



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Anàlisi de variants en els gens *APC* i *UNC5C* associats a càncer colorectal

Elena Sanchez Cuartielles

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Anàlisi de variants en els gens *APC* i *UNC5C* associats a càncer colorectal

Memòria presentada per
Elena Sánchez Cuartielles

Per optar al Grau de
Doctor per la Universitat de Barcelona

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

Tesi adscrita al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia,
Universitat de Barcelona.

Programa de Doctorat de Genètica.

Tutor: Daniel Raúl Grinberg Vaisman

Gabriel Capellá Munar

Daniel Grinberg Vaisman

Elena Sánchez Cuartielles

Barcelona, setembre de 2015

ÍNDEX



ÍNDIX

ABREVIATURES I ACRÒNIMS	I
INTRODUCCIÓ	1
1. EL CÀNCER	3
2. EL CÒLON	5
3. EL CÀNCER DE CÒLON	7
4. BASE MOLECULAR DE LA TRANSFORMACIÓ DE L'EPITELI COLÒNIC	12
4.1. <i>Via de la inestabilitat cromosòmica o CIN</i>	13
4.2. <i>Via de la inestabilitat de microsatèl·lits</i>	13
4.3. <i>Via del fenotip metilador d'illes CpG</i>	14
5. GEN APC	14
6. FUNCIONS DE LA PROTEÏNA APC.....	17
6.1. <i>Via de senyalització Wnt</i>	18
6.2. <i>Migració i adhesió cel·lular</i>	21
6.3. <i>Control del cicle cel·lular</i>	22
6.4. <i>Apoptosi</i>	23
6.5. <i>Estabilitat cromosòmica</i>	23
7. CÀNCER COLORECTAL HEREDITARI O SÍNDROMES DE PREDISPOSICIÓ HEREDITÀRIA AL CÀNCER COLORECTAL	24
7.1. <i>Càncer hereditari no polipós (HNPCC)</i>	25
7.2. <i>Síndromes Poliposes</i>	29
7.3. <i>Naturalesa molecular de les alteracions en el gen APC</i>	36
7.4. <i>Algoritme diagnòstic de la Poliposi adenomatosa familiar</i>	38
8. AL·LELS DE PENETRÀNCIA MODERADA	39
8.1. Al·lel APC I1307K	40
9. AL·LELS DE BAIXA PENETRÀNCIA	41
10. VARIANTS DE SIGNIFICAT DESCONEGUT (VSD) I LA SEVA CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL.....	43
10.1. <i>Assaig in silico</i>	45
10.2. <i>Assaig a nivell de mRNA</i>	47
10.3. <i>Assaig in vitro amb línies cel·lulars humanes</i>	47
10.4. <i>Estudi d'interacció proteica</i>	50
10.5. <i>Models murins</i>	51

10.6.	<i>Caracterització funcional de mutacions en el gen APC</i>	51
11.	CÀNCER COLORECTAL FAMILIAR DE TIPUS X	52
12.	GEN <i>UNC5C</i>	55
HIPÒTESIS		59
OBJECTIUS		63
MATERIALS I MÈTODES		67
1.	MATERIALS	69
1.1	MOSTRES BIOLÒGIQUES DE MALALTS UTILITZADES	69
1.1.1	<i>Estudi de contribució funcional de l'al·lel I1307K en la progressió tumoral</i>	69
1.1.2	<i>Estudi mutacional del gen UNC5C: Mostres de pacients i informació clínica</i>	69
1.2	LÍNIES CEL·LULARS	70
1.3	VECTORS D'EXPRESSION GÈNICA	71
1.4	ANIMALS I ESTABULARI	72
2.	MÈTODES	72
2.1	GENERACIÓ DELS PLASMIDIS AMB LES DIFERENTS MUTACIONS EN <i>APC</i>	72
2.1.1	<i>Mutagènesis dirigida</i>	72
2.2	TRANSFORMACIÓ I CREIXEMENT DE LES COLÒNIES BACTERIANES	73
2.2.1	<i>Aïllament i purificació del DNA plasmídic</i>	74
2.2.2	<i>Seqüenciació</i>	74
2.3	GENERACIÓ DE TRANSFECTANTS ESTABLES	75
2.4	ESTUDI DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL MITJANÇADA PER B-CATENINA	77
2.4.1	<i>Activitat transcripcional en transfeccions transitòries</i>	78
2.4.2	<i>Activitat transcripcional en transfectants estables</i>	79
2.4.3	<i>Assaig de l'activitat transcripcional</i>	80
2.5	TRANSCRIPCIÓ REVERSA (RT) I PCR QUANTITATIVA (QPCR)	81
2.6	EXTRACCIÓ DE PROTEÏNES	81
2.6.1	<i>Quantificació de proteïnes</i>	81
2.7	ASSAIG WESTERN BLOT/ELECTROFORESIS DE PROTEÏNES PER SDS-PAGE	82
2.7.1	<i>Sistema Mini-PROTEAN</i>	82
2.7.2	<i>Electrotransferència</i>	83
2.7.3	<i>Western Blot</i>	85

2.8	ESTUDI DE LA INTERACCIÓ ENTRE ELS FRAGMENTS DE LA PROTEÏNA APC I LA B-CATENINA AMB BIACORE.	87
2.8.1	Construcció del pGEX-APC-4x15 amb la mutació APC S1028R.....	87
2.8.2	Construcció de pGEX-APC-3x20 amb les mutacions I1307K E1317Q.....	87
2.8.3	Expressió i purificació de proteïnes recombinants en procariotes.....	89
2.9	BIACORE T100.....	91
2.10	EXPERIMENTS <i>IN VIVO</i>	94
2.10.1	Injecció subcutània.....	94
2.10.2	Extracció de DNA de teixit amb Salí.....	94
2.10.3	Seqüenciació del DNA.....	95
2.11	ESTUDI DEL IMPACTE FUNCIONAL DE L'AL·LEL I1307K EN LA PROGRESSIÓ TUMORAL.....	95
2.11.1	Amplificació del DNA.....	96
2.11.2	RNA de teixit normal i de tumor.....	96
2.12	ESTUDI MUTACIONAL DEL GEN <i>UNC5C</i>	97
2.12.1	Seqüenciació automàtica directe.....	98
2.12.2	En l'anàlisi de predicció <i>in silico</i>	98
2.12.3	L'anàlisi de metilació del promotor.....	99
	RESULTATS.....	101
	PART I.....	103
1.	VARIANTS DEL GEN <i>APC</i>.....	103
2.	ESTUDI DE L'ACTIVITAT TRANSCRIPCIONAL MITJANÇADA PER β-CATENINA.....	104
3.	ESTUDI DELS NIVELLS DE B-CATENINA I LA SEVA DISTRIBUCIÓ CEL·LULAR A LES CÈL·LULES SW480 TRANSFECTADES DE FORMA ESTABLE.....	108
4.	ESTUDI DELS NIVELLS D'EXPRESSIONI DELS GENS <i>APC</i>, <i>C-MYC</i> I <i>AXIN2</i>.....	110
4.1.	<i>APC</i>	111
4.2.	<i>C-MYC</i>	112
4.3.	<i>AXINA2</i>	114
5.	ANÀLISIS <i>IN SILICO</i> DE L'EFFECTE EN LA FUNCIÓ I ESTABILITAT DE LES VARIANTS <i>MISSENSE</i> EN LA PROTEÏNA <i>APC</i>.....	116

6. BIACORE T100: ESTUDI DE LA INTERACCIÓ DE B-CATENINA AMB ELS DOMINIS DE LA PROTEÏNA APC.....	119
6.1 FRAGMENTS GST-APC-4X15.....	120
6.2 FRAGMENTS GST-APC-3X20.....	128
7. EXPERIMENTS <i>IN VIVO</i>	133
7.1. DLD-1	133
7.2. SW480	134
8. RESUM DELS EXPERIMENTS DE CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE LES VARIANTS <i>MISSENSE</i> DEL GEN <i>APC</i>.....	138
9. AVALUACIÓ DE L'IMPACTE FUNCIONAL DE L'AL·LEL I1307K EN LA PROGRESSIÓ TUMORAL.....	139
PART II.	141
10. ESTUDI MUTACIONAL DEL GEN <i>UNC5C</i>: GEN CANDIDAT DE PREDISPOSICIÓ A CÀNCER COLORECTAL.....	141
DISCUSSIÓ	153
1. CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE L'AL·LEL I1307K DEL GEN <i>APC</i>	155
2. CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL D'ALTRES VARIANTS <i>MISSENSE</i> DEL GEN <i>APC</i>	166
3. ANÀLISI MUTACIONAL DEL GEN <i>UNC5C</i>	174
CONCLUSIONS.....	177
BIBLIOGRAFIA	181

ABREVIATURES I ACRÒNIMS



ABREVIATURES I ACRÒNIMS

AA:	Aminoàcid
AFAP:	Poliposi adenomatosa familiar atenuada; de l'anglès, <i>Atenuated Familial Adenomatous Polyposis</i>
APC:	de l'anglès, <i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
BER:	de l'anglès, <i>Base Excision Repair</i>
CCR:	Càncer colorectal
CCRF-X:	Càncer colorectal familiar tipus X
cDNA:	DNA complementari; de l'anglès, <i>complementary DNA</i>
CIMP:	via del fenotip metilador d'illes CpG; de l'anglès, <i>The CpG Island Methylator Phenotype</i>
CIN:	inestabilitat cromosòmica; de l'anglès, <i>Chromosome Instability</i>
CTNNB1:	<i>Catenin (cadherin-associated protein), beta-1</i>
DNA:	Àcid desoxiribonucleic; de l'anglès, <i>desyribonucleic acid</i>
DTT:	Ditiotreitòl
ESE:	element exònic activador de l' <i>splicing</i> ; de l'anglès, <i>Exonic Splicing Enhancer</i>
FAP:	Poliposi adenomatosa familiar; de l'anglès, <i>Familial Adenomatous Polyposis</i>
FBS:	de l'anglès, <i>Fetal Bovine Serum</i>
FFPE:	mostres de teixits fixades en formol i incloses en parafina; de l'anglès, <i>Formalin Fixed Paraffin Embedded tissue</i>
FRET:	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
FT:	de l'anglès, <i>Flow-through</i>
GSK3 β :	de l'anglès, <i>Glycogen synthase kinase 3β</i>
GST:	de l'anglès, <i>Glutathione S-transferase</i>
GWAS:	estudis d'associació de tot el genoma, de l'anglès, <i>Genome-wide association study</i>
HNPCC:	càncer colorectal hereditari no associat a poliposis; de l'anglès, <i>Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer</i>
IHQ:	Inmunohistoquímica

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

IPTG:	Isopropil- β -D-tio-galactòsid
ISCS:	cèl·lules multipotents intestinals; de l'anglès, <i>intestinal stem cells</i>
LOH:	pèrdua d'heterozigositat; de l'anglès, <i>Loss of heterozygosity</i>
MAF:	Al·lel de menor freqüència; del anglès, <i>Minor Allele Frequency</i>
MAP:	poliposi associada al gen <i>MUTYH</i> ; de l'anglès, <i>MUTYH Associated Polyposis</i>
MCR:	regió d' <i>APC</i> anomenada de l'anglès, <i>Mutation Cluster Region</i>
MMR:	sistema de reparació de desaparellaments erronis produïts durant la replicació del DNA; de l'anglès, <i>Mismatch repair genes</i>
MLPA:	amplificació dependent de lligasa de múltiples sondes; de l'anglès, <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>
mRNA:	Àcid ribonucleic missatger; de l'anglès, <i>messenger RNA</i>
MSI:	inestabilitat dels microsatèl·lits; de l'anglès, <i>Microsatellite Instability</i>
MSS:	sense inestabilitat de microsatèl·lits; de l'anglès, <i>Microsatellite Stable</i>
NES:	senyal d'exportació nuclear; de l'anglès, <i>Nuclear Export Signals</i>
NGS:	Seqüenciació de nova generació o seqüenciació massiva en paral·lel; de l'anglès, <i>Next-Generation Sequencing</i>
NLS:	senyal de localització nuclear; de l'anglès, <i>Nuclear Localization Signals</i>
OR:	raó d'oportunitats; de l'anglès, <i>Odds Ratio</i>
PBS:	de l'anglès, <i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCR:	Reacció en cadena de la polimerasa; de l'anglès <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PMSF:	<i>Phenylmethanesulphonylfluoride</i>
qPCR:	de l'anglès, <i>quantitative polymerase chain reaction</i>
RNA:	Àcid ribonucleic; de l'anglès, <i>Ribonucleic acid</i>
RT-PCR:	de l'anglès, <i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
RUS:	unitats de ressonància; de l'anglès, <i>Resonance Units</i>
SDS-PAGE:	de l'anglès, <i>Sodium dodecylsulfate polyacrilamide gel electrophoresis</i>

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

SNP:	Polimorfisme d'una sola base; de l'anglès, <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SPR:	de l'anglès, <i>Surface Plasmon Resonance</i>
TA:	Temperatura Ambient
TBE:	<i>Tris-borat-EDTA</i>
TBS:	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBST:	<i>Tris-Buffered Saline-Tween</i>
TK:	de l'anglès, <i>Thymidine kinase</i>
UNC5C:	<i>Unc-5 homolog C (C. elegans)</i>
VSD:	variant de significat desconegut
WB:	de l'anglès, <i>Western Blotting</i>
WT:	de l'anglès, <i>Wild type</i>

INTRODUCCIÓ



1. El Càncer

El càncer es caracteritza per un creixement descontrolat d'un grup de cèl·lules que envaeixen teixits i òrgans causant, eventualment, la mort del malalt. És el resultat de dos processos consecutius: l'augment descontrolat de proliferació d'un grup de cèl·lules formant un tumor o neoplàsia i una posterior adquisició de la capacitat invasiva que permet a aquest grup de cèl·lules migrar a altres parts de l'organisme i proliferar. Aquest procés es coneix com a metàstasi.

Hanahan i Weinberg van definir un conjunt de trets moleculars, bioquímics i cel·lulars que són compartits per la majoria de tumors (Hanahan & Weinberg, 2000). Per tant s'ha proposat que pel desenvolupament tumoral, les cèl·lules han d'adquirir 6 capacitats que dicten el creixement maligne dels tumors, com l'evasió de l'apoptosi, un potencial replicatiu il·limitat, l'autosuficiència de les senyals proliferatives, l'evasió dels senyals supressors de creixement, la inducció de l'angiogènesi i la capacitat d'invasió i metàstasi. L'any 2011 els mateixos autors van revisar l'esquema i van identificar dues característiques més com són la desregulació de la energia cel·lular i la capacitat d'evasió a la resposta immune. També van identificar dues característiques que afavoreixen l'aparició del fenotip maligne com ara la inestabilitat genòmica i la inflamació crònica que predisposa, en alguns casos, al càncer (figura 1).



Figura 1: Característiques de la progressió tumoral. Adaptat de (Hanahan & Weinberg, 2011)

INTRODUCCIÓ

Gràcies a aquests conceptes hem passat de veure el tumor com a una massa de cèl·lules canceroses en proliferació aïllades, a veure'l com un complex teixit compost per múltiples tipus de cèl·lules, incloent les cèl·lules no neoplàsiques que conformen l'estroma associat al tumor (i.e. fibroblasts, cèl·lules endotelials, limfòcits, etc).

El càncer també és considerat una malaltia genètica esporàdica, que excepcionalment pot ser hereditària. La formació d'una neoplàsia consisteix en una acumulació de múltiples alteracions en el genoma de les cèl·lules somàtiques que formen el tumor. A més si aquests canvis es produeixen en la línia germinal, aquestes mutacions genètiques es poden transmetre a la descendència, conferint als portadors una predisposició al càncer hereditari (A. G. Knudson, 2002).

Fins fa relativament poc, les investigacions sobre els factors causants de la susceptibilitat heretada a patir càncer, es van centrar en identificar els gens d'alta penetrància o alta susceptibilitat. Les mutacions en aquests gens donen lloc a patrons d'herència mendeliana, en els que la susceptibilitat a desenvolupar la malaltia es transmet, en general, de forma autosòmica dominant. Exemples de gens d'alta penetrància són *APC* que està implicat en la síndrome de càncer de còlon polipós hereditari, i els gens *BRCA1* i *BRCA2* implicats en la síndrome de càncer de mama i ovari hereditari. La freqüència de les mutacions en aquests gens en la població general és molt baixa, però en canvi quan estan mutats el risc que confereixen a patir càncer és molt elevat. No obstant, en la gran majoria dels càncers on hi ha un component hereditari, aquest resideix en els gens de baixa penetrància, ja que els càncers causats per gens d'alta penetrància representen el 1% dels casos. Les alteracions en els gens de baixa penetrància són comunes en la població general i el risc que confereixen és baix. És a dir, que a nivell individual cada variant modifica poc el risc a desenvolupar la malaltia, però en unió amb altres factors, tant genètics com ambientals, serien responsables de les diferències en el risc de patir càncer que existeixen entre els individus de la població general. La combinació de diverses variants, en gens diferents de baixa penetrància, seria el que donaria lloc al rang de susceptibilitat que provoca les diferències individuals a patir càncer. Per tant, els gens de baixa o moderada penetrància estarien implicats no sols a la susceptibilitat

INTRODUCCIÓ

genètica a desenvolupar càncer, si no que la seva acumulació i combinació també podria explicar molts dels patrons de càncer hereditari familiar que no segueixen una herència mendeliana. Per tant, els al·lels de baixa penetrància són variants polimòrfiques en la població general però que, al mateix, temps tenen una repercussió funcional (*Càncer hereditari*, 2010).

2. El còlon

El còlon o intestí gros, forma part del sistema digestiu, també anomenat sistema gastrointestinal o GI. La funció del sistema digestiu és processar l'aliment ingerit per produir energia i obtenir els nutrients necessaris per l'organisme. (1: *American Cancer Society. Colorectal cancer facts & Figures 2013*)

L'intestí gros es divideix en tres parts: el cec, el còlon i el recte. A més, el còlon es subdivideix en 4 segments: còlon ascendent, còlon transvers, còlon descendent i sigmoide.

Histològicament el còlon està format per diferents capes: la mucosa que és la capa més interna i que està formada per cèl·lules epitelials, la membrana basal, la làmina pròpia i la muscularis mucosa. Després trobem la capa submucosa, la muscularis pròpia, la suberosa i la serosa.

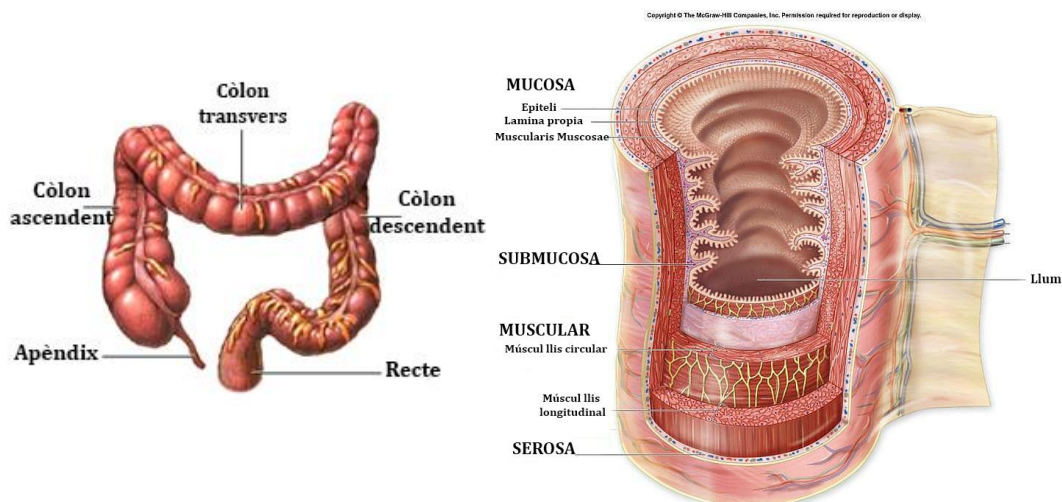


Figura 2: Anatomia i histologia del còlon.

INTRODUCCIÓ

L'epiteli intestinal és una monocapa de cèl·lules epitelials que formen una barrera que protegeix el nostre cos dels agents de l'exterior i està dissenyat per maximitzar la superfície de l'òrgan per reabsorbir aigua i nutrients dels aliments. Aquest epiteli penetra en el teixit connectiu subjacent, la làmina pròpia, formant un elevat nombre d'invaginacions, conegudes com les criptes de Lieberkühn que són glàndules tubulars, i on hi trobem diferents tipus cel·lulars. En el fons de les criptes, hi trobem les cèl·lules mare, que es divideixen donant lloc a cèl·lules multipotents intestinals (ISCS) o progenitores no diferenciades que són les encarregades de mantenir la renovació epitelial. Aquestes cèl·lules passen per diverses rondes de divisions cel·lulars i viatgen en sentit ascendent ocupant aproximadament dos terços de la base de les criptes i llavors passen a anomenar-se *transit-amplifying cells*. Al arribar al terç superior de les criptes, les *transit-amplifying cells* deixen de proliferar i comencen a diferenciar-se cap a tots els llinatges cel·lulars: enteròcits o colonòcits, cèl·lules caliciformes o cèl·lules endocrines. Aquest procés de renovació cel·lular és el que regula l'homeòstasi de l'epiteli colònic, gràcies a un equilibri dinàmic entre producció i mort cel·lular, i requereix entre 3 a 5 dies per completar el cicle de regeneració epitelial al llarg de l'eix cripta-vellositat (Krausova & Korinek, 2014; Reya & Clevers, 2005).

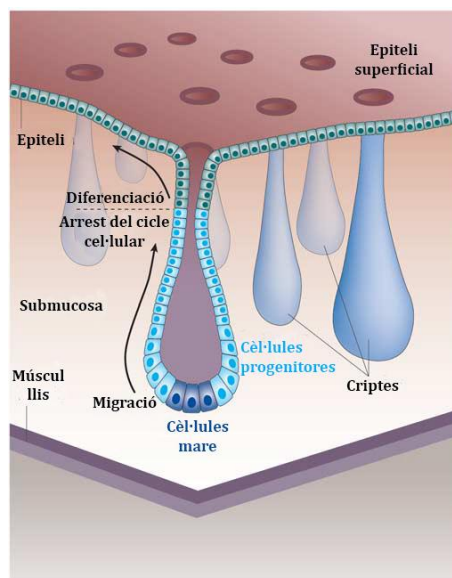


Figura 3: Anatomia de l'epiteli colorectal modificat: (Reya & Clevers, 2005).

INTRODUCCIÓ

Aquestes característiques de l'epiteli intestinal de renovació constant, i que a més a més actua com a barrera física d'agents nocius que poden causar alteracions oncogèniques, fa que l'epiteli intestinal sigui més susceptible a ser l'origen d'un càncer.

3. El càncer de còlon

El càncer de còlon o càncer colorectal (CCR) és el tercer càncer més comú en el món (Boursi et al., 2013), i és la segona causa de mort per càncer en ambdós sexes, en els països desenvolupats. A Espanya, el CCR és la neoplàsia més freqüent si tenim en compte els dos sexes a la vegada (15,51% de freqüència relativa). A més, representa la segona causa de mort per càncer en ambdós sexes, després del de pulmó en homes i el de mama en dones.

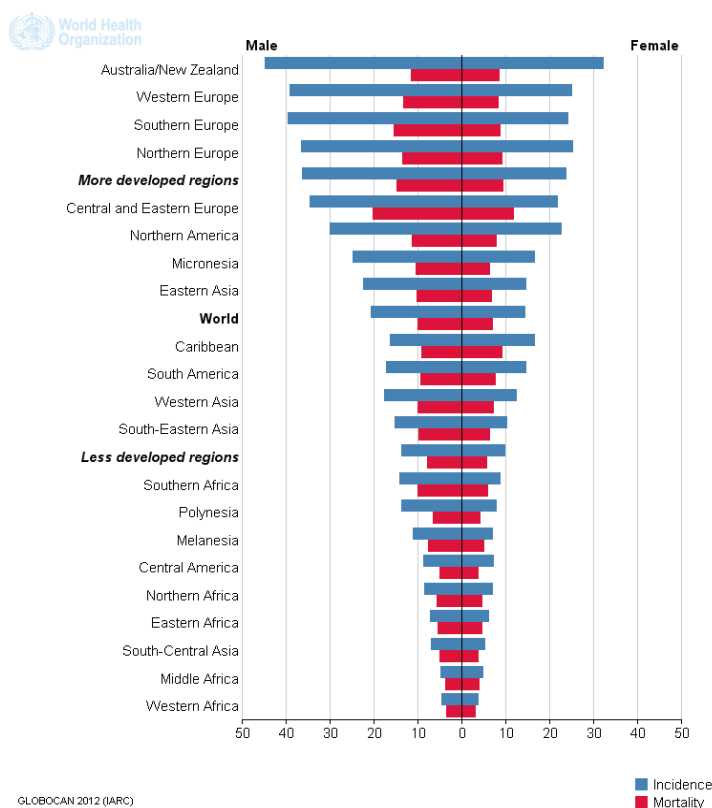


Figura 4: Incidència estimada, mortalitat i prevalença en el món de CCR en 2012. Taxa estandarditzada per edat per 100.000. Esquerra homes i dreta dones. Imatge adaptada de GLOBOCAN 2012, International Agency for Research on Cancer.

INTRODUCCIÓ

La taxa de mortalitat està disminuint en els països occidentals, gràcies a un millor tractament, una major sensibilització i una detecció primerenca, mentre que segueix augmentant en molts països amb recursos i infraestructures sanitàries limitades.

Aquest tipus de càncer inclou qualsevol neoplàsia del còlon, recte i apèndix, i s'inicia, a la majoria del casos, amb l'aparició de pòlips benignes en l'epiteli colorectal, que amb el pas del temps, si no s'eliminen per endoscòpia o quirúrgicament, poden transformar-se en tumors malignes.

En l'etiologia del CCR intervenen tant factors genètics com factors ambientals i és el balanç d'aquests factors el que determina la susceptibilitat individual de desenvolupar CCR.

Un dels factors de risc més determinant del CCR és l'edat, començant a augmentar la incidència de CCR als 50 anys i sent la màxima als 65-70 anys. Per altra banda, la importància dels factors ambientals es veu patent en les grans diferències que trobem en la incidència del càncer de còlon entre els diferents països (figura 4), on trobem una diferència substancial en els estils de vida. A més estudis en poblacions emigrants suggereixen que els factors ambientals tenen un efecte essencial en l'etiologia del càncer de còlon. Els hàbits dietètics estan relacionats amb un alt risc de desenvolupar CCR, ja que s'ha vist en estudis epidemiològics que el consum de carn vermella o processada, grasses i la ingesta total calòrica estan associat amb el desenvolupament de CCR. Altres hàbits com són el tabaquisme, el consum excessiu d'alcohol, la manca d'activitat física, el sobrepès i l'obesitat també estan associats a un risc incrementat de desenvolupar càncer colorectal (Boyle & Levin, 2008; Ferrari et al., 2007; Giovannucci, 2006).

Pel que fa als factors genètics, trobem famílies amb una elevada agregació de tumors localitzats en el intestí gruixut, indicant que els membres d'aquella família tenen un risc elevat de desenvolupar CCR (Macklin, 1960; Woolf Cm Fau - Richards, Richards Rc Fau - Gardner, & Gardner, 1955), i per tant els individus amb historial familiar de càncer de còlon tenen més risc a patir càncer. Els estudis de cas-control suggereixen que els factors genètics contribueixen considerablement al CCR, amb raó d'oportunitats (en anglès, *odds ratios*, *OR*) moderades amb valors entre 2 i 4 (Johns &

INTRODUCCIÓ

Houlston, 2001). La *OR* és una mesura estadística utilitzada en estudis epidemiològics, i es defineix com la possibilitat que una condició de salut o malaltia es presenti en un grup de població comparat amb el risc que passi en una altra població. A més a més, estudis amb bessons estimen que l'efecte de la heretabilitat, que és la proporció de la variació d'un caràcter multifactorial a causa de les diferències entre els genotips a la variació fenotípica total, pot arribar a ser fins un 35% per aquest tumor (Lichtenstein et al., 2000).

Classificació segons grau d'agregació familiar

El CCR es divideix, segons el grau d'agregació familiar, en esporàdic, hereditari o familiar. El 70-80% dels casos de CCR són esporàdics, tot i que només el 5% corresponen a casos amb una predisposició hereditària clara. Per altra banda, es creu que entre el 20 - 25% dels casos de CCR hi pot haver un component hereditari associat, però el qual encara es desconeix. Aquests casos són els que es coneixen com CCR familiar, i en aquestes famílies, la incidència del CCR té una freqüència més elevada que en les famílies amb CCR esporàdic, però sense seguir un patró característic del CCR hereditari (Burt, 2000; S. J. Winawer et al., 1997).

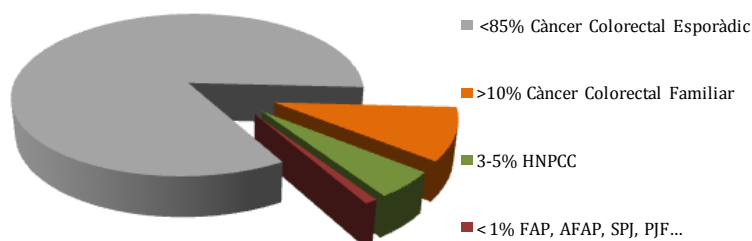


Figura 5: Contribucions relatives i aproximades de la predisposició hereditària per desenvolupar càncer colorectal. (Modificat de Half et al., 2009)

El procés d'aparició del CCR presenta una seqüència d'esdeveniments ben definida. Aquest procés comença amb la proliferació aberrant de les criptes, seguit pel desenvolupament d'una lesió premaligna, habitualment un adenoma, que és una neoplàsia epitelial benigna. Una minoria d'aquests adenomes, si no són eliminats endoscòpicament, poden passar a carcinomes *in situ*, i finalment a carcinoma invasiu i

INTRODUCCIÓ

metastàtic. Es parla de càncer quan les cèl·lules tumorals envaeixen i traspassen la membrana basal de l'epiteli.

Classificació i estadiatge del càncer de còlon i recte.

El pronòstic del CCR depèn de varis factors. El factor més determinant és l'estadi del tumor, que es defineix en funció del grau d'invasió i infiltració a través de la paret de l'intestí gruixut, del grau de disseminació ganglionar i de la presència de metàstasis a distància. El tractament que el pacient rep depèn del estadi en que es troba el tumor en el moment del diagnòstic. Els estadis del CCR s'estableixen d'acord amb la classificació de Dukes (Dukes, 1932) que posteriorment va ser modificada per Astler i Coller (Astler & Coller, 1954) per incloure el concepte de malaltia disseminada.

Taula 1: Classificació de Dukes modificada per Astler i Coller.

Estadis	Extensió del tumor
A	El tumor està limitat a la mucosa
B1	El tumor envaeix fins la muscularis pròpia
B2	El tumor travessa la capa muscularis pròpia fins la capa serosa
C1	Igual que B1 més metàstasi ganglionar
C2	Igual que B2 més metàstasis ganglionar
D	Metàstasis a distància o invasió parietal d'òrgans adjacents.

Més tard es va definir una tercera classificació, el sistema TNM de la *International Against Cancer* (Fleming, Phillips, Menck, Murphy, & Winchester, 1997). Aquest nou sistema permet classificar els pacients segons els estadis i amb pronòstics associats diferents.

INTRODUCCIÓ

Taula 2: Sistema TNM per CCR.

Categories T	Extensió que ocupa el tumor primari
Tx	La informació és incompleta i no es pot definir l'extensió del tumor
Tris	Carcinoma in situ. És l'estadi més inicial, el tumor no ha travessat la mucosa
T1	El tumor ha travessat la mucosa, la muscularis mucosa, i envaeix la submucosa
T2	El tumor ha travessat la mucosa, la muscularis mucosa, la submucosa i envaeix la muscularis pròpia
T3	El tumor ha travessat la mucosa, la muscularis mucosa, la submucosa, la muscularis pròpia, i envaeix la subserosa sense arribar a capa teixit veí
T4	El tumor envaeix altres òrgans i estructures

Categories N	Absència o presència de metàstasi als ganglis limfàtics
Nx	La informació és incompleta i no es coneix l'afecció de ganglis limfàtics
N0	No hi ha cap gangli afectat
N1	1-3 ganglis afectats
N2	4 o més ganglis afectats

Categories M	Absència o presència de metàstasi a distància
Mx	La informació és incompleta i no hi ha descripció de metàstasi a distància
M0	No hi ha metàstasi a distància
M1	Presència de metàstasi a distància

En estadis inicials tan sols és necessari la cirurgia, mentre que quan hi ha afectació ganglionar també es requereix una teràpia adjuvant mitjançant la quimioteràpia i/o radioteràpia. En el cas que la malaltia estigui disseminada la combinació de quimioteràpia i de cirurgia del tumor primari i de les metàstasis són les estratègies terapèutiques habituals.

4. Base molecular de la transformació de l'epiteli colònic

El procés de carcinogènesis colorectal s'associa a una acumulació progressiva d'alteracions genètiques i epigenètiques de les cèl·lules transformades. Fearon i Vogelstein l'any 1990 (Fearon & Vogelstein, 1990), van proposar un model seqüencial d'adquisició d'alteracions genètiques associades als diferents estadis del CCR, que oferia la primera aproximació a la base molecular de la seqüència adenoma-carcinoma. En aquest model, el desenvolupament del CCR és resultat de l'activació d'oncogens, com *KRAS*, i de la inactivació de gens supressors de tumors com *APC* i *TP53*. Actualment aquest model és conegut com la via de la inestabilitat cromosòmica (CIN). És important destacar que la inactivació del gen *APC* es creu suficient i necessària per a la transformació inicial de la cèl·lula epitelial colònica cap a l'adenoma.

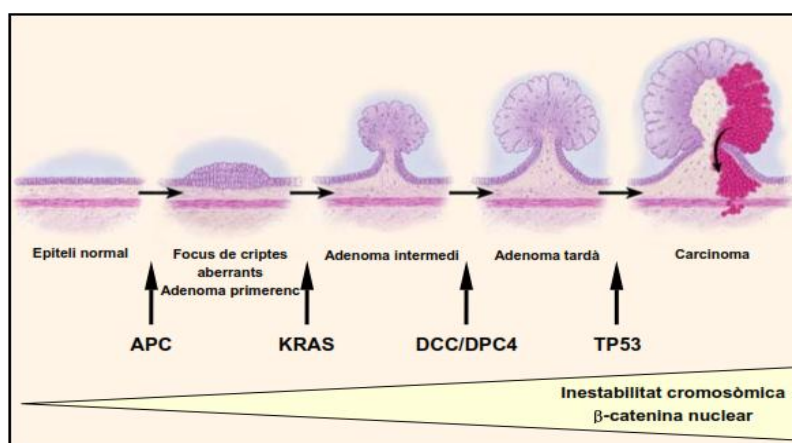


Figura 6: Model genètic de la carcinogènesis colorectal. (Modificat de Fearon & Vogelstein, 1990)

Els oncogens són gens que controlen la proliferació i diferenciació cel·lulars i que quan estan mutats condicionen un fenotip que contribueix al desenvolupament de tumors. Les mutacions en aquests gens fan que les seves funcions estiguin permanentment activades. Aquestes mutacions estan habitualment en heterozigosis ja que són dominants a nivell cel·lular. El cas oposat són els gens supressors de tumors, que són aquells gens capaços d'inhibir la proliferació i diferenciació cel·lular, l'absència completa de gens supressors de tumors pot produir el desenvolupament

d'una neoplàsia, però la presència d'un sol al·lel salvatge pot evitar-ho, d'aquí que es denominin oncogens recessius, i per tal que s'inactivin han d'estar els dos al·lells mutats (*Càncer hereditari*, 2010).

Posteriorment s'han descrit dues vies més a part de la via de la inestabilitat cromosòmica que poden condicionar el procés de carcinogènesis colorectal: la via de la inestabilitat de microsatèl·lits i la via del fenotip metilador d'illes CpG (Munteanu & Mastalier, 2014).

4.1. Via de la inestabilitat cromosòmica o CIN

La via CIN es caracteritza per un desequilibri en el nombre de cromosomes (aneuploïdia) i la pèrdua d'heterozigotitat, que pot ser deguda a una deleció completa del cromosoma, una deleció intersticial o per recombinació mitòtica. Aquest procés pot ser causat per un defecte en la segregació cromosòmica, inestabilitat dels telòmers, o en la resposta al dany del DNA, no obstant no es coneixen tots els gens implicats. A més també intervenen altres aspectes com la migració i l'adhesió cel·lular, el control del cicle cel·lular i l'apoptosis (Abal et al., 2007). Des del punt de vista molecular les mutacions primerenques en el gen *APC* podrien contribuir a promoure aquesta inestabilitat cromosòmica (Fodde, 2003).

4.2. Via de la inestabilitat de microsatèl·lits

Aquesta via s'associa a un dèficit en la capacitat de reparació d'errors simples d'aparellament i estan lligats a alteracions en els anomenats gens reparadors del DNA (DNA mismatch repair genes, MMR) que causen inestabilitat en microsatèl·lits (MSI). En la majoria dels casos és deguda a la inactivació per metilació del promotor del gen reparador *MLH1* que es pot detectar entre un 7-15% dels tumors colorectals, depenent de l'origen geogràfic del tumor. La MSI ocorre quan els errors habituals que produeix la DNA polimerasa durant la replicació de seqüències repetitives, conegudes com a microsatèl·lits, no es reparen de manera adient. Aquests errors durant la replicació són el resultat de l'anomenat "*slippage*" o lliscament que condiona que la polimerasa no sigui capaç de sintetitzar de manera acurada el mateix número de

repeticions de nucleòtids o dinucleòtids. El resultat és l'adició o substitució de seqüències repetides, principalment (A)_n o (CA)_n. Si bé la majoria d'aquests canvis no tenen repercussió funcional sí que poden generar canvis en el patró de lectura si estan dins de seqüències codificants. Les alteracions en la longitud de microsatèl·lits determinats (i.e. BAT26 o BAT25) s'utilitzen per la identificació de la MSI (Heinen, 2010).

