pathol.*, **230**, 148–153.
  - Murphy, K., Darmawan, H., Schultz, A., Fidalgo da Silva, E. and Reha-Krantz, L.J. (2006) A method to select for mutator DNA polymerase deltas in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome*, **49**, 403–410.
  - Smith, C.G., Naven, M., Harris, R., Colley, J., West, H., Li, N., Liu, Y., Adams, R., Maughan, T.S., Nichols, L. *et al.* (2013) Exome resequencing identifies potential tumor-suppressor genes that predispose to colorectal cancer. *Hum. Mutat.*, **34**, 1026–1034.
  - Hes, F.J., Nielsen, M., Bik, E.C., Konvalinka, D., Wijnen, J.T., Bakker, E., Vasen, H.F., Breuning, M.H. and Tops, C.M. (2008) Somatic APC mosaicism: an underestimated cause of polyposis coli. *Gut*, **57**, 71–76.
  - Kirk, R. (2013) Genetics: new classification for endometrial cancer puts genes in POLE position. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, **10**, 304.
  - Gomez-Fernandez, N., Castellvi-Bel, S., Fernandez-Rozadilla, C., Balaguer, F., Munoz, J., Madrigal, I., Mila, M., Grana, B., Vega, A., Castells, A. *et al.* (2009) Molecular analysis of the APC and MUTYH genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations? *BMC Med. Genet.*, **10**, 57.
  - Guarinos, C., Sanchez-Fortun, C., Rodriguez-Soler, M., Perez-Carbonell, L., Egoavil, C., Juarez, M., Serradesanferm, A., Bujanda, L., Fernandez-Banares, F., Cubiella, J. *et al.* (2013) Clinical subtypes and molecular characteristics of serrated polyposis syndrome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.*, **11**, 705–711; quiz e746.

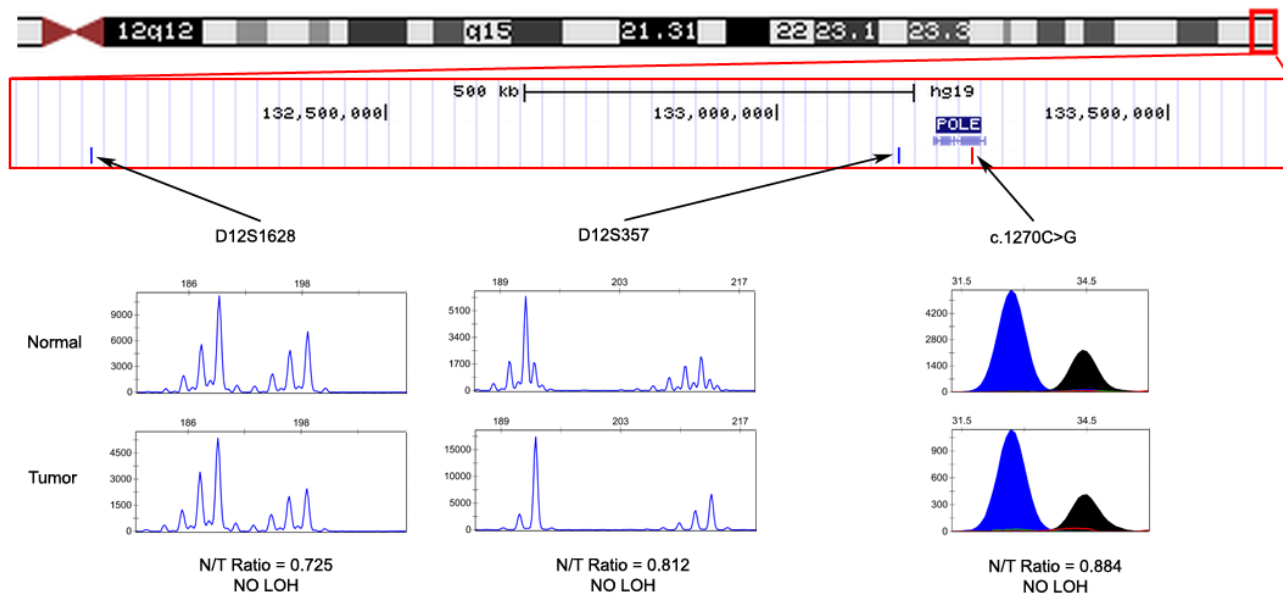
20. Yue, P. and Moulton, J. (2006) Identification and analysis of deleterious human SNPs. *J. Mol. Biol.*, **356**, 1263–1274.
21. Adzhubei, I.A., Schmidt, S., Peshkin, L., Ramensky, V.E., Gerasimova, A., Bork, P., Kondrashov, A.S. and Sunyaev, S.R. (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods*, **7**, 248–249.
22. Ng, P.C. and Henikoff, S. (2002) Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. *Genome Res.*, **12**, 436–446.
23. Gonzalez-Perez, A. and Lopez-Bigas, N. (2011) Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel. *Am. J. Hum. Genet.*, **88**, 440–449.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

**Suppl. Table 1.** Primers and PCR conditions.

	Forward Primer (5'-3')	Reverse Primer (5'-3')	Amplicon size	Annealing temperature	Series
<i>POLE</i> _exon 13	CATCCTGGCTTCTGTTCTCA	GTGGCCATCTGGATGTGTG	223	60°C	No.2
<i>POLD1</i> _exon 11	GTGTGTCCCTGTCCTTGGAA	GTCAGAGGTTGGGGTGAGAG	217	60°C	No.2
<i>POLE</i> _L424V	GGTGCCTGTTAGGAACCTGC	CCGCACACACAGTAAGGAGA	449	57°C	No.1
<i>POLD1</i> _S478N	GGAGTACAAGCTCCGCTCCT	GAAAAAGTGGGCGTCAGGTA	250	57°C	No.1
<b>SNaPshot</b>					
<i>POLE</i> _L424V_LOH	TTACCTTCTGTGGGCAGTC	TAGCTCCACGGGATCATAGC	73	54°C	
SNaPshot extension	TTCTGTGGGCAGTCATAAT	-	-	-	

**Suppl. Figure 1.** Absence of LOH at *POLE* in the colon tumor developed by the *POLE* L424V mutation carrier. LOH results using two informative microsatellites, D12S1628 and D12S357, and the mutation, assessed by SNaPshot, are shown.



## **ARTÍCULO ANEXO 4**

### **Exome sequencing identifies *MUTYH* mutations in a family with an atypical phenotype.**

Nuria Seguí, Matilde Navarro, Marta Pineda, Nicole Köger, **Fernando Bellido**, Sara González, Olga Campos, Silvia Iglesias, Rafael Valdés-Mas, Adriana López-Doriga, Marta Gut, Ignacio Blanco, Conxi Lázaro, Gabriel Capellá, Xose S. Puente, Guido Plotz, Laura Valle.

Gut. 2015 Feb;64(2):355-6. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307084.

#### **Resumen:**

La causa de la agregación de CCR en una familia Ámsterdam I con seis miembros afectados de CCR sin poliposis no pudo identificarse en los análisis genéticos de rutina. Se planteó la secuenciación de exomas completos en 4 familiares afectados de CCR y un individuo sano de edad avanzada sin historia familiar de CCR. Como resultado, se identificó la mutación patogénica *MUTYH*, c.1147delC (p.Ala385Profs\*23) en todos los afectados de CCR. Además, en los tres miembros afectados de la segunda generación que fueron analizados también se encontró la variante *MUTYH* c.43A>G (p.Met15Val), la cual inactiva el codón de inicio de las isoformas nucleares  $\beta$  y  $\gamma$  de este gen, con funciones especialmente relevantes en colon. De esta manera, la agregación de CCR presente en la familia quedó explicada en base a la presencia de mutaciones en *MUTYH*. El CCR presente en la primera generación se explicaría en base a un modelo haploinsuficiente, probablemente en conjunción con el efecto de variantes de riesgo bajo o moderado al CCR. El patrón de herencia aparentemente autosómico dominante observado en la familia, así como la ausencia o escasez de pólipos y la presencia de un tumor con inestabilidad de microsatélites había conllevado a no considerar inicialmente a *MUTYH* como una causa probable de la agregación de CCR familiar. Sin embargo, debido a que los fenotipos asociados a mutaciones en este gen han sido frecuentemente definidos en base a portadores identificados en series de casos polipósicos, es posible que la frecuencia de fenotipos tales como el de la familia estudiada haya sido infra-estimada. Por ello, en base a nuestro hallazgo, se recomienda considerar el análisis en tumores de CCR de la mutación *KRAS* c.34G>T, generalmente ligada a fallos en *MUTYH* y muy infrecuente en otros tipos de CCR. Esta pauta sería especialmente recomendable para familias con patrones de herencia anómalos y/o presencia de anticipación en la edad de aparición del CCR en la generación más joven. Esta estrategia podrá ayudar a identificar a *MUTYH* como causa genética de la agregación de CCR en familias que, a día de hoy, no han podido ser explicadas en base a mutaciones presentes en otros genes de predisposición al CCR.





## Exome sequencing identifies *MUTYH* mutations in a family with colorectal cancer and an atypical phenotype

Ma *et al*<sup>1</sup> comprehensively assessed the association of previously reported genetic variants with colorectal cancer (CRC) risk. The meta-analyses revealed strong evidence for association with rare *MUTYH* variants, even when excluding cases with *MUTYH*-associated polyposis. An article by Nieuwenhuis *et al*<sup>2</sup> accurately defined the phenotypical features of *MUTYH*-associated polyposis. However, the study was performed on clinic-based series ascertained based on the inheritance model or the presence of polyps, which may miss additional phenotypes relevant to improve the disease characterisation and therefore, its genetic diagnosis. To illustrate this, we report a family with a clinical phenotype that resembled Lynch syndrome but was caused by *MUTYH* mutations.

To identify novel hereditary CRC genes, we studied an Amsterdam I family (hereditary non-polyposis CRC) with no mutations in the DNA mismatch repair

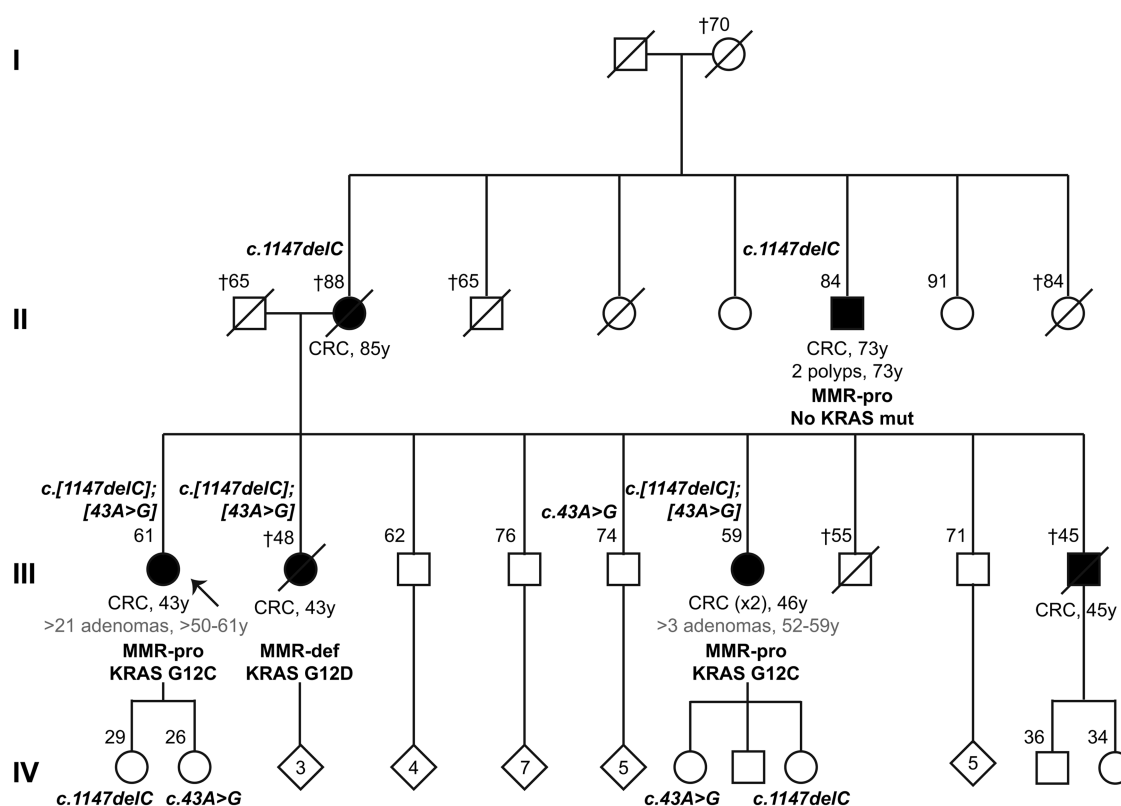
(MMR) genes (figure 1, table 1). By exome sequencing performed on four cancer-affected (II.2, II.6, III.1 and III.6) and one cancer-free (III.5) family members, we identified a total of 11 unreported or rare heterozygous variants present in the cancer-affected individuals (see online supplementary table S1). One of them was *MUTYH* c.1147delC (p. Ala385Profs\*23) (NM\_001128425.1), an European recurrent mutation.<sup>3</sup> Cancer-affected individuals of the third generation also carried a novel *MUTYH* variant: c.43A>G (p.Met15Val). The presence of biallelic *MUTYH* mutations in II.2 and II.6 that could explain the pseudodominant transmission was discarded.