4.3. Via del fenotip metilador d'illes CpG

El fenotip metilador d'illes CpG o CIMP s'associa a la hipermetilació aberrant de les regions promotores en les illes CpG (regions del genoma riques en citosines i guanines) que té com a conseqüència la inactivació d'un conjunt específic de gens supressors de tumors. La metilació de gens supressors de tumors està fortament lligada a la falta de transcripció del gen en absència de mutacions a la regió codificadora per tant en aquests tumors múltiples gens supressors de tumors poden ser inactivats simultàniament (Toyota et al., 1999). Aproximadament dos terços dels tumors colorectals amb fenotip metilador tenen hipermetilació del promotor del gen *MLH1* (gen reparador del DNA, MMR), i són inestables (Curtin, Slattery, & Samowitz, 2011). A més també presenten una elevada freqüència de mutacions en el gen *BRAF* i poques mutacions en els gens *APC* i *KRAS*. Aquest perfil mutacional és molt diferent al que tenen els tumors que no presenten hipermetilació. Per altra banda, trobem els tumors amb fenotip metilador que no tenen el gen *MLH1* silenciats. Aquests presenten un gran nombre de mutacions en els gens *APC* i *KRAS*, i poques en el gen *BRAF*. Per tant, els CCR que presenten hipermetilació es poden classificar en dos subgrups amb vies de malignitat diferenciades (Donehower et al., 2013).

5. Gen APC

El gen supressor de tumors *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) juga un paper clau en els primers estadis de la carcinogènesis. La seva inactivació es creu que és el primer pas per a que comenci la cascada d'esdeveniments que dona lloc a la transformació maligna de l'epiteli del còlon, ja que com hem comentat abans, es

INTRODUCCIÓ

considera que la inactivació d'APC és necessària i suficient perquè es desenvolupi un adenoma.

El gen *APC* es troba localitzat en el cromosoma 5q21 i consta de 8538pb. La seqüència codificant es compon de 15 exons i té com a producte una proteïna de 2843 aminoàcids (AA). La proteïna APC és una proteïna multifuncional citoplasmàtica, però que també es pot trobar en el nucli de les cèl·lules.

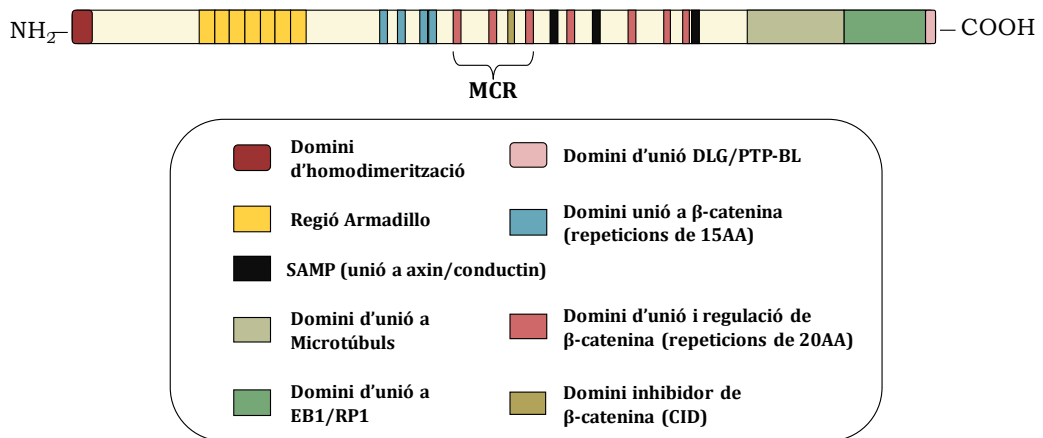


Figura 7: Esquema dels dominis funcionals de la proteïna APC (modificat de Nature reviews/Cancer)

En l'extrem N-terminal trobem el domini d'homodimerització, que permet la formació d'homodímers, i està format per repeticions de set residus hidrofòbics. S'ha vist que els primers 171 residus són suficients per la seva correcta funció i que els primers 45 AA són imprescindibles per a que hi hagi associació entre les proteïnes APC (Su et al., 1993). Després està la regió armadillo que abasta els residus 453 a 767. Aquesta regió que està formada per set repeticions de 42 AA, i està implicada en la interacció proteïna - proteïna i és la regió més conservada de la proteïna APC, suggerint que té un paper essencial per la seva funció. Aquest domini s'uneix amb la proteïna PP2A que quan interacciona amb l'Axina evita la fosforilació de la proteïna β -catenina. A més també s'uneix amb la proteïna Asef regulant d'aquesta manera l'estabilitat del citoesquelet d'actina (Kawasaki, 2000; Seeling et al., 1999).

A continuació trobem el domini implicat en la unió d'APC amb β -catenina, que és un component essencial de la via Wnt i de les unions adherents. Aquest domini està format per quatre repeticions de 15 AA, es troba entre els residus 1020 i 1187 i està

INTRODUCCIÓ

altament conservat al llarg de l'evolució (Eklof Spink, Fridman, & Weis, 2001). Tot seguit hi ha un altre domini d'interacció amb β -catenina, però en aquest cas també juga un paper molt important en la regulació a la baixa dels nivells de β -catenina citoplasmàtica. Aquest domini d'interacció i regulació de β -catenina està format per una sèrie de set repeticions de 20 AA, i es troba entre els residus 1265 i 2035. Quan aquest regió és fosforilada per GSK-3 β incrementa la capacitat d'APC per unir-se a β -catenina (Ikeda, Kishida, Matsuura, Usui, & Kikuchi, 2000). A més a més, en càncer colorectal, la majoria de proteïnes d'APC truncades els hi falten totes o la major part d'aquestes set repeticions suggerint que la pèrdua de funció d'aquesta regió proporciona un avantatge per a la proliferació cel·lular.

Flanquejat per la segona i la tercera repeticions de 20 AA es troba el Domini Inhibidor de β -catenina (CID) que és absolutament necessari per regular a la baixa els nivells de β -catenina citoplasmàtica i regular la seva activitat transcripcional (Kohler, Chandra, Behrens, & Schneikert, 2009). També en aquesta àrea, entre les repeticions de 20 AA, hi trobem tres repeticions SAMP (Ser-Ala-Met-Pro) que s'uneixen a Axina i a Conductina. Ambdues són proteïnes inhibidores de la via Wnt que promouen la fosforilació de β -catenina formant un complex amb APC i GSK-3 β (Behrens, 1998; Kishida et al., 1998) que conduirà a la destrucció de β -catenina.

A prop de l'extrem C-terminal trobem el domini bàsic, entre els aminoàcids 2200 i 2400, que té la capacitat d'unir-se als microtúbuls exercint un paper important entre la dinàmica dels microtúbuls i el control del creixement cel·lular (Munemitsu et al., 1994). Per últim, trobem els dominis d'unió a EB1/RP1 i el domini d'unió a DLG/PTP-BL, que estan implicats en la progressió del cicle cel·lular (Su et al., 1995). EB1 té un paper important en la regulació del citoesquelet (Aoki & Taketo, 2007). D'aquesta manera EB1 i APC coordinen juntament el control del creixement normal i el procés de diferenciació a l'epiteli colònic (Berrueta et al., 1998). Els aminoàcids de la regió C-terminal s'uneixen, mitjançant una seqüència VTSV, al domini PDZ de les proteïnes hDLG (Matsumine et al., 1996) i PTP-BL (Senda, Iizuka-Kogo, Onouchi, & Shimomura, 2007). La proteïna hDLG (*human disc large*) és una proteïna supressora de tumors que es localitza a les regions de contacte cèl·lula - cèl·lula de les cèl·lules epitelials, fet

que ens indica que APC podria intervenir en la migració i/o motilitat cel·lular. I per altra banda, la interacció d'APC amb la proteïna tirosina fosfatasa PTP-BL podria regular les fosforilacions de les tirosines de proteïnes que s'associen amb APC, com és el cas de la β -catenina o de la GSK-3 β .

Malgrat que la localització de APC és habitualment citoplasmàtica, també presenta dues senyals de localització nuclear NLS (*Nuclear Localization Signals*) que són necessàries per tal que APC pugui ser transportada a l'interior del nucli, ja que al ser una proteïna tan gran és necessari de la presència d'aquestes senyals (Zhang, White, & Neufeld, 2000). Quan APC es troba a l'interior del nucli, és capaç d'unir-se directament al DNA, per uns dominis d'unió al DNA que es troben a la segona repetició de 20 AA, al domini bàsic i a prop de l'extrem C-terminal, pel que podria regular la transcripció de gens tant de forma directa com indirecta.

Finalment s'han identificat cinc senyals NES (*Nuclear Export Signals*) que són utilitzades per transportar la β -catenina del nucli al citoplasma per la seva posterior degradació. Aquestes senyals es troben dues al extrem N-terminal i tres a la regió de repeticions de 20 AA. Són regions altament conservades i la seva absència provoca una acumulació de β -catenina al nucli, on activa els gens de proliferació cel·lular (Henderson, 2000; Neufeld et al., 2000) (Rosin-Arbesfeld, Cliffe, Brabletz, & Bienz, 2003).

6. Funcions de la proteïna APC

La proteïna APC participa en diferents processos cel·lulars, com en la migració i adhesió cel·lular, control del cicle cel·lular, l'apoptosi i l'estabilitat cromosòmica, que són mediats pels diferents dominis funcionals (Aoki & Taketo, 2007; McCartney & Nathke, 2008).

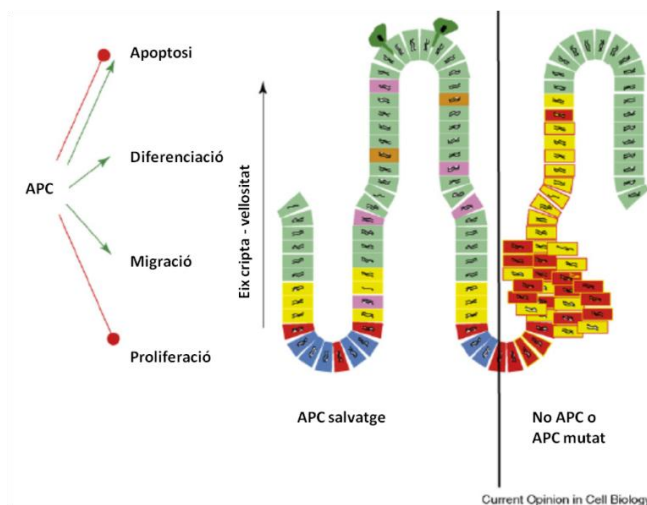


Figura 8: Funcions d'APC en l'epiteli intestinal (Modificat de (McCartney & Nathke, 2008))

6.1. Via de senyalització Wnt

La proteïna APC té una funció rellevant en la via de senyalització de proliferació Wnt, ja que és el regulador negatiu d'aquesta via (Fodde, 2002). La via Wnt, mitjançant el complex β -catenina/TCF-4, juga un paper molt destacat en el desenvolupament embrionari i l'homeòstasi dels teixits adults. En el tracte gastrointestinal manté la capacitat d'auto-renovació de cèl·lules mare epitelials, per tant, l'activació aberrant d'aquesta via promou la iniciació i la progressió del càncer colorectal (Krausova & Korinek, 2014).

APC, quan no hi ha senyal de proliferació, s'uneix i regula la degradació de β -catenina lliure del citoplasma (Munemitsu, Albert, Souza, Rubinfeld, & Polakis, 1995). La β -catenina és una proteïna multifuncional que va ser descoberta com a part del complex de les unions adherents conjuntament amb les proteïnes cadherina i α -catenina per Ozawa et al. 1989. Però també juga un paper molt important en la regulació transcripcional ja que exerceix de coactivador transcripcional de la via Wnt, dirigint l'expressió de gens de proliferació cel·lular (Stamos & Weis, 2012).

INTRODUCCIÓ

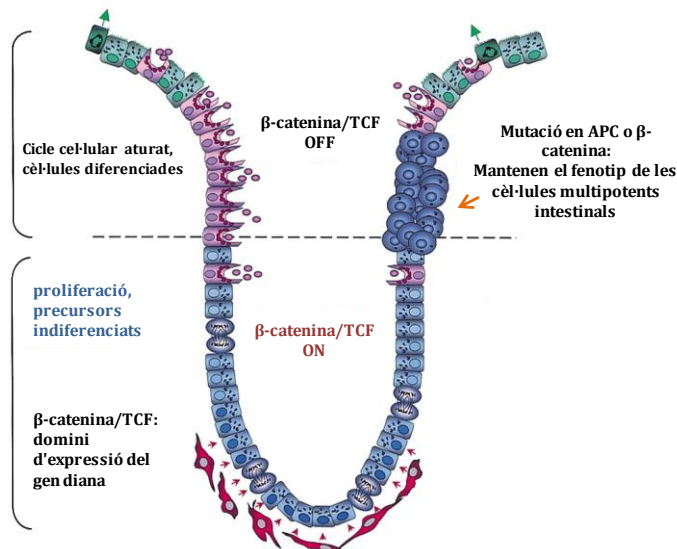


Figura 9: Representació esquemàtica d'una cripta del còlon. Al llarg de la cripta hi ha un gradient d'activació del complex β -catenina/TCF que regula la proliferació i diferenciació cel·lulars. (Modificat de: (van de Wetering et al., 2002))

La regulació de la via Wnt, en absència d'estímul extracel·lular, té lloc mitjançant un complex proteic format per la serina/treonina caseïn quinasa 1 alfa ($CK1\alpha$), la glicogen quinasa sintetasa 3 beta ($GSK-3\beta$), que gràcies a la unió amb les proteïnes Axina i APC, poden fosforilar a β -catenina. Aquest complex proteic, format per $CK1\alpha$, $GSK-3\beta$, Axina i APC, es coneix com el complex de degradació de β -catenina. Quan la β -catenina citoplasmàtica és capturada pel complex de degradació, $CK1\alpha$ la fosforila en la serina 45. Aquesta primera fosforilació és necessària per tal que la $GSK-3\beta$ pugui fosforilar els tres residus següents, la treonina 41, la serina 37 i la serina 33 (Wang, Liu, Gusev, Wang, & Fagotto, 2014). Un cop la β -catenina és fosforilada la proteïna β -TrCP pot ubiquïtinitzar-la per tal que sigui degradada pel proteosoma. (Aberle, Bauer, Stappert, Kispert, & Kemler, 1997; Behrens, 1998; Krausova & Korinek, 2014).

INTRODUCCIÓ

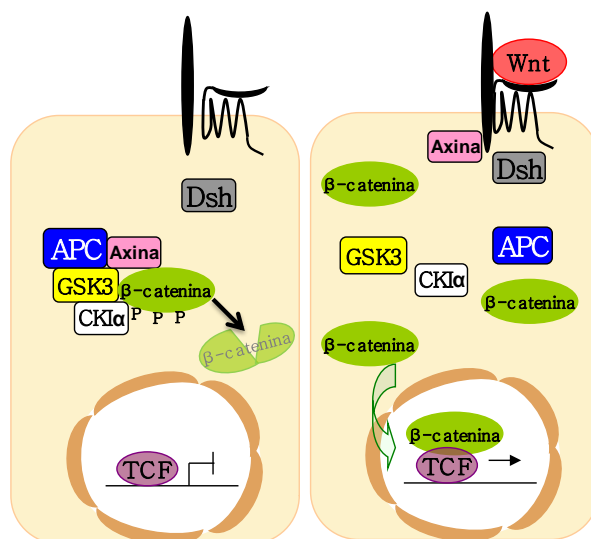


Figura 10: Esquema de la via de senyalització Wnt (modificat de www.wormbook.org)

L'Axina té un paper rellevant en el control de la destrucció de β -catenina, ja que és l'encarregada de promoure la fosforilació eficient de β -catenina i APC. La fosforilació d'APC és produïda mitjançant les quinases GSK-3 β i CK1 α , que fan augmentar la seva capacitat d'unió a β -catenina. Les dues quinases fosforilen de manera predominant un motiu SXXSSLSXLS dins la regió de les 7 repeticions de 20 AA, que està altament conservat (Liu, Xing, Hinds, Zheng, & Xu, 2006; Stamos & Weis, 2012).

Quan la via Wnt està activa, les proteïnes de senyalització s'uneixen al domini extracel·lular dels receptors de la família Frizzled, que conjuntament amb els coreceptors relacionats amb les lipoproteïnes de baixa densitat, LRP5 i LRP6, transmeten els senyals de proliferació. Un cop s'activa el receptor Frizzled, aquest recluta la proteïna plasmàtica Dishevelled (Dsh) a la membrana cel·lular interna mitjançant la seva fosforilació. Llavors la proteïna Dsh s'uneix a l'Axina que deixa de formar part del complex de degradació provocant la inhibició de la proteïna GSK-3 β encarregada de fosforilar la β -catenina (Kolligs, Bommer, Ouml, & Ke, 2002). D'aquesta manera β -catenina s'acumula al citoplasma i es dirigeix al nucli on s'uneix a factors de transcripció de la família Lef/TCF, activant la transcripció de gens diana de la proliferació cel·lular com *c-myc*, *ciclina D1*, etc (Herbst et al., 2014).

6.2. Migració i adhesió cel·lular

En les cèl·lules epitelials que estan migrant activament hi trobem la proteïna APC localitzada a la membrana plasmàtica associada al citoesquelet tant de forma directa com indirecta. Aquest fet suggereix que APC està implicada tant en la polarització com en la migració cel·lular. Curiosament, APC tendeix a unir-se preferentment a les puntes dels microtúbuls que sostenen de forma activa la migració cel·lular. La diferenciació de les cèl·lules epitelials a l'intestí passa per migrar activament cap amunt des del fons de les criptes fins a la superfície luminal, i la pèrdua de APC condueix a una disminució en aquesta migració (McCartney & Nathke, 2008; Munemitsu et al., 1994).

A més, s'ha especulat que APC interactua amb els filaments d'actina, però de forma indirecta. En cèl·lules epitelials de l'intestí de ratolí s'ha observat la presència d'altres quantitats d'APC al llarg de les vores laterals de les cèl·lules, així com en el citoplasma apical i en les microvellositats. Aquestes zones de les cèl·lules es caracteritzen per la presència de filaments d'actina. La regió armadillo d'APC s'uneix i activa a Asef, que és una Rho GTPasa i té un paper fonamental en nombrosos processos cel·lulars que s'inicien per estímuls extracel·lulars. Quan s'ha activat Asef aquesta estimula Rac1, que és una proteïna d'unió a GTP involucrada en la reordenació de les xarxes d'actina, el que resulta en la millora de la migració cel·lular. Aquests esdeveniments indiquen que APC pot estar implicada en l'adhesió cèl·lula - cèl·lula, la polarització cel·lular i la migració cel·lular direccional mitjançant el citoesquelet d'actina (Kawasaki, 2000; Kawasaki, Sato, & Akiyama, 2003; Senda et al., 2007).

Per altra banda, APC interactua amb β -catenina, que al mateix temps s'uneix a E-cadherina, α -cadherina i al citoesquelet d'actina. Per tant, s'ha proposat, que la inactivació d'APC podria promoure la tumorigènesis mitjançant la pèrdua d'adhesió cel·lular, ja que té un paper clau en el control de la distribució de β -catenina i E-cadherina entre el citoplasma i la membrana cel·lular (Aoki & Taketo, 2007).

6.3. Control del cicle cel·lular

Una altra funció coneguda de la proteïna APC és la seva capacitat per bloquejar la progressió de les cèl·lules en la fase G₁ tardana, inhibint el pas a la fase S. Hi ha estudis que demostren que la sobreexpressió de certs complexos CDK-ciclina aboleix l'activitat de bloqueig del cicle cel·lular de l'APC. A més, es va suggerir que la inhibició de l'activitat de CDK2 està involucrada en la mediació del bloqueig del cicle cel·lular induïda per APC. Per tant, una sobre expressió d'APC, inhibeix el creixement cel·lular mitjançant l'aturada del cicle cel·lular, modulant negativament l'activitat dels complexos ciclina-CDK (Baeg et al., 1995).

Per altra banda, hi ha casos de pacients amb FAP que presenten mutacions en el gen *APC* a la regió C-terminal, això suggereix que aquesta regió també és important per l'efecte supressor de tumors d'APC. En aquesta regió trobem el domini d'unió a hDLG (*homolog Drosophila lethal discs large*), que és una proteïna supressora de tumors. La inactivació de DLG en *Drosophila* provoca la proliferació neoplàsica dels discs imaginals de les cèl·lules epitelials i causa canvis dramàtics en l'estructura de botó de les sinapsis. Per totes aquestes evidències, es creu que hDLG pot tenir un paper important en la regulació negativa de la proliferació cel·lular. S'ha comprovat que la sobreexpressió de hDLG atura la progressió del cicle cel·lular de la fase G₀/G₁ a la fase S, i que APC mutant sense la regió C-terminal no bloqueja de forma efectiva la progressió del cicle cel·lular, la qual cosa suggereix que la formació del complex APC-hDLG és necessari per la inhibició del cicle cel·lular.

Per tant, APC sembla controlar la proliferació cel·lular a través de diverses vies de senyalització, incloent la regulació negativa de β -catenina que té com efecte la regulació a la baixa de la ciclina D1 i les vies hDLG-dependents. Com que hDLG no està implicada en la degradació de β -catenina s'han de considerar els dos mecanismes completament independents (Ishidate, Matsumine A Fau - Toyoshima, Toyoshima K Fau - Akiyama, & Akiyama, 2000).

6.4. Apoptosi

Les mutacions en APC també poden promoure canvis en l'apoptosi, un procés fonamental de la biologia epitelial en el tracte intestinal. Quan les cèl·lules arriben a la superfície luminal des de la cripta del còlon entren en l'apoptosi i són abocades cap al lumen del intestí. Encara no es coneix el mecanisme pel qual APC intervé en l'apoptosi, però hi ha evidències de que té un paper indirecte en la regulació de la via de mort cel·lular. Una de les evidències és que la inducció de l'expressió d'APC WT en línies cel·lulars de CCR que tenen la proteïna APC endògena truncada, provoca la pèrdua de les adhesions cel·lulars i un increment de la mort cel·lular a través de l'apoptosi (Morin, Vogelstein, & Kinzler, 1996).

APC podria induir l'apoptosi mitjançant la seva acceleració associada activant les caspases. Per altra banda, si els components de la via de la mort cel·lular són blancs directes de la via de senyalització Wnt, els canvis en aquesta via podria modificar l'execució de l'apoptosi. És important destacar que el balanç general dels canvis pro-apoptòtics i anti-apoptòtics induïts per la pèrdua d'APC pot estar altament associat al context i al teixit. Per tant APC pot causar un augment o disminució de l'apoptosi, depenent de tipus de teixit, compartiment tissular, etapes de desenvolupament, etc (McCartney & Nathke, 2008; Senda et al., 2007).

6.5. Estabilitat cromosòmica

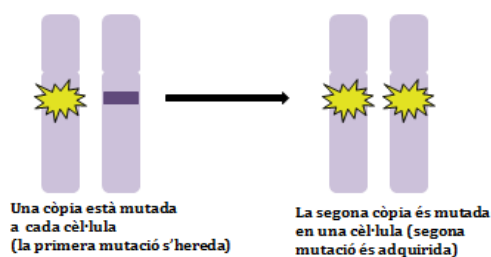
La majoria dels CCR es caracteritzen per presentar inestabilitat cromosòmica. Les interaccions d'APC amb el citoesquelet no només afecten les cèl·lules en interfase, ja que en l'extrem C-terminal, que en la majoria de tumors està deletat, hi ha el domini bàsic que s'uneix als microtúbuls i estimula la polimerització de la tubulina *in vitro*, pel que també pot afectar a la funció del fus mitòtic. En aquesta regió d'APC també es troba el domini d'unió a EB1, que s'associa amb el centròmer, el fus mitòtic i els extrems positius dels microtúbuls en totes les fases del cicle cel·lular. En conseqüència, la pèrdua de funció d'APC, durant la mitosi, condueix a defectes en l'alineació de l'eix, en el punt de control del fus mitòtic, i en el desenvolupament dels

punts de l'anafase. Una conseqüència immediata d'aquests canvis és l'acumulació de cèl·lules tetraploides (Aoki & Taketo, 2007; McCartney & Nathke, 2008).

7. Càncer Colorectal Hereditari o Síndromes de predisposició hereditària al càncer colorectal

Parlem de càncer hereditari, o de predisposició hereditària al càncer quan les alteracions genètiques, principalment en gens supressors de tumors, es troben en la línia germinal i es transmeten a la descendència. L'individu que hereta una de les dues còpies mutada només requereix la mutació de l'al·lel salvatge restant per acumular la pèrdua de funció d'un gen rellevant, que li conferirà més predisposició a desenvolupar càncer. En canvi, en el cas de càncer esporàdic les dues còpies del gen són salvatges per la qual cosa, són necessàries dues mutacions somàtiques perquè s'evidenciï la pèrdua completa de la funció del gen, aquest procés es coneix com a teoria del doble *hit*, i s'espera que la segona mutació sigui independent a l'anterior. En la figura 11 resumeix de forma gràfica la diferència entre una malaltia hereditària i esporàdica. (Calvert & Frucht, 2002).

Mutació germinal (malaltia hereditària)



Mutació somàtica (malaltia esporàdica)

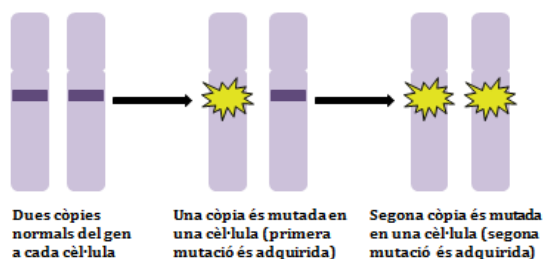


Figura 11: Teoria del doble "hit" (modificat de (Calvert & Frucht, 2002))

El 5% de totes les neoplàsies colorectals segueixen un patró hereditari autosòmic. Les síndromes de predisposició hereditària al càncer colorectal es divideixen en síndromes poliposes i no poliposes.

7.1. Càncer hereditari no polipós (HNPCC)

La síndrome de Lynch (SL), abans conegut com HNPCC (*Hereditary non-polyposis colorectal cancer*), és la síndrome de predisposició a CCR més comuna. Es tracta d'una malaltia autosòmica dominant que es caracteritza per l'aparició de CCR abans dels 50 anys, i un risc de patir altres càncers, com d'endometri, estómac, ovari, tracte urinari, tracte hepatobiliar, pàncrees, intestí prim, pell i esporàdicament de cervell (Lynch, 2008). Les seves característiques clíniques més rellevants estan descrites a la taula 3.

Taula 3: Característiques clíniques associades al Síndrome de Lynch (adaptat de(Lynch et al., 2009))

Característiques clíniques dels tumors associats al SL
- Alt risc de desenvolupar CCR: Incidència fins el 70% als 70 anys i del 80% als 85 anys.
- Patró d'herència dominant.
- Edat primerenca d'aparició de CCR: Edat mitja de 45 anys enfront els 69 de la població general.
- Localització del CCR amb major freqüència (70%) en el còlon proximal.
- Carcinogènesis accelerada: La transformació epiteli-mesènquima sol donar-se en 2 – 3 anys (en front als 8 – 10 anys de la població general).
- Elevat risc de CCR addicionals (sincrònics o metacrònics): 25 – 30% de reincidència de CCR als 10 anys.
- Risc incrementat de tumors extracolònics: endometri, ovari, estómac, intestí prim, tracte hepatobiliar i pàncrees, tracte urinari, cervell, pell i altres adenomes.
- Els tumors de CCR solen ser poc diferenciats, presenten excés de cèl·lules mucoses i en anell, a més de donar-se freqüentment la reacció limfoide de tipus Crohn.
- Major supervivència al CCR respecte als casos esporàdics.

Aquesta síndrome s'associa a mutacions germinals o en alguns casos epimutacions en els gens reparadors de desaparellades simples de bases del DNA (MMR) *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*. Les mutacions en aquests gens permeten l'acumulació de múltiples errors de replicació en seqüències repetitives. Com s'ha comentat anteriorment, aquesta forma d'inestabilitat genòmica es coneix com a inestabilitat de microsatèl·lits (MSI).

INTRODUCCIÓ

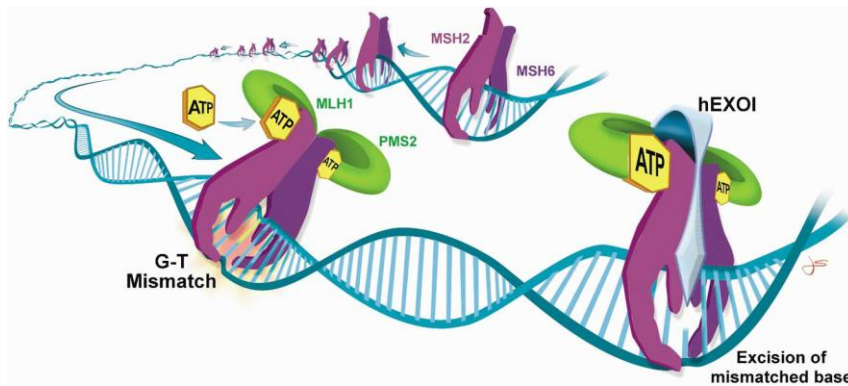


Figura 12: Model per a la via de reparació del DNA (MMR) en humans. Extret de: (Gruber, 2006)

Malgrat que a nivell familiar són síndromes de predisposició hereditària de caràcter dominant amb una expressivitat variable, a nivell cel·lular els gens reparadors es comporten de manera recessiva. Per tant quan en una cèl·lula somàtica s'acumula una segona alteració, ja sigui mutació puntual, deleció o metilació de les illes CpG, s'inactiva de manera completa el gen. Quan això passa, per exemple, en una cèl·lula del epitel·li del còlon, és quan s'inicia de manera clara la transformació neoplàsica (Valle, 2014).

El 90% dels casos amb SL presenten mutacions en línia germinal en els gens *MLH1* i *MSH2*, entre un 7-10% presenten mutacions en el gen *MSH6* i menys del 5% de les famílies presenten mutacions en el gen *PMS2*. També hi ha altres gens com el *MSH3*, *EXO1* i *TGFbR2* on s'han trobat mutacions en famílies amb sospita de síndrome de Lynch, tot hi que encara no està establert el seu significat clínic (Peltomaki, 2003). Altres alteracions germinals, com la deleció del gen *EPCAM*, inactiven el gen *MSH2* mitjançant la metilació de les illes CpG, aquest cas representa aproximadament l'1% dels casos de SL (Kuiper et al., 2011; Valle, 2014).

La identificació de portadors amb mutacions en els gens MMR és essencial per millorar les mesures preventives i la detecció precoç de càncer. Abans de que es coneguessin els gens causals de la SL, el Grup de Col·laboració Internacional sobre el càncer hereditari no associat a poliposi va establir l'any 1991 els criteris d'Amsterdam I, per identificar aquells casos amb alta sospita de càncer familiar (Vasen, Mecklin, Khan, & Lynch, 1991). Posteriorment l'any 1999 es van proposar

INTRODUCCIÓ

nous criteris (Amsterdam II) que incloïen els càncers extracolònics associats al SL (Vasen, Watson, Mecklin, & Lynch, 1999). Dos anys abans, l'any 1997 es van proposar les directrius Bethesda per la identificació de tumors candidats a realitzar l'anàlisi de MSI (Rodriguez-Bigas et al., 1997), que són menys restrictives i tenen una sensibilitat superior al 90%, permetent la identificació d'un major número de casos, però amb una menor especificitat, en aquest cas del 25%. Els criteris Bethesda van ser revisats l'any 2004 proposant unes noves recomanacions per la selecció de pacients (Umar et al., 2004). Aquests criteris permeten la identificació de candidats a ser estudiats, i estan descrits a la taula 4. En el cas de la SL tenim l'avantatge de tenir un marcador tissular com és la presència de MSI o, alternativament, de la pèrdua d'expressió de les proteïnes reparadores MLH1, MSH2 i MSH6 mitjançant immunohistoquímica (IHQ). Amb aquesta evidència de dèficit de capacitat reparadora es pot indicar l'estudi de mutacions en els gens MMR mitjançant la seva seqüenciació i anàlisi de grans reordenaments.

INTRODUCCIÓ

Taula 4: Criteris d'Amsterdam I, II i de Bethesda revisats, per al diagnòstic de la síndrome de Lynch.

CRITERIS D'AMSTERDAM I (l'individu els ha de complir tots)

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

CRITERIS D'AMSTERDAM II (l'individu els ha de complir tots)

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

CRITERIS DE BETHESDA REVISIATS (l'individu n'ha de complir un d'ells)

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

7.2. Síndromes Poliposes

Les síndromes poliposes es caracteritzen per desenvolupar nombrosos pòlips en el tracte gastrointestinal, particularment a l'àrea colorectal. La major part tenen un component genètic hereditari important i presenten un risc elevat de desenvolupar càncer de còlon. A més, són freqüents la coexistència de manifestacions extraintestinals (García & Arenas). Dins de les síndromes poliposes gastrointestinals hereditàries trobem:

- **Síndrome de poliposis mixta hereditària**
- **Poliposis Hamartomatoses**
 - Síndrome de Peutz-Jeghers
 - Poliposi Juvenil Familiar
 - Síndromes de tumors hamartomatosos associats al gen *PTEN* (Síndrome de Cowden, Síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley)
- **Poliposis associada a alteracions en les polimerases amb capacitat de correcció (proofreading polymerase)**
- **Poliposis Adenomatoses**
 - Poliposi Adenomatosa Familiar (FAP)
 - Poliposi Adenomatosa Familiar Atenuada (AFAP)
 - Poliposi Associada a MUTYH (MAP)

INTRODUCCIÓ

Taula 5: Resum dels gens hereditaris de càncer colorectal, les principals síndromes associades, maneres d'herència, tipus de mutacions identificades i les característiques moleculars específiques associades dels tumors. (Adaptada de (Valle, 2014))

Gen	Síndrome	Herència	Mutacions reportades	Característiques moleculars dels tumors
<i>MLH1</i>	Síndrome de Lynch	Autosòmica dominant	Mutació Puntual Grans reordenaments Metilació illes CpG	Deficiència en MMR (MSI)
<i>MSH2</i>	Síndrome de Lynch	Autosòmica dominant	Mutació Puntual Grans reordenaments Metilació illes CpG	Deficiència en MMR (MSI)
<i>MSH6</i>	Síndrome de Lynch	Autosòmica dominant	Mutació Puntual Grans reordenaments	Deficiència en MMR (MSI)
<i>PMS2</i>	Síndrome de Lynch	Autosòmica dominant	Mutació Puntual Grans reordenaments	Deficiència en MMR (MSI)
<i>EPCAM</i>	Síndrome de Lynch	Autosòmica dominant	Grans reordenaments	Deficiència en MMR (MSI)
<i>GERM1</i>	Síndrome de poliposis mixta hereditària	Autosòmica dominant	Duplicació 40 kb	-
<i>STK11</i>	Síndrome de Peutz-Jeghers	Autosòmica dominant	Mutació Puntual Grans reordenaments	-
<i>SMADA</i>	Poliposi Juvenil Familiar	Autosòmica dominant	Mutació Puntual Grans reordenaments	-
<i>BMPR1A</i>	Poliposi Juvenil Familiar	Autosòmica dominant	Mutació Puntual Grans reordenaments	-
<i>PTEN</i>	Tumors hamartomatosos associats al gen <i>PTEN</i>	Autosòmica dominant	Mutació Puntual Grans reordenaments Promotor	-
<i>POLE</i>	Síndrome de "polymerase proofreading polyposis"	Autosòmica dominant	Mutació Puntual (domini exonucleasa)	transversions G:T>T:A
<i>POLD1</i>	Síndrome de "polymerase proofreading polyposis"	Autosòmica dominant	Mutació Puntual (domini exonucleasa)	transversions G:T>T:A
<i>APC</i>	Poliposis Adenomatosa Familiar (Atenuada)	Autosòmica dominant Mutacions <i>de novo</i> Mosaïcismes	Mutació Puntual Grans reordenaments ASE	-
<i>MUTYH</i>	Poliposi Associada a MYH	Recessiva	Mutació Puntual Grans reordenaments	Deficiència en la reparació d'excisió de bases: KRAS c.34G>T

7.2.1. Síndrome de poliposis mixta hereditària

Aquesta síndrome és una malaltia poc comuna, presenta una herència autosòmica dominant i els individus manifesten múltiples tipus de lesions colorectals però en canvi no presenten manifestacions extracolòniques. Aquesta síndrome s'ha relacionat amb la duplicació del gen *GREM1* en famílies amb ascendència Ashkenazi.

7.2.2. Poliposis Hamartomatoses

Aquest grup de síndromes són poc freqüents, els pacients desenvolupen múltiples pòlips hamartomatosos, que són el resultat de la proliferació de cèl·lules madures de la mucosa. Al principi aquests pòlips no eren considerats neoplàsics però posteriorment es va observar que aquests pacients tenen una predisposició a tenir CCR (García & Arenas)

Síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ): és una malaltia hereditària autosòmica dominant d'elevada penetrància caracteritzada per la presència de nombrosos pòlips hamartomatosos, distribuïts per tot el tracte gastrointestinal, generalment en l'intestí prim, la zona colorectal i l'estómac. A més els pacients tenen una hiperpigmentació mucocutània molt característica que està present en el 95% dels casos. Aquesta síndrome està associada a mutacions germinals en el gen *STK11* també anomenat *LKB1* (Dunlop, 2002; Valle, 2014) que es troba en el cromosoma 19. El 50% dels casos són esporàdics per mutacions de *novo*.