The functional studies performed for c.43A>G are described in online supplementary material. The variant inactivates the start codon of the two transcripts encoding the nuclear *MUTYH* isoforms ( $\beta$  and  $\gamma$ ), highly relevant in ascending colon,<sup>4</sup> the location of  $\geq$ five tumours developed in the family.

*KRAS* c.34G>T (p.G12C), hallmark of *MUTYH*-associated carcinomas,<sup>5</sup> was present in the tumours developed by two *MUTYH* biallelic mutation carriers but not in the tumour developed by II.6,

carrier of only c.1147delC. The MMR-deficient tumour developed by a *MUTYH* biallelic mutation carrier had a transition in the same *KRAS* codon; c.35G>A (p.G12D) (table 1).

The features of this family suggest that the selection criteria proposed for *MUTYH* testing,<sup>6</sup> might fail to detect a number of mutated families due to infrequent phenotypes. First, *MUTYH* heterozygous mutations may, probably in the presence of other cancer risk factors, provide an increased risk of developing cancer in heterozygous carriers,<sup>5 7</sup> and thereby disguise the *MUTYH* recessive inheritance to look like autosomal-dominant. One should be suspicious when an extreme anticipation in the age of cancer onset is observed between two affected generations. Second, absence or scarcity of polyps, even at relatively advanced ages (early 50 s) and with a prior CRC diagnosis, can occur in biallelic mutation carriers. When this occurs in several cancer-affected mutation carriers within the same family it can lead to a misdiagnosis of hereditary non-polyposis CRC. Third, the presence of MMR-deficient tumours should not be an exclusion criterion for *MUTYH* genetic screening.<sup>5</sup> Finally, as previously



**Figure 1** Family pedigree. Ages at information gathering or at death, when available, are indicated on the top left corner of each individual's symbol. Germline *MUTYH* mutations identified are indicated on the top left corner (above the age). Tumour *KRAS* mutations in codon 12 are indicated below the CRC and/or polyposis diagnosis information. In grey, number of adenomas identified at follow-up screenings. Filled symbol, CRC; numbers within the symbols, number of children; arrow, index case. CRC, colorectal cancer; y, years at cancer or polyposis diagnosis; MMR-pro, DNA mismatch repair proficiency in the tumour; MMR-def, DNA mismatch repair deficiency in the tumour.

**Table 1** Characteristics of the tumours developed by family members and information on the number of polyps detected at diagnosis and at follow-up

Family member	MUTYH mutation	Age at CRC diagnosis	Tumour location	Stage	MMR status	KRAS mutation (codon 12)	Polyp no. at diagnosis and Ams I classification	Cumulative no. polyps at follow-up (age)
II.2	c.1147delC	85	Colon	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	Deceased
II.6	c.1147delC	73	Cecum	pT3pN0pM0	MMR-pro	No	2	No follow-up
III.1	c.[1147delC]; [43A>G]	43	Right colon	pT3pN0pM0	MMR-pro	c.34G>T (p.G12C)	0	n~34 (>50–61 years)
III.2	c.[1147delC]; [43A>G]	43	Right colon	pT3pN2pM0	MMR-def	c.35G>A (p.G12D)	0	Deceased
III.6 (a)	c.[1147delC]; [43A>G]	46	Right colon	pT3pN0pM0	MMR-pro	c.34G>T (p.G12C)	0	n=7 (52–59 years)
III.6 (b)	c.[1147delC]; [43A>G]	46	Right colon	pTis	n.a.	n.a.		
III.9	n.a.	45	Colon	Disseminated	n.a.	n.a.	n.a.	Deceased

Ams I, Amsterdam I; CRC, colorectal cancer; MMR, DNA mismatch repair; MMR-def, MMR deficient; MMR-pro, MMR proficient; n.a., not available information.

proposed, somatic *KRAS* codon 12 analysis might help select patients with CRC eligible for *MUTYH* testing,<sup>8,9</sup> regardless of the presence of polyps or even in absence of a clear recessive pattern of inheritance.

The registry of colonoscopy follow-up results in family members of genetically uncharacterised families is key to, in cryptic polyposis cases, finally redirect the hereditary cancer diagnosis to right gene tests. In the studied family, no polyps had been detected at CRC diagnosis and at genetic counselling in any of the three *MUTYH* compound heterozygotes, however, several years later a total of 34 and 7 polyps (21 and 3 adenomas, respectively) were reported in two of them.