Poliposi Juvenil Familiar o SPJ: és la síndrome de poliposi hamartomatososa més freqüent, i es tracta d'una malaltia autosòmica dominant amb una penetrància variable, on apareixen pòlips, principalment en el còlon, encara que es poden trobar pòlips en qualsevol part del tracte digestiu. A més, el risc de patir càncer colorectal o duodenal en aquests pacients és molt elevat. S'han identificat mutacions germinals en els gens *SMAD4* o en *BMPR1A* en el 40% dels casos de SPJ. Ambdós gens codifiquen per una proteïna involucrada en la via de senyalització del TGF- β (Valle, 2014).

INTRODUCCIÓ

Síndromes de tumors hamartomatosos associats al gen *PTEN*: inclou, entre altres, les síndromes de Cowden i Bannayan-Riley-Ruvalcaba. El diagnòstic definitiu d'aquestes patologies es dóna quan s'identifiquen mutacions en el gen *PTEN*. Els fenotips clínics dels portadors de mutacions en el gen *PTEN* són molt variables, fins hi tot hi ha una significativa variabilitat dintre de les famílies (Jelsig et al., 2014; Valle, 2014).

La Síndrome de Cowden es caracteritza per la presència de múltiples pòlips hamartomatosos en diferents òrgans i acostumen a presentar-se en els elements ectodèrmics o endodèrmics (Schreibman, Baker, Amos, & McGarrity, 2005). És una malaltia autosòmica dominant. Normalment les mutacions en el gen *PTEN* són mutacions puntuals o petites delecions o insercions. Aquests pacients tenen un increment del risc a desenvolupar càncer de tiroides, càncer de mama, melanomes, càncer d'endometri i càncer colorectal (Jelsig et al., 2014).

La Síndrome Bannayan-Riley-Ruvalcaba també presenta un fenotip molt variable, a més de presentar poliposi hamartomatosa, principalment a la llengua i al còlon, a més a més els individus afectes també presenten discapacitat intel·lectual. També és una malaltia d'herència autosòmica dominant i s'han descrit mutacions en el gen *PTEN* a la línia germinal (García & Arenas, 2014; Jelsig et al., 2014; Schreibman et al., 2005).

7.2.3. Poliposis associada a alteracions en les polimerases amb capacitat de correcció (polymerase proofreading)

S'han descrit en pacients amb CCR familiar amb múltiples adenomes, mutacions en les DNA polimerases ϵ (*POLE*) i δ (*POLD1*). En la polimerasa *POLE* es va identificar la mutació germinal p.Leu424Val i en la *POLD1* la mutació p.Ser478Asn, ambdues en individus amb múltiples adenomes i CCR. Les dues mutacions es caracteritzen per un patró d'herència dominant i s'associen amb un alt risc de múltiples adenomes colorectals, adenomes grans, CCR diagnosticat a edat jove i múltiples CCR. A més a més, les mutacions a *POLD1* s'associen a un major risc de càncer d'endometri en dones portadores. Per altra banda, també s'ha trobat la variant de *POLD1*,

p.Pro327Leu, la qual no s'ha determinat la seva patogenicitat, i es va detectar en un pacient amb múltiples adenomes (Palles et al., 2013).

En el nostre grup s'han trobat mutacions patogèniques *de novo* en el gen *POLD1*, p.L474P, en pacients amb CCR no polipòs que complia els criteris d'Amsterdam II sense defectes en MMR. Per tant el terme "poliposi associada a l'activitat polimerasa" pot ser enganyós, i s'ha d'utilitzar amb cura, almenys fins que es descriguin més famílies *POLE/POLD1* (Bellido et al., 2015).

Fins ara, totes les mutacions en línia germinal descrites a *POLE* i *POLD1* es localitzen en el domini de correcció (exonucleasa), la qual cosa suggereix una deficiència en la capacitat de corregir i reparar els errors durant la replicació del DNA. Les mutacions que no estan en el domini exonucleasa no semblen estar associades al CCR familiar, però no hem d'oblidar que aquest gens han sigut descoberts de forma recent i per tant no es poden descartar per ara les mutacions fora d'aquest domini exonucleasa, ja que no hi ha suficients evidències que no intervinguin en la predisposició a CCR (Chubb et al., 2015).

7.2.4. Poliposis Adenomatoses

Els adenomes són neoplàsies benignes epitelials, quan es troben en el còlon parlem d'adenomes colorectals i es consideren els precursors de la majoria dels carcinomes colorectals. La OMS classifica els adenomes en diferents tipus: tubulars, tubulovelloso i vellosos. Els adenomes tubulars es caracteritzen per tenir menys d'un 20% de component vellós, i són els més comuns ja que corresponen el 85% dels casos. Tots els adenomes presenten un grau de displàsia que pot ser de baix o d'alt grau. Els carcinomes en canvi, sempre tenen un grau de displàsia alt i s'associen a canvis clars en l'arquitectura del teixit. Les anomenades poliposis adenomatoses es caracteritzen per una predisposició a desenvolupar adenomes principalment colorectals tot i que en moltes ocasions es poden desenvolupar adenomes en el tracte GI superior. També s'associen a un risc augmentat de tumors en altres localitzacions.

La Poliposis Adenomatosa Familiar (FAP): és una malaltia autosòmica dominant que es manifesta per igual en ambdós sexes (Half, Bercovich, & Rozen, 2009) i es

INTRODUCCIÓ

caracteritza per l'aparició de més de 100 adenomes (poden ser centenars o milers) en el còlon i recte a partir de la segona dècada de vida, aquesta malaltia va ser descrita l'any 1975 per Bussey (Muto, Bussey, & Morson, 1975). La prevalença de FAP és de 2,3 – 3,2 casos per 100000 persones. Històricament, entre el 0,5 – 1% de casos de CCR eren pacients amb FAP. Actualment gràcies al cribatge per proves genètiques, aquesta xifra està al voltant del 0,7% (García & Arenas).

Els símptomes apareixen quan els adenomes són grans i nombrosos i causen sangnat rectal o fins hi tot anèmia. Per aquesta raó, els símptomes són poc freqüents en nens i adolescents. També poden causar restrenyiment o diarrea, dolors abdominals, masses abdominals palpables o pèrdua de pes. Els individus amb FAP a qui no se'ls realitza una colectomia profilàctica, tenen un risc aproximadament del 100% de desenvolupar un CCR als 40-50 anys (Fearnhead, Britton, & Bodmer, 2001; Lynch & de la Chapelle, 2003).

A més, la gran majoria dels malalts presenten manifestacions extracolòniques, com són adenomes gastroduodenals, osteomes, anomalies dentals, hipertrofia congènita de epitelí de la retina i tumors desmoides. Algunes d'aquestes manifestacions extracolòniques (sobretot els tumors desmoides i els tumors de tracte gastrointestinal superior) són la causa principal de mortalitat en pacients amb FAP que se'ls hi ha fet cirurgia colorectal profilàctica o curativa si ja han desenvolupat un carcinoma al còlon (Fearnhead et al., 2001). Quan els pacients amb FAP desenvolupen manifestacions extracolòniques parlem de la síndrome de Gardner, i quan s'acompanya de tumors en el sistema nerviós central llavors s'anomena síndrome de Turcot.

Entre el 80-90% de les famílies amb FAP, presenten una mutació patogènica en el gen supressor de tumors *APC*. La gran majoria d'aquests casos tenen història familiar però també hi ha casos *de novo*, és a dir, sense evidència clínica o genètica d'antecedents familiars. Una part d'aquests casos *de novo* poden ser el resultat de mosaïcisme germinal (Half et al., 2009).

En aquells familiars que mitjançant un diagnòstic genètic s'ha trobat una mutació en el gen *APC* o bé en membres de la família en situació de risc que encara no s'han fet

INTRODUCCIÓ

l'estudi genètic, es recomana el cribatge periòdic anual del còlon i recte per sigmoidoscòpia flexible a partir dels 10 – 12 anys d'edat (S. Winawer et al., 2003). A partir dels 25 anys, si no s'ha trobat cap adenoma, les sigmoidoscòpia es podran anar espaiant progressivament. En el moment que es detecta algun adenoma s'ha de realitzar una colonoscòpia total cada 6 – 12 mesos fins que s'indiqui la cirurgia. En la majoria de pacients es realitza la proctocolectomia total amb la creació de un reservori ileoanal o la colectomia total amb anastomosi ileorectal profilàctica preventiva quan el número d'adenomes fa inviable el seu control endoscòpic (Vasen, 2000).

La Poliposis Adenomatosa Familiar Atenuada (AFAP): és una variant de la FAP més moderada, ja que presenta un número inferior de pòlips, entre 10 i 100, i l'aparició dels adenomes sol ser 10 – 15 anys més tardana que en els casos amb FAP clàssica (Knudsen, Bisgaard, & Bulow, 2003). Existeix una major predisposició a que els pòlips es localitzin en el còlon dret, també poden desenvolupar adenomes duodenals, pòlips fúngics gàstrics, escassos cops desmoides, però rarament presenten hipertrofia del epitelí de la retina (Half et al., 2009).

Clínicament, els pacients d'AFAP que tenen un número de pòlips baix es poden confondre fenotípicament amb pacient amb SL. L'AFAP segueix un patró autosòmic dominant, però amb un índex de mutació *de novo* superior al de la síndrome de FAP. Es detecten mutacions en el gen *APC* només en un 30% dels casos d'AFAP i en una proporció semblant se'ls hi detecten alteracions bial·lèliques en gen *MUTYH* (veure més endavant) que s'associen a un patró d'herència autosòmic recessiu (Filipe et al., 2009; Kashfi et al., 2015; Nielsen et al., 2007; Sieber et al., 2003).

Les colonoscòpies completes es recomanen fer-les cada cinc anys en els familiars en situació de risc a partir dels 15-25 anys, en funció de l'edat de presentació de la malaltia en els familiars afectes. A partir dels 30 anys es recomana fer-les cada dos anys fins als 74 anys, que llavors s'individualitza cada cas. La colectomia profilàctica es recomana en aquells casos amb múltiples adenomes on no es pot assegurar un total control per colonoscòpia, i així evitar el desenvolupament de CCR.

INTRODUCCIÓ

Poliposi Associada a MUTYH (MAP): va ser descrita per Al-Tassat et al., l'any 2002 (Al-Tassat et al., 2002) i està causada per mutacions germinals bial·lèliques en el gen *MUTYH*. És la primera síndrome de poliposi que té transmissió autosòmica recessiva, i té una penetrància completa però d'expressió variable (Bolocan, Ion D Fau - Stoian, Stoian Rv Fau - Serban, & Serban, 2011). Molt sovint no es pot discriminar segons la clínica entre les síndromes FAP i AFAP. Així mateix alguns pacients també presenten manifestacions extracolòniques, com pilomatricomes, pòlips duodenals i càncer gàstric d'aparició precoç.

El gen *MUTYH* és un gen que codifica per una DNA glicosilasa implicada en la reparació del DNA, en particular en la reparació mitjançant escissió de bases (BER, *Base Excision Repair*) que es troba en el cromosoma 1p34. Les mutacions bial·lèliques en el gen *MUTYH* s'han identificat en famílies clínicament catalogades com FAP o AFAP, explicant una tercera part dels casos amb AFAP. El 7,5% dels pacients amb un fenotip de FAP clàssica i sense cap mutació identificada en el gen *APC*, tenen dues mutacions germinals en el gen *MUTYH* (Sieber et al., 2003), la Y165C i G382D, que representen el 75% de les variants identificades en el gen *MUTYH* en caucàsics (Yamaguchi et al., 2014).

La inactivació bial·lèlica del gen *MUTYH* comporta l'acumulació de mutacions somàtiques de tipus transversions. Si afecten al gen *APC* en l'epiteli colònic, dóna pas a la transformació neoplàsica. Aquest fet explica el fenotip que comparteixen els pacients amb MAP amb els casos FAP i AFAP (Bolocan et al., 2011). El patró de mutacions somàtiques en els càncers i adenomes en la poliposi associada a *MUTYH*, a nivell de l'*APC* i d'altres gens com *KRAS*, es caracteritza per un excés significatiu de mutacions G:C>T:A.

7.3. Naturalesa molecular de les alteracions en el gen *APC*

La majoria de les mutacions germinals en el gen *APC* associades a FAP són mutacions *nonsense* o *frameshift* que tenen com a resultat una proteïna truncada; que en afectar la seva funcionalitat es consideren clarament patogèniques. La resta de mutacions poden ser variants *missense* (no sinònimes) (Frayling et al., 1998; Laken et al., 1997; Wallis, Morton, McKeown, & Macdonald, 1999; Woodage et al., 1998), que

INTRODUCCIÓ

provoquen el canvi d'un sol AA (aminoàcid), grans delecions (Sieber, Heinemann, et al., 2002; Sieber, Lamlum, et al., 2002) o mutacions d'*splicing* (Aretz, Uhlhaas, Caspari, et al., 2004; Aretz, Uhlhaas, Sun, et al., 2004; Montero et al., 2001). Mentre que l'impacte funcional de les grans delecions i també de les variants que afecten de manera clara l'*splicing* (Aretz, Uhlhaas, Sun, et al., 2004) es pot considerar clar, no ho és tant el de les mutacions *missense*. De fet, les mutacions *missense* es troben en una minoria dels casos amb FAP clàssiques mentre que la proporció de mutacions *missense* en els casos d'AFAP són proporcionalment més freqüents (Azzopardi et al., 2008).

S'han descrit correlacions genotip - fenotip, de tal manera que la localització de la mutació germinal d'*APC* condiona la severitat i l'espectre clínic de la malaltia (Galiatsatos & Foulkes, 2006; Nagase et al., 1992; Nieuwenhuis & Vasen, 2007). La major part de les mutacions germinals del gen *APC*, es localitzen entre els codons 157 i 1595, però els codons amb més freqüència de mutacions són el 1061 i el 1309. Aquestes dues mutacions estan a la regió anomenada MCR (*Mutation Cluster Region*), que a més a més, és la regió on s'acumulen el 80% de les mutacions somàtiques d'*APC* (Miyoshi et al., 1992). La mutació truncant en el codó 1309 és la mutació que s'associa amb un fenotip de FAP més sever.

Ja que el gen *APC* actua com a gen supressor tumoral i d'acord amb la hipòtesi del "*two-hit*" de Knudson (A. G. Knudson, Jr., 1971), s'esperaria que *APC* quedés completament inactivat degut a una mutació somàtica del segon al·lel o per pèrdua del al·lel salvatge (A. G. Knudson, 1993) i que aquests dos esdeveniments foren totalment independents. Per contra s'ha descrit que el tipus de mutació somàtica d'*APC* ve condicionat per la localització de la mutació germinal (Kohler et al., 2009; Lamlum et al., 1999; Rowan et al., 2000; Sieber et al., 2006), qüestionant la independència del segon *hit*. Si la primera mutació és més agressiva, és a dir produeix una proteïna truncada que ha perdut gran part de la regió d'unió i regulació de la β -catenina, el segon *hit* acostuma a ser la pèrdua al·lèlica, mentre que si la primera és menys patogènica la segona mutació pot ser una mutació truncant de major impacte funcional.

7.4. Algoritme diagnòstic de la Poliposi adenomatosa familiar

A la pràctica clínica aquests malalts que presenten adenomes múltiples segueixen un algoritme de diagnòstic per a la identificació de FAP, AFAP o MAP. A sota es descriu l'algoritme que fem en el nostre centre.

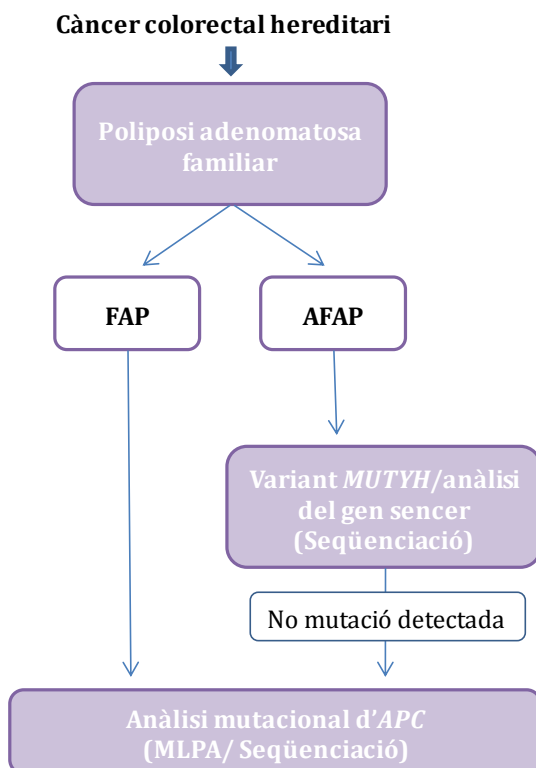


Figura 13: Algoritme diagnòstic per la poliposi adenomatosa familiar i la poliposi associada a MUTYH. Davant d'una família amb poliposi clàssica es procedeix directament al anàlisi mutacional del gen APC (primer de grans delecions per MLPA seguit de la seqüenciació de la regió codificant sencera). Si el patró és recessiu o la clínica és atenuada primer es fa l'anàlisi mutacional del gen MUTYH i si no es detecta cap mutació es procedeix a l'anàlisi de l'APC.

8. Al·lells de penetrància moderada

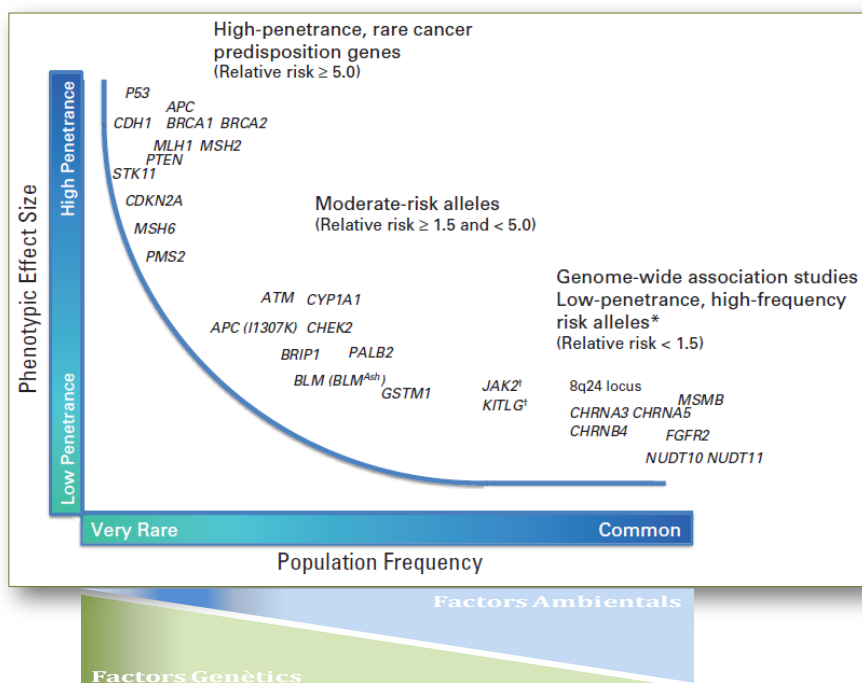


Figura 14: Grandària de l'efecte fenotípic i freqüència d'ocurrència. (*) Els gens amb nom només reflecteixen els gens candidats amb més probabilitats d'estar implicats pels polimorfismes nucleòtid únic (SNP) identificats a partir dels estudis GWAS. Modificat de (Stadler et al., 2010)

Les alteracions descrites fins el moment afecten a gens d'alta penetrància que en són responsables, en general, de síndromes de predisposició hereditària al càncer clarament definides. En l'altra banda de l'espectre d'aquesta predisposició estarien les variants en gens de baixa penetrància i que són comunes en la població general. En mig d'aquestes categories estan els gens de penetrància moderada que confereixen un risc relatiu entre 1.5 i 5, que podrien ser responsables d'una proporció significativa de casos en poblacions seleccionades. En el gen *APC* s'han descrit algunes variants que semblen complir amb aquestes característiques (Scott et al., 2004).

8.1. Al·lel *APC* I1307K

En aquesta tesi hem centrat una part important dels esforços en caracteritzar l'al·lel de penetrància moderada I1307K del gen *APC* que és un canvi *missense* amb penetrància incompleta, que va ser reportada per primer cop per Steve J. Laken et al. l'any 1997 (Laken et al., 1997). Aquesta mutació és un canvi nucleotídic d'una timina (T) a una adenina (A) en el nucleòtid 3920 (c.3920T>A) present en un 6% de controls sans de la població Ashkenazi i al voltant del 28% de les famílies Ashkenazi amb història familiar de CCR. Des del punt de vista epidemiològic la variant I1307K confereix un increment del risc $\sim 1.5 - 2.17$ de desenvolupar tant adenomes com carcinomes colorectals (Boursi et al., 2013; Gryfe, Di Nicola, Lal, Gallinger, & Redston, 1999; Regev et al., 2005; Rennert et al., 2005; Stern et al., 2001) i fins al moment, la seva caracterització funcional ha sigut molt escassa.

S'ha dut a terme estudis per avaluar l'impacte de I1307K en altres tumors (Lieberman et al., 2007). Així, no es va detectar cap associació entre la variant *APC* I1307K i el desenvolupament de càncer d'estómac (Dundar et al., 2007). Tampoc es va trobar relació estadísticament significativa entre la variant i el risc de patir càncer de pròstata (Lehrer et al., 2003; Lehrer et al., 2000; Poynter et al., 2006). Però per altra banda es va establir una associació entre la presència de l'al·lel I1307K i el ser portadors de mutacions en *BRCA1/2*. Aquesta l'alta prevalença d'al·lel I1307K amb mutacions en els gens *BRCA1/2* probablement es podria explicar per l'ascendència jueva de les famílies estudiades (Gershoni-Baruch et al., 2000).

Aquesta variant provoca un canvi d'aminoàcid hidrofòbic, la isoleucina (I) a un de carga positiva, la lisina (K) en el codó 1307. Tanmateix, també genera una regió hipermutable de vuit adenines (A) consecutives, i això podria causar l'acumulació de mutacions somàtiques, augmentant la predisposició al càncer colorectal (Laken et al., 1997; P. Zauber et al., 2014). Tots aquest fets deixen oberta la possibilitat de que la variant *APC* I1307K promogui la tumorigènesis per mecanismes alternatius: bé una alteració subtil en les funcions clàssiques d'APC lligades a la unió a β -catenina o bé en incrementar la freqüència de mutacions que conduïrien a una major probabilitat d'adquisició de mutacions truncants en el gen *APC*.

INTRODUCCIÓ

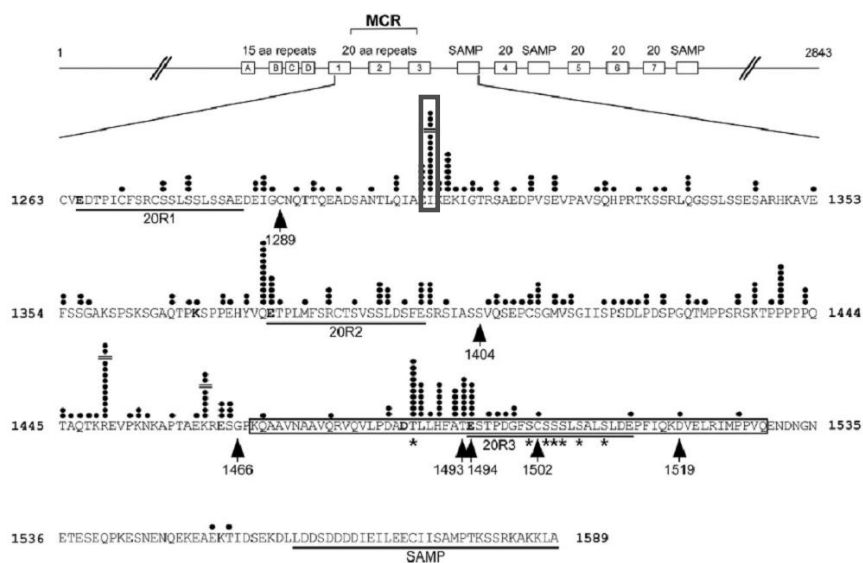


Figura 15: Localització de la mutació I1307K en la regió MCR i on es mostra que aquest residu és diana freqüent de mutacions somàtiques (Kohler, Derungs, Daum, Behrens, & Schneikert, 2008)

A més a més, s'ha identificat una mutació associada a la variant I1307K. Es tracta d'una inserció a nivell somàtic d'una adenina en la regió dels codons 1306 – 1309 (c.3924_3925insA) que té com a resultat la creació d'un codó stop prematur (Lieberman et al., 2007; N. P. Zauber et al., 2005). Per altra banda, la manca de qualsevol variació addicional de la línia germinal suggereix fermament que és el canvi c.3920T> A el que causa la inestabilitat genètica local, que resulta en més canvis somàtics (P. Zauber et al., 2014).

9. Al·lels de baixa penetrància

Una altra estratègia que ha estat de gran importància en la identificació de gens de predisposició al càncer han estat els estudis d'associació del genoma complet (Genome-Wide Association Studies, GWAS) o de gens candidats, fets en àmplies series de casos i controls. Aquests estudis recopilats amb meta-anàlisis, com el que van publicar Ma et al. 2013 (Ma, Zhang, & Zheng, 2013), han relacionat nombroses variants amb el risc de CCR.

Cal destacar que aquests estudis han evidenciat que hi ha variants de baixa penetrància en el gen *APC* que podrien tenir un rol no només en casos de poliposi sinó

INTRODUCCIÓ

també en càncer colorectal esporàdic com són: I1307K en poblacions no Ashkenazi, i l'al·lel E1317Q. Per això la seva contribució al desenvolupament de les síndromes FAP o AFAP no estan clares (Frayling et al., 1998; Heinimann et al., 2001; Menendez et al., 2008). Per altra banda, aquests estudis també han contribuït a classificar variants de baixa penetrància com a polimorfismes, com es el cas de la variant *APC* D1822V.

Taula 6: Variants genètiques associades al CCR identificades en estudis del gens candidats. Adaptada de: (Ma et al., 2013; Valle, 2014)

GEN	Variant	Freqüència en controls	OR (98%CI)	Evidències d'associació	Etnia
<i>MUTYH</i>	Mutació bial·lèlica	0,01%	10,19 (5,0 – 22,0)	Forta	Caucàsics
<i>MUTYH</i>	G382D (rs36053993)	0,00%	6,49 (2,6 – 10,4)	Forta	Caucàsics
<i>MUTYH</i>	Y165C (rs34612342)	0,01%	3,32 (1,1 – 9,8)	Forta	Caucàsics
<i>APC</i>	I1307K (rs1801155)	6,80%	1,96 (1,4 – 2,8)	Forta	Ashkenazi
<i>CHEK2</i>	1100delC	0,71%	1,88 (1,3 – 2,7)	Forta	Caucàsics
<i>CHEK2</i>	I157T (rs17879961)	3,91%	1,56 (1,3 – 1,8)	Forta	Caucàsics
<i>MLH1</i>	Rs1800734 (promotor)	21,11%	1,51 (1,3 – 1,7)	Forta	Caucàsics
<i>DNMT3B</i>	Rs1569686 (promotor)	16,99%	0,57 (0,5 – 0,7)	Forta	Tots
<i>GSTM1</i>	“Present/Nul”	50,64%	1,10 (1,0 – 1,2)	Moderada	Tots
<i>TERT</i>	Rs2736100 (intró 2)	49,34%	1,07 (1,0 – 1,1)	Moderada	Caucàsics

De les variants d'*APC* identificades, la més prevalent és la variant *APC* D1822V. Aquesta provoca un canvi d'un àcid aspàrtic (aminoàcid hidròfil) a una valina (aminoàcid hidròfob) degut a una transversió d'A a T. Aquest canvi es troba en el domini de regulació de β -catenina entre la quarta i la cinquena repetició de 20 AA. Tot i que teòricament pot tenir un cert impacte funcional la seva rellevància segueix sent desconeguda. La majoria del estudis no troben una associació de la variant amb un increment del risc de CCR, i la consideren com a polimorfisme. De fet alguns estudis l'associen a un risc reduït de càncer de còlon per aquells individus amb la variant en homozigosi diagnosticats després dels 65 anys d'edat o en individus que

tenen una dieta baixa en greixos, o fins hi tot reporten un possible efecte protector enfront el CCR (Bougatef et al., 2009; Feng et al., 2014; Menendez et al., 2004; Ruiz-Ponte, Vega, Conde, Barros, & Carracedo, 2001a, 2001b; Slattery et al., 2001).

Una altra variant, l'*APC* E1317Q, també localitzada al domini d'unió a β -catenina, es va relacionar amb múltiples pòlips i es va reportar una feble associació amb CCR (Frayling et al., 1998; Hall et al., 2009; Lamlum et al., 2000). Val a dir que estudis més recents amb més pacients i controls de CCR no han pogut confirmar la relació entre la variant i l'augment del risc de CCR (Hahnloser et al., 2003; Heinen, 2010; Rozek, Rennert, & Gruber, 2006).

10. Variants de significat desconegut (VSD) i la seva caracterització funcional

El nostre treball s'ha centrat a intentar caracteritzar funcionalment algunes variants *missense* del gen *APC*, que han estat associades tant a una agregació familiar de poliposi com de càncer colorectal. Per algunes d'aquestes variants la seva contribució al desenvolupament de CCR segueix sent desconeguda.

Quan una mutació germinal patogènica és identificada en una família, els portadors de la mutació poden beneficiar-se d'una major vigilància i prendre decisions sobre les mesures preventives de manera informada. Al mateix temps els familiars no portadors de la mutació no s'han de sotmetre a una vigilància intensiva que en el cas del CCR, a més, és invasiva en estar indicada una colonoscòpia. Però, en molts casos, les variants identificades en línia germinal no se sap si interfereix en la síntesi o funció de les proteïna, el que impedeix la seva utilització clínica (Auclair et al., 2006; Bray, Ren, Masuyer, & Ferlay, 2013; S. J. Winawer et al., 1997).

Amb l'ús de la seqüenciació massiva de nova generació i els mètodes d'enriquiment de seqüència genòmica fa que els panells de seqüenciació de gens complets de predisposició de càncer siguin tècnicament viables, podent-los aplicar al diagnòstic, el que ens permetrà delimitar millor la relació entre el fenotip i el genotip d'aquestes síndromes. Però l'ús d'aquestes tecnologies també fa augmentar de forma

INTRODUCCIÓ

exponencial el nombre de VSD (variant de significat desconegut) identificades i per tant fa més evident encara la necessitat de classificar-les.

Aquestes VSD són generalment canvis *silents*, canvis en les zones no codificants o canvis *missense*. Les variants *missense* que són canvis no sinònims, són aquelles situades en una regió codificant d'un gen que comporten el canvi d'un aminoàcid. Aquest canvi pot afectar la funció de la proteïna i tenir conseqüències fenotípiques en els individus portadors. Els intents actuals per classificar aquestes variants impliquen l'ús de diferents criteris que poden suggerir patogenicitat com són les dades dels estudis de co-segregació, les prediccions funcionals *in silico*, antecedents personals i familiars de càncer, la co-ocurrència d'aquestes variants amb mutacions clarament patogèniques, la freqüència d'aquestes variants en la població general (controls) o les característiques moleculars dels tumors.

Des del punt de vista de laboratori van tenint més importància el poder evidenciar els efectes de les variants sobre el RNA (*splicing*, expressió relativa de l'al·lel mutat) i fer estudis funcionals *in vitro* que varien en funció de les funcions de la proteïna afectada (Cotton & Sriver, 1998; Hofstra, Osinga, & Buys, 1997; Syngal et al., 1999; Valle, 2014). El pes relatiu de cada criteri és variat. Amb els criteris clínics hi ha més consens sobre la seva rellevància, però en canvi en la manera de valorar el resultat dels assajos funcionals es tendeix a ser més prudent i exigir una reproduïbilitat i una coherència elevada. S'ha proposat la utilització de models Bayesianes per a la integració d'evidències directe i indirectes de la patogenicitat en un model únic per obtenir un valor de probabilitat de patogenicitat (Goldgar et al., 2008; Pastrello et al., 2011; Plon et al., 2008) en un intent d'objectivar la evidència disponible. De totes maneres aquests models probabilístics fan moltes assumpcions que també són motiu de discussió.

A continuació detallarem alguns dels procediments utilitzats per la caracterització funcional de les mutacions trobades en els gens lligats a la predisposició hereditària al càncer.

10.1. Assaig *in silico*

Aquests assajos permeten predir com pot afectar la VSD a nivell de processament del mRNA i a nivell de proteïna. Són programes de predicció dels llocs de *splicing*, que han estat desenvolupats per predir la possibilitat de que es creï, es modifiqui o hi hagi pèrdua d'un d'aquests llocs (Aretz, Uhlhaas, Sun, et al., 2004; Spurdle, Couch, Hogervorst, Radice, & Sinilnikova, 2008). Hi ha altres programes de predicció de llocs ESE (*Enhancer Splicing Elements*)(Cartegni, Wang, Zhu, Zhang, & Krainer, 2003), altres que prediuen si hi ha modificacions a nivell de proteïna, que sovint utilitzen la conservació evolutiva com a mesura per avaluar la importància del residu, la severitat del canvi d'aminoàcid o si provoca una modificació a l'estructura de la proteïna (Arnold et al., 2009; Chao et al., 2008).

INTRODUCCIÓ

Taula 7: Programes de predicció *in silico* a nivell de RNA i proteïna més comunament utilitzats.

Anàlisi <i>in silico</i> a nivell de RNA		
Programes de predicció de llocs <i>splicing</i>		
Programa	Pàgina Web	Referències
NetGene2	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/	Hebsgaard et al., 1996 Brunak et al., 10991
Spliceport	http://spliceport.cs.umd.edu	Dogan et al., 2007
NNSplice	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html	Reese et al., 1997
SoftBerry	http://linux1.softberry.com/berry.html	Burset et al., 2001
MaxEntScan	http://genes.mlt.edu/burgelab/maxent/Xmaxentntscan_coreseq.html	EngL et al., 2004
GENESCAN	http://genes.mit.edu/GENSCAN	Burge and Karlin et al., 1998
Splice Site Finder	http://violin.genet.sickkids.on.ca/all/splicesitefinder.html	Senapathy et al., 1990
GeneSplicer	http://www.tigr.org/tdb/GeneSplicer/gene_spl.html	Peryea et al., 2001
Human Splice Finder	http://splice.uwo.ca	Rogan et al., 2009 Nalla i Rogan et al., 2005
Splicing Sequence Finder	http://www.umd.be/SSF/	Desmet et al., 2009
Programes de predicció de llocs ESE		
RescueESE	http://genes.mit.edu/burgelab/rescue-ese/	Fairbrother et al., 2002
ESEfinder 3.0	http://rulai.cshl.edu/cgi-bin/tools/ESE3/esefinder.cgi?process=home	Cartegni et al., 2003 Smith et al., 2006
PESX	http://cubweb.biology.columbia.edu/pesx/	Zhang i Chasin., 2004 Zhang et al., 2005
Anàlisi <i>in silico</i> a nivell de proteïna		
Programa	Pàgina Web	Referències
Polyphen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/	Adzhubei et al., 2010
A-GVGD	http://agvgd.iarc.fr/	Mathe et al., 2006 Tavtigian et al., 2005
SIFT	http://sift.jcvi.org/	Ng i Henikoff et al., 2002
MAPP-MMR	http://mappmmr.blueankh.com/	Chao et al., 2008
CONDEL	http://bg.upf.edu/condel/home	Gonzalez-Perez et al., 2011
Mutation Assessor	http://mutationassessor.org/v1/	Reva et al., 2011

10.2. Assaig a nivell de mRNA

Tenim dos tipus assajos per mirar si la variant té cap efecte sobre el mRNA:

1) Estudi experimental de l'efecte de la variant en el processament del mRNA, que es fa a partir d'un disseny específic per avaluar si hi ha un efecte en el *splicing* del mRNA mitjançant RT-PCR (Arnold et al., 2009; Kaufmann et al., 2009; Sharp, Pichert, Lucassen, & Eccles, 2004; Tournier et al., 2008).

2) Estudi de l'expressió al·lèlica diferencial, que analitzen la quantitat relativa dels dos al·lells en el mRNA (Castellsague et al., 2010; Santibanez Koref et al., 2010).

Aquests tests es poden aplicar sobre RNA obtingut de limfòcits de sang perifèrica o bé en sistemes tancats, amb plasmidis. Si es pot fer aquests assajos a partir de limfòcits de pacients (Aretz, Uhlhaas, Sun, et al., 2004; Kaufmann et al., 2009) poden ser molt informatius si el processament de la mostra ha estat òptim, però molt sovint no es disposa d'aquest tipus de material. Per això s'han desenvolupat tècniques per fer l'estudi de mRNA *in vitro* que presenten bona correlació amb els estudis amb limfòcits. Alguns d'aquests assajos utilitzen plasmidis d'expressió on s'incorpora la VSD a estudiar, i posteriorment es transfecta aquest plasmidi en una línia cel·lular estable. El RNA extret de les cèl·lules s'utilitzarà per fer l'anàlisi a partir de RT-PCR (Betz et al., 2010; Cartegni, Chew, & Krainer, 2002); (Lastella, Surdo, Resta, Guanti, & Stella, 2006; Naruse et al., 2009; Tournier et al., 2008). Per altra banda, també s'han descrit els assajos de conversió, que es basen en convertir una mostra diploide en una haploide, mitjançant l'aïllament dels dos al·lells en híbrids de cèl·lules somàtiques i posteriorment es realitza l'estudi del RNA de cada cèl·lula (Casey et al., 2005; Nakagawa et al., 2002; Yan et al., 2000). Aquest estudis es poden fer per a qualsevol gen i també s'han utilitzat pel gen *APC* (Kaufmann et al., 2009).