Targeted next generation sequencing using comprehensive panels of genes applied to routine genetic testing of familial cancers will overcome the problem of overlapping phenotypes and complex patterns of inheritance.

Nuria Seguí,<sup>1</sup> Matilde Navarro,<sup>1</sup> Marta Pineda,<sup>1</sup> Nicole Köger,<sup>2</sup> Fernando Bellido,<sup>1</sup> Sara González,<sup>1</sup> Olga Campos,<sup>1</sup> Silvia Iglesias,<sup>1</sup> Rafael Valdés-Mas,<sup>3</sup> Adriana López-Doriga,<sup>4</sup> Marta Gut,<sup>5</sup> Ignacio Blanco,<sup>1</sup> Conxi Lázaro,<sup>1</sup> Gabriel Capellá,<sup>1</sup> Xose S Puente,<sup>3</sup> Guido Plotz,<sup>2</sup> Laura Valle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, Hospitalet de Llobregat, Spain

<sup>2</sup>Biomedical Research Laboratory, Medizinische Klinik 1, Universitätsklinikum Frankfurt, Frankfurt, Germany

<sup>3</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Instituto Universitario de Oncología, Universidad de Oviedo, Oviedo, Spain

<sup>4</sup>Unit of Biomarkers and Susceptibility, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL and CIBERESP, Hospitalet de Llobregat, Spain

<sup>5</sup>Centro Nacional de Análisis Genómico, Fundació Parc Científic de Barcelona, Barcelona, Spain

**Correspondence to** Dr Laura Valle, Hereditary Cancer Program, Catalan Institute of Oncology, IDIBELL, Av. Gran Via 199-203, Hospitalet de Llobregat 08908, Spain; lvalle@iconcologia.net and to Dr Guido Plotz, Medizinische Klinik 1, Biomedizinisches Forschungslabor, Haus 11, Theodor-Stern-Kai 7, Universitätsklinikum Frankfurt, Frankfurt 60590, Germany; plotz@med.uni-frankfurt.de

LV and GP contributed equally to this work.

**Contributors** LV, GC, CL and GP conceived and designed the study and experiments. MN, MP, IB, OC, SG, CL, GC and LV collected data, performed genetic analyses, and provided samples and clinical data. NS, MG, FB, NK, OC, GP and LV performed the experiments and analysed the results. XSP, RV-M and AL-D analysed the next-gen sequencing data. LV and GP wrote the manuscript. All authors critically reviewed the manuscript and provided final approval.

**Funding** This work was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (State Secretariat for Research, Development and Innovation) (grants SAF2012-38885 and SAF2010-21165 to LV and XSP, Ramón y Cajal contract to LV, fellowship to FB, and RTICC networks RD12/0036/0031 and RD12/0036/0008); the Deutsche Krebshilfe (grant 110799 to GP); the Carlos III Health Institute (fellowship to NS); L'Oréal-UNESCO "For Women in Science"; the Scientific Foundation Asociación Española Contra el Cáncer; and the Government of Catalonia (grant 2009SGR290).

**Ethics approval** IDIBELL Ethics Committee.

**Provenance and peer review** Not commissioned; internally peer reviewed.

► Additional material is published online only. To view please visit the journal online (<http://dx.doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307084>).



CrossMark

**To cite** Seguí N, Navarro M, Pineda M, *et al.* *Gut* 2015;**64**:355–356.

Received 20 February 2014

Accepted 10 March 2014

Published Online First 1 April 2014

*Gut* 2015;**64**:355–356.

doi:10.1136/gutjnl-2014-307084

## REFERENCES

- 1 Ma X, Zhang B, Zheng W. Genetic variants associated with colorectal cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Gut* 2014;**63**:326–36.
- 2 Nieuwenhuis MH, Vogt S, Jones N, *et al.* Evidence for accelerated colorectal adenoma—carcinoma progression in *MUTYH*-associated polyposis? *Gut* 2012;**61**:734–8.
- 3 Quesada V, Conde L, Villamor N, *et al.* Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2011;**44**:47–52.
- 4 Plotz G, Casper M, Raedle J, *et al.* *MUTYH* gene expression and alternative splicing in controls and polyposis patients. *Hum Mutat* 2012;**33**:1067–74.
- 5 Nielsen M, Morreau H, Vasen HF, *et al.* *MUTYH*-associated polyposis (MAP). *Crit Rev Oncol Hematol* 2011;**79**:1–16.
- 6 Brand R, Nielsen M, Lynch H, *et al.* *MUTYH*-associated polyposis. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, *et al.*, eds. *GeneReviews™ [Internet]*. Seattle, WA: University of Washington, Seattle: 1993–2014.
- 7 Farrington SM, Tenesa A, Barnetson R, *et al.* Germline susceptibility to colorectal cancer due to base-excision repair gene defects. *Am J Hum Genet* 2005;**77**:112–19.
- 8 van Puijnenbroek M, Nielsen M, Tops CM, *et al.* Identification of patients with (atypical) *MUTYH*-associated polyposis by *KRAS2* c.34G>T prescreening followed by *MUTYH* hotspot analysis in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Clin Cancer Res* 2008;**14**:139–42.
- 9 Guarinos C, Juarez M, Egoavil CM, *et al.* Prevalence and characteristics of *MUTYH*-associated polyposis in patients with multiple adenomatous and serrated polyps. *Clin Cancer Res* 2014;**20**:1158–68.

## **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

### **RESULTS**

#### ***MUTYH* c.43A>G (p.Met15Val) functional analyses**

The *in silico* algorithm NNSplice0.9 predicted no splicing alterations. The potential impact of this novel variant on the function of the protein was assessed using different prediction servers PolyPhen-2, SIFT and Condel; all of them predicting damaging functional effects for p.Met15Val. This variant not only affects an evolutionary conserved methionine of  $\alpha$  isoforms (mitochondrial), it also inactivates the start codon of the two transcripts encoding the nuclear *MUTYH* isoforms ( $\beta$  and  $\gamma$ ).

To assess the functional effect of c.43A>G, we first tested if it affects the mRNA expression or stability of *MUTYH* transcripts, using qPCRs with RNA extracted from lymphocytes of two controls, three c.1147delC heterozygous carriers (IV.1, IV.24, and an unrelated carrier), one c.43A>G carrier (IV.2), and two c.[1147delC];[43A>G] compound heterozygotes (III.1 and III.6). This analysis revealed large inter-individual variation in *MUTYH* expression, overall and isoform-specific. When compared to controls and c.1147delC carriers, where a specific downexpression of the nuclear transcripts was not expected, the  $\beta$  and  $\gamma$  mRNA expression variability (reduction) observed in c.43A>G carriers might fall within the range of inter-individual variation (Suppl. Figure 1).

It has been previously observed that the expression of *MUTYH* nuclear transcripts is much lower in lymphocytes than in intestinal cells.[1] Therefore, In order to approximate the conditions that occur in colon, lymphocytes from three controls, one c.1147delC carrier (IV.24), one c.43A>G carrier (IV.2) and one c.[1147delC];[43A>G] compound heterozygous carrier (III.1) were cultured for 7 days to induce the expression of *MUTYH* nuclear isoforms. The qPCR results confirmed the increase of *MUTYH*  $\beta$  and  $\gamma$  transcripts (Suppl. Figure 2A), probably triggered by growth signals present under culture conditions.[1] A statistically significant reduction in the expression of  $\beta$  and  $\gamma$  transcripts in c.43A>G carriers compared to the wildtype controls and the c.1147delC carrier was detected (Suppl. Figure 2B). Nevertheless, this expression reduction does not represent the complete loss of mRNA expression of the c.43A>G allele. Transcript-specific reverse transcription (RT)-PCR and sequencing confirmed these results,

showing subtle or no mRNA expression reduction of nuclear isoforms in the c.43G allele (Suppl. Figure 3). Moreover, isoform-specific qPCRs performed in cultured lymphocytes treated with puromycin, which blocks the nonsense-mediated mRNA decay (NMD) mechanism, did not show any difference compared to untreated lymphocytes of c.43A>G carriers (data not shown).

Regarding protein effects, the genetic change c.43A>G leads to  $\beta$  and  $\gamma$  transcripts where the first in-frame translational start codon is located in exon 4, i.e. 92 aminoacids (276 bp) downstream of the original start codon. It is identical to the postulated protein translated from mRNA BAA89339. This protein, however, has no relevant functional elements since a highly conserved loop that binds the misincorporated adenine during the repair process is missing, and it is extremely unstable.[1] In summary, the evidence herein gathered suggests that the main functional effect of the c.43A>G variant probably depends on the disruption of the translation start of functional nuclear ( $\beta$  and  $\gamma$ ) *MUTYH* isoforms.

## **METHODS**

### **Whole exome capture and massive parallel sequencing**

Library preparation for capturing selected DNA regions was performed according to Agilent's SureSelect protocol for Illumina paired-end sequencing (SureSelect XT Human All Exon V3, 50Mb, Agilent Technologies, Santa Clara, CA). In brief, 3.0  $\mu$ g of genomic DNA were sheared on a Covaris™ E220 instrument. Fragment size (150-300bp) and quantity were checked with the Agilent 2100 Bioanalyzer 7500 chip. Fragmented DNA was end-repaired, adenylated and ligated to Agilent indexing-specific paired-end adaptors. The DNA with adaptor-modified ends was PCR amplified (6 cycles, Herculase II fusion DNA polymerase) with SureSelect Primer and SureSelect Pre-capture Reverse PCR primers, quality controlled on the DNA 7500 assay for the library size range of 250 to 450 bp, and hybridized for 24hrs at 65°C (Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler, Life Technologies, Carlsbad, CA). The hybridization mix was washed in the presence of magnetic beads (Dynabeads MyOne Streptavidin T1, Life Technologies). The eluted fraction was PCR amplified (16 cycles) in order to add the index tags using SureSelectXT Indexes for Illumina. The final library size and concentration was determined on Agilent 2100 Bioanalyzer 7500 chip and sequenced on

an Illumina HiSeq 2000 platform with paired end run of 2x76bp following the manufacturer's protocol. Images generated by Illumina HiSeq 2000 were processed using the manufacturer's software to generate FASTQ sequence files.

### **Sequencing data analysis**

Reads were aligned to the reference genome (GRCh37) using Burrows-Wheeler analysis (BWA) with the sample option,[2] and a BAM file was generated using SAMtools.[3] PCR-duplicates were removed using SAMtools and custom scripts, and initial SNP calling was performed using a combination of SAMtools and Sidrón as previously described.[4] Common variants, defined as those present in dbSNP135 with a minor allele frequency  $\geq 1\%$ , were filtered out.

### **In silico functional prediction of genetic variants**

Protein damage prediction of missense genetic variants was performed by using the *in silico* algorithms PolyPhen-2,[5] SIFT,[6] and Condel.[7] Possible alterations of the splice sites were evaluated using NNSplice0.9.[8]

### **qPCR quantification of MUTYH**

Reverse transcription and qPCR were used to quantify the three different transcript forms of *MUTYH* according to the MIQE guidelines, as previously described.[1] *MUTYH* c.43A>G sequence signals were assessed by specifically amplifying the three different *MUTYH* transcripts with the following primers:  $\alpha$ -transcript: 5'-ctcctcgtggctagttcagg (F);  $\beta$ -transcript: 5'-ctcgcggcggaacgcgg (F);  $\gamma$ -transcript: 5'-taattgcctattggcctgtg (F); and 5'-catcacaggcagaaggc (R) for all transcripts. PCRs were performed according to standard conditions. Purified PCR products were sequenced with the reverse primer using BigDye v3.1, and analyzed on an ABI 3130XL sequencer.