10.3. Assaig *in vitro* amb línies cel·lulars humanes

Els estudis *in vitro* s'utilitzen per avaluar l'impacte funcional de les variants. En aquest cas els tests desenvolupats ja estan orientats i són específics per cadascuna de les proteïnes i les seves funcions. En les taules 8 i 9 s'esmenten alguns d'aquests assajos segons la proteïna i funció que es vol caracteritzar.

INTRODUCCIÓ

Taula 8: Assajos utilitzats per caracteritzar mutacions en les proteïnes BRCA1/2

PROTEINA	ASSAIG	DOMINI/FUNCIÓ	BIBLIOGRAFIA
BRCA1	Activitat Transcripcional	Domini C-Terminal	(Millot, Carvalho et al. 2012)
BRCA1	Fenotip de la colònia petita (SCP)	Les colònies per variants deletèries son més grans que la variant salvatge.	(Millot, Carvalho et al. 2012)
BRCA1	Rescat de resistència a la radiació	Manteniment de la integritat del genoma	(Millot, Carvalho et al. 2012)
BRCA1	Sensibilitat a la proteasa	Les variants poden causar defectes en el plegament de les proteïnes	(Millot, Carvalho et al. 2012)
BRCA1	Unió a fosfoèptits	Domini BRCT	(Millot, Carvalho et al. 2012)
BRCA1	Activitat de la lligasa d'ubiquitina	Domini N-Terminal dels dits de zing té activitat lligasa d'ubiquitina	(Millot, Carvalho et al. 2012)
BRCA1/2	Localització subcel·lular	Normalment es localitzen al nucli.	(Millot, Carvalho et al. 2012)
BRCA1/2	Estudi funcional basat en cèl·lules mares embrionàries	Si les variants són patogèniques no fan viables les cèl·lules embrionàries.	(Millot, Carvalho et al. 2012) (Guidugli, Carreira et al. 2014)
BRCA1/2	Assaig de recombinació homòloga-Dirigida	Avaluar la capacitat de les variants en promoure la recombinació homòloga dirigida.	(Millot, Carvalho et al. 2012) (Guidugli, Carreira et al. 2014)
BRCA1/2	Amplificació del centròmer	Variants deletèries generen múltiples centròmers	(Millot, Carvalho et al. 2012) (Guidugli, Carreira et al. 2014)
BRCA1/2	Recombinació en llevat	Estudi de la capacitat de recombinació en llevats diploides.	(Millot, Carvalho et al. 2012) (Guidugli, Carreira et al. 2014)
BRCA2	Supervivència al MMC	Cèl·lules deficientes amb BRCA2 presenten hipersensibilitat a agents que danyen el DNA.	(Guidugli, Carreira et al. 2014)
BRCA2	Interacció proteïna-proteïna	BRCA2 s'uneix a diferents proteïnes i variants en els dominis d'unió pot alterar la seva afinitat.	(Guidugli, Carreira et al. 2014)
BRCA2	<i>RNA splicing</i>	Anàlisi del <i>splicing</i> basat en minigén o anàlisi de RNA derivats de la sang o mostres de teixit de pacients	(Guidugli, Carreira et al. 2014)

*(Guidugli et al., 2014; Millot et al., 2012)

Taula 9: Assajos utilitzats per caracteritzar mutacions en les proteïnes MMR

PROTEINA	ASSAIG	DOMINI/FUNCIÓ	BIBLIOGRAFIA
MMR	IHQ i test MSI	Fenotip dels tumors	(Heinen and Juel Rasmussen 2012)
MMR	Reparació de bases desaparellades	Capacitat de reparar una sola base desaparellada i petits bucles d'inserció / deleció	(Heinen and Juel Rasmussen 2012)
MMR	Localització cel·lular	Els MMR és important que entrin al nucli per reparar el DNA malmès.	(Heinen and Juel Rasmussen 2012)
MMR	Resposta al DNA malmès	Línies cel·lulars tumorals deficientes en MMR són més resistents al tractament amb agents que danyen el DNA.	(Heinen and Juel Rasmussen 2012)
MMR	Estudi de VSD en llevats	Són soques amb gens marcadors que porten repeticions homopolimeriques.	(Heinen and Juel Rasmussen 2012)
MMR	<i>RNA splicing</i>	Anàlisi del <i>splicing</i> basat en minigén o anàlisi de RNA derivats de la sang o mostres de teixit de pacients	(Heinen and Juel Rasmussen 2012)
MMR	Interacció proteïna-proteïna	Examinar la formació d'heterodímers entre variants MSH2 i una proteïna de fusió GST-MSH3/6. O variants en MLH1 variants per unir-se a PMS2	(Heinen and Juel Rasmussen 2012)

*(Heinen & Juel Rasmussen, 2012)

INTRODUCCIÓ

Pel que fa al gen *APC*, alguns estudis analitzen l'efecte de les variants introduïdes en un plasmidi amb el cDNA de gen d'*APC*, mitjançant la transfecció transitòria o estable, en línies cel·lulars deficientes en el gen *APC* (Azzopardi et al., 2008; Hargest & Williamson, 1995; Menendez et al., 2008). Amb aquest experiment es poden analitzar diferents funcions de la proteïna APC que, com s'ha comentat abans, són variades.

Assaig de luciferasa: Aquest assaig avalua el que es considera la funció més rellevant d'*APC* com és l'activitat de transcripció mitjançada pel complex β -catenina/TCF-4 de les cèl·lules transfectades amb les variants a estudiar. La co-transfecció de plasmidis amb el gen de la luciferasa i l'anàlisi de la quantitat de senyal que tinguin les cèl·lules transfectades ens indica si les variants en *APC* restableixen una activitat transcripció normal o pel contrari la proteïna APC continua sent no funcional ja que les cèl·lules receptores són deficientes en *APC* wt (Azzopardi et al., 2008).

Localització (i quantificació) de la β -catenina: Es pot estudiar la localització subcel·lular de la β -catenina mitjançant dues tècniques:

1) Detecció de la proteïna per Western Blot després de separar les fraccions cel·lulars, és a dir, separar la proteïna citoplasmàtica de la nuclear (Menendez et al., 2008). Aquesta tècnica també permet valorar si hi ha diferències en la quantitat de β -catenina total.

2) La detecció de la β -catenina per immunofluorescència permet veure si hi ha diferència en la distribució cel·lular de la proteïna en les cèl·lules transfectades (Faux et al., 2004).

La localització cel·lular de la proteïna APC: també és rellevant la localització de la proteïna APC i pot ser estudiada mitjançant immunotinció o bé, per l'estudi de la proteïna fusionada amb un fluorocrom que serà expressada en cèl·lules humanes deficientes en aquesta proteïna (Brieger et al., 2005; Kohler et al., 2008).

INTRODUCCIÓ

Creixement i morfologia cel·lular: Quan es transfecta el cDNA del gen *APC* salvatge en una línia cel·lular amb el gen inactiu, aquestes canvien la seva morfologia i la seva capacitat de proliferació. Transfectar el cDNA amb les variants que es volen caracteritzar es permetria veure si també afecta a la morfologia i al creixement cel·lular.

Assaig de migració i adhesió: A partir d'un cultiu cel·lular completament confluent s'hi fa una "ferida" a la monocapa de cèl·lules, d'aquesta manera es pot comprovar, després de 24 o 48h, si la capacitat de migració de les cèl·lules per recolonitzar la ferida canvia al estar transfectades amb la variant d'*APC* (Faux et al., 2004).

Assaig de creixement en agar tou: amb aquest experiment s'estudia la capacitat de les cèl·lules transfectades en la formació de colònies, i per tant, la seva capacitat tumorigènica (Faux et al., 2004).

Apoptosi: Amb el marcatge de cèl·lules amb un anticòs fluorescent contra la caspasa 3 escindida, que és un marcador específic de cèl·lules en apoptosi, es pot comprovar per citometria si hi ha un increment de cèl·lules en apoptosi un cop es transfecten amb el cDNA amb la variant *APC* (Dikovskaya et al., 2007).

10.4. Estudi d'interacció proteica

Per estudiar l'efecte de les VSD en les interaccions de la proteïna APC amb les altres proteïnes disposem de varis assaigs:

Cromatografia d'afinitat: en el cas que la variant es localitzi en alguna de les repeticions dels dominis d'interacció amb β -catenina es poden crear petits pèptids amb les variants i per columnes d'afinitat es pot estudiar si la variant modifica la capacitat d'aquests dominis a unir-se a la β -catenina (Menendez et al., 2008).

BIAcore: aquesta tècnica permet estudiar la interacció entre biomolècules en temps real, i es pot detectar no tan sols si hi ha interacció o no, si no que permet

veure si hi ha algun canvi en la cinètica d'interacció entre les biomolècules (Menendez et al., 2008).

Immunoprecipitació de complexos proteics (Co-IP): Amb aquesta tècnica es poden aïllar i identificar les interaccions entre proteïnes. Funciona mitjançant la utilització d'un anticòs que té com a diana una proteïna coneguda que es creu que pertany a un gran complex de proteïnes. Localitzant a aquest membre conegut es pot aïllar tot el complex dins d'una solució donada i, d'aquesta manera, ens permetrà aïllar i identificar els altres membres del complex.

10.5. Models murins

Hi ha diferents tipus de models murins, que ens permetran estudiar de forma diferent les característiques de cada variant d'interès.

Un dels models murins que es pot utilitzar per estudiar la capacitat tumorigènica de les variants és injectar de forma subcutànea cèl·lules d'una línia cel·lular humana transfectada de forma estable el plasmidi amb la variant d'interès i seguir l'evolució en el ratolí. És a dir, veure si la transfecció modifica la capacitat que tenen les cèl·lules de formar tumor i créixer. Després aquests tumors es poden caracteritzar molecularment (Faux et al., 2004).

Un altra model murí podrien generar-se amb el gen *APC* mutat amb la variant a estudiar i així veure si la mutació fa incrementar el risc de desenvolupar càncer (Colnot et al., 2004; Jonkers & Berns, 2002).

10.6. Caracterització funcional de mutacions en el gen *APC*

La caracterització funcional de les variants del gen *APC* no és fàcil ja que la mida de la proteïna i les seves múltiples funcions fan que el disseny i interpretació del resultats no sigui senzill. El nostre grup té experiència en aquesta caracterització i ha publicat un dels pocs treballs en aquest tema. Gràcies als assajos funcionals es va poder estimar la patogenicitat de la variant *missense APC* N1026S (Asn a Ser) detectada en una família espanyola afectada de AFAP. A més de co-segregar amb la malaltia la variant presentava una disminució en la capacitat de regular la degradació

INTRODUCCIÓ

de β -catenina, que com a conseqüència produïa un modest increment de la β -catenina nuclear que activa la transcripció de gens involucrats en la carcinogènesis (Menendez et al., 2008). Amb aquestes evidències van considerar que aquesta mutació podria ser considerada com la responsable de la malaltia en aquesta família. Aquesta experiència prèvia ens va animar a endegar un dels objectius de la present tesi. A la taula 10 s'esmenten els assajos funcionals utilitzats per caracteritzar mutacions en el gen *APC*.

Taula 10: Experiments funcionals per estudiar mutacions en el gen *APC*.

PROTEINA	ASSAIG	DOMINI/FUNCIÓ	BIBLIOGRAFIA
APC	Activitat transcripcional	Anàlisi dels nivells de transcripció mediada pel complex β -catenin/TCF-4.	(Azzopardi, Dalosso et al. 2008) (Menendez, Gonzalez et al. 2008)
APC	Assaig de formació de colònies	Es basa un assaig <i>in vitro</i> la supervivència cel·lular en la capacitat d'una sola cèl·lula a créixer en una colònia	(Faux, Ross et al. 2004)
APC	Proliferació cel·lular	Es mesura el nombre de cèl·lules, o el canvi en la proporció de cèl·lules, que s'estan dividint	(Faux, Ross et al. 2004)
APC	Interacció entre proteïnes	Si les variants estan en el domini d'interacció i regulació β -catenina és possible estudiar l'efecte de la variant en l'afinitat entre ambdues proteïnes	(Menendez, Gonzalez et al. 2008)
APC	Invació i Migració cel·lular	Es mesura la velocitat de tancament d'una ferida feta en un cultiu cel·lular en monocapa de cèl·lules confluent.	(Faux, Ross et al. 2004)
APC	RNA splicing	Anàlisi del <i>splicing</i> basat en l'estudi de RNA derivats de la sang o mostres de teixit de pacients	(Kaufmann, Vogt et al. 2009)

11. Càncer Colorectal Familiar de tipus X

Una proporció rellevant (40%) de famílies que presenten una agregació de CCR no polipós i que compleixen els criteris clínics d'Amsterdam tipus I no presenten evidències de MSI i per tant tenen un sistema reparador de desaparellaments intacte (Sanchez-Tome et al., 2015). Avui en dia, aquestes famílies són agrupades, en un calaix de sastre, denominat CCRf-X (Càncer colorectal familiar tipus X)(Lindor et al., 2005).

Les famílies CCRf-X presenten un patró d'herència autosòmica dominant, amb un risc menor de patir CCR i una edat mitjana de diagnòstic de càncer més gran que en la síndrome de Lynch, és a dir al voltant dels 57 anys. Els tumors predominen en el

INTRODUCCIÓ

còlon esquerra i sigmoide i en el recte, i presenten un fenotip semblant als tumors esporàdics (Dominguez-Valentin, Therkildsen, Da Silva, & Nilbert, 2015). A més a més, tenen un ritme més lent de progressió adenoma-carcinoma, tenen una menor incidència de tumors extracolònics i un risc més gran de tumors sincrònics i metacrònics (Jass et al., 1995; Lindor et al., 2005; Llor et al., 2005; Mueller-Koch et al., 2005; Valle et al., 2007).

La definició d'aquesta categoria, que els diferencia dels casos de SL, ha estat important per a la implementació d'un protocol de vigilància específic. A aquests malalts se'ls recomana seguir un protocol de vigilància amb colonoscòpies més espaciades en el temps (cada 5 anys) que s'inicien a una edat més avançada (al voltant dels 35-40 anys). Només en el cas de que en l'història familiar hi hagi un càncer d'endometri cal fer el seguiment de l'endometri.

Els estudis moleculars dels tumors desenvolupats en aquests malalts han revelat que comparteixen mutacions en gens com *KRAS*, *BRAF*, *APC* o *TP53*, que freqüentment es troben alterats en la via CIN, és a dir que l'estat mutacional en aquests gens en els tumors CCRf-X s'assembla al que es pot trobar en els tumors esporàdics amb estabilitat de microsatèl·lits (Abdel-Rahman et al., 2005; Francisco et al., 2011; Sanchez-de-Abajo et al., 2007). Per altra banda, es poden distingir dos grups diferenciats de casos CCRf-X, els que presenten inestabilitat cromosòmica amb freqüents pèrdua de gens supressors de tumors com *APC*, *TP53*, *SMAD4*, *DCC*, etc i així com metilació freqüent del promotor de gens, com *KRAS*, *APC* i *MGMT*. Els estudis genòmics han revelat un increment significatiu del guany en el número de còpies dels cromosomes 2p, 2q, 7p, 7q, 8q, 13q, 20p, i 20q i la pèrdua dels cromosomes 10q 17p, 18p i 18q. A més a més la regió del cromosoma 20q està fortament lligada a tumors CCRf-X (Bellido et al., 2014; Dominguez-Valentin et al., 2015; Middeldorp et al., 2012; Therkildsen et al., 2013). L'altre grup de tumors CRRf-X es caracteritzen per no presentar inestabilitat cromosòmica i una baixa metilació i són infreqüents les mutacions en *TP53* (Dominguez-Valentin et al., 2015; Francisco et al., 2011).

En canvi, a nivell d'alteracions epigenètiques, s'ha reportat que els tumors CCRf-X presenten una tendència a tenir una hipometilació global quan es comparen amb

INTRODUCCIÓ

tumors desenvolupats en pacients amb la SL o en tumors esporàdics. Aquesta hipometilació es relaciona en una reactivació de proto-oncogens que en condicions normals estarien silenciats. També s'ha observat que aquesta hipometilació afecta en els elements *LINE-1* (*Long Interspersed Nuclear Elements*) i es creu que al estar hipometilats poden interferir en la segregació cromosòmica i per tant incrementar la seva inestabilitat. A més a més aquesta hipometilació s'ha associat a una menor supervivència i un inici del CCR a edats més joves (Bellido et al., 2014; Dominguez-Valentin et al., 2015; Goel et al., 2010).

Totes aquestes diferències entre els diferents casos de CCRf-X fa pensar que aquest grup podria estar englobant més d'una síndrome hereditària de predisposició al CCR: en alguns casos seguiria un model monogènic mentre que en altres casos encaixaria amb un model poligènic. Es fa difícil doncs estudiar aquestes famílies on a més un estil de vida compartit podria ser parcialment responsable de l'agregació familiar (Ku et al., 2012; Valle, 2014).

Per tal d'identificar la causa genètica d'aquesta predisposició s'han utilitzat diferents estratègies, com són els estudis de lligament, GWAS i més recentment la seqüenciació d'exomes i genomes. Gràcies a aquests darrers estudis s'estan proposant un gran número de gens que poden estar relacionats amb la predisposició al càncer familiar hereditari (Gylfe et al., 2010). Per exemple, Garre i col·laboradors van proposar els gens de la via de reparació per escissió de bases com ara *NUDT1*, *OGG1* i *MUTYH*, com a possibles responsables de la predisposició del CCR en aquestes famílies, mitjançant l'aproximació del gen candidat (Garre et al., 2011). Un altre exemple de gen proposat com a gen candidat de predisposició a càncer colorectal és el gen *UNC5C*. Aquest gen codifica per un receptor de Netrina-1 amb activitat pro-aptòtiques, que en molts tumors de còlon s'ha observat que la seva expressió està reduïda. En un estudi realitzat per Coissieux et al. van relacionar mutacions en aquest gen com a possible causa de l'agregació familiar de CCR (Coissieux et al., 2011). Més recentment, mitjançant la seqüenciació d'exomes en individus amb CCR amb estabilitat de microsatèl·lits d'una mateixa família que complien criteris d'Amsterdam, s'han proposat com a gens candidats de predisposició a càncer

colorectal els gens *FAN1*, *RPS20*, *SEMA4A*, *FOCAD*, *BUB1* i *BUB3*, etc (Nieminen et al., 2014; Schulz et al., 2014; Segui et al., 2015; Weren et al., 2015).

12. Gen *UNC5C*

La molècula Netrina-1 (NTN-1) va ser descoberta per Tessier-Lavigne i col·laboradors l'any 1994 (Serafini et al., 1994). La van descriure com una molècula quimiotropa que regula l'orientació i migració neuronal durant el desenvolupament del sistema nerviós. Però a més, aquesta molècula també és el lligand dels receptors transmembrana de tipus 1, *UNC5A*, *UNC5B* i *UNC5C*, que funcionen com a receptors de dependència. Aquests receptors activen la mort cel·lular quan no estan units al seu lligand, la NTN1, mentre que, per contra, les seves propietats pro-apoptòtiques són inhibides quan s'uneix a Netrina-1 (Kury et al., 2014; Thiebault et al., 2003).

El gen *UNC5C* està localitzat en el cromosoma 4q22.3 i té 16 exons i codifica per a una proteïna de 931 AA. Quan *UNC5C* s'uneix al seu lligand transmet senyals positives de proliferació i migració. La inactivació *UNC5C* no només ajuda a la progressió del tumor, també podria afavorir l'aparició de CCR. Existeixen evidències de que l'expressió de *UNC5C* es perd o és marcadament reduïda en el càncer colorectal i en càncer gàstric (Thiebault et al., 2003; Toda et al., 2015), per la pèrdua d'heterozigositat o per la metilació del promotor. Aquest fet suggereix que l'*UNC5C* podria actuar com un gen supressor de tumors i les mutacions en aquest gen podrien representar un avantatge selectiu per al desenvolupament de CCR (Kury et al., 2014).

Per altra banda el gen *UNC5C* no és l'únic receptor de NTN1 que s'ha descrit en CCR, ja que també es coneix el gen *DCC* (*Deleted in Colorectal Carcinoma*) com a gen supressor de tumors. Aquest gen no s'expressa o presenta expressió molt reduïda en la majoria de càncers colorectals en estadis avançats. A més aquest receptor indueix apoptosi quan no s'uneix al seu lligand, la NTN1, igual que el receptor *UNC5C*. En un model murí amb pèrdua de funció de *DCC* no es va relacionar la pèrdua de funció d'aquest gen amb un major desenvolupament de CCR, però en canvi sí que es va associar amb un increment de l'agressivitat dels tumors intestinals en els models murins que també presentaven mutacions en el gen *APC*. Aquests resultats demostren

INTRODUCCIÓ

que el DCC funciona com un supressor de tumors a través de la seva capacitat de desencadenar l'apoptosi en cèl·lules tumorals (Castets et al., 2012). En la figura 16 es representa les vies de senyalització dels receptors DCC i UNC5C i s'observa com els dos tenen funcions molt semblants.

Per tant en l'epiteli intestinal la NTN1 juga un paper important en la integritat de la mucosa, la migració de cèl·lules epitelials, i la renovació de teixits mitjançant la inducció de la supervivència cel·lular en la proliferació de cèl·lules progenitores de les criptes, on els nivells de NTN1 són alts. En canvi, a la punta de vellositats, on els nivells de NTN1 són baixos, tant DCC com UNC5C promouen l'apoptosi i el desprendiment de cèl·lules, ja que aquests receptors de mort cel·lular s'expressen constitutivament al llarg de l'eix cripta-vellositat. S'ha vist que la inactivació de *UNC5C* i *DCC* es presenta en el 90% dels CCR, i que és degut tant a alteracions genètiques com epigenètiques. A més, el moment de les alteracions moleculars en els receptors NTN1 no és aleatòria, perquè la inactivació de *UNC5C* es produeix en els primers estadis de les lesions neoplàstiques, mentre que la pèrdua de *DCC* ocorre en etapes posteriors de la carcinogènesi colorectal (Shin et al., 2007).

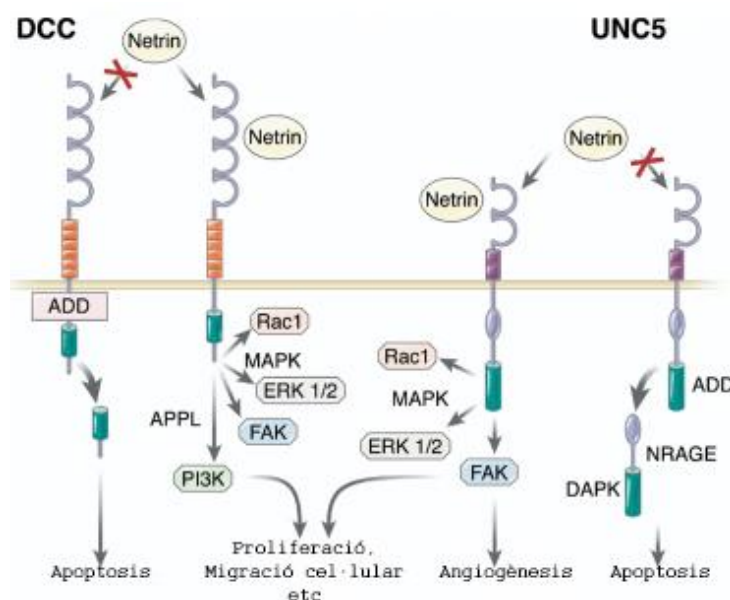


Figura 16: Representació esquemàtica de les vies de senyalització i efectes biològics induïts quan DCC i UNC5C estan lligats i no lligats a NTN1. Els receptors poden activar gran varietat de vies quan s'uneix a Netrina que regulen diferents esdeveniments biològics. (Modificat de: (Grady, 2007))

INTRODUCCIÓ

El gen *UNC5C* va ser descrit com a gen de predisposició al CCR per Coissieux et al. (Coissieux et al., 2011), ja que hi van identificar variants que podrien explicar l'agregació de CCR en famílies d'alt risc. En aquest treball de Coissieux et al, van analitzar el gen *UNC5C* en casos i controls de tres cohorts diferents, on van identificar 20 variants. De totes les variants que van detectar 13 eren canvis sinònims i 7 eren canvis *missense*. Dels 7 canvis *missense* es van centrar en 4, ja que 2 dels canvis ja havien estat reportats prèviament com a polimorfismes i l'últim no estava situat en cap domini funcional de la proteïna, i a més el canvi d'AA no estava associat a un defecte significatiu en la polaritat de la proteïna. Les 4 variants que van estudiar amb més profunditat, totes estaven localitzades en dominis funcionals del receptor. Per altra banda, en 3 de les variants (p.D353N, p.R603C i p.Q630E) no van observar que estiguessin en una proporció més alta en casos que en controls. La variant p.A628K, que no la van detectar en controls, la van identificar en 5 famílies de dues de les tres cohorts estudiades, i en totes les famílies la variant co-segregava amb la malaltia. Aquesta variant està localitzada en el domini funcional pro-apoptòtic ZU5, el que permetia realitzar un estudi funcional per comprovar com afectava a la funció de la proteïna. En l'assaig funcional van observar que la variant p.A6028K disminuïa de forma significativa les capacitats pro-apoptòtiques del receptor.

Amb tots aquests evidències, és a dir, l'activitat pro-apoptòtica del receptor *UNC5C*, el fet que la seva expressió s'ha vist que esta fortament reduïda en CCR i que s'han reportat mutacions que poden explicar l'agregació familiar de CCR, vam pensar que el gen *UNC5C* era un bon gen candidat per estudiar en la nostre sèrie de pacients amb agregació familiar de CCR, que inclou càncer de colon familiar tipus X i poliposis.

HIPÒTESIS



Premisses

L'al·lel *APC* I1307K incrementa el risc de desenvolupar adenomes i carcinomes. Però es desconeix si aquest risc està associat a una activació basal de la via Wnt o a un increment de la taxa de mutació lligat a l'existència d'una regió de vuit adenines consecutives.

S'han identificat mutacions *missense* en *APC* que podrien ser responsables de la predisposició a poliposi. Disposem de tècniques, no estandarditzades, que permeten estudiar el seu impacte funcional.

Hi ha evidències preliminars que indiquen que el gen *UNC5C* es podria associar a un risc augmentat de càncer colorectal.

Hipòtesis

- El risc augmentat de desenvolupar càncer associat a la variant *APC* I1307K pot ser degut a una activació constitucional de la via Wnt.
- El risc augmentat de desenvolupar càncer associat a la variant *APC* I1307K podria estar relacionat a un increment de la taxa de mutacions en el gen *APC*.
- És possible caracteritzar l'impacte funcional de variants *missense* en el gen *APC*.
- Les mutacions en el gen *UNC5C* poden ser responsables d'una part de l'agregació familiar de càncer de còlon familiar tipus X i potser d'altres formes de agregació familiar de càncer de colon.

OBJECTIUS



Objectiu generals:

(I) Avaluació de la contribució de variants *missense* en el gen *APC* en la tumorigènesis colorectal.

(II) Identificació de mutacions en el gen *UNC5C* com a causa de predisposició a càncer colorectal.

Objectius específics:

1: Avaluar l'impacte funcional de la variant I1307K en l'expressió de gens de la via Wnt així com en la unió amb β -catenina.

2: Avaluar l'impacte del al·lel I1307K en la progressió tumoral realitzant una caracterització molecular exhaustiva dels tumors que desenvolupen aquests pacients.

3: Avaluar l'impacte funcional de les variants S1028R i E1317Q en l'expressió de gens de la via Wnt així com en la unió amb β -catenina.

4: Estudiar la contribució de les mutacions constitucionals en el gen *UNC5C* en pacients amb càncer colorectal familiar i/o poliposi sense mutacions en els gens de predisposició coneguts.

MATERIALS I MÈTODES



1. **Materials**

1.1 **Mostres biològiques de malalts utilitzades**

1.1.1 **Estudi de contribució funcional de l'al·lel I1307K en la progressió tumoral**

Per analitzar si l'al·lel I1307K del gen *APC* tenia un impacte en la progressió tumoral es van escollir 8 casos portadors de la mutació dels quals disposàvem de DNA genòmic de limfòcits i teixit colònic parafinat normal i tumoral. Tots els malalts havien estat informats i van donar el seu consentiment per participar en l'estudi. El protocol de l'estudi va ser aprovat pel Comitè Ètic d'Investigació Clínica de les institucions corresponents.

1.1.2 **Estudi mutacional del gen *UNC5C*: Mostres de pacients i informació clínica**

Es van estudiar un total de 562 casos incloent: 474 càncer no polipós familiar o càncer colorectal a edats joves i 88 individus amb poliposis, als quals es va analitzar la presència de mutacions al gen *UNC5C*. Tots els casos de càncer no polipós complien els criteris Amsterdam I/II (16,4%) o els criteris Bethesda (82,2%). En 6 casos no hi havia informació sobre la història familiar (1,2%). La edat mitja de diagnòstic de càncer del grup no polipós era de 48,98 anys. Els tumors presentaven inestabilitat cromosòmica amb expressió dels les proteïnes de reparació (MMR). Els casos de poliposi van consistir en casos d'adenomatosis poliposa clàssica (n=15), atenuada (n=42) i casos que no eren adenomatosis poliposa (n=14), a més dins d'aquest grup es va incloure 17 casos que la unitat de diagnòstic genètic els havia classificat com a "poliposi" però no hi havia informació clínica específica disponible. L'edat mitjana de diagnòstic dels 88 individus amb poliposis era 49,36 anys. Als pacients de poliposi se'ls havia fet l'estudi dels gens *MUTYH* i *APC*. Les característiques clíniques d'aquesta sèrie estan descrites a la taula 11.

Els pacients havien estat avaluats per la Unitat de Consell Genètic de l'Institut Català d'Oncologia de Catalunya, entre el 1999 i el 2012 i a la Unitat de Consell

MATERIALS I MÈTODES

Genètic del Centre Nacional d'Investigacions Oncològiques (CNIO). Els pacients van ser informats i van donar els seu consentiment per realitzar l'estudi. Aquest estudi va ser aprovat pels comitès d'ètica de les institucions involucrades. En tots els casos es va analitzar DNA extret de limfòcits de sang perifèrica. En casos en els quals es van identificar mutacions, es va convidar a participar a membres de la família per fer estudis de co-segregació.

Taula 11: Descripció de la sèrie utilitzada en l'anàlisi de mutacions del gen *UNC5C*.

Fenotip (n casos/n famílies)	Classificació	Número de casos (%)	Edat mitja al moment de diagnòstic de CCR	
CCR no polipós (474/468)	Amsterdam I	67 (14,1%)	48,98 (±12.54)	
	Amsterdam II	11 (2,3%)		
	Bethesda	390 (82,2%)		
	No disponible	6 (1,2%)		
Fenotip (n casos/n famílies)	Classificació	Número de casos (%)	Edat mitja al moment de diagnòstic de CCR	CCR; n (%)
Poliposis (88/88)	FAP	15 (17,0%)	43.0 (±11.1)	9 (60.0%)
	AFAP	42 (47,7%)	53.3 (±13.3)	31 (73.8%)
	No poliposis	14 (15,9%)	51.8 (±8.5)	8 (57.1%)
	No disponible	17 (19,3%)	-	-

1.2 Línies cel·lulars

Pels assajos funcionals per caracteritzar les variants *missense* en el gen *APC*, es van utilitzar les línies cel·lulars SW480 i DLD-1. Ambdues línies cel·lulars són línies epitelials humanes derivades d'adenocarcinomes primaris de còlon. Ambdues creixen en monocapa, tenen una mutació truncant en un dels al·lèls del gen *APC* i pèrdua d'heterozigotat de l'al·lel salvatge, per la qual cosa no tenen la proteïna APC funcional. En conseqüència presenten una elevada activitat transcripcional mitjançada pel complex β -catenina/TCF-4. Per mantenir les cèl·lules en creixement, vam utilitzar el medi DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12) (BioWhittaker, Walkersville, MD) suplementat amb un 10% de FBS (*Fetak Bovine Serum*) (Gibco) i un

1% de penicil·lina/estreptomicina (Gibco). Les cèl·lules es mantenen en l'incubador a 37°C i 5% CO₂.

1.3 Vectors d'expressió gènica

mYF-APCfs: És un vector d'expressió sota el promotor CMY (citomegalovirus). Conté el gen *APCwt* clonat a les dianes dels enzims de restricció: BamHI, NotI, SmaI i XmaI. També conté el gen de resistència a Kanamicina/Neomicina. A més té un gen que codifica per la proteïna YFP (*yellow fluorescence protein*). Aquest plasmidi va ser cedit pel Prof. Dr. J. Behrens (Nikolaus-Fiebiger-Center of Molecular Medicine, University Erlangen).

pGEX-4T1: És un vector d'expressió de 4.9Kb amb un promotor *tac* induïble per IPTG (isopropilo-β-D-tio-galactosid). Conté un gen codificant per *GST* (*glutathione S-transferase*) i una seqüència d'AA diana per la trombina. Conté el gen de resistència a l'ampicil·lina.

pGFP: És un vector d'expressió que porta la seqüència codificant per la proteïna de fluorescència verda (*GFP: green fluorescent protein*). Conté el gen de resistència a ampicil·lina.

pGEX-6P3-β-catenina: És un vector d'expressió de 4.9Kb amb un promotor *tac* induïble per IPTG (isopropilo-β-D-tio-galactosid). Conté un gen codificant per *GST* (*glutathione S-transferase*) i una seqüència d'AA diana per l'enzim *PreScission protease*. Conté el gen de resistència a ampicil·lina. Aquest plasmidi va ser cedit per la Dra. E. Sancho (Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona)

pTOPFLASH: És un vector d'expressió de 5.5Kb que conté dos sets de tres còpies salvatges de la seqüència d'unió a TCF-4 en direcció 5' del promotor constitutiu *Thymidine kinase (TK)* i del gen *Firefly* luciferasa. Aquest plasmidi va ser cedit per la Dra. E. Sancho (Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona)

pFOPFLASH: És un vector d'expressió de 5.5Kb que conté dos sets de tres còpies mutades de la seqüència d'unió a TCF-4 en direcció 5' del promotor constitutiu *Thymidine kinase (TK)* i del gen *Firefly* luciferasa. Aquest plasmidi va ser cedit per la Dra. E. Sancho (Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona)

phRL-TK: És un vector que conté el gen *Renilla* luciferasa sota el control del promotor constitutiu *Thymidine kinase (TK)*. Aquest plasmidi va ser cedit pel Dra. A. Vinyals (Institut de Recerca Oncològica).

1.4 Animals i Estabulari

Per estudiar la capacitat de tumorigènesi de les línies cel·lulars transfectades amb les variants del gen *APC*, es van utilitzar ratolins atímics nu/nu swiss, mascles, de 4 - 6 setmanes d'edat i 20 - 22gr de pes (Harlan Laboratorios, França). Aquests animals es van mantenir en l'estabulari del Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, a una temperatura de 20-22°C, en condicions de SPF (lliure de patògens específics) i esterilitat. Se'ls va proporcionar menjar i beguda *ad limitum*. Tots els experiments es van dur a terme en les cabines de flux laminar vertical, i els procediments de manipulació van ser avaluats i aprovats pel comitè ètic especialista en experimentació animal de IDIBELL i de la Generalitat de Catalunya.

2. Mètodes

2.1 Generació dels plasmidis amb les diferents mutacions en *APC*

2.1.1 Mutagènesis dirigida.

Per estudiar les mutacions puntuals S1028→R, I1307→K i E1317→Q es van introduir en els plasmidis mYF-APCfs amb el kit *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)* seguint les instruccions del fabricant. Per dissenyar els encebadors necessaris per introduir la mutació puntual es va utilitzar la següent pàgina web:

<https://www.genomics.agilent.com/CollectionOverview.aspx?PageType=Application&SubPageType=ApplicationOverview&PageID=111>

MATERIALS I MÈTODES

Taula 12: Seqüència dels encebadors utilitzats per introduir la mutació puntual.

Encebadors mutagènesis	Seqüència
APC11307K Fw	5'-TAATACCCTGCAAATAGCAGAAA A AAAAAGAAAAGATTGGAAGTAGGT-3'
APC11307K Rv	5'-ACCTAGTTCCAATCTTTTCTTTT T TTTCTGCTATTTGCAGGGTATTA-3'
APC S1028R Fw	5'-GAACTAGATACACCAATAAATTATAG G CTTAAATATTCAGATGAGCAGTTGAA-3'
APC S1028R Rv	5'-TTCAACTGCTCATCTGAATATTTAAG C TATAATTTATTGGTGTATCTAGTTC-3'
APC1309_del42-46 Fw	5'-CCCTGCAAATAGCAGAAATAAAAGATTGGAAGTAGGTGAGCTG-3'
APC1309_del42-46 Rv	5'-CAGCTGACCTAGTTCCAATCTTTTATTTCTGCTATTTGCAGGG-3'
APC_N1026S Fw	5'-CTAGATACACCAATAA G TTATAGTCTTAAATATTC-3'
APC_N1026S Rv	5'-GAATATTTAA GACTATA A CT TATTGGTGTA TCTAG-3'
APC_Glu1317Gln Fw	5'-GGAAGTAGGTGAGTCAAGATCCTGTGAGCG-3'
APC_Glu1317Gln Rv	5'-CGCTCACAGGATCTT G AGCTGACCTAGTTCC-3'

Un cop s'havia fet la mutagènesis dels plasmidis es va realitzar la transformació bacteriana per la posterior verificació de la producció de la mutació amb l'objectiu de disposar de material per realitzar els assajos funcionals *in vitro*.

2.2 Transformació i creixement de les colònies bacterianes.

Per amplificar els plasmidis mitjançant transformació bacteriana es van utilitzar les bactèries *E.coli* competents XL-blue. En aquestes bactèries se'ls va introduir el DNA pel procés de xoc tèrmic mitjançant el següent procediment:

1. Incubar 30 minuts en gel un volum de 50-125µl de bactèries competents amb 2µl de plasmidi (50ng/µl).

2. Llavors s'incuben les bactèries amb el plasmidi a 42°C durant exactament 45 segons.

3. Immediatament es posen 2 minuts en gel.

4. Un cop fet el xoc tèrmic es posa 900µl LB líquid estèril (1% triptona, 0,5% extracte de llevat, 1% NaCl, pH 7,5) sense antibiòtic prèviament escalfat a 37°C, i s'incuben els tubs durant 1h a 37°C en agitació.

5. Passada l'hora ja es pot plaquejar en plaques de LB (Luria Bertani)-agar estèril suplementades amb l'antibiòtic de selecció adequat (50µg/ml d'ampicil·lina i/o 30 µg/ml de kanamicina). Normalment es plaqueja uns 200-400µl de bactèries competents per placa.

6. Es deixen tota la nit a 37°C.

7. Al dia següent es seleccionen les colònies que han crescut i es fa un segon creixement a 37°C durant tota la nit en 3ml de LB líquid estèril amb l'antibiòtic de selecció.

8. Posteriorment s'aïlla el DNA plasmídic a partir d'2 ml del creixement. El volum restant es guarda amb glicerol a -80°C per a posteriors creixements.

2.2.1 Aïllament i purificació del DNA plasmídic.

Per aïllar i purificar DNA plasmídic de cultius bacterians d'*E. coli* s'utilitzen diferents protocols segons la quantitat de DNA que es vulgui obtenir. Per obtenir al voltant de 20µg de DNA plasmídic, es va utilitzar el kit de *QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)*, i per obtenir fins a 500µg de DNA vam utilitzar el kit *QIAGEN Plasmid Kit (Qiagen)*, segons les instruccions del fabricant. El DNA obtingut d'una miniprep es dilueix en 50µl d'aigua bidestil·lada i en el cas del DNA obtingut d'una maxiprep es dilueix en 200-300µl també d'aigua bidestil·lada. Posteriorment es quantifica el DNA obtingut mitjançant el nanodrop i es visualitza en un gel d'agarosa.

2.2.2 Seqüenciació

El DNA obtingut es va seqüenciar amb el kit *BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems)* per electroforesis de capil·lars utilitzant el seqüenciador automàtic ABI Prism 3730 (Applied Biosystems). La reacció de seqüència conté 1µl de *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, 1.5µl de *BigDye v3.1 Sequencing Buffer(5x)*, 3.2pmols de encebadors i 10 µl de DNA. La quantitat de DNA a afegir, entre 1-5µl de la solució mare, depèn de la intensitat de la banda observada en el gel d'agarosa i s'hi afegeix aigua bidestil·lada fins un volum final de 10 µl. Les condicions de la reacció de seqüenciació són: 25 cicles de 30s a 96°C, 15s a la temperatura d'aparellament dels encebadors menys 5°C, i 4min a 60°C. A continuació es precipita el DNA amb etanol al

70% per eliminar les resta de nucleòtids no incorporats a la seqüència. Un cop precipitats el DNA s'hi afegeix 10µl de *Formamida*. Les seqüències s'alineen amb el programa *Mutation Surveyor V3.01 (SoftGenetics)*. Per verificar les mutacions es va fer la seqüenciació en ambdues direccions.

2.3 Generació de transfectants estables

Per fer les línies cel·lulars transfectades estables es va utilitzar el reactiu *Lipofectamine^R 2000 Reagent (Invitrogen)* i es va seguir el següent protocol:

1. Primer es linealitzen els plasmidis mYF-APCfs amb les diferents mutacions incorporades amb l'enzim de restricció NotI-HF (New England BioLabs) seguint les instruccions del fabricant. Generalment es necessiten 2µg de DNA per a cada transfecció. Es purifica el fragment del plasmidi linealitzat amb el kit *QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)*, seguint les indicacions dels fabricant.

2. El primer dia es sembren en plaques de 6 pouets les cèl·lules en 2 ml de medi complet. El nombre de cèl·lules dependrà de cada línia cel·lular, però s'han de sembrar prou cèl·lules per a que el segon dia estiguin aproximadament entre el 85 al 90% de confluència.

Taula 13: Número de cèl·lules plaquejades:

Línia cel·lular	Número de cèl·lules que s'han de plaquejar en una placa de 6 poues per tenir una confluència del 90% el dia següent:
DLD-1	300000
SW480	500000

3. El segon dia es prepara el còctel de transfecció. En un tub ("A") s'hi afegeix els 2µg de DNA en Opti-Mem-I per a un volum final de 200µl.

4. En un altra tub ("B") hi posem 190µl de Opti-Mem-I i 10µl Lipofectamine 2000 i es deixa incubar durant 5 minuts a temperatura ambient, però no més de 10 minuts.

5. Passats els 5 minuts es combina suaument els tubs A i B i es deixa incubant almenys 20 minuts.

MATERIALS I MÈTODES

6. Durant aquest temps s'aprofita per treure el medi de les plaques i s'hi afegeix 1,6 ml de medi fresc (que pot contenir penicil·lina/estreptomicina).

7. Passat com a mínim els 20 minuts s'afegeix la barreja de lipofectamine/DNA a cada pouet i s'agita suaument per barrejar.

8. S'incuba a 37°C durant 4 a 6 hores per a les cèl·lules delicades o durant tota la nit per a les cèl·lules difícils de transfectar.

9. Després de la incubació, es retira el medi i es reemplaça amb medi fresc. Si el plasmidi transfectat conté una proteïna fluorescent, es pot fer la verificació de l'eficàcia de transfecció mitjançant la visualització en un microscopi de fluorescència. Llavors es deixen créixer les cèl·lules durant 1 a 2 dies.

10. Passats el període de creixement es tripzinitzen les cèl·lules i es plaquegen en una placa 10 cm i s'hi afegeix l'antibiòtic de selecció. A partir d'aquest moment les cèl·lules es fan créixer sempre amb l'antibiòtic de selecció per a que no perdin el plasmidi transfectat. Aquestes línies estables es mantenen en les mateixes condicions que les línies parentals però en el medi era suplementat amb geneticina (Geneticin® Selective Antibiotic (G418 Sulfate) (50 mg/mL) de Gibco, afegíem en el medi 35µl de geneticina per 1ml medi.

11. Vam comprovar que mantenen el transgen ja que el plasmidi produeix una proteïna de fusió amb fluorescència.

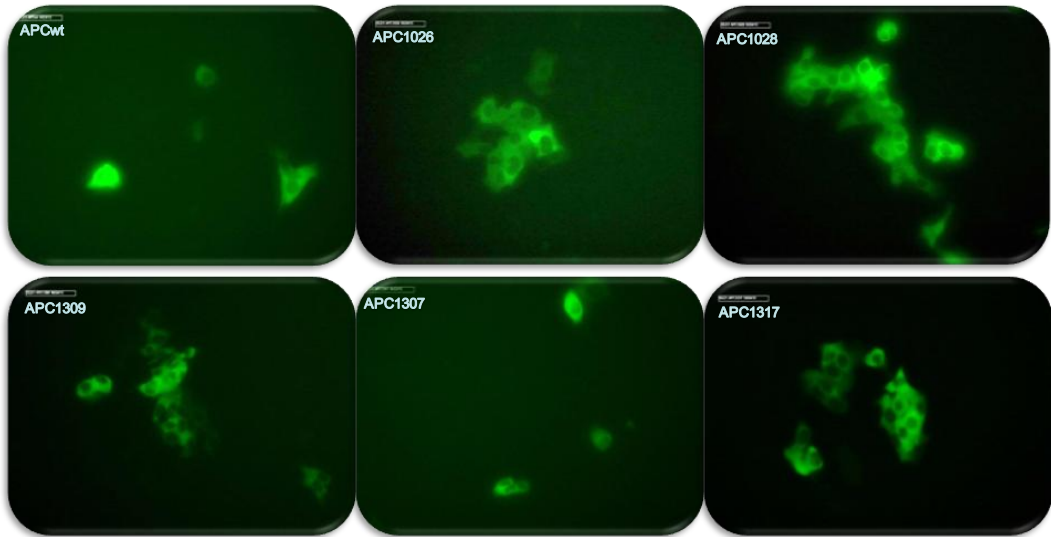


Figura 17: Transfectants estables de la línia cel·lular DLD-1, 4 setmanes després de la transfecció.

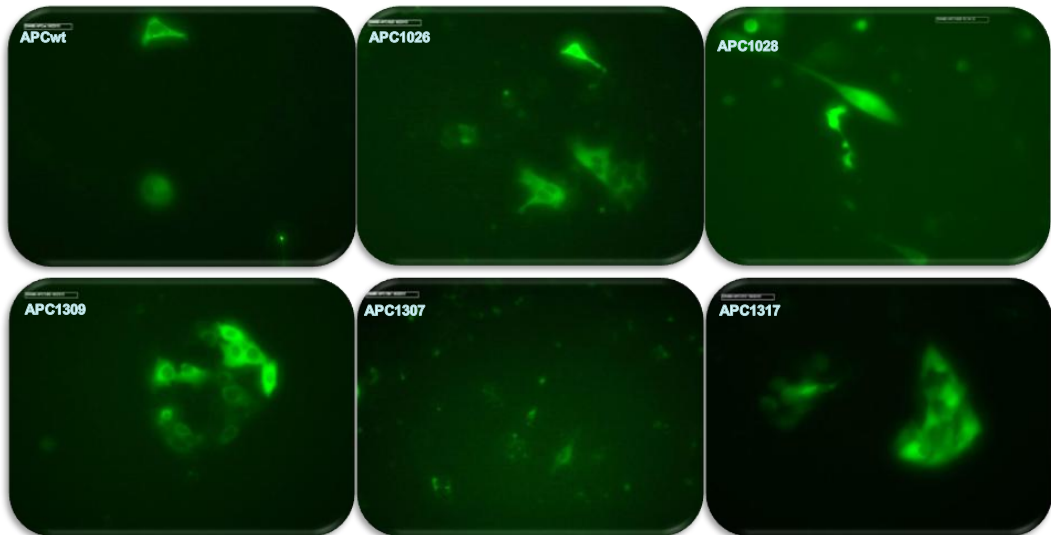


Figura 18: Transfectants estables de la línia cel·lular SW480, 4 setmanes després de la transfecció.

2.4 Estudi de l'activitat transcripcional mitjançada per β -catenina

Com hem dit anteriorment per realitzar els assajos funcionals es van utilitzar les línies cel·lulars SW480 i DLD-1 i l'experiment es va realitzar tant mitjançant transfeccions transitòries com utilitzant transfectants estables amb les diferents mutacions en el gen *APC*.

2.4.1 Activitat transcripcional en transfeccions transitòries

Per la transfecció transitòria es va utilitzar el reactiu *Lipofectamine LTX™ Reagent* (Invitrogen), i per augmentar l'eficiència de transfecció s'hi va afegir el reactiu *PLUS™ Reagent* (Invitrogen). Per una placa de 100mm posàvem 25µl *Lipofectamine* i 12,5µl *PLUS*. Procediment:

1. El dia anterior a la transfecció es sembren les cèl·lules, 2x10⁶ células SW480 i 7'5x10⁵ células DLD-1 en plaques de 100mm.

2. El dia després, es comprova que estiguin entre el 50 – 70% de confluència.

3. Llavors es co-transfecten tres plasmidis a cada placa:

0.5µg de plasmidi pTOPFLASH o pFOPFLASH.

50ng de plasmidi phRL-TK.

3µg de plasmidi mYF-APCs amb les diferents variants.

4. Per cada condició experimental es van afegir les quantitats indicades dels diferents plasmidis (un total de 3,55µg de DNA per placa) a un tub amb 1ml de medi DMEM-F12 sense sèrum i es barrejava amb la pipeta.

5. Llavors s'hi afegeix els 12,5µl *PLUS* i es torna a barrejar amb la pipeta o per copets.

6. Es deixa incubar 5 minuts a temperatura ambient.

7. Un cop passat aquest temps s'hi afegeix els 25µl *Lipofectamine* i es barreja amb la pipeta.

8. La barreja final es deixa incubar 30 minuts (es pot deixar incubar fins un màxim de 6h) a temperatura ambient.

9. Mentrestant es canvia el medi de les cèl·lules amb DMEM-F12 complet escalfat a 37°C en un volum de 9ml per placa.

10. Un cop passat els 30 minuts s'afegeix la barreja de *Lipofectamine+PLUS+DNA* a la placa amb les cèl·lules i es deixa al incubador 24h a 37°C i 5% de CO₂.

La combinació dels tres plasmidis (variant *APC*, promotor luciferasa TOP o FOP, renilla) dona lloc a 12 condicions experimentals diferents.

2.4.2 Activitat transcripcional en transfectants estables

En aquest cas també es va utilitzar el reactiu *Lipofectamine LTX™ Reagent* (Invitrogen), i per augmentar l'eficiència de transfecció s'hi va afegir el reactiu *PLUS™ Reagent* (Invitrogen). Per una placa de 6 pous posàvem 5µl *Lipofectamine* i 2,5µl *PLUS* per pou.

1. Com en els transfeccions transitòries, el dia anterior a la transfecció es sembren les cèl·lules estables pel plasmidi d'*APC* amb les diferents mutacions, unes $4,5 \times 10^5$ de cèl·lules SW480 i 3×10^5 de cèl·lules DLD-1 per pou, en plaques de 6 pous.

2. El dia següent, es comprova que estiguin entre el 50 – 70% de confluència i llavors es co-transfecten amb les següents quantitats de plasmidi a cada pou:

0.5µg de plasmidi pTOPFLASH o pFOPFLASH.

50ng de plasmidi phRL-TK.

3. Per cada condició experimental es van afegir les quantitats indicades dels diferents plasmidis (un total de 55ng de DNA per pou) a un tub amb 200µl de medi DMEM-F12 sense sèrum i ho vam barrejar amb la pipeta.

4. Llavors s'hi afegeix els 2,5µl *PLUS* i es barreja amb la pipeta o per copets.

5. Es deixa incubar 5 minuts a temperatura ambient.

6. Un cop passat aquest temps s'hi afegeix els 5µl *Lipofectamine* i es barreja amb la pipeta.

7. La barreja final es deixa incubar 30 minuts (es pot deixar incubar fins un màxim de 6h) a temperatura ambient.

8. Mentrestant es canvia el medi de les cèl·lules amb DMEM-F12 complet escalfat i l'antibiòtic de selecció a 37°C en un volum de 1,8ml per pou.

9. Un cop passat els 30 minuts s'afegeix la barreja de *Lipofectamine+PLUS+DNA* a la placa amb les cèl·lules i es deixa al incubador 24h a 37°C i 5% de CO₂.

La combinació de cada línia cel·lular transfectada de forma estable amb el plasmidi mYRF-APCfs amb les diferents variants i els diferents plasmidis, dona lloc a 14 condicions experimentals diferents per triplicat.

2.4.3 Assaig de l'activitat transcripcional

L'activitat transcripcional del complex β -catenina/Tcf-4 es va mesurar mitjançant la luciferasa *Firefly* i *Renilla* amb un luminòmetre utilitzant el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) 24h després de fer la transfecció.

1. Primer es lisen els *pellets* de cèl·lules transfectades amb un volum d'entre 100 a 700 μ l de PLB 1x (*Passive Lysis Buffer*). Per lisar-les es pipeteja bé cada mostra amb la solució PLB 1x.

2. Es deixa incubar 15 minuts a temperatura ambient i passat aquest temps es vortegen.

3. Tot seguit es fan dos cicles de congelació - descongelació posant les mostres amb neu carbònica i després en un bany a 37°C.

4. A continuació es centrifuguen a 10000rpm durant 5 minuts a 4°C per posteriorment transferir el sobrenedant a tubs nous.

5. Per fer la reacció per mirar l'activitat luciferasa pipetejàvem 10 μ l de la mostra a un tub de polipropilè especial pel luminòmetre i afegíem 50 μ l de LARII (*Luciferase Assay Reagent II*).

6. Es pipeteja cada barreja 2 o 3 vegades i llavors es fa la primera lectura (activitat *Firefly* luciferasa).

7. Després se li afegeix 50 μ l del reactiu Stop&Glo (per cada mostra: 50 μ l solució Stop&Glo més 1 μ l de Substrat Stop&Glo), es vorteja la mostra i es fa la segona lectura (activitat *Renilla* luciferasa).

Per cada mostra, les activitats luciferasa TOPFLASH i FOPFLASH es van normalitzar per l'activitat *Renilla*, que és un control intern d'eficiència de la transfecció. A més es va fer cada lectura per triplicat. L'activitat transcripcional del complex β -catenina/TCF-4 es va determinar per la *ratio* TOP/FOP, que corregeix la transcripció no específica.

2.5 Transcripció reversa (RT) i PCR quantitativa (qPCR)

Per analitzar els nivells d'expressió del gen *c-myc*, 24h després de la transfecció, es va utilitzar la tècnica de la PCR quantitativa (qPCR) a partir de cDNA. Per poder fer l'anàlisi primer s'ha d'extreure el RNA de les cèl·lules transfectades, nosaltres vam utilitzar el reactiu *Trizol* (Invitrogen), seguint les instruccions del fabricant. Després es va utilitzar 500ng de RNA per fer una retrotranscripció del RNA a cDNA utilitzant pdN6 i la *transcriptasa reversa MMLV* (Invitrogen). A continuació es va fer l'amplificació del gen *c-myc*, *APC* i *Axin2* per qPCR amb el sistema LightCycler 480 (Roche) i la metodologia de detecció del SYBR Green.

Taula 14: Seqüències dels encebadors per l'assaig de qPCR.

Encebadors qPCR	Seqüència
AXIN2 Fw	5'-AGTGTGAGGTCCACGAAAC-3'
AXIN2 Rv	5'-TGGCTGGTGCAAAGACATAG-3'
APCe2-3_Fw	5'-GCTATGGCTTCTTCTGGACA-3'
APCe2-3_Rv	5'-AACGGAGGGACATTTTTGACC-3'
cMyc-fw-primerbank	5'-TCGGAAGGACTATCCTGCTG-3'
cMyc-rv-primerbank	5'-GTGTGTTCGCCTCTTGACATT-3'
Human_ACTIN -s	5'-CATGTACGTTGCTATCCAGGC-3'
Human_ACTIN -as	5'-CTCCTTAATGTCACGCACGAT-3'

2.6 Extracció de proteïnes

Per fer l'extracció de les proteïnes separant les proteïnes citoplasmàtiques de les nuclears es va utilitzar el kit *NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagent* (Thermo Scientific), tal com recomana el fabricant.

2.6.1 Quantificació de proteïnes.

Per quantificar les proteïnes extretes per fraccionament subcel·lular, es va utilitzar el kit *-Rad Protein Assay* (BioRad), basat en el mètode Bradford o el sistema *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific), seguint les instruccions del fabricant.

Les concentracions de proteïna van ser extrapolades a partir dels valors obtinguts amb una recta patró feta a partir de concentracions conegudes de la proteïna BSA.

2.7 Assaig Western Blot/Electroforesis de proteïnes per SDS-PAGE.

L'electroforesis en gels de poliacrilamida amb dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE, *Sodium dodecylsulfate polyacrilamide gel electrophoresis*) és el mètode més utilitzat per la separació de proteïnes en funció del seu pes molecular. Vam utilitzar el sistema Mini-PROTEAN de BioRad per l'electroforesi de proteïnes de pes molecular de fins a 150-200kDa.

2.7.1 Sistema Mini-PROTEAN.

Per l'electroforesi es va utilitzar gels de poliacrilamida de 1.5mm de gruix. Aquest gels consten d'una part coneguda com a gel concentrador (*stacking*) amb un percentatge d'acrilamida del 4%, que permet alinear les proteïnes abans de ser separades, i una altra part anomenada gel separador (*resolving*) amb un percentatge del 12% d'acrilamida, que permet la separació de les proteïnes en funció del seu pes molecular.

Miniprotean (Per 1 gel de 1,5mm)	Separador					Concentrador	
	14%	12%	10%	8%	6%	4%	
Aigua (ml)	4	4,5	5	5,5	6	3,3	
40%acridamida (ml)	3,5	3	2,5	2	1,5	0,5	
TRIS-HCL 1,5M (Ph 8,8)	2,5 ml					1,25 ml	TRIS-HCL 0,5M (Ph 6,8)
SDS 10%	100 µl					50 µl	
TEMED	10 µl					5 µl	
APCS 10%	100 µl					50 µl	
Volum final	10 ml					5 ml	

Figura 19: Esquema dels volums necessaris de cada reactiu per preparar gel d'acridamida

Es va utilitzar el marcador de pes molecular *Benchmark Prestained Protein Ladder* (Invitrogen). Procediment per realitzar l'electroforesi és el següent:

1. Es munten els vidres del sistema d'electroforesi, que prèviament han estat rentats amb etanol. S'hi afegeix aigua entre els vidres per comprovar que estan ben muntats i no perden líquid. Aboquem aquesta aigua.

2. En primer lloc es prepara el gel separador i s'aboca entre els vidres fins que ocupa $\frac{3}{4}$ del volum d'aquest. Al damunt, s'afegeix una fina capa d'aigua destil·lada per evitar que l'oxigen de l'aire inhibeixi la polimerització del gel. Un cop polimeritzat, es decanta l'aigua i s'hi aboca el gel concentrador, amb cura de no fer bombolles. Ràpidament es col·loca la pinta per formar els pous de càrrega.

3. Preparar la quantitat de proteïna que es vol carregar (normalment entre 10 i 50 μg) en un tub eppendorf amb tampó de mostra 1x (SB *sample buffer* 1x: 2% SDS, 0,5mg/ml ditiotreitòl, 10% glicerol, 0,1mg/ml blau de bromfenol, 5% β -mercaptoetanol).

4. La mostra s'escalfa a 95°C durant 5 minuts i es centrifuga a 12000g durant 1 minut. El marcador de pes molecular, *BenchMark Prestained Protein Ladde*, (Invitrogen), també el desnaturalitzem a 95°C i s'hi afegeix 15 μl a un dels carril o a dos.

5. Un cop polimeritzat el gel concentrador, es treu la pinta, es col·loca el gel en el seu suport en la cubeta plena de tampó d'electroforesi (25mM Tris base, 192mM glicina, 0,1% SDS) i es carreguen les mostres de proteïna i el marcador de pes molecular (preferiblement a la campana d'extracció de gasos).

6. Es col·loca la tapa amb els elèctrodes i es fa córrer l'electroforesi durant 1 hora o fins que les proteïnes arribin al final del gel, a 100mA per un gel o a 200mA per si es corren 2 gels a la vegada.

A continuació es transfereixen les proteïnes a una membrana.

2.7.2 Electrotransferència

Un cop les proteïnes s'han separat per mida en un gel d'acrilamida, aquestes són transferides a una membrana sintètica, on hi quedaran fixades en la mateixa posició relativa en que es trobaven en el gel. En el nostre cas vam utilitzar el sistema *Mini-Protean TransBlot Cell* de BioRad per la electrotransferència de les proteïnes a la membrana.

MATERIALS I MÈTODES

1. Fent servir guants, es talla un tros de membrana de la mateixa mida que el gel (6x9cm), s'hidrata en aigua destil·lada durant 10 segons i s'equilibra en tampó de transferència (25mM Tris base, 192mM glicina, 0,02% SDS i 20% metanol) 10 minuts.

2. Es tallen papers Whatmann de la mateixa mida que la membrana (7x9cm).

3. Es descarta (tallant) la part corresponent al gel concentrador i es submergeix el gel separador en tampó de transferència.

4. Es procedeix a muntar el sistema en una safata plena de tampó de transferència. Sobre la part negra del sistema s'hi col·loca (per aquest ordre) una esponja, dos papers Whatmann i el gel separador d'acridamida, i a sobre d'aquest s'hi col·loca la membrana, dos paper Whatmann més i una altra esponja. És molt important procurar que no quedin bombolles entre el gel i la membrana perquè això dificultaria la transferència de les proteïnes. Finalment es tanca el sistema procurant que no es moguin els elements que hi ha a l'interior.

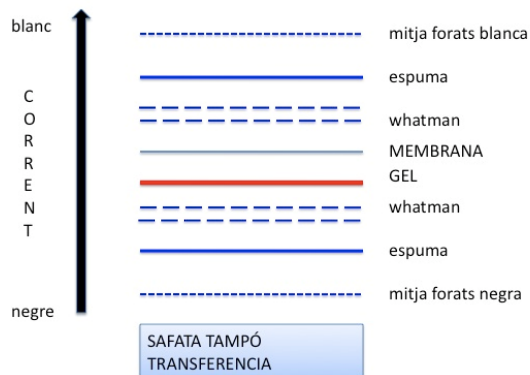


Figura 20: Esquema de muntatge del sistema d'eletrotransferència.

5. Es col·loca el sistema en la cubeta de transferència. Posem un bloc de gel per evitar l'escalfament excessiu i omplim la cubeta amb tampó de transferència que es mantindrà en agitació suau mentre duri la transferència.

6. Posem el sistema en una safata amb gel i s'hi aplica una corrent de 400 mA durant una hora a la cambra freda (a 4°C).

7. En finalitzar es desmunta el sistema evitant que la membrana s'assequi.

OPCIONAL: Després de la transferència, per assegurar que les proteïnes s'han transferit correctament, es tenyeix la membrana amb solució al 0,5% de Roig de Ponceau (Sigma) durant 2-5 minuts en agitació. Després es renta 2 vegades amb aigua destil·lada per treure l'excés de colorant fins observar el patró de bandes de les proteïnes. Un cop comprovem que les proteïnes s'han transferit bé es renta la membrana amb PBS 1x.

2.7.3 Western Blot

Un cop que les proteïnes s'han transferit a la membrana, es procedeix a la identificació d'aquestes, mitjançant la tècnica de la immunodetecció denominada *Western Blot*. És important l'ús d'anticossos primaris que reconeixen de manera específica la proteïna d'interès, i la utilització d'anticossos secundaris, específic per les immunoglobulines de la espècie on s'ha originat l'anticòs primari. A més l'anticòs secundari té incorporat l'enzim peroxidasa que en presència del seu substrat catalitza una reacció de quimioluminescència. El protocol varia en funció del anticòs primari que s'utilitzi, normalment es modifica la dilució del anticòs, el tampó que s'utilitzi o fins hi tot el temps d'incubació. El protocol general és:

1. Es bloqueja la membrana amb llet en pols o BSA (*Bovine Serum Albumin*) al 5% en TBST 1x (TBST 10x: 99mM Tris base i 1,49M NaCl + 0,05% Tween 20). Durant una hora a temperatura ambient en agitació. Així evitem la unió inespecífica da la membrana dels anticossos que utilitzarem.

2. Es dilueix els anticossos (a la concentració que recomani la casa comercial) en TBST 1x + llet en pols o BSA al 2%. Posteriorment s'incuba la membrana amb les dilucions anticossos primaris durant tota la nit en agitació a la cambra freda.

MATERIALS I MÈTODES

Taula 15: Anticossos primaris

Anticòs	Casa comercial	Origen	Dissolució de treball
anti- β -catenina	BD- Transduction Laboratories, Lexington, KY	Monoclonal Ratoí (Epítóp: AA 571-781)	1/500
Anti-MSH6	BD- Transduction Laboratories Clone 44/MSH6	Monoclonal Ratoí	1/750
anti-actina	MP Biomedicals, Irvine, CA C4	Monoclonal Ratoí	1/1000

3. Al dia següent es fan tres rentats de 10 minuts amb tampó de rentat TBST 1x + 2% de llet.

4. S'incuba la membrana amb els anticossos secundaris corresponents, diluïts amb TBST 1x + 2% de llet, de 1 a 2 hores a temperatura ambient.

Taula 16: Anticossos secundaris

Anticòs	Casa comercial	Origen	Dissolució de Treball
anti-Ratoí IgG HRP	BioRad	Policlonal Cabra	1/5000
anti-Ratoí IgG HRP	GE Healthcare	Policlonal Ovella	1/1000
anti-Conill IgG HRP	BioRad	Policlonal Cabra	1/5000

5. Es torna a fer 6 rentats de 10 minuts amb TBST 1x + 2% de llet.

6. Pel revelat, s'incuba la membrana amb el sistema de detecció per quimioluminescència en una mescla 1:1 amb les solucions de *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific) i amb pel·lícules fotogràfiques *Hyperfilm* (Amersham Biosciences) amb diferents temps d'exposició.

2.8 Estudi de la interacció entre els fragments de la proteïna APC i la β -catenina amb BIAcore.

2.8.1 Construcció del pGEX-APC-4x15 amb la mutació APC S1028R

En el cas del fragment del gen *APC* amb les 4 repeticions de 15 AA, ja estava construït el plasmidi amb el fragment d'*APC* salvatge (Menendez et al., 2008). Es va procedir a fer la mutagènesis de S1028R sobre el fragment d'*APC* salvatge.

2.8.2 Construcció de pGEX-APC-3x20 amb les mutacions I1307K E1317Q

Es va clonar un fragment del gen *APC* que conté les 3 primeres repeticions de 20 AA del domini d'unió i regulació de β -catenina (AA 1258-1521) dins del plasmidi pGEX-4T1. L'amplificació del fragment APC 3x20 es realitza a partir del gen *APC* del plasmidi mYF-APCfs sobre els que ja s'havien introduït les mutacions mitjançant mutagènesi dirigida. Aquesta amplificació es fa utilitzant uns encebadors específics. En l'encebador *forward* s'hi va afegir una diana per l'enzim de restricció EcoRI i en l'encebador *reverse* una diana per l'enzim de restricció *XhoI*, aquestes dianes es troben en el extrem 5' de cada encebador. La qualitat dels productes amplificats es comprova mitjançant l'electroforesi en un gel d'agarosa.

Purificació del DNA a partir de gels d'agarosa: Després de visualitzar els fragments amplificats en un gel d'agarosa, es purifica el DNA amplificat i es seqüència amb els mateixos encebadors, per comprovar que no tenen mutacions no desitjades. Els fragments de DNA poden ser recuperats i purificats dels gels d'agarosa, quan els fragments han estat separats es retallen les bandes, corresponents als fragments que es vol recuperar, amb un bisturí sota una il·luminació de llum UV de baixa intensitat. Una vegada retallada la banda, es purifica amb un kit de purificació de DNA, en el nostre cas vam utilitzar el Kit *High Pure PCR Product Purification Kit* de Qiagen, d'acord amb les instruccions del fabricant.

Digestió del DNA amb enzims de restricció i lligació dels fragments de DNA: Tot seguit es realitza una digestió doble, tant del plasmidi pGEX-4T1 com dels fragments

MATERIALS I MÈTODES

d'APC 3x20 amb els enzims de restricció EcoRI i XhoI (BioLabs), segons les instruccions del fabricant. Els productes digerits es visualitzen en un gel d'agarosa. Després de l'electroforesi es talla la banda del plasmidi i de l'insert i es purifiquen, en el nostre cas amb el kit *High Pure PCR Product Purification Kit*, d'acord amb les instruccions del fabricant.

Després de purificar els productes de la digestió, es procedeix a lligar el fragment APC 3x20 amb el plasmidi pGEX-4T1 mitjançant el kit *Rapid DNA Ligation Kit (Roche)*, segons les instruccions del fabricant. El producte de la lligació es va utilitzar per transformar bacteris *E.coli* competents, tal com s'ha comentat anteriorment. Una vegada es va verificar que els bacteris havien incorporat l'insert, es va seqüenciar, seguint el protocol ja descrit, per comprovar que aquest no tingués cap mutació addicional.

Taula 17: Seqüència dels encebadors utilitzats per la construcció del plasmidi de les proteïnes de fusió i la seva seqüenciació.

Encebadors plasmidis recombinants Biacore	Seqüència
APC3x20upEcoRI	5'-CCGGAATTCACAATACAGACTTAT-3'
APC3x20dwXhoI	5'-CCGCTCGAGCACATCTTTCTG-3'
APC3x15upEcoRI	5'-CCGGAATTCATGGATGATAATGATGGA-3'
APC3x15dwXhoI	5'-CCGCTCGAGGAATGAAAATGACTGTTTCTGT-3'
pGEX_5_primer up	5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3'
pGEX_3_primer dw	5'-CCGGGAGCCTGCATGTGTCTAGAGG-3'
Primer GST fw (dentro secuencia)	5'-GGATGCGTTCCCAAAATTAG-3'
pGEX_3_primer dw	5'-CCGGGAGCTGCATGTGTCTAGAGG-3'
Primer all_GSTfw	5'-GACAATTAATCATCGGCTCGT-3'
Primer GST_APC4X15rv	5'-TGTGAAGGACTTTGCCTTCC-3'
Primer GST_APC3X20rv	5'-TGCTGGATTTGGTTCTAGGG-3'

2.8.3 Expressió i purificació de proteïnes recombinants en procariotes.

Es van expressar en *E.coli* les proteïnes de fusió, GST-APC-4x15-WT, GST-APC-4x15-S1026, GST-APC-4x15-R1028, GST-APC-3x20-WT, GST-APC-3x20-K1307, GST-APC-3x20-Q1317 i el GST-lliure. Després les vam purificar per cromatografia d'afinitat.

1. Per produir les proteïnes es fa créixer un inòcul de bactèries transformades, amb el plasmidi que conté els inserts del gen *APC*, en 200ml de LB, amb l'antibiòtic de selecció corresponent, en agitació a 37°C tota la nit.

2. Al matí següent s'hi afegeix 40ml del inòcul en 1L de LB amb antibiòtic, i es deixa en agitació a 37°C fins que el creixement de les bactèries arriba a una densitat òptica a 60nm de 0.3-0.6.

3. En aquest punt, s'indueix l'expressió de les proteïnes amb IPTG a una concentració final de 0.1mM i es deixa incubant durant 3h a 37°C en agitació.

4. Passat aquest temps es centrifuguen les bactèries a 3000rpms durant 30 minuts a 4°C.

5. Després es resuspèn el *pellet* amb 4ml de PBS 1x (10mM EDTA, pH 7.5) amb inhibidors de proteases.

6. Llavors es precedeix a lisar les bactèries per sonicació en dos períodes de 30 segons, mantenint-les en gel constantment.

7. A continuació s'hi afegeix en el lisat 1mM de PMSF (*phenylmethanesulphonylfluoride*) i un 1% Tritó X-100 i es deixa incubar 1h en gel.

8. Passada aquesta hora, es torna a centrifugar el lisat a 10000rpm durant 15 minuts a 4°C.

9. Llavors ens quedem la fracció soluble de on es purifiquen les proteïnes i es descarta el *pellet*.

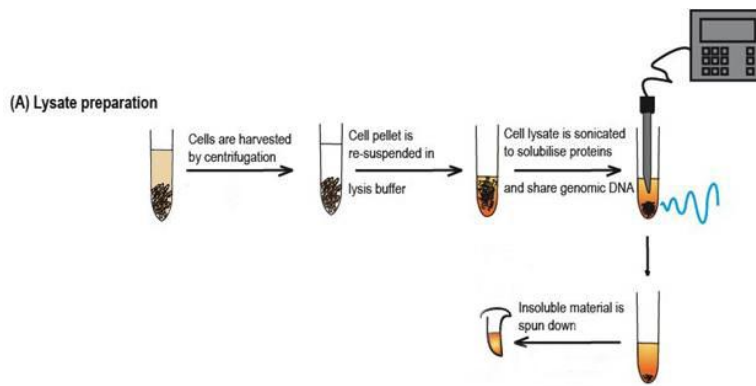


Figura 21: Esquema d'extracció de proteïnes produïdes en bacteris.

10. El sobrenedant s'incuba 2h i 30 minuts a 4°C en rotació amb 500µl de resina *Glutathione-Sepharose 4B* (Amersham Biosciences), prèviament rentades amb PBS 1x suplementat amb inhibidors de proteases.

11. Després de la incubació es fan tres rentats amb PBS 1x amb inhibidors de proteases per eliminar les proteïnes no unides a la resina.

12. Seguidament s'elueixen les proteïnes que estaven unides a la resina amb 10mM de glutatió reduït amb 50mM Tris-HCL pH8 i 5mM DTT.

(B) Antibody and beads preparation

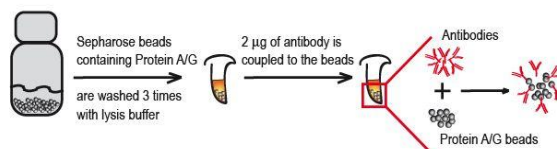


Figura 22: Esquema de la purificació de proteïnes produïdes en bacteris.

13. La proteïna obtinguda es va dialitzar amb 5mM HEPES pH 7.6, 1mM DTT, 0,2 PMSF i 1mM EDTA, durant 18h en agitació a 4°C.

14. Finalment, la proteïna dialitzada es va quantificar per la tècnica BCA, i es va córrer en un gel de SDS-PAGE per visualitzar-la amb una solució de blau de Coomassie. Per a quantificar les proteïnes expressades en bacteris es va seguir el mateix protocol descrit anteriorment.