### **Direct automated sequencing**

For segregation analysis, exons 2 and 12 of *MUTYH* and their corresponding flanking regions were sequenced using a standard protocol for automated direct Sanger sequencing. Codons 12 and 13 of the *KRAS* gene were amplified and sequenced in DNA extracted from FFPE tumor samples. Primer sequences and PCR conditions are available upon request. Sequencing was performed on an ABI Sequencer 3730 and data analyzed using Mutation Surveyor v.3.10.

## REFERENCES

1. Plotz G, Casper M, Raedle J, *et al.* MUTYH gene expression and alternative splicing in controls and polyposis patients. *Hum Mutat* 2012;**33**:1067-74.
2. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* 2009;**25**:1754-60.
3. Li H, Handsaker B, Wysoker A, *et al.* The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 2009;**25**:2078-9.
4. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, *et al.* Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011;**475**:101-5.
5. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods* 2010;**7**:248-9.
6. Ng PC, Henikoff S. Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. *Genome Res* 2002;**12**:436-46.
7. Gonzalez-Perez A, Lopez-Bigas N. Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel. *Am J Hum Genet* 2011;**88**:440-9.
8. Reese MG, Eeckman FH, Kulp D, *et al.* Improved splice site detection in Genie. *J Comput Biol* 1997;**4**:311-23.

## TABLES

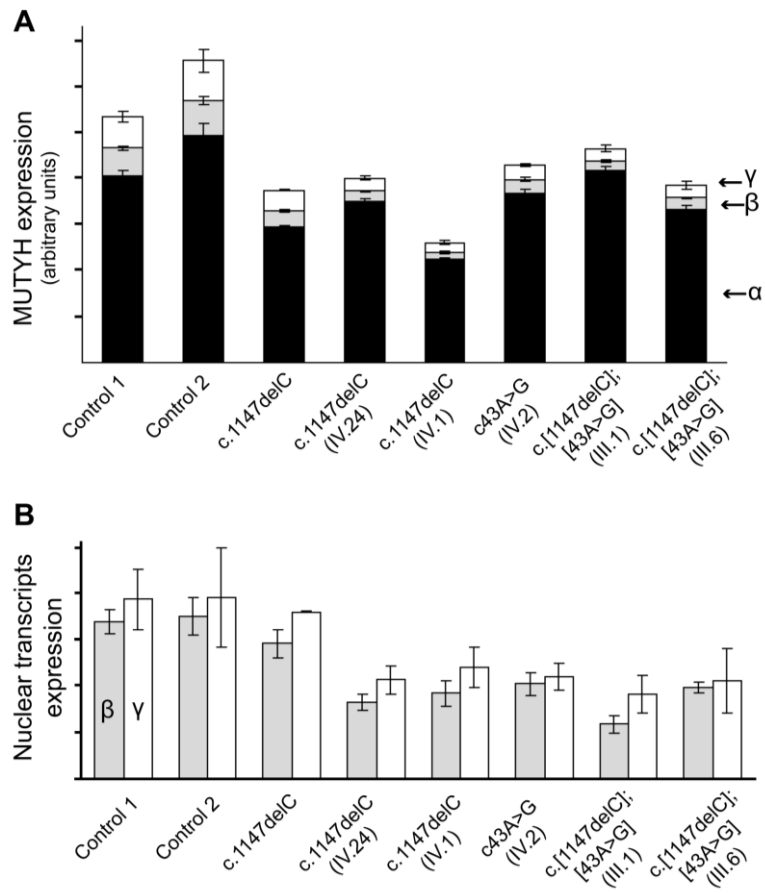
**Supplementary Table 1.** Rare or unreported genetic variants identified by exome sequencing shared by the studied cancer-affected family members.

Gene	Nucleotide change	Aminoacid change	Location	Protein prediction (score)			Splice site prediction
				PolyPhen-2 (HumDiv / HumVar)	SIFT	Condel	
ANXA6	c.934G>A	p.Glu312Lys	Exon 13	Probably damaging (0,964) / (0,790)	Damaging (0)	Deleterious (0,842)	No change
*COL6A3	c.8846C>T	p.Pro2949Leu	Exon 40	Probably damaging (1) / (0,996)	NA	Neutral (0)	No change
C22orf33	c.356C>T	p.Thr119Met	Exon 4	Possibly damaging (0,648) / Benign (0,075)	Tolerated (0,1)	Neutral (0,314)	No change
DDIT4L	c.370A>T	p.Ile124Phe	Exon 3	Probably damaging (0,993) / (0,929)	Damaging (0,01)	Deleterious (0,746)	No change
MUTYH	c.1147delC	p.Ala385Profs*23	Exon12	-	-	-	-
*NRP2	c.1198G>A	p.Ala400Thr	Exon 8	Benign (0) / (0)	Tolerated (0,26)	Neutral (0,007)	No change
PRSS33	c.89A>G	p.Gln30Arg	Exon 3	Benign (0,002) / (0,005)	Tolerated (0,62)	Neutral (0,350)	No change
RPL19	c.179G>A	p.Arg60Gln	Exon 3	Benign (0,118) / (0,062)	Damaging (0)	Neutral (0,007)	No change
SLC8A3	c.876G>A	p.Met292Ile	Exon 2	Benign (0,021) / (0,016)	Damaging (0,015)	Neutral (0,013)	No change
SPPL2C	c.418delC	p.Arg140Alafs*68	Exon 1	-	-	-	-
UGT1A6	c.242C>T	p.Pro81Leu	Exon 1	Benign (0,063) / (0,052)	Tolerated (0,06)	Neutral (0,378)	No change