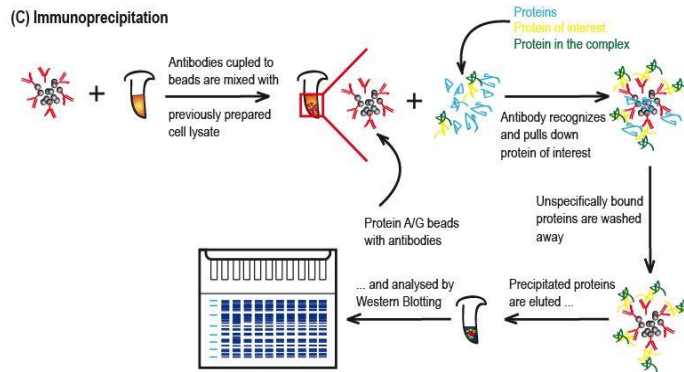


Figura 23: Esquema de visualització de les proteïnes purificades produïdes en bacteris.

2.9 BIAcore T100

La plataforma BIAcore permet estudiar la interacció entre biomolècules a temps real. Es basa en el fenomen òptic de ressonància de plasmó superficial (SPR, *Surface Plasmon Resonance*). El SPR es produeix quan la llum polaritzada colpeja una superfície elèctricament conductora en la interfase entre dos medis de diferent índex de refracció. Això genera ones de densitat de càrrega d'electrons anomenades plasmons.

En el BIAcore, les interaccions entre biomolècules canvien la concentració del solut i, per tant, l'índex de refracció. Aquesta variació en l'índex de refracció provoca una variació en l'angle, que s'expressa en unitats de ressonància (RUs, *Resonance Units*) i es presenta la seva variació en funció del temps mitjançant un sensograma.

El fenomen SPR permet mesurar els canvis de massa produïts en una superfície entre una molècula unida a aquesta superfície i unes altres en suspensió, en temps real, sense necessitat de marcatges i independentment de la naturalesa de les molècules que interaccionen.

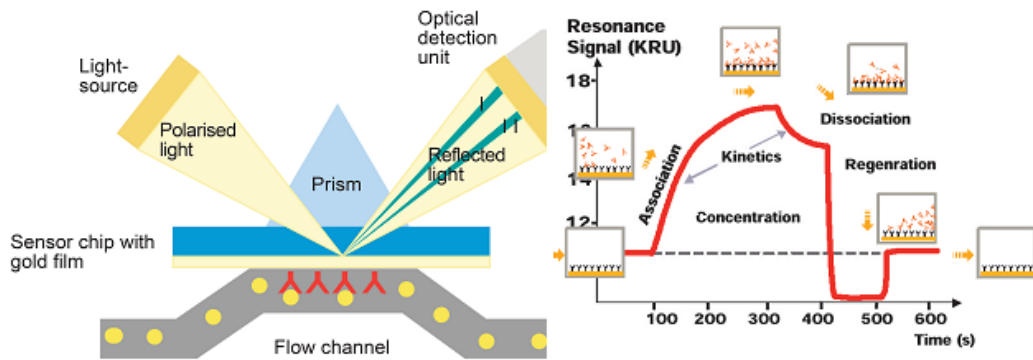


Figura 24: Esquema de del funcionament del BIAcore per l'estudi d'interacció entre biomolècules.

Durant el curs de la interacció, la llum polaritzada es dirigeix cap a la superfície del sensor i es detecta l'angle de la llum d'intensitat mínima reflectida. Aquest angle canvia a mesura que les molècules s'uneixen i es dissocien i el perfil d'interacció es registren en temps real.

Entre les aplicacions de la SPR destaquen la investigació i el descobriment de nous fàrmacs, l'estudi de l'activitat de proteïnes i l'anàlisi d'estabilitat en la producció biofarmacèutica.

En el nostre cas els assajos d'interacció entre proteïnes es van fer amb l'aparell BIAcore T100 dels Serveis Científicotècnics de la UB. Una de les proteïnes s'immobilitza sobre una superfície de sensor d'or. Hi ha diferents tipus de xips que es diferencien bàsicament en el tipus de superfície on s'immobilitza el lligand; el xip més comú és el CM5, que és el que vam utilitzar, en el qual s'ha dipositat una matriu de dextrà carboximetilat sobre la superfície d'or. Cada xip consta de quatre canals diferents, i a cada canal s'hi pot unir covalentment un lligand diferent. L'analit s'injecta sobre la superfície que conté el lligand immobilitzat mitjançant un flux continu. Si es produeix interacció, obtindrem una corba d'associació. Posteriorment s'atura la injecció de l'analit, però es manté un flux continu del tampó en el què estava dissolt l'analit i això ens permet obtenir la corba de dissociació. Finalment, s'injecta una solució de regeneració que indueix la dissociació total de l'analit amb el lligand sense danyar el lligand.

Els passos que vam seguir en el nostre experiment van ser els següents:

1. Primer es va activar la superfície del xip amb 1-ethyl-3-(3-dimethylaminoropyl)carbodiimide (EDC) i N-hydroxysuccinimide (NHS).
2. Per assegurar que la unió entre els fragments proteics es produïen en la orientació correcte primer vam immobilitzar un anticòs anti-GST covalentment 0.07pmols/mm² en els canals del xip CM5 mitjançant la formació d'enllaços amida, a una velocitat de flux de 10µl/min, d'acord amb les instruccions del fabricant.
3. Finalment, l'excés de grups reactius es van desactivar amb 70µl d'1M ethaboline-HCl, pH8,5.
4. Després passàvem primer les proteïnes de fusió (GST-fragments APC) a 0,05µM i ens asseguràvem que s'unia al anticòs.

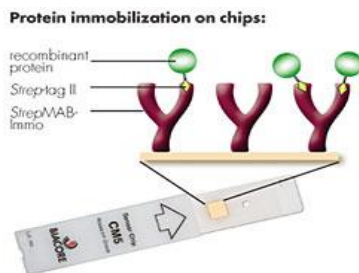


Figura 25: Esquema de la nostra estratègia per l'estudi d'interacció entre proteïnes amb el BIAcore.

5. Un cop units els fragments d'APC al anticòs mitjançant la GST, injectàvem diferents concentracions de β -catenina, entre 0,156µM - 10µM, purificada sense GST en tampó HBS-EP (0.01M HEPES pH 7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% Surfactant P20). Com a control de que la β -catenina s'unia als fragments d'APC i no la GST o al anticòs, també es va passar diferents concentracions de β -catenina en un canal on sols estava unit l'anticòs anti-GST o un canal on primer s'havia injectat la proteïna GST sense APC. D'aquesta manera es pot afirmar que β -catenina tan sols interactua amb APC i no amb l'anticòs o la proteïna GST.
6. Després de passar cada concentració de β -catenina, regeneràvem el xip, deixant en els canals tan sols l'anticòs contra GST. És a dir, que per cada cop que injectàvem la

β -catenina, primer havíem de fer la captura dels fragments d'APC o de GST i injectar després la β -catenina.

2.10 Experiments *in vivo*

2.10.1 Injecció subcutània

Es van injectar subcutàniament 5×10^6 cèl·lules de les línies cel·lulars SW480 parentals, SW480 estables transfectades amb *APC^w*, *APC N1026S*, *APC S1028R* i *APC I1307K* en 5 ratolins per cada línia i en cada costat del ratolí (n=10). Els ratolins es sacrificaven passats uns 30 dies després de la injecció. En el moment del sacrifici que es realitzava mitjançant dislocació cervical s'extreien els tumors. Els tumors es pesaven, es mesuraven i es guardaven per posteriorment estudiar les seves característiques. Es guardaven en blocs de parafina i OCT per realitzar estudis histològics, i es congelaven petits fragments directament en tubs amb la major velocitat possible per realitzar estudis moleculars. El volum tumoral es va determinar seguint la fórmula: $((\text{llarg del tumor}) \times (\text{Ample del tumor})^2)/2$

2.10.2 Extracció de DNA de teixit amb Salí

El procediment que s'ha de seguir per fer l'extracció de DNA de teixit és el següent:

1. Prendre una petita quantitat de teixit i tallar amb un bisturí estèril.
2. Afegir 700 μ l de tampó d'extracció (100mM NaCl, 20mM Tris, 25mM EDTA), 20 μ l de proteïnasa-K (20 mg/ml) i 80 μ l de SDS (dodecil sulfat sòdic) al 10%.
3. Incubar les mostres durant la nit a 56°C.
4. Al dia següent s'hi afegeix NaCl 5M per a que sigui una concentració final de 1,5M i s'agiten les mostres.
5. Llavors es centrifuguen les mostres a la màxima velocitat (12-14,000 rpm) durant 15 minuts a temperatura ambient.
6. S'aboca el sobrenedant a un tub eppendorfs de 1,5ml nou.
7. En el sobrenedant s'hi afegeix un volum igual (~800ml) de 100% de isopropanol i barrejar suaument invertint el tub fins que es vegi el precipitat de DNA.

8. Es torna a centrifugar la mostra a tota velocitat (12-14,000 rpm) durant 10 minuts.

9. Després es retira el sobrenedant i es rentar el sediment de DNA amb 200-700µl de 70% d'etanol dues vegades.

10. Es deixa que la mostra s'assequi a l'aire.

11. I un cop la mostra és ben seca, es resuspèn el DNA en 50-300µl (depenent de la mida de la mostra) d'aigua bidestil·lada estèril.

2.10.3 Seqüenciació del DNA

El DNA tumoral es va seqüenciar tal i com s'ha descrit anteriorment després d'amplificar la regió d'interès. Els encebadors utilitzats per la seqüenciació es descriuen a la taula 18.

Taula 18: Seqüència dels encebadors utilitzats per la seqüenciació del DNA extret dels tumors.

Encebadors	Seqüència
APC 15 D up	5'-CTGCCCATACACATTCAAACAC-3'
APC 15 D dw	5'-TGTTTGGGTCTTGCCCATCTT-3'
APC 15 G up	5'-AAGAAACAATACAGACTTATTGT-3'
APC 15 H dw	5'-TATCAGCATCTGGAAGAACCT-3'
APC 15 I up	5'-AGTAAATGCTGCAGTTCAGAGG-3'
APC 15 I dw	5'-TTCTGCCTCTTTCTCTTGGTT-3'

2.11 Estudi del impacte funcional de l'al·lel I1307K en la progressió tumoral

Per realitzar l'estudi es van escollir 8 casos portadors de l'al·lel APC I1307K, dels quals desponíem de DNA genòmic de limfòcits i teixit colònic parafinat normal i tumoral. De les mostres de teixit vam extreure DNA i RNA mitjançant el kit d'extracció *RNA/DNA extracció of FFPE slides: RecoverAll total nucleic acid isolation kit. Ambion/RNA by life technologies* (seguint les instruccions del fabricant).

Tot seguit es va procedir a preparar les llibreries tant de DNA com de RNA per posteriorment realitzar la seqüenciació de les mostres per seqüenciació massiva amb la plataforma d'*Illumina HiSeq 2500*.

2.11.1 Amplificació del DNA

Per tal de poder verificar els resultats obtinguts per seqüenciació massiva vam utilitzar el kit de *Sigma SeqPlex Enhanced DNA Amplification-kit* per tal d'amplificar el DNA, extret de parafina i dels limfòcits, ja que disposàvem de molt poc material.

1. El DNA de limfòcits primer es va fragmentar amb el *Fragmentation buffer from WGA2 sigma kit* seguint les instruccions del fabricant.

2. El DNA de parafina no s'ha de fragmentar ja que en el procés de parafinar i desparafinar el DNA que s'obté ja està fragmentat. El que es va fer va ser reparar-lo amb el kit *PreCR repair Mix*, aquest tractament és un procés que serveix per reparar les alteracions (insercions d'uracils) produïdes pel procés de parafinar i desparafinar.

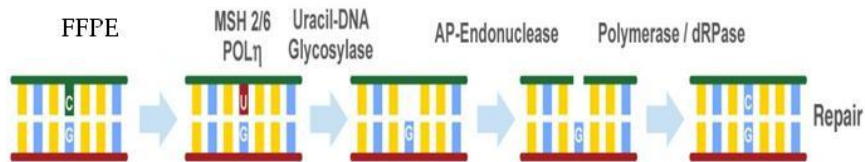


Figura 26: Esquema del procés de reparació del DNA de blocs de parafina mitjançant la *PreCR repair Mix*.

3. Amplificació del DNA.

4. El material amplificat es va reparar mitjançant l'enzim *T4 DNA Polymerase*.

5. La qualitat i la mida dels fragments de DNA es van analitzar amb la plataforma *Agilent 2100 BioAnalyzer*.

6. Després es va enviar a la plataforma de seqüenciació per tal que acabessin el procés de preparació de llibreries seguint el protocol de *New England Bio-Lab* i la posterior seqüenciació.

2.11.2 RNA de teixit normal i de tumor

1. Primer es va tractar el RNA amb el kit *Ovation RNA-Seq FFPE System from Nugen*, tal i com indica el fabricant.

2. Un cop tractat el RNA es van preparar les llibreries amb el *kit Encore Rapid DR Multiplex System kit*.

3. La qualitat i la mida de les llibreries de RNA es van analitzar amb la plataforma *Agilent 2100 BioAnalyzer*.

2.12 Estudi mutacional del gen *UNC5C*

Es va obtenir DNA genòmic de sang perifèrica dels malalts inclosos en l'estudi. L'extracció es va realitzar amb el *kit DNA FlexiGene* (Qiagen). Per altra banda es va extreure DNA de mostres de parafina fixades amb formalina, utilitzant el kit de teixit *FFPE DNA QIAamp* (Qiagen, Hilden, Alemanya), seguint les instruccions del fabricant.

Es van realitzar l'estudi mutacional del gen *UNC5C* utilitzant una combinació d'amplificacions del DNA per PCR agrupant els pacients i dirigint la seqüenciació massiva en paral·lel, tal com va ser descrit prèviament (Puente et al., 2011). Les amplificacions de les barreges de DNA es van realitzar amb la polimerasa d'alta fidelitat: *Phusion High-Fidelity DNA Polymerase* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), utilitzat encebadors dissenyats per nosaltres, els encebadors es van dissenyar utilitzant la web Primer3 (Primer3 Input (versió 0.4.0)). La seqüenciació massiva en paral·lel, es va dur a terme en la plataforma HiSeq-2000 (Illumina) en el Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica (CNAG, Barcelona, Espanya).

Taula 19: Seqüència dels encebadors utilitzats per l'estudi mutacional del gen *UNC5C*

Anàlisi mutacional (Exons)	Encebador Fw (5'-3')	Encebador Rv (5'-3')
1	TCAAACCTCCTCGGCGTC	GGCCGGGAGCTTGGCGGAC
2	ATGTGTTAACCATCTTCCAC	GTGAATCTTGAAGTGAATG
3	AGTATGAATCTTGTGTTGAC	TGGGATTACAGGCGTGAGTC
4	GCACAGATAAAATACTAAGCCAGAAA	CATACCCTAATTCAGTGCACCA
5	ATCAGGGGATCCATGCTGAG	TGAACTAGATTGAGACCCTG
6	GTGTTGTGCATGCACACATG	GGAGATACTTGGAAATGAGAG
7	CTCCATCCCTTAAGCAGCTG	CCCTCAATGTCTGCAGTTTG
8	TATAAGCAGCTGGTTCAATG	AAGTAACAGGGGTGTGAAGTG
9a	CTGAATGGAGAATGCCAATG	GACAGCTTGGACGTAAGCTC
9b	CAAAGTGTACAACACCTCAG	AATATGTTTCAAGCTGCCTC
10	TCATTCCCTTTTACGTGCTG	CATTGGTAAAGTCAGTGCAC
11	ACCCAAGTGCATAGTTCATG	TGCTCCTGCTTATCTGCATG
12	TCCTGGGTGACTTAGCCATG	TTCCAGGTGGAGGTGAAGAG
13	GAGAGCTGACAGAAGTGATC	TCTTAGAGATGTCTCCAGAC
14	GGCAGCAGACCATCTGAGAG	TTCCTGAGTGTGCGACTCTC
15	TGTCCTCAGAAATAATGCTG	ACAGAAAGAAGCTAGTCTTG
16	TAAGTCACACTGTTGAGCAC	TCCTTCATTTCCCCTCCAG

2.12.1 Seqüenciació automàtica directe

Es va dur a terme la seqüenciació per Sanger dels exons on s'havia trobat una mutació per identificar els individus que eren portadors. La seqüenciació es va realitzar tal i com s'ha descrit anteriorment. En aquest cas es van utilitzar els mateixos encebadors que es van fer servir pel cribatge mutacional.

2.12.2 En l'anàlisi de predicció *in silico*

Per veure si les variants *missense* produïen un impacte a nivell proteic, es va fer l'anàlisi *in silico* utilitzant els programes de predicció SIFT, PolyPhen-2 i Condel. L'algoritme SIFT s'utilitza per predir l'efecte de la variant no sinònima en la funció de la proteïna (Kumar, Henikoff S Fau - Ng, & Ng, 2013) El PolyPhen-2 es va utilitzar per predir si hi havia un efecte funcional de les variants *missense* en humans (Adzhubei, Jordan, & Sunyaev, 2013) I per últim, el programa Condel millora l'avaluació dels resultats d'SNPs no sinònims amb una puntuació de consens deletèria (Gonzalez-Perez & Lopez-Bigas, 2011). Els efectes potencials de la variant en el *splicing* es van

avaluar mitjançant l'ús del programa: Human Splice Cercador v.3.0 (www.umd.be/HSF/).

L'estructura 3D de la proteïna humana UNC5C (O95185, ENSP00000406022) estava disponible per a la regió compresa entre els aminoàcids 528 i 928 (plantilla MODBASE 3g5b_A, amb un percentatge d'identitat en la seqüència d'aminoàcids del 62% comparada amb la seqüència d'aminoàcids humana real) i per als aminoàcids 260-367 (plantilla swissmodel 1lsl_A, amb un percentatge d'identitat en la seqüència d'aminoàcids del 41% comparada amb la seqüència d'aminoàcids humana real). D'altra banda, l'efecte sobre l'estabilitat de la proteïna de les mutacions *missense* identificades ha estat predita utilitzant els programes PoPMuSIC (<http://dezyme.com>), Eris (<http://troll.med.unc.edu/eris/>), I-Mutant 2,0 (<http://folding.biofold.org/i-mutant/i-mutant2.0.html>) i CUPSAT (<http://cupsat.tu-bs.de>).

2.12.3 L'anàlisi de metilació del promotor

Per tal d'analitzar els nivells de metilació del promotor en el gen *UNC5C*, es va tractar 1µg de DNA genòmic amb bisulfit, usant el *kit* de metilació de DNA EZ-Gold (Zymo Research, Orange, CA, EUA), seguint les instruccions del fabricant. Després es va utilitzar un total de 1µl d'DNA convertit amb bisulfit en dues reaccions de PCR per a l'amplificació i posterior seqüenciació de la regió de promotor del gen *UNC5C*. Es van analitzar 23 illes CpG. Per tal d'identificar si la metilació del promotor del gen *UNC5C* era específica de tumor, es van comparar els resultats de seqüenciació de bisulfit entre mostres de tumor i mostres de teixit normal (sang o mucosa de còlon normal) del mateix pacient.

Taula 20: Seqüència dels encebadors utilitzats per l'estudi de metilació en el promotor del gen *UNC5C*

Anàlisi metilació (Promotor)	Encebador Fw (5'-3')	Encebador Rv (5'-3')
UNC5C_1	GGTGTTTGTGTGTGTTTTTATAGG	TTTAAAAATCCCTCTTTCCCAATAC
UNC5C_2	GTATTGGGAAAGAGGGATTTTTAAA	AACCCCACTAAACAAAAACTAAATC

RESULTATS



PART I

1. Variants del gen APC

La variant d'APC I1307K està present en un 6% de la població jueva Askenazi i està considerada com un al·lel de risc moderat pel càncer colorectal (Laken et al., 1997), però hi ha molta controvèrsia sobre la seva patogenicitat. Per la variant APC E1317Q hi ha estudis que la consideren com al·lel de risc i altres com a polimorfisme (Azzopardi et al., 2008; Dallosso et al., 2009; Lamlum et al., 2000; Liberman et al., 2007). En aquest estudi també es va incloure en l'anàlisi la variant S1028R detectada en un pacient amb AFAP.

Característiques clíniques de la variant APC S1028R

La variant APC S1028R, prèviament no descrita, es va identificar en una pacient de 53 anys afecte d'AFAP (30 adenomes en el moment del diagnòstic; tots ells amb un grau lleu de displàsia) i sense antecedents de FAP a la família. El pare i l'àvia paterna havien desenvolupat un carcinoma colorectal sense adenomes (figura 27). Aquesta variant dóna lloc a un canvi de serina a arginina en un residu altament conservat de l'exó 15 del gen APC, localitzat en la primera de les quatre repeticions de 15 AA que regulen la unió d'APC amb β -catenina. Degut a la seva localització dins d'un domini funcional de la proteïna i pel fet de que es tracta d'una seqüència altament conservada en l'evolució fa sospitar que la variant pugui ser la responsable de la malaltia. De fet, aquesta mutació està localitzada molt a prop de la posició on es va localitzar la mutació N1026S que va ser reportada com a patogènica en una família afecte d'AFAP (Menendez et al., 2008).

RESULTATS

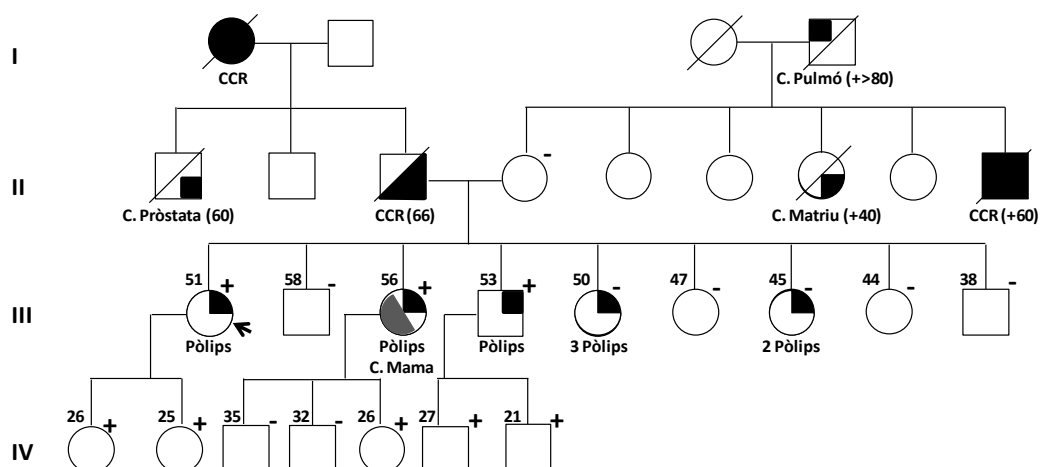


Figura 27: Arbre familiar on va ser identificada la variant missense APC S1028R

2. Estudi de l'activitat transcripcional mitjançada per β -catenina

Per realitzar aquests assajos es va dur a terme transfeccions transitòries i estables en les línies cel·lulars SW480 i DLD-1. Ambdues línies cel·lulars, no tenen la proteïna APC funcional i l'expressió exògena de la proteïna APCwt en aquestes cèl·lules produeix una disminució dels nivells de transcripció del complex β -catenina/TCF-4 (Korinek, 1997; Morin et al., 1996). Per altra banda, l'expressió exògena de la proteïna APC D1309 Δ , que també és una variant truncat, no redueix la transcripció mitjançant el complex β -catenina/TCF-4 en aquestes cèl·lules. Per tant, esperem que les variants amb impacte funcional provoquin una disminució en la unió de la proteïna APC amb β -catenina, el que impediria la correcta fosforilació i degradació de β -catenina i com a conseqüència, aquesta s'acumularia al citoplasma i seguidament al nucli. Per aquest motiu esperem que les cèl·lules transfectades amb variants *missense* mostrin uns valors de transcripció intermedis entre les cèl·lules que expressen APCwt i les cèl·lules que expressen APC D1309 Δ .

Efecte de les variants S1028R, I1307K i E1317Q en la transcripció mitjançant el complex de β -catenina/TCF-4

RESULTATS

Transfeccions transitòries: Com esperàvem les cèl·lules transfectades amb *APC*wt tenen un nivell de transcripció mitjançat el complex β -catenina/TCF-4 significativament més baix que les cèl·lules transfectades amb el plasmidi sense *APC* (GFP) i les transfectades amb *APC* D1309 Δ . En la figura 28 s'observa que totes les variants *missense* que vam testar en la línia cel·lular SW480 tenen l'activitat de transcripció més elevada, pel que interpretem que totes les variants *missense* podrien tenir un impacte funcional sobreactivant la transcripció mitjançada pel complex β -catenina/TCF-4. Però a causa de la variabilitat dels resultats, entre els experiments, tan sols observem diferències significatives amb les variants *APC* S1028R i *APC* E1317Q quan les comparem amb els valors obtinguts amb la variant *APC*wt.

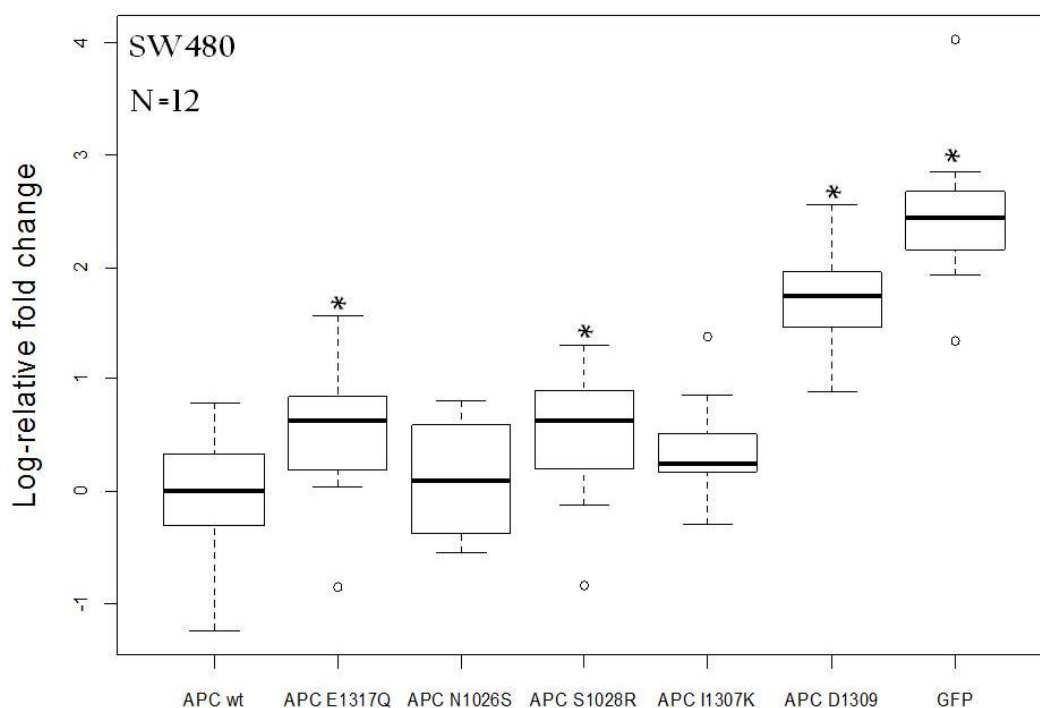


Figura 28: Efecte de l'expressió de les variants d'*APC* en la transcripció mitjançada per β -catenina/TCF-4 a les cèl·lules SW480. Es mostra un box plot representant el nivell de canvi relatiu en escala logarítmica (log-relative fold change) de la transcripció en les cèl·lules transfectades amb *APC* E1317Q, *APC* N1026S, *APC* S1028R, *APC* I1307K, *APC* 1309 Δ i pGFP respecte a les transfectades amb *APC*wt. Els experiments es van realitzar en sis dies independents i es van analitzar per triplicat obtenint dotze rèpliques.

RESULTATS

Pel que fa als resultats obtinguts amb la línia cel·lular DLD-1, figura 29, no veiem diferències en cap de les variants *missense* quan les comparem amb la variant salvatge. Però sí que hi ha diferències significatives quan comparem les cèl·lules transfectades amb *APC*wt amb les transfectades amb el plasmidi sense *APC* o amb la variant truncant *APC* D1309Δ.

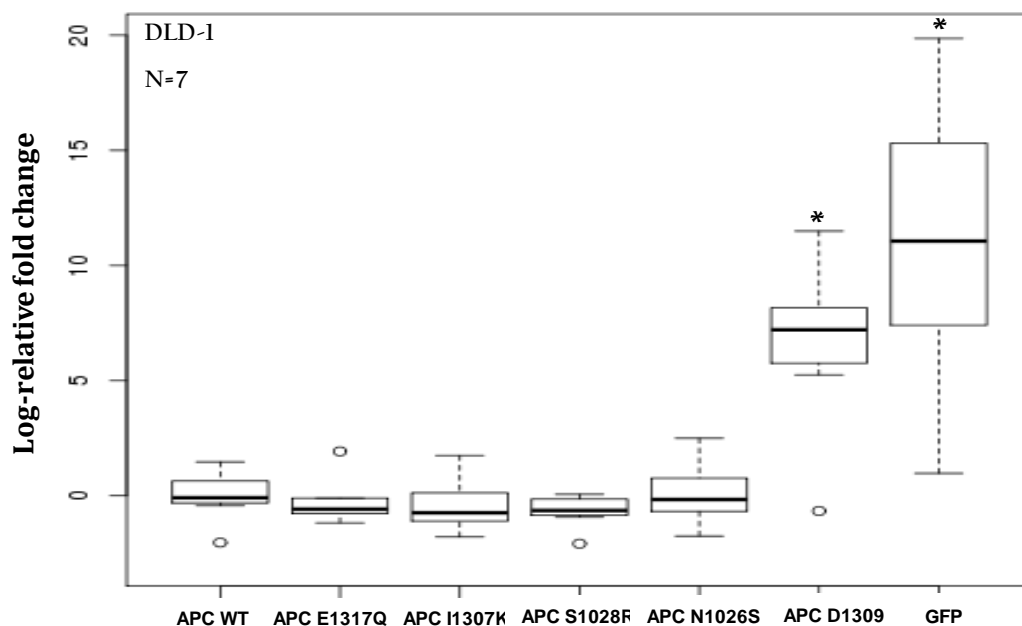


Figura 29: Efecte de l'expressió de les variants d'*APC* en la transcripció mitjançada per β -catenina/*TCF-4* a les cèl·lules DLD-1. Es mostra un box plot representant el nivell de canvi relatiu en escala logarítmica (log-relative fold change) de la transcripció en les cèl·lules transfectades amb *APC* E1317Q, *APC* N1026S, *APC* S1028R, *APC* I1307K, *APC* 1309Δ i *pGFP* respecte a les transfectades amb *APC*wt. Els experiments es van realitzar en 3 dies independents i es van analitzar per duplicat o triplicat obtenint 7 rèpliques.

Transfeccions estables. A la llum dels resultats obtinguts amb transfectants transitoris vam decidir produir, amb les línies cel·lulars SW480 i DLD-1, transfectants estables amb les variants del gen *APC* que volíem estudiar, per així intentar disminuir la variabilitat intra i interexperimental, que podria estar afectant a la sensibilitat analítica de l'assaig.

RESULTATS

Amb la línia cel·lular DLD-1, figura 30, es van obtenir diferències significatives en el nivell de transcripció en totes les variants analitzades. Cal remarcar que, en aquest cas, la variant *APC* N1026S, descrita en un treball anteriorment com a patogènica, i la variant *APC* S1028R, tenen uns valors de transcripció comparables a la variant truncant, i per tant clarament patogènica, *APC* D1309Δ. La variant *APC* I1307K també mostra un valor de transcripció clarament diferent a la variant *APC*wt, però sense arribar al mateix nivell que la variant truncant.

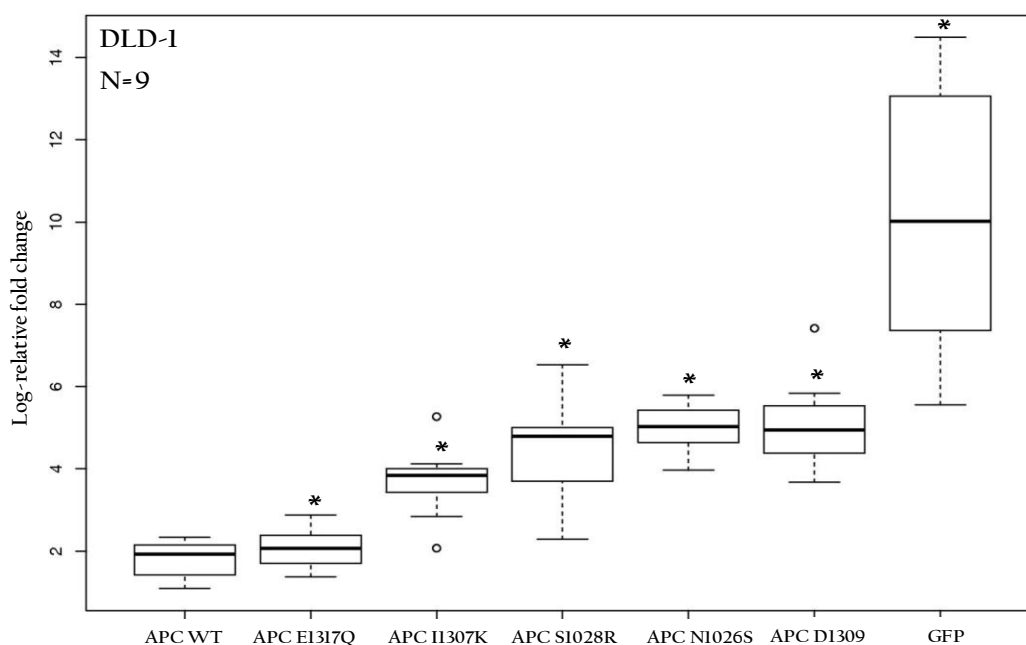


Figura 30: Efecte de l'expressió de les variants d'*APC* en la transcripció mitjançada per β -catenina/TCF-4 a les cèl·lules DLD-1 transfectants estables. Es mostra un box plot representant el nivell de canvi relatiu en escala logarítmica (*log-relative fold change*) de la transcripció en les cèl·lules transfectades amb *APC* E1317Q, *APC* N1026S, *APC* S1028R, *APC* I1307K, *APC* 1309Δ i pGFP respecte a les transfectades amb *APC*wt. Els experiments es van realitzar en tres dies independents per triplicat i es van obtenir nou rèpliques.

En el cas de la línia SW480 transfectada de forma estable, figura 31, també observem diferències significatives quan comparem les variants amb la variant salvatge, excepte en el cas de la variant *APC* E1317Q.

RESULTATS

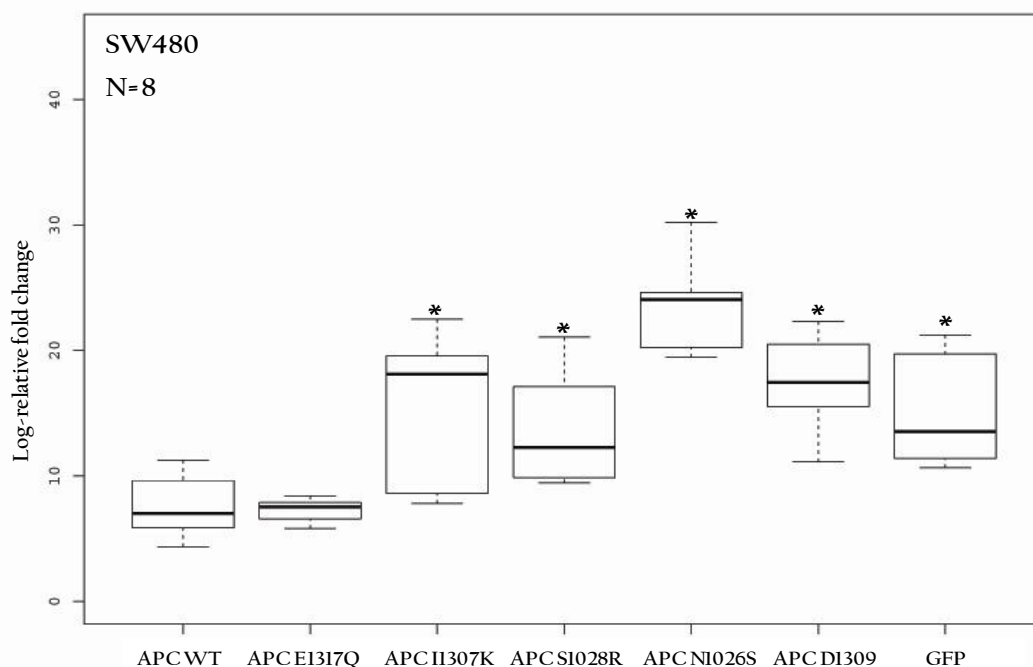


Figura 31: Efecte de l'expressió de les variants d'APC en la transcripció mitjançada per β -catenina/TCF-4 a les cèl·lules SW480 transfectants estables. Es mostra un box plot representant el nivell de canvi relatiu en escala logarítmica (log-relative fold change) de la transcripció en les cèl·lules transfectades amb APC E1317Q, APC N1026S, APC S1028R, APC I1307K, APC 1309 Δ i pGFP respecte a les transfectades amb APCwt. Els experiments es van realitzar en tres dies independents per duplicat i triplicat i es van obtenir vuit rèpliques.

3. Estudi dels nivells de β -catenina i la seva distribució cel·lular a les cèl·lules SW480 transfectades de forma estable.

A continuació es va analitzar si l'activació de la transcripció mitjançada pel complex β -catenina/TCF-4 en les cèl·lules SW480 transfectades de forma estable amb les variants APC I1307K i APC S1028R estava associada amb canvis en els nivells de β -catenina cel·lular i/o en la seva distribució subcel·lular.

En la figura 32 observem un exemple de Western Blot, on es va detectar els nivells de la proteïna MSH6, com a marcador de la fracció nuclear, per tal de comprovar si érem capaços de separar les proteïnes citoplasmàtiques (escrit com a "Cito.") de les nuclears (escrit com a "Nucli"). Com es pot observar no acabem de separar del tot la fracció citoplasmàtica de la nuclear, sobretot en el cas de les cèl·lules transfectades

RESULTATS

amb la variant salvatge, però sí que tenim un enriquiment de MSH6 en la fracció nuclear. En la segona franja de la figura 32, observem que els nivells de β -catenina citoplasmàtica baixen en les cèl·lules transfectades amb la variant APCwt mentre que no es modifiquen els nivells de β -catenina nuclear el que suggereix que la sobreexpressió de APCwt promou la degradació de β -catenina citoplasmàtica. La transfecció de les variants APC estudiades no comporta cap canvi en l'expressió de β -catenina citoplasmàtica o nuclear quan es comparen amb les parentals.

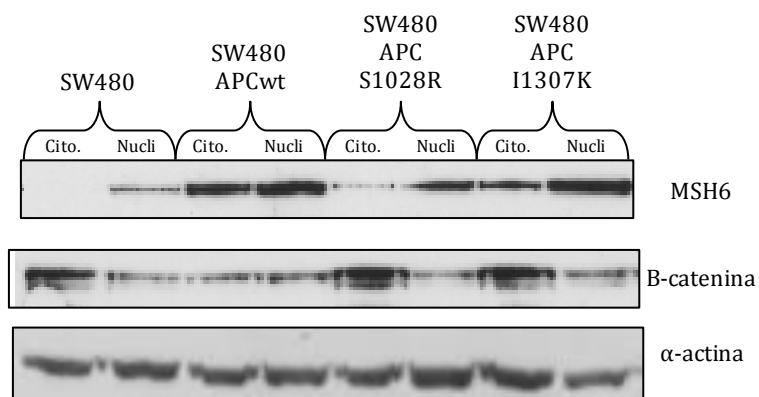


Figura 32: Western Blot de les línies cel·lulars SW480 parentals i les transfectades de forma estable amb les variants d'APCwt, APC S1028R i APC I1307K. (Cito. = fracció citoplasmàtica; Nucli= fracció nuclear). Com a control de càrrega vam utilitzar l'anticòs contra α -actina.

A la gràfica de sota (figura 33) es mostra la valoració quantitativa de les diferències observades normalitzant per l'efecte observat per la reintroducció d'APCwt. Tot i que la interpretació dels experiments ha de ser cautelosa no veiem que la variant I1307K es comporti com l'al·lel wt quant a la seva capacitat de disminuir i de redistribuir la quantitat de β -catenina nuclear i citoplasmàtica.

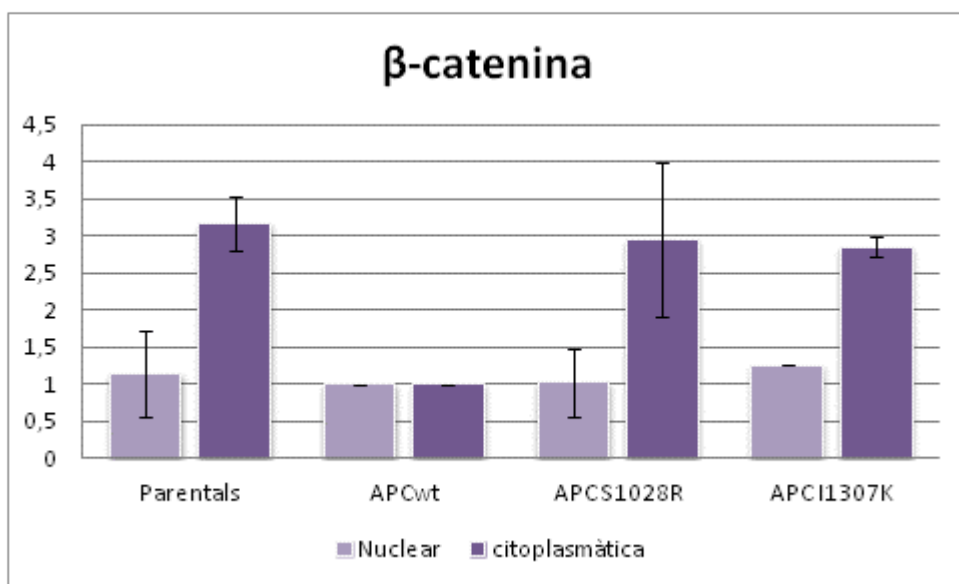


Figura 33: Gràfica de la intensitat de β -catenina observada en el Western Blot de les línies cel·lulars SW480 parentals i les transfectades de forma estable amb les variants d'APCwt, APC S1028R i APC I1307K (N=2).

4. Estudi dels nivells d'expressió dels gens APC, c-myc i Axin2

Pel que fa a l'expressió dels gens *c-myc* i *Axin2*, línies cel·lulars SW480 i DLD-1, al tenir la proteïna APC truncada, tenen la via Wnt activa i per tant uns nivells d'expressió elevats d'aquests gens, ja que són gens diana de la via β -catenina/TCF-4 (He et al., 1998). En aquest cas també esperem que les nostres variants *missense* mostrin nivells intermedis entre l'efecte de la variant APCwt i la variant truncant, d'APC D1309 Δ .

Efecte de les variants I1307K, S1028R i E1317Q en l'expressió dels gens APC, c-myc i Axin2.

Transfeccions transitòries: Mitjançant l'assaig qPCR es va estudiar l'efecte de les variants a nivell transcripcional dels gens implicats en la via Wnt.

4.1. APC

L'expressió d'APC en les cèl·lules transfectades de forma transitòria, tant en la línia cel·lular SW480 com en la DLD-1, figures 34 i 35 respectivament, amb el plasmidi buit és significativament menor a la resta, tal i com era d'esperar. En canvi, entre les diferents variants *missense* o la variant truncant, no observem diferències significatives quan les comparem amb les cèl·lules transfectades amb APCwt. Per tant, es pot interpretar que les diferències que observem en els nivells de transcripció i expressió entre variants no poden ser atribuïdes a diferències en la dosi d'APC.

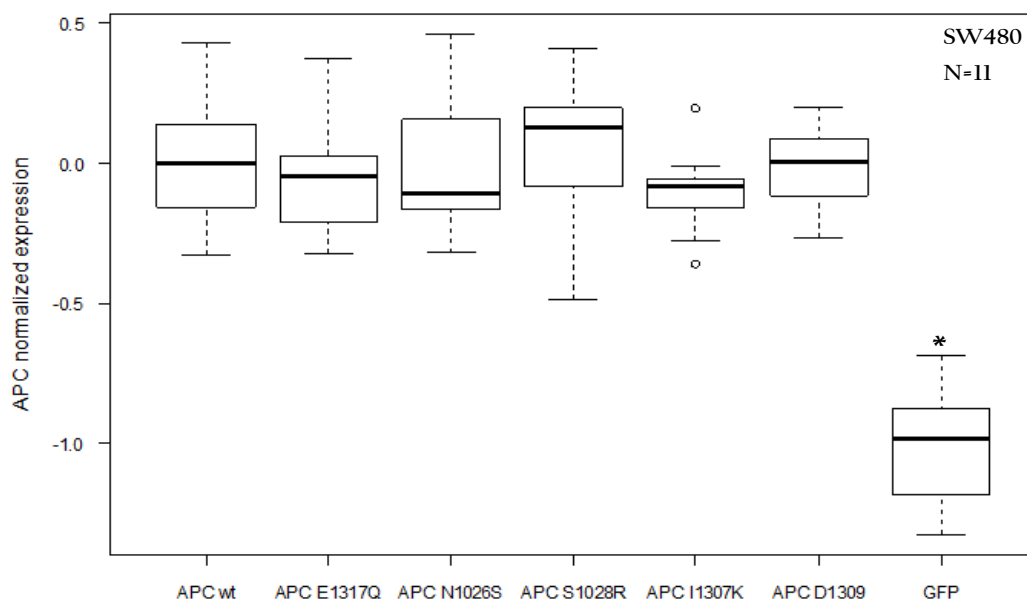


Figura 34: Efecte de l'expressió de les variants d'APC en la transcripció del gen APC en les cèl·lules SW480. Es mostra un box plot representant el nivell de canvi relatiu en escala logarítmica (log-relative fold change) de l'expressió d'APC en les cèl·lules transfectades amb APC E1317Q, APC N1026S, APC S1028R, APC I1307K, APC 1309Δ i pGFP respecte a les transfectades amb APCwt. Els resultats mostren la mitjana de 6 experiments independents realitzats per duplicat o triplicat (n=11).

RESULTATS

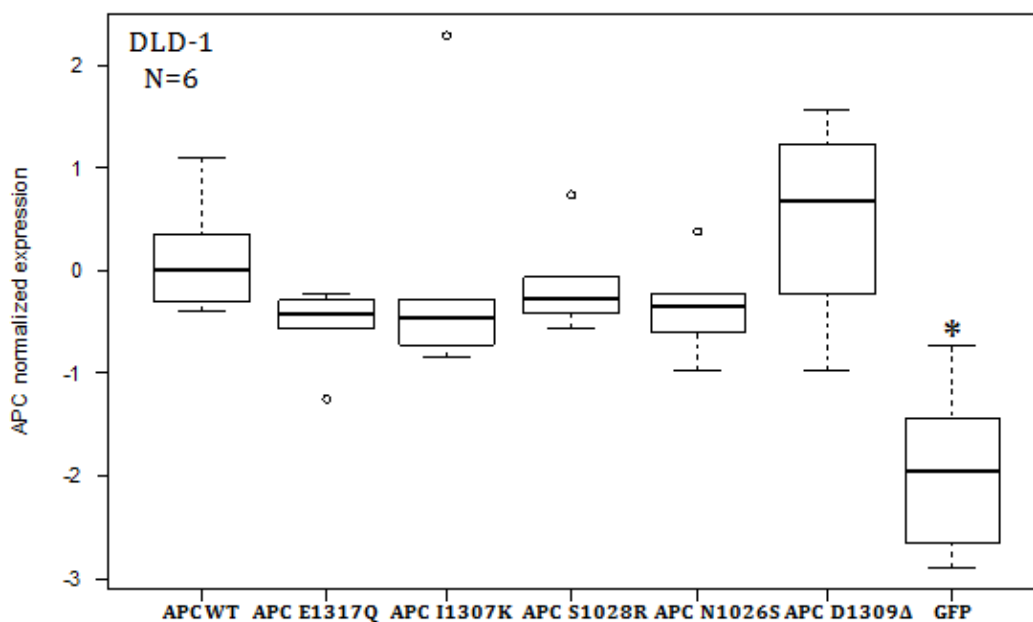


Figura 35: Efecte de l'expressió de les variants d'APC en la transcripció del gen APC en les cèl·lules DLD-1. Es mostra un box plot representant el nivell de canvi relatiu en escala logarítmica (*log-relative fold change*) de l'expressió d'APC en les cèl·lules transfectades amb APC E1317Q, APC N1026S, APC S1028R, APC I1307K, APC 1309Δ i pGFP respecte a les transfectades amb APCwt. Els resultats mostren la mitjana de 2 experiments independents realitzats per duplicat o triplicat ($n=6$).

4.2. *c-myc*

En la línia cel·lular SW480, figura 36, els nivells de transcripció del gen *c-myc* són significativament més alts en les transfeccions amb el plasmidi APC 1309Δ quan es compara amb APCwt (p -valor= $3.402e-05$).

RESULTATS

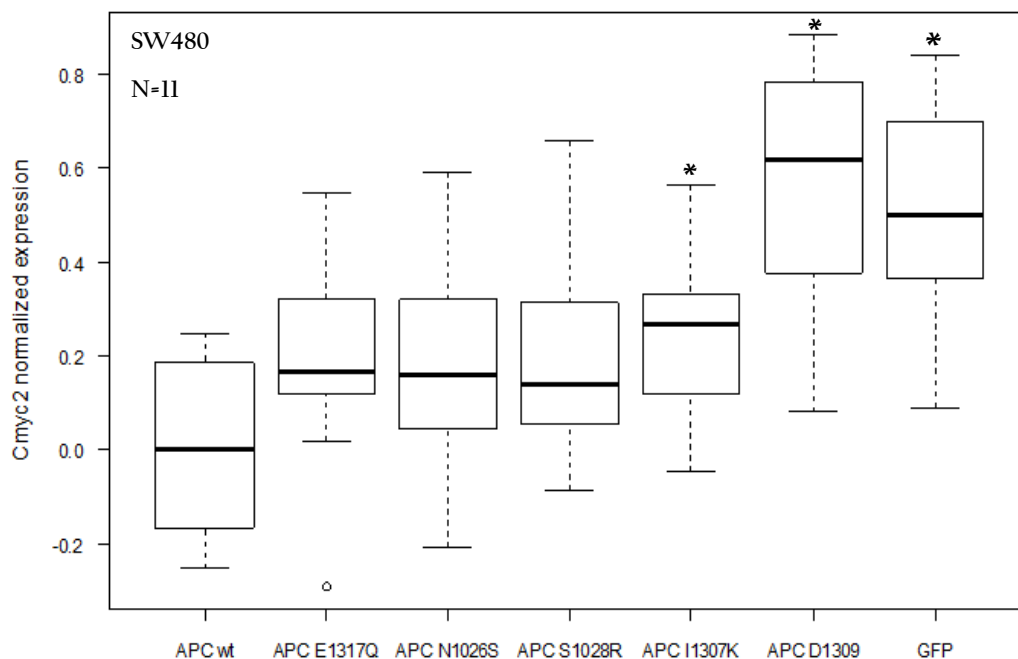


Figura 36: Efecte de l'expressió de les variants d'APC en la transcripció del gen *c-myc* en les cèl·lules SW480. Es mostra un box plot representant el nivell de canvi relatiu en escala logarítmica (*log*-relative fold change) de l'expressió de *c-myc* en les cèl·lules transfectades amb APC E1317Q, APC N1026S, APC S1028R, APC I1307K, APC 1309Δ i pGFP respecte a les transfectades amb APCwt. Els resultats mostren la mitjana de 6 experiments independents realitzats per duplicat o triplicat (n=11).

Cap de les variants d'interès era capaç de disminuir els nivells d'expressió de *c-myc* tant com l'al·lel salvatge. No obstant, només la variant APC I1307K presenta uns nivells d'expressió del gen *c-myc* significativament més elevats que la variant salvatge. Pel que fa als resultats amb la línia cel·lular DLD-1, figura 37, també segueixen la mateixa tendència que la línia SW480 però no veiem diferències significatives quan comparem les variants *missense* amb la variant APCwt.

RESULTATS

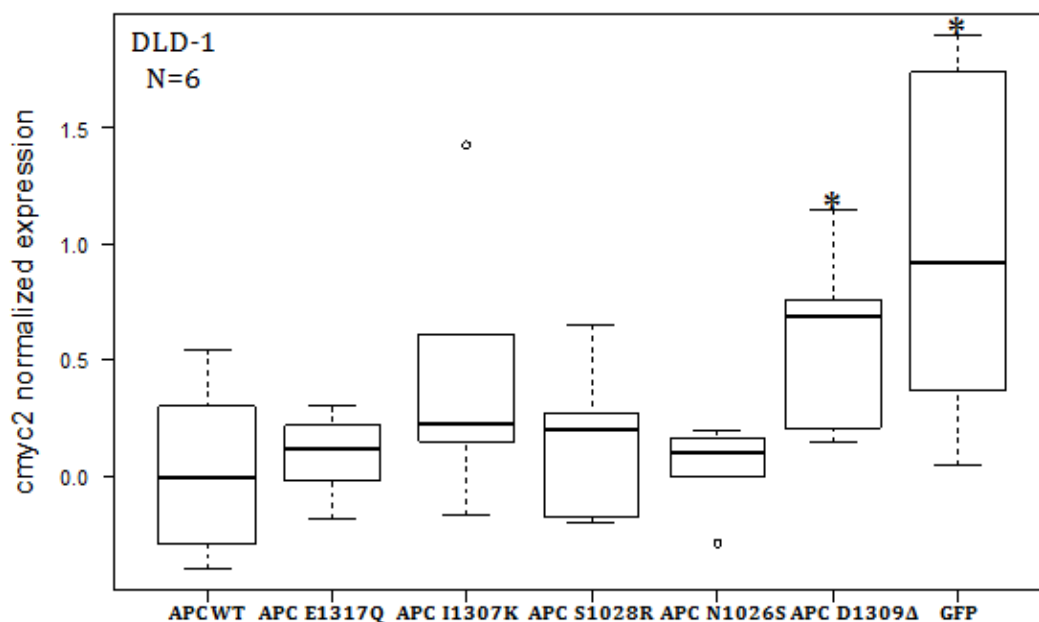


Figura 37: Efecte de l'expressió de les variants d'APC en la transcripció del gen *c-myc* en les cèl·lules DLD-1. Es mostra un box plot representant el nivell de canvi relatiu en escala logarítmica (*log-relative fold change*) de l'expressió de *c-myc* en les cèl·lules transfectades amb APC E1317Q, APC N1026S, APC S1028R, APC I1307K, APC 1309Δ i pGFP respecte a les transfectades amb APCwt. Els resultats mostren la mitjana de 2 experiments independents realitzats per duplicat o triplicat ($n=6$).

4.3. *Axin2*

Quan analitzem els resultats obtinguts pel gen *Axin2*, figures 38 per la línia SW480 i figura 39 per la línia cel·lular DLD-1, cap de les variants que s'estudiaven mostraven diferències significatives en el nivell d'expressió d'*Axin2* quan les comparàvem amb la variant salvatge tot i que el patró d'expressió era el mateix que l'observa't per *c-myc*. L'únic resultat discordant era el resultat de la variant I1307K mostrava, de manera reproduïble, nivells d'expressió semblants al WT. Aquest patró el vam observar en ambdues línies cel·lulars.

RESULTATS

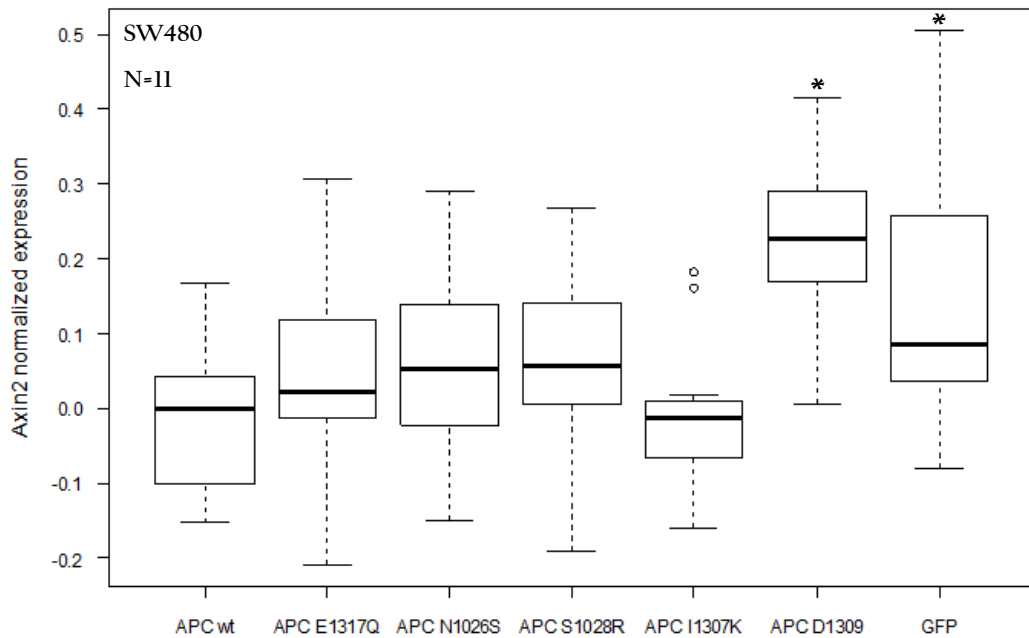


Figura 38: Efecte de l'expressió de les variants d'APC en la transcripció del gen *Axin2* en les cèl·lules SW480. Es mostra un box plot representant el nivell de canvi relatiu en escala logarítmica (log-relative fold change) de l'expressió d'*Axin2* en les cèl·lules transfectades amb APC E1317Q, APC N1026S, APC S1028R, APC I1307K, APC 1309Δ i pGFP respecte a les transfectades amb APCwt. Els resultats mostren la mitjana de 6 experiments independents realitzats per duplicat o triplicat (n=11).

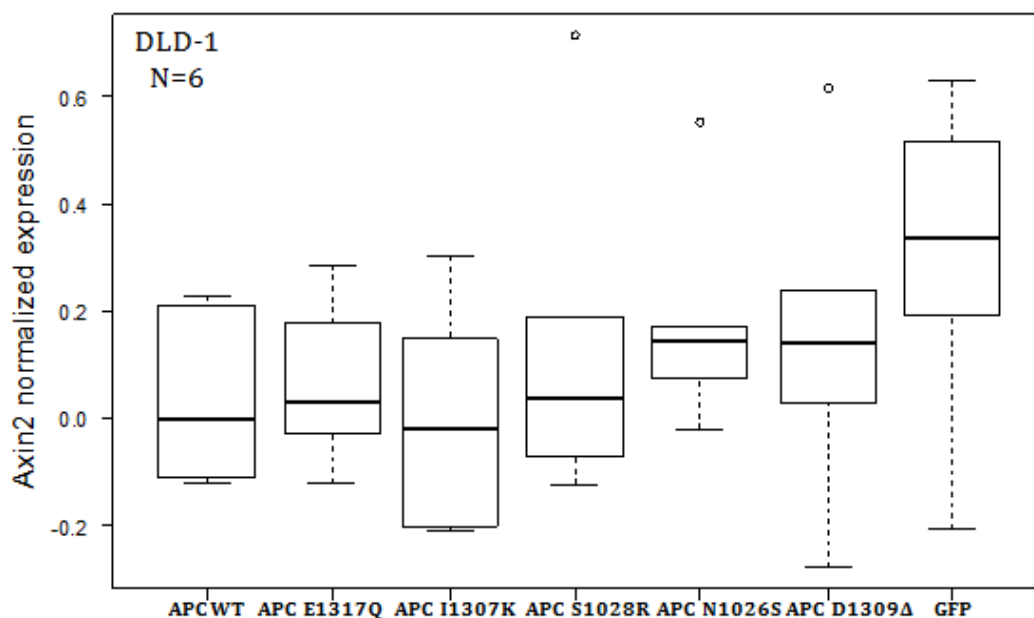


Figura 39: Efecte de l'expressió de les variants d'APC en la transcripció del gen *Axin2* en les cèl·lules DLD-1. Es mostra un box plot representant el nivell de canvi relatiu en escala logarítmica (log-relative fold change) de l'expressió d'*Axin2* en les cèl·lules transfectades amb APC E1317Q, APC N1026S, APC S1028R, APC I1307K, APC 1309Δ i pGFP respecte a les transfectades amb APCwt. Els resultats mostren la mitjana de 2 experiments independents realitzats per duplicat o triplicat (n=6).

5. Anàlisis *in silico* de l'efecte en la funció i estabilitat de les variants missense en la proteïna APC.

De forma paral·lela es va fer l'estudi de la predicció de funció de com afectaven els canvis *missense* en la proteïna APC. els tres programes de predicció *in silico* el Condel, el Polyphen (PPH2) i el SIFT classifiquen les variants I1307K i E1317Q com a neutres, és a dir que no afecten la funció de la proteïna. En canvi per la variant S1028R els tres programes la classifiquen com a patogènica (Condel: 0,56; PPH2: 0,999; SIFT:0,0).

Per les variants S1028R i N1026S s'ha pogut fer l'estudi d'estabilitat de la proteïna, ja que es troben en una regió de la proteïna APC que va ser cristal·litzada. Aquest anàlisi està basat en un model 3D de la interacció entre β -catenina i la proteïna APC humana. Per realitzar l'estudi es va utilitzar les estructures cristal·litzades del complex *murine β -catenina:human APC* (PDB ID: 1JPP), el qual ja va

RESULTATS

ser utilitzar en el treball anterior per estudiar el canvi N1026S (Menendez et al., 2008), i que hem tornat a utilitzar. També s'ha utilitzat el complex *human β -catenin:human HTCF-4* (PDB ID: 1JDH), on es reemplaça l'estructura de la β -catenina de ratolí per la humana, assumint que l'orientació de la proteïna APC humana en el complex amb β -catenina és la mateixa. En la figura 40 es pot veure que no existeixen canvis de conformació en la β -catenina amb la unió d'un lligant o l'altre (hAPC o hHTCF-4). A més el percentatge d'identitat en la seqüència entre la β -catenina de ratolí i la humana és del 99% per la regió de la seqüència que està cristal·litzada.

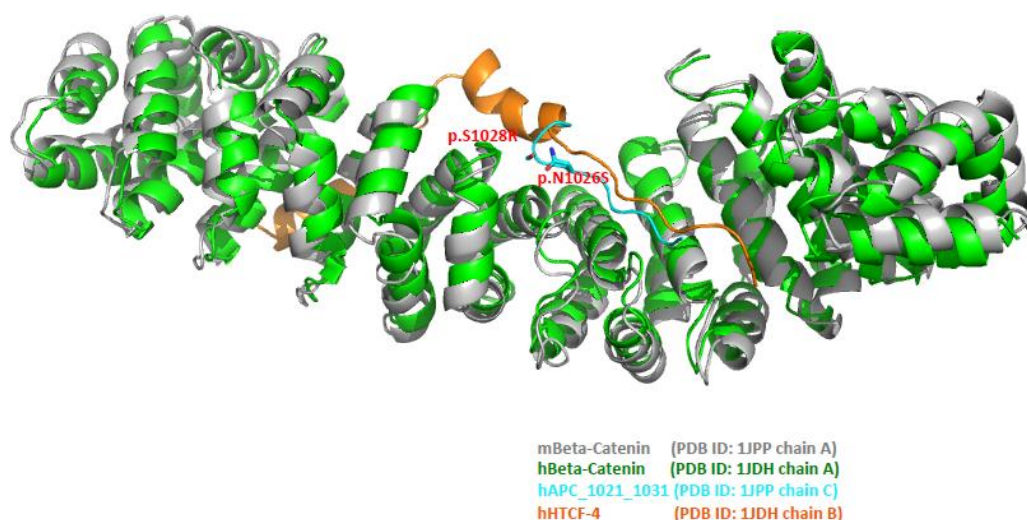


Figura 40: Estructures cristal·litzades del complex murine β -catenina (gris): human APC (blau)(PDB ID: 1JPP) i human β -catenin (verd):human HTCF-4 (taronja) (PDB ID: 1JDH)

Per les dues mutacions (N1026S i S1028R) les prediccions suggereixen que desestabilitzen l'estructura del pèptid hAPC. Tot i així l'efecte desestabilitzador sembla més clar per la variant N1026S, prèviament descrita, que per la variant S1028R (taula 20) segons la majoria dels programes emprats.

RESULTATS

Taula 20: Predicció de l'estabilitat de la proteïna (Kcal/mol)

Mutació	CUPSAT:	ERIS (Fixa):	ERIS (Flexible):	I-Mutant (3D):	I-Mutant (1D):	PoPMuSiC:
p.N1026S	Estabilitza (0,58)	Desestabilitza (1,09)	Desestabilitza (1,17)	Desestabilitza (-1,48)	Desestabilitza (-0,79)	Desestabilitza (0,82)
p.S1028R	Estabilitza (2,52)	Estabilitza (-3,11)	Estabilitza (-1,67)	Desestabilitza (-0,42)	Desestabilitza (-0,58)	Desestabilitza (1,30)

*(1D) Basat en la seqüència d'AA; (3D) Basat en l'estructura cristal·litzada

Cal esmentar que l'efecte més important de les variants és l'efecte que tenen sobre l'afinitat en la unió amb la β -catenina. Les dues variants estan en la interfície d'interacció amb hAPC: β -catenina i el model BeAtMuSiC v1.0 prediu que aquestes dues variants disminueixen l'afinitat d'unió amb β -catenina (taula 21). Quant a l'impacte sobre l'afinitat sembla que S1028R l'afecta més que no pas N1026R. Cal destacar que els canvis N1026S i S1028R eliminen varis contactes amb les cadenes laterals Lys354 i Asp390 de la β -catenina, i també els contactes existents entre les posicions 1026 i 1028 d'APC.

Taula 21: Predicció de l'afinitat d'unió amb β -catenina

Mutació	BeAtMuSiC v1.0
p.N1026S	1.04 (disminueix afinitat d'unió)
p.S1028R	1.42 (disminueix afinitat d'unió)

En resum els diferents mètodes utilitzats suggereixen que la variants S1028R afecta l'estabilitat d'hAPC (pèptid) i la seva unió amb la β -catenina de manera semblant a la variant N1026S. És important destacar que els resultats obtinguts amb la variant N1026S estan d'acord amb els que van ser reportats en el treball realitzat anteriorment en el nostre grup (Menendez et al., 2008).

6. BIAcore T100: Estudi de la interacció de β -catenina amb els dominis de la proteïna APC

Per poder analitzar si les mutacions tenien un efecte en la unió de la β -catenina amb la proteïna APC, de forma més directa, vam fer l'estudi d'interacció entre les dues molècules mitjançant la plataforma de BIAcore T100. Aquesta plataforma es basa en el fenomen de ressonància de plasmon de superfície (SPR, *Surface Plasmon Resonance*) que permet mesurar els canvis de massa produïts en una superfície entre una molècula unida a aquesta superfície i una altra que està en suspensió a l'interaccionar entre elles.

Primer vam immobilitzar en tots els canals del xip l'anticòs anti-GST. Després, en canals independents, hi injectàvem les proteïnes de fusió de GST amb el fragment d'APCwt o els fragments d'APC amb les diferents variants *missense*. Per cada mutació d'APC analitzada, comparàvem el grau d'interacció de la β -catenina amb el fragment APCwt amb el grau d'interacció amb el fragment APC mutat, tenint en compte tant l'associació com la dissociació. Per analitzar si les mutacions feien variar el grau d'afinitat que tenen les dues molècules es calculava la constant de dissociació (KD). Aquest constant és una constant d'equilibri que mesura la propensió que te un complex a separar-se (dissociar-se de forma reversible). Com més baixa sigui la constant de dissociació, més fortament està unida la molècula al seu lligand, és a dir, més gran és l'afinitat entre elles.

Com hem esmentat anteriorment, vam produir dos fragments de la proteïna APC diferents, ja que les mutacions estaven localitzades en diferents dominis d'interacció de la proteïna APC amb la β -catenina. Les variants N1026S, S1028R i L1129S estan localitzades a la regió de 4 repeticions de 15 AA (figura 41), que com hem comentat és el domini d'unió a β -catenina, i les variants I1307K i E1317Q estan localitzades entre les dues primeres repeticions de 20 AA (figura 48), que és el domini d'unió i regulació a la baixa dels nivells citoplasmàtics de β -catenina. Per tant, els resultats obtinguts s'expliquen en funció de quin sigui el fragment d'APC analitzat.

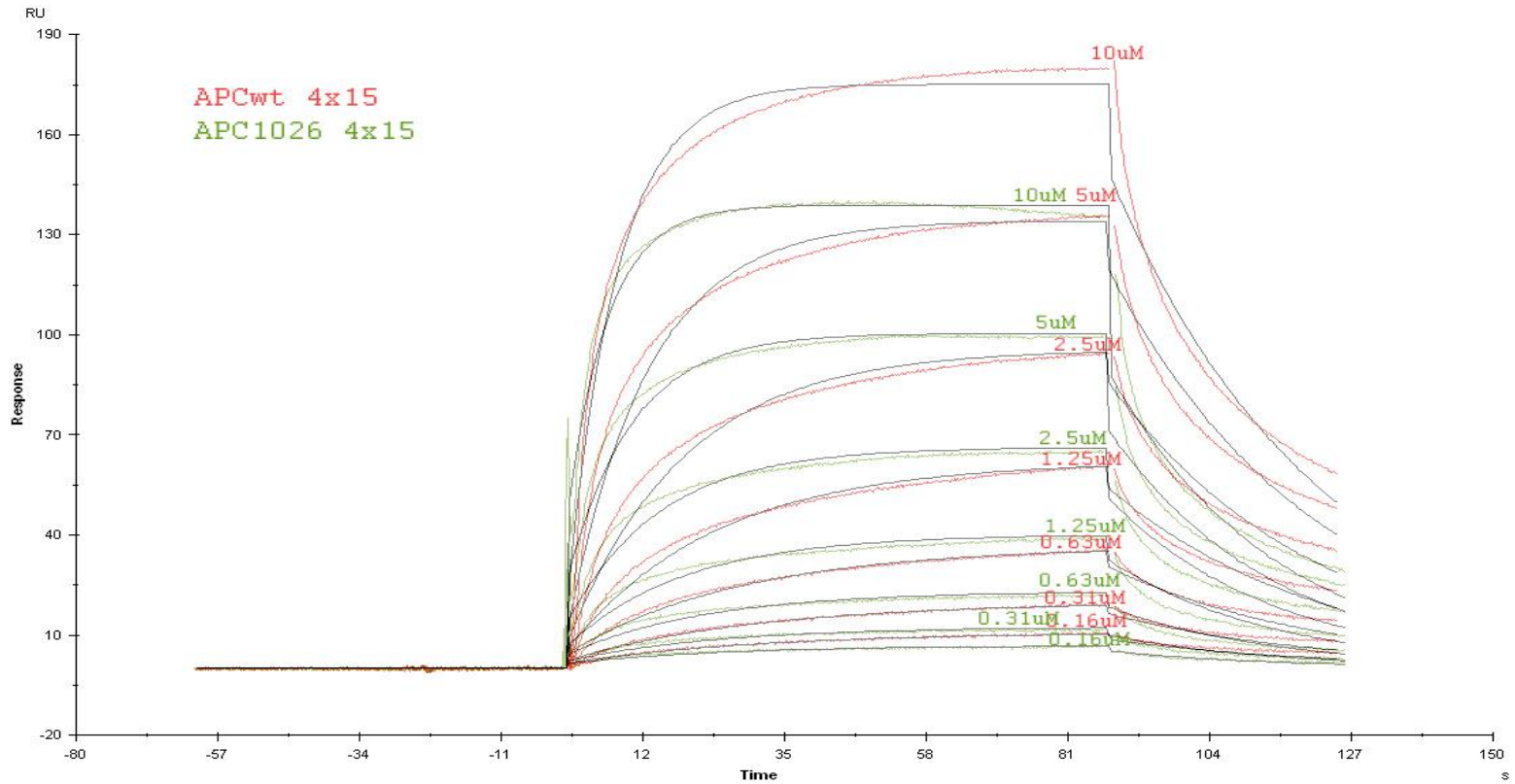


Figura 42: Sensograma que mostra la cinètica d'associació i dissociació de N1026S. Es mostren els resultats per diferents injeccions de concentració β -catenina sobre la superfície de sensor on havíem immobilitzat els fragments APCwt-4x15 (vermell) o APCN1026S-4x15 (verd). La resposta en unitats de ressonància es va registrar com una funció del temps

RESULTATS

L'afectació en la cinètica d'associació-dissociació induïda per N1026S té un correlat en l'afinitat del fragment APC per la β -catenina. En el sensograma d'afinitat (figura 43) està representat el valor de KD per a cada molècula, com una línia vertical. Si el valor de KD indicat és major que la meitat de la concentració més alta utilitzada, aquesta línia es mostrarà de forma discontinua, advertint que serien necessàries concentracions més elevades d'analit per poder calcular millor la KD de forma precisa. Per tant, observem que per una concentració màxima de 10 μ M de β -catenina es pot calcular l'afinitat pel fragment APCwt (línia negra continua de la figura). En canvi pel fragment proteic APCN1026S, la línia és discontinua, ja que al tenir menys afinitat serien necessàries concentracions més elevades de β -catenina per a calcular de forma exacte el valor de KD. Aquest resultat posen de manifest que el fragment d'APC amb la mutació té menys afinitat per la β -catenina que el fragment APCwt

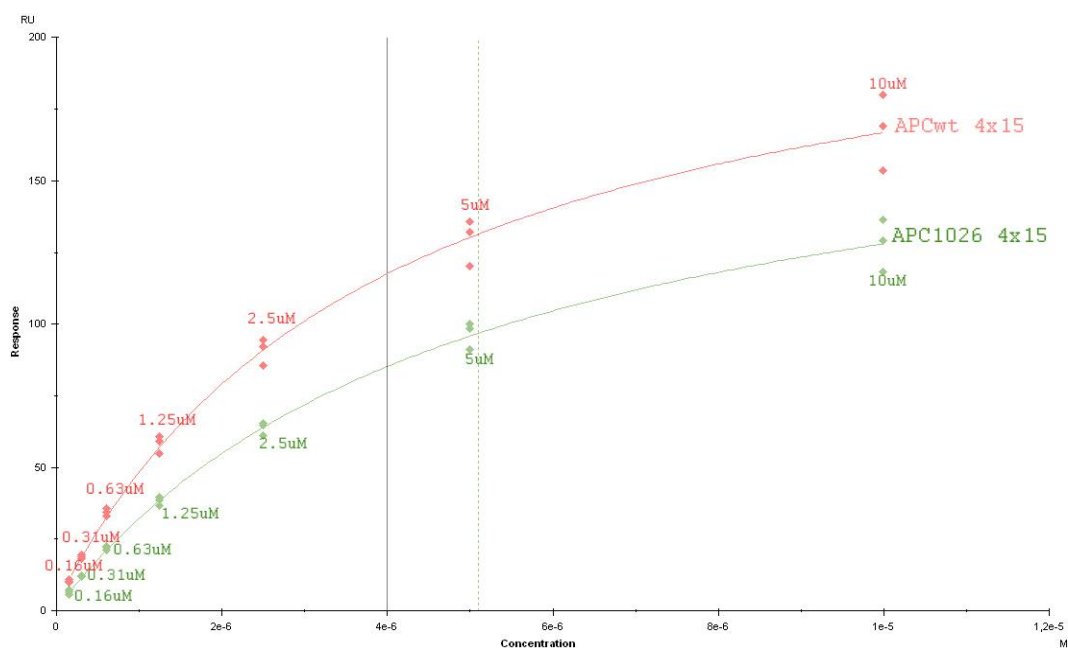


Figura 43: Sensograma que mostra els perfils d'afinitat de diferents injeccions de concentració β -catenina sobre la superfície de sensor on havíem immobilitzat els fragments APCwt-4x15 o APCN1026S-4x15. La resposta en unitats de ressonància es va registrar com una funció del temps. Les línies verticals representen els valors de KD, la contínua pel fragment d'APCwt i la discontinua pel fragment mutat.