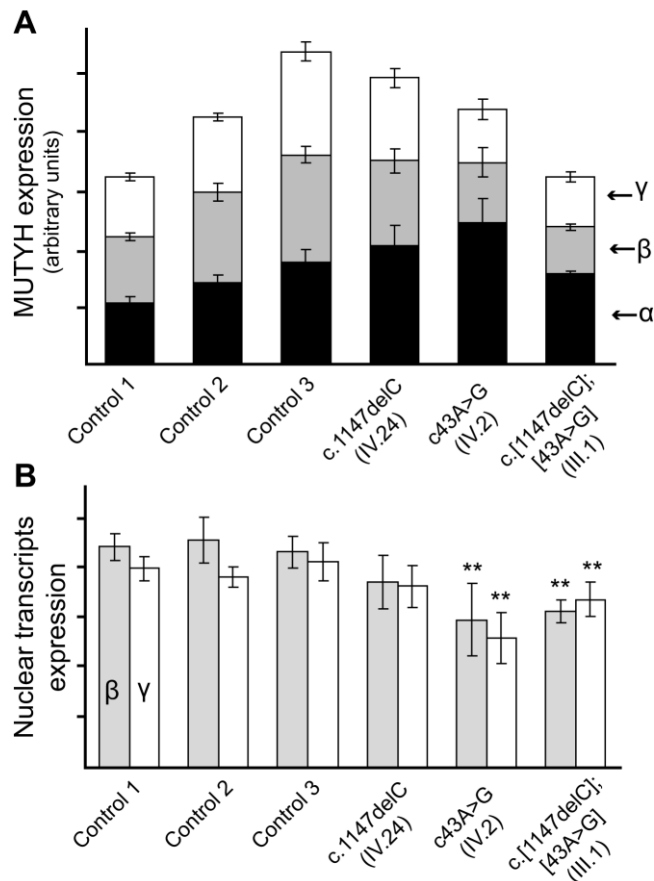
\* variants reported at the NHLBI Exome Sequencing Project (Exome Variant Server) with minor allele frequencies (MAF) of 0.012 in individuals of European origin.



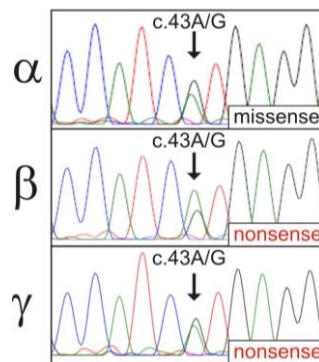
## FIGURES



**Suppl. Figure 1.** qPCR quantification of *MUTYH*. Overall (A) and transcript-specific (A and B) mRNA expression quantification was performed in lymphocyte cDNA from two wildtype controls, three c.1147delC, one c.43A>G, and two c.[1147delC];[43A>G] compound heterozygous carriers.



**Suppl. Figure 2.** qPCR amplification of *MUTYH* (overall and isoform-specific expression). **A)** Overall and relative mRNA expression of the  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$  transcripts quantified with transcript-specific qPCR in cDNA obtained from cultured (non-immortalized) lymphocytes of three wildtype controls, one c.1147delC, one c.43A>G and one c.[1147delC];[43A>G] mutation carriers. **B)** Expression of the nuclear transcripts  $\beta$  and  $\gamma$ . The expression of  $\beta$  and  $\gamma$  transcripts in the c.43A>G carrier and the c.[1147delC];[43A>G] compound heterozygote is significantly lower ( $p < 0.01$ ) than in controls and c.1147delC carrier. The comparisons were performed using t-test. Bars indicate the standard errors of the means.



**Suppl. Figure 3.** Sequences of the different *MUTYH* transcripts in a c.43A>G mutation carrier (RNA extracted from cultured lymphocytes) show the relatively weak reduction of RNA expression of the mutated allele in the nuclear transcripts ( $\beta$  and  $\gamma$ ) compared to its expression in the  $\alpha$  transcript.



# **ANEXO 2**

# **Informes del Director**

---



## INFORME DEL DIRECTOR SOBRE EL FACTOR DE IMPACTO DE LOS ARTÍCULOS PUBLICADOS Y GRADO DE PARTICIPACIÓN DEL DOCTORANDO.

En calidad de directora de la tesis doctoral "Caracterización molecular y búsqueda de causas genéticas del cáncer colorrectal hereditario no polipósico" realizada por Fernando Bellido Molías, hago constar que el doctorando ha participado de forma activa en el diseño, realización experimental, análisis de los resultados y discusión, elaboración y preparación de los manuscritos finales de los estudios incluidos en la presente tesis. A continuación, se indica de forma específica la contribución del doctorando en cada uno de dichos estudios, así como el factor de impacto de las revistas en las que se han publicado los resultados obtenidos.

### ARTÍCULO 1

#### **Genetic variant in the telomerase gene modifies cancer risk in Lynch syndrome**

**Fernando Bellido**, Elisabet Guinó, Shantie Jagmohan-Changur, Nuria Seguí, Marta Pineda, Matilde Navarro, Conxi Lázaro, Ignacio Blanco, Hans FA Vasen, Víctor Moreno, Gabriel Capellá, Juul T Wijnen y Laura Valle.

European Journal of Human Genetics 21(5):511-6; 2013. doi: 10.1038/ejhg.2012.204.

**Factor de impacto (2013 JCR Science Edition):** 4,225

**Contribución del doctorando:** Selección, preparación y genotipado de las muestras analizadas en el estudio. Recopilación de resultados y preparación para su análisis estadístico posterior.

### ARTÍCULO 2

#### **Comprehensive molecular characterisation of hereditary non-polyposis colorectal tumours with mismatch repair proficiency**

**Fernando Bellido**, Marta Pineda, Rebeca Sanz-Pamplona, Matilde Navarro, Marga Nadal, Conxi Lázaro, Ignacio Blanco, Víctor Moreno, Gabriel Capellá y Laura Valle

European Journal of Cancer (2014) 50, 1964–1972. doi: 10.1016/j.ejca.2014.04.022.

**Factor de impacto (2013 JCR Science Edition):** 4,819

**Contribución del doctorando:** Selección y preparación de muestras, extracción de ADN tumoral de bloques de parafina. Preparación y envío de muestras para la realización del *array* de número de copia e interpretación y análisis informático de los datos generados. Realización de hibridaciones *in situ* con sondas

fluorescentes en cortes de parafina tumorales como técnica de validación de los resultados del *array*. Estudio de mutaciones en los genes *KRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* y *TP53* utilizando ensayos KASPar en la plataforma nanofluídica Fluidigm y secuenciación Sanger, estudio del fenotipo metilador de islas CpG (CIMP) mediante *Methylation-specific (MS)-MLPA* y análisis de los resultados generados. Participación en la escritura del manuscrito.

### ARTÍCULO 3

***POLE* and *POLD1* mutations in 529 kindreds with familial colorectal cancer and/or polyposis, review of reported cases and recommendations for genetic testing and surveillance**

**Fernando Bellido**, Marta Pineda, Gemma Aiza, Rafael Valdés-Mas, Matilde Navarro, Diana A. Puente, Tirso Pons, Sara González, Silvia Iglesias, Esther Darder, Virginia Piñol, José Luís Soto, Alfonso Valencia, Ignacio Blanco, Miguel Urioste, Joan Brunet, Conxi Lázaro, Gabriel Capellá, Xose S. Puente, Laura Valle.

Aceptado en *Genetics in Medicine*, pendiente de publicación.

**Factor de impacto (2013 JCR Science Edition):** 6,435

**Contribución del doctorando:** Diseño y realización del estudio de la pérdida de heterocigosidad en tumores portadores de mutaciones en *POLE* y *POLD1* mediante SNaPshot y análisis de microsatélites. Revisión del manuscrito.

### ARTÍCULO 4: Manuscrito en preparación

**Exome sequencing identifies inherited mutations in *BRF1* and *BARD1* as probable causes of hereditary non-polyposis colorectal cancer.**

**Fernando Bellido**, et al.

**Contribución del doctorando:** Participación en la fase final de selección y cribado de las variantes obtenidas tras la secuenciación de exomas. Realización de los estudios de cosegregación familiar y pérdida de heterocigosidad en tumor (por medio del análisis de microsatélites, secuenciación directa, SNaPshot o reacciones de inmunohistoquímica). Realización de predicciones *in silico* sobre el efecto de las variantes. Comprobación experimental del impacto de los cambios sobre el *splicing* o la expresión del microARN (en los casos que corresponde). Búsqueda bibliográfica de expresión o de impacto en cáncer de los diferentes genes seleccionados. Generación de *pools* o secuenciación directa de casos con CCR familiar para la búsqueda de mutaciones adicionales. Participación en la escritura del manuscrito.

**Otros artículos publicados (ANEXO I)**

**ARTÍCULO 5**

**Telomere length and genetic anticipation in Lynch syndrome**

Nuria Seguí, Marta Pineda, Elisabet Guinó, Ester Borràs, Matilde Navarro, **Fernando Bellido**, Victor Moreno, Conxi Lázaro, Ignacio Blanco, Gabriel Capellá, Laura Valle.

PLoS One 23;8(4):e61286; 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0061286.

**Factor de impacto (2013 JCR Science Edition): 3,534**

**Contribución del doctorando:** Colaboraciones puntuales en la parte experimental del estudio (preparación de muestras y medida telomérica).

**ARTÍCULO 6**

**Longer Telomeres Are Associated with Cancer Risk in MMR-Proficient Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer**

Nuria Seguí, Elisabet Guinó, Marta Pineda, Matilde Navarro, **Fernando Bellido**, Conxi Lázaro, Ignacio Blanco, Victor Moreno, Gabriel Capellá, Laura Valle.

PLoS One 3;9(2):e86063; 2014. doi: 10.1371/journal.pone.0086063.

**Factor de impacto (2013 JCR Science Edition): 3,534**

**Contribución del doctorando:** Colaboraciones puntuales en la parte experimental del estudio (preparación de muestras y medida telomérica).

**ARTÍCULO 7**

**New insights into *POLE* and *POLD1* germline mutations in familial colorectal cancer and polyposis.**

Laura Valle, Eva Hernández-Illán, **Fernando Bellido**, Gemma Aiza, Adela Castillejo, María-Isabel Castillejo, Matilde Navarro, Nuria Seguí, Gardenia Vargas, Carla Guarinos, Miriam Juárez, Xavier Sanjuán, Silvia Iglesias, Cristina Alenda, Cecilia Egoavil, Ángel Segura, María-José Juan, María Rodríguez-Soler, Joan Brunet, Sara González, Rodrigo Jover, Conxi Lázaro, Gabriel Capellá, Marta Pineda, José Luís Soto y Ignacio Blanco.



Human Molecular Genetics, 2014, Vol. 23, No. 13. doi:10.1093/hmg/ddu058.

**Factor de impacto (2013 JCR Science Edition):** 6,677

**Contribución del doctorando:** Evaluación de la cosegregación de la mutación POLE p.L424V en la familia (y comprobación de su naturaleza *de novo*). Evaluación de la pérdida de heterocigosidad en tumor para esta misma mutación.

## ARTÍCULO 8

**Exome sequencing identifies *MUTYH* mutations in a family with an atypical phenotype.**

Nuria Seguí, Matilde Navarro, Marta Pineda, Nicole Köger, **Fernando Bellido**, Sara González, Olga Campos, Silvia Iglesias, Rafael Valdés-Mas, Adriana López-Doriga, Marta Gut, Ignacio Blanco, Conxi Lázaro, Gabriel Capellá, Xose S. Puente, Guido Plotz, Laura Valle.

Gut. 2015 Feb;64(2):355-6. doi: 10.1136/gutjnl-2014-307084.

**Factor de impacto (2013 JCR Science Edition):** 13,319

**Contribución del doctorando:** Participación en la preparación de muestras y el genotipado tumoral para el punto caliente de *KRAS* correspondiente al codón 12.

**Atentamente,**

**Laura Valle Velasco**

Investigadora Ramón y Cajal

Programa de cáncer hereditario

Instituto Calatán de Oncología – IDIBELL