- **Variant L1129S**

Una altra variant que vam estudiar en l'assaig d'interacció va ser la variant *APC* L1129S, que també va ser caracteritzada amb el mateix mètode en el treball anterior (Menendez et al., 2008). En aquest cas ens servia com a control negatiu, ja que els resultats obtinguts en l'estudi anterior van ser que no afectava a la capacitat d'interacció amb β -catenina. En aquest cas, figura 44, el fragment d'APC amb la mutació L1129S (color blau cel) mostra unes RU més elevades que el fragment WT (color vermell), encara que la diferència entre les RUs és menor que per la variant N1026S. Aquest resultat ens indiquen que la variant L1129S, en presència de les altres quatre repeticions de 15 AA, no disminueix la interacció d'APC 4x15 amb la β -catenina..

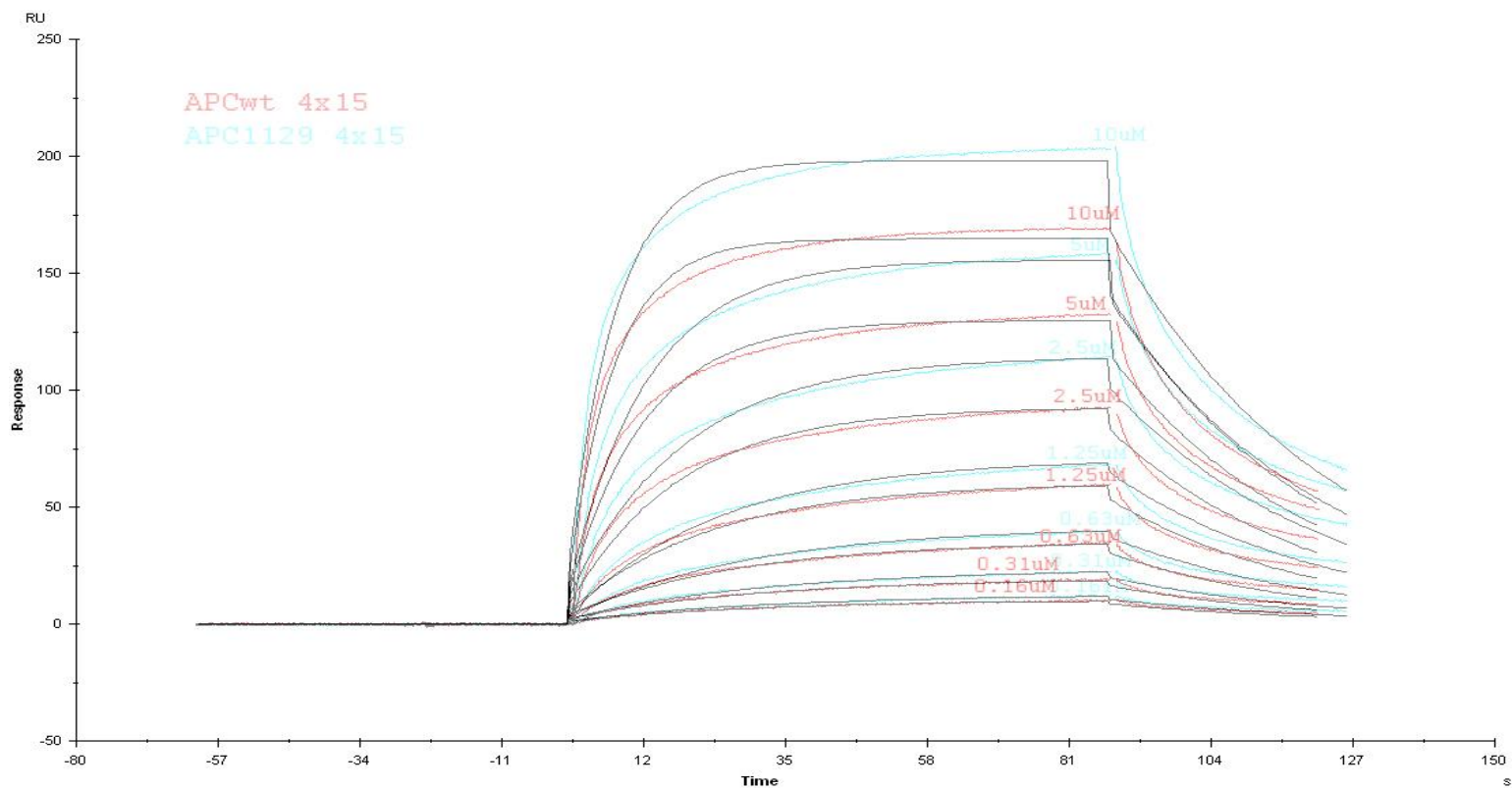


Figura 44: Sensograma que mostra la cinètica d'associació i dissociació de L1129S. Es mostren els resultats per diferents injeccions de concentració β -catenina sobre la superfície de sensor on havíem immobilitzat els fragments APCwt-4x15 (vermell) o APCL1129S-4x15 (blau cel). La resposta en unitats de ressonància es va registrar com una funció del temps.

RESULTATS

Pel fragment amb la mutació L1129S tampoc es va veure afectació en l'afinitat del fragment APC per la β -catenina. En aquest cas, a la figura 45, es pot observar que el fragment de la proteïna APCwt té menys afinitat per β -catenina que el fragment APC L1129S. A més a més, en ambdós casos es pot calcular de manera precisa, amb una concentració màxima de $10\mu\text{M}$ de β -catenina el valor de la KD, ja que aquesta constant està representada pels dos fragments amb una línia continua de color negra.

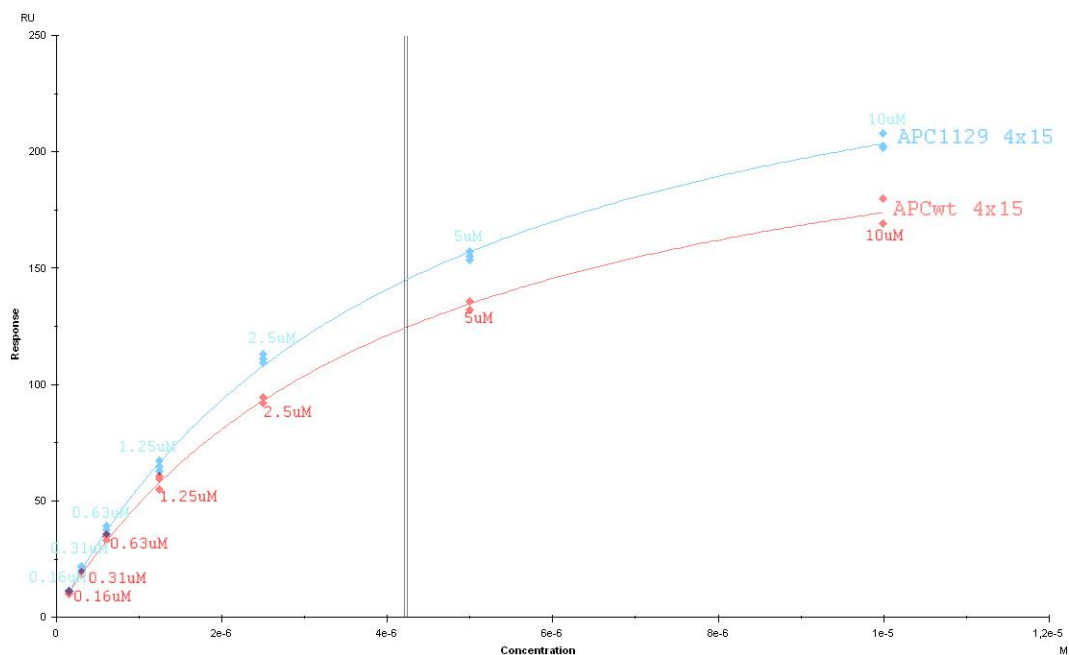


Figura 45: Sensograma que mostra els perfils d'afinitat de diferents injeccions de concentració β -catenina sobre la superfície de sensor on s'havien immobilitzat els fragments APCwt-4x15 o APC L1129S-4x15. La resposta en unitats de ressonància es va registrar com una funció del temps. Les línies verticals representen els valors de KD.

- **Variant S1028R**

Pel fragment d'APCS1028R-4x15, figura 46, observem una disminució de la interacció de β -catenina amb el fragment mutat (color rosa) quan es compara amb el fragment APCwt (color vermell). A més, en aquest cas sembla que l'afectació de la interacció és més clara per S1028R que per N1026S.

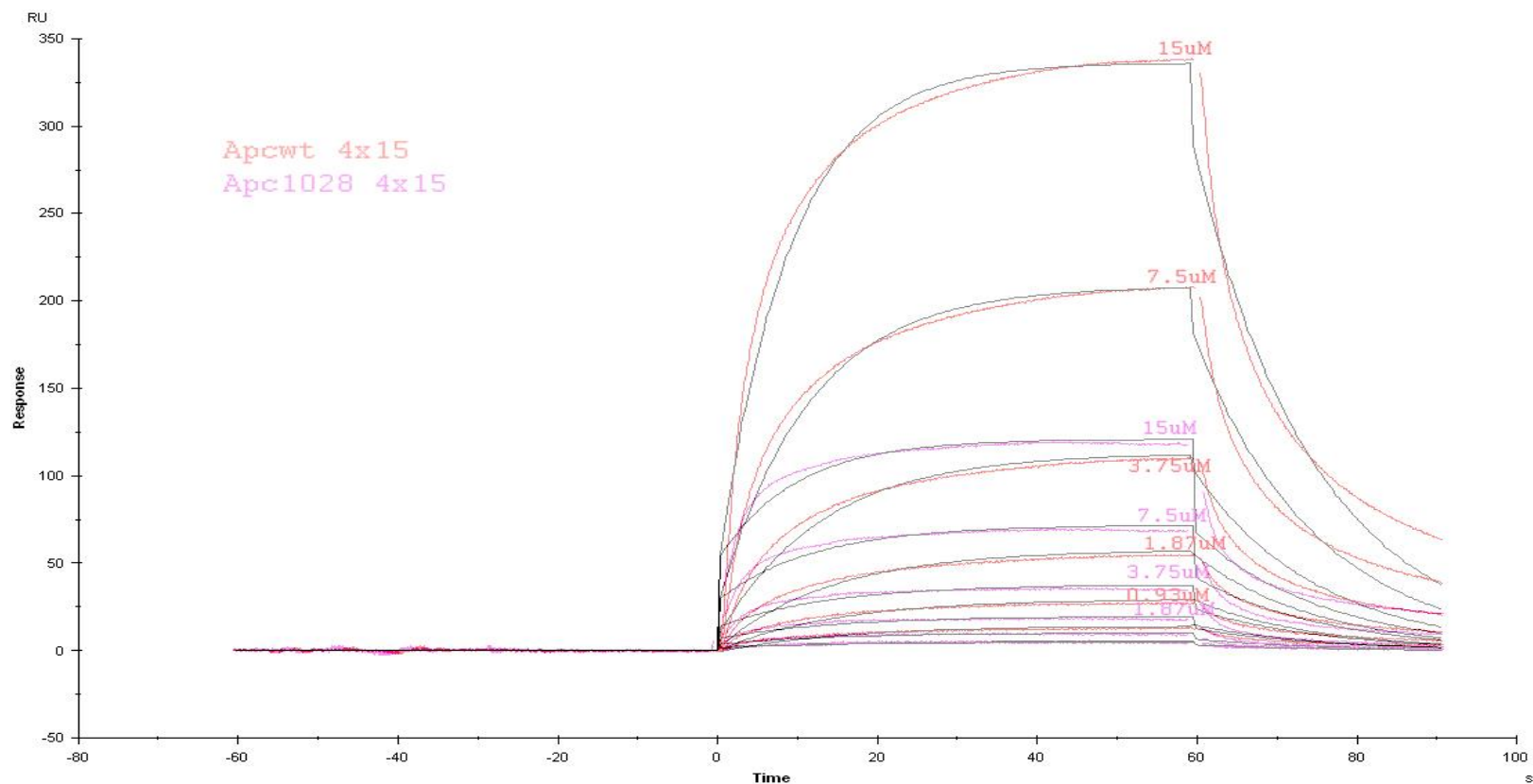


Figura 46: Sensograma que mostra la cinètica d'associació i dissociació de S1028R. Es mostren els resultats per diferents injeccions de concentració β -catenina sobre la superfície de sensor on havíem immobilitzat els fragments APCwt-4x15 (vermell) o APCS1028R-4x15 (rosa). La resposta en unitats de ressonància es va registrar com una funció del temps.

RESULTATS

En consonància amb les observacions prèvies es veu clarament que la mutació S1028R disminueix l'afinitat amb la β -catenina, com s'observa en la figura 47. La representació de la KD de la variant és una línia discontinua (rosa). En aquest cas la KD també està dibuixada amb una línia discontinua perquè serien necessàries concentracions de β -catenina més elevades per poder calcular de forma més acurada el valor de la KD per la mutació. Quan comparem la KD de la variant S1028R amb la KD obtinguda amb la variant N1026S. Observem que la variant S1028R té encara menys afinitat per β -catenina que la variant N1026S (figura 42).

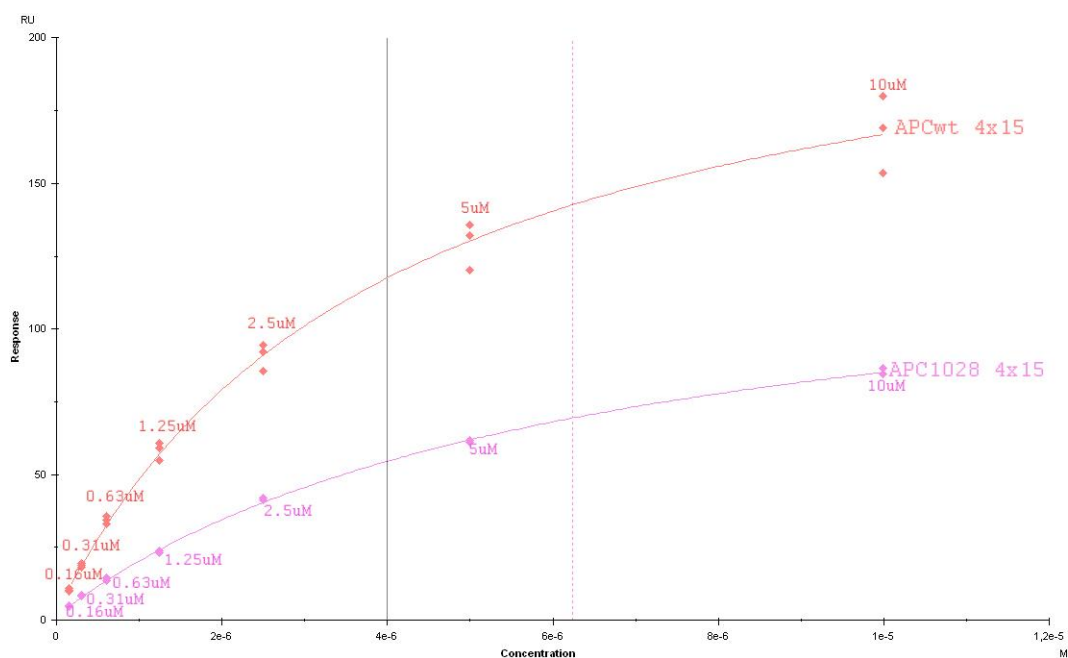


Figura 47: Sensograma que els perfils d'afinitat de diferents injeccions de concentració β -catenina sobre la superfície de sensor on havíem immobilitzat els fragments APCwt-4x15 o APC1028R-4x15. La resposta en unitats de ressonància es va registrar com una funció del temps. Les línies verticals representen els valors de KD, la contínua pel fragment d'APCwt i la discontinua pel fragment mutat.

A la taula 23 hem resumit els resultats d'interacció entre els fragments d'APC amb les 4 repeticions de 15 aminoàcids i les diferents concentracions de β -catenina

RESULTATS

Taula 23: Valors de les KD de la cinètica com de l'afinitat dels fragments de GST-APC 4x15 amb β -catenina

	Cinètica			Afinitat		
	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
APCwt 4x15	2.97E-06	182.8	8	4.20E-06	243.9	6.63
APC1129 4x15	2.81E-06	207.5	9.08	4.24E-06	288.2	5.96
APC1026 4x15	4.78E-06	222	10.3	6.68E-06	302.6	3.52
APC1028 4x15	4.34E-06	304	10.7	5.83E-06	397.9	2.08

6.2 Fragments GST-APC-3X20

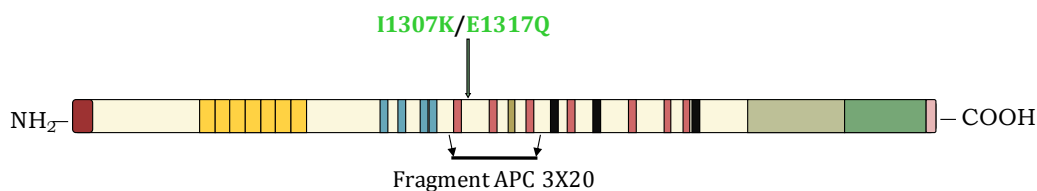


Figura 48: Representació esquemàtica dels fragments d'APC utilitzats en el estudi d'interacció entre APC i β -catenina i localització de les variants estudiades.

- **Variant I1307K**

La mutació I1307K afecta de manera clara la cinètica d'associació-dissociació del fragment d'APC I1307K-3x20 (color blau fosc; 60 RU) quan es compara amb el fragment wt (color vermell; 90 RU) (figura 49).

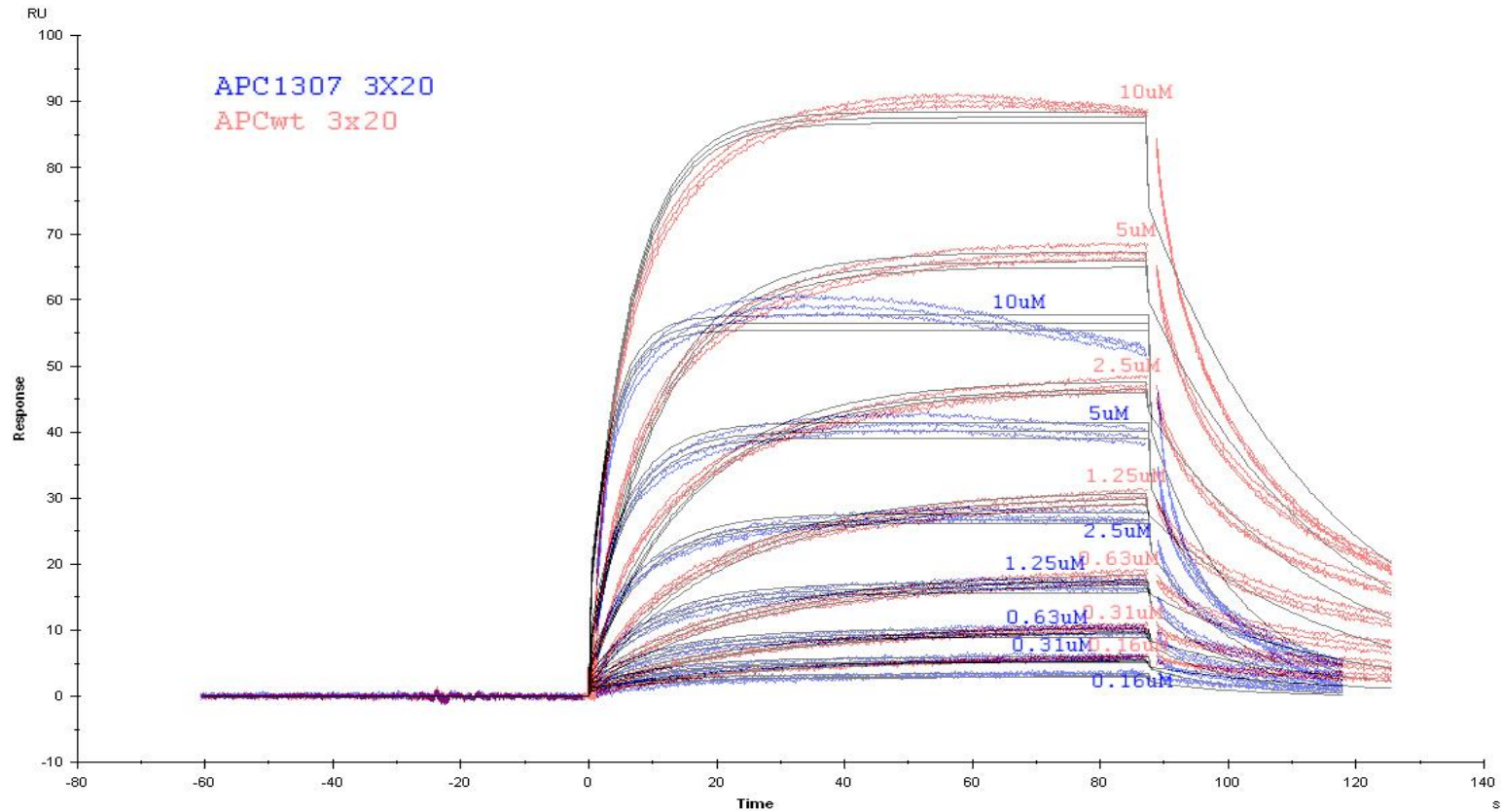


Figura 49: Sensograma que mostra la cinètica de l'associació i dissociació de I1307K. Es mostren els resultats per diferents concentracions de β -catenina sobre la superfície de sensor on havíem immobilitzat els fragments APCwt-3x20 (vermell) o APC1307K-3x20 (blau). La resposta expressada en unitats de ressonància, es va registrar com una funció del temps.

RESULTATS

També, hem observat que l'afinitat de la variant I1307K per β -catenina és clarament menor a la del fragment APCwt, tal i com es veu a la figura 50. La KD de la variant també està representada amb una línia discontinua (blava) indicant que es necessitarien concentracions de β -catenina més elevades per poder-la calcular de forma més exacta.

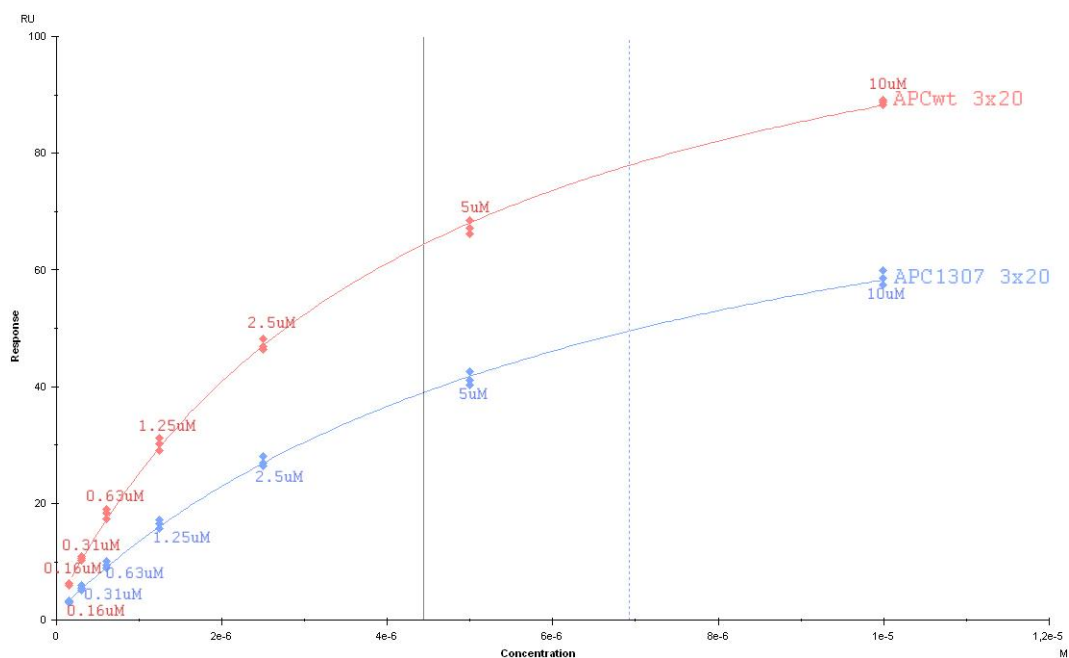


Figura 50: Sensograma que mostra la cinètica de l'associació i dissociació de I1307K. Es mostren els resultats per diferents concentracions de β -catenina sobre la superfície de sensor on havíem immobilitzat els fragments APCwt-3x20 (vermell) o APC1307K-3x20 (blau). La resposta expressada en unitats de ressonància, es va registrar com una funció del temps

• Variant E1317Q

Pel que fa a la variant E1317Q, no hi ha diferències en la cinètica d'associació-dissociació entre el fragment amb la mutació E1317Q (color marró) i el fragment APCwt (color vermell). Tot hi que sí que sembla que la β -catenina s'hi uneixi amb menys afinitat a la variant (figura 51).

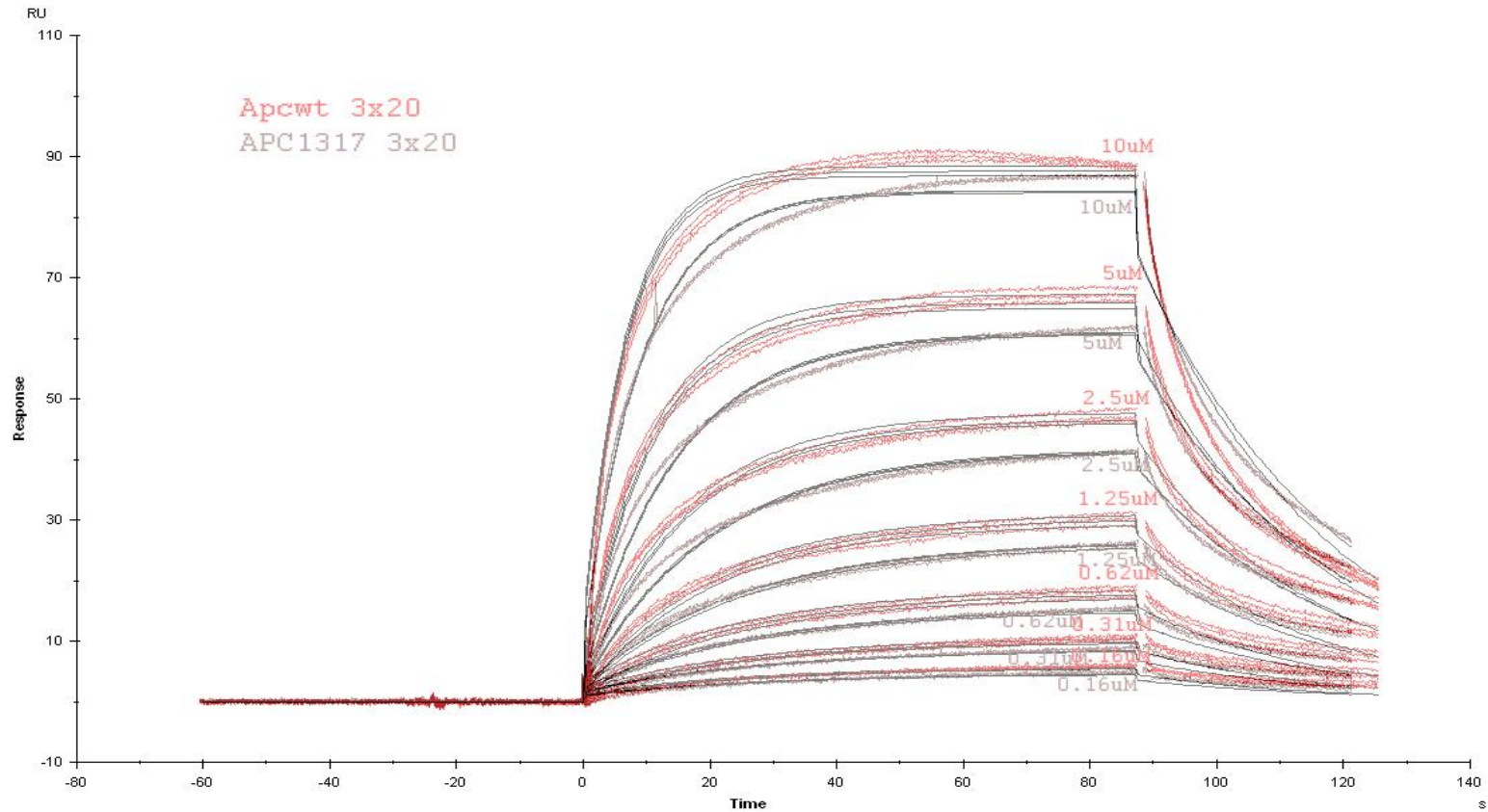


Figura 51: Sensograma que mostra la cinètica de l'associació i dissociació de E1317Q. Es mostren els resultats per diferents concentracions de β -catenina sobre la superfície de sensor on havíem immobilitzat els fragments APCwt-3x20 (vermell) o APCSE1317Q-3x20 (marró). La resposta expressada en unitats de ressonància, es va registrar com una funció del temps.

RESULTATS

Igual passa amb el sensograma de l'afinitat, on no sembla que la variant E1317Q disminueixi l'afinitat amb la β -catenina si la comparem amb el fragment APCwt (figura 52).

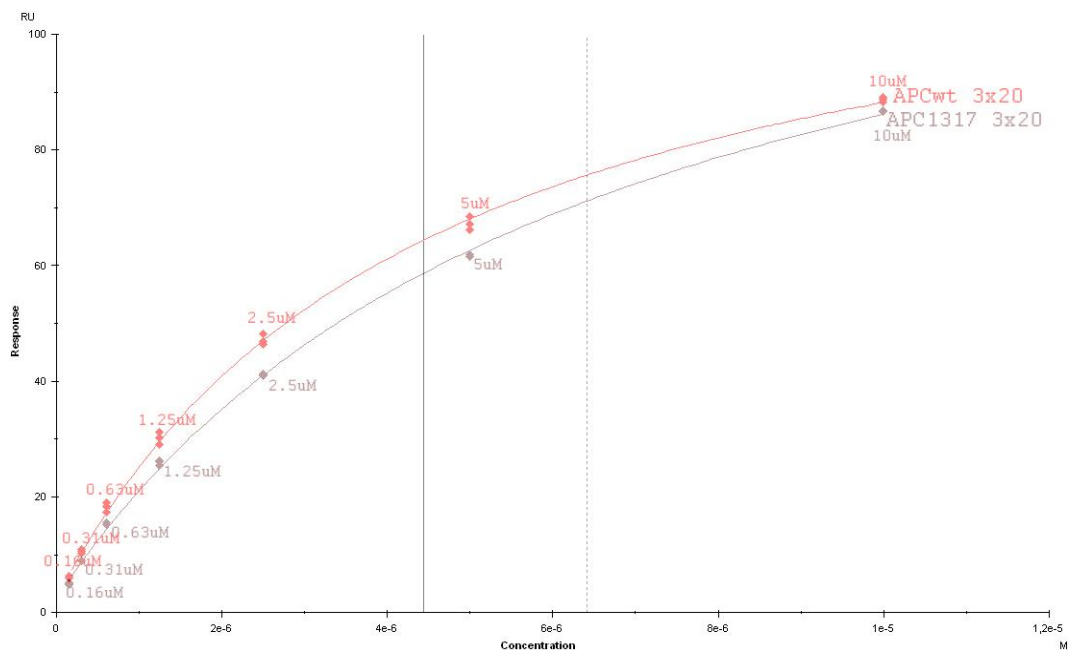



Figura 52: Sensograma que els perfils d'afinitat de diferents injeccions de concentració β -catenina sobre la superfície de sensor on havíem immobilitzat els fragments APCwt-3x20 o APC1317Q-3x20. La resposta en unitats de ressonància es va registrar com una funció del temps. Les línies verticals representen els valors de KD, la contínua pel fragment d'APCwt i la discontinua pel fragment mutat

De totes maneres quan veiem els valors d'interacció entre els diferents fragments de GST-APC-3x20 i la β -catenina (taula 24) veiem que no hi ha diferències clares entre I1307K i E1317Q mentre que les dues variants difereixen d'APCwt. Intrepretem aquests resultats com que les dues variants afecten l'afinitat per la β -catenina de manera moderada.

RESULTATS

Taula 24: Valors de les KD de la cinètica com de l'afinitat dels fragments de GST-APC 3x20 amb β -catenina

	Cinètica			Afinitat		
	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)	KD (M)	Rmax (RU)	Chi ² (RU ²)
APCwt 3x20	3.11E-06	97.3	2.28	4.44E-06	123.8	0.817
APC1307 3x20	3.96E-06	99.5	1.56	6.83E-06	141.4	1.49
APC1317 3x20	4.19E-06	104.3	1.56	6.41E-06	137.1	0.651

7. Experiments *in vivo*

Per analitzar si la transfecció amb les variants del gen *APC* modificava la seva capacitat tumorogènica, vam decidir injectar-les de forma subcutània en ratolins *nu/nu*. Aquest experiment el vam decidir realitzar basant-nos en resultats previs que mostraven que la línia cel·lular SW480 transfectada de forma estable amb el gen *APCwt* disminuïa la seva capacitat tumorogènica quan s'injectava de forma subcutània en ratolins (Faux et al., 2004). Vam injectar les línies cel·lulars SW480 i DLD-1 transfectades amb el gen *APCwt*, *APCN1026S* i *APCI1307K*, i com a control les línies cel·lulars sense transfectar amb el gen *APC*.

7.1. DLD-1

Un cop injectades les cèl·lules vam deixar créixer els tumors durant 5 setmanes. La figura 53 es pot observar que no hi ha diferències entre les diferents cèl·lules estudiades. Per interpretar aquests resultats negatius vam fer extracció de DNA de tumor i vam comprovar si detectàvem el transgen. Al seqüenciar el DNA dels tumors ortotòpics no vam detectar les mutacions del gen exogen. Això ens fa pensar que el transgen es perd durant el creixement dels tumors, i per tant fan que aquests resultats no siguin informatius.

RESULTATS

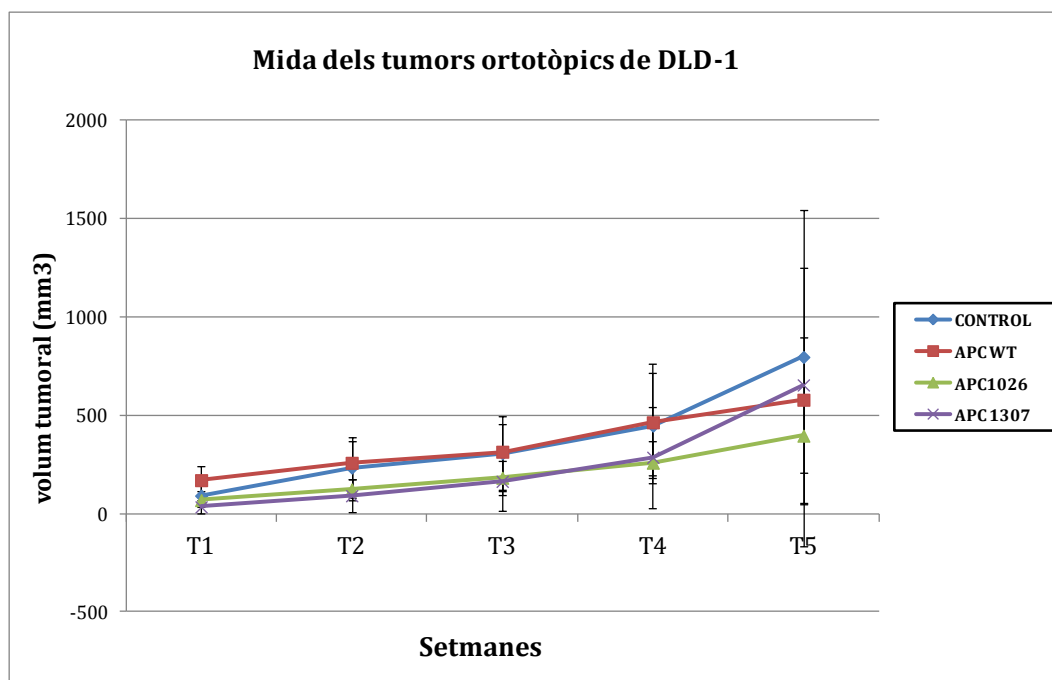


Figura 53: Representació gràfica del creixement tumoral de les cèl·lules DLD-1 injectades en els ratolins.

7.2. SW480

Pel que fa a les línies estables amb les cèl·lules SW480 també les vam deixar créixer durant 5 setmanes. Per aquesta línia cel·lular vam incloure els transfectants estables amb el gen *APCS* 1028R que no s'havien injectat per DLD-1. A la figura 54 es pot observar que la línia cel·lular transfectada amb la variant *APCwt* semblava créixer més ràpidament que les cèl·lules SW480 parentals (sense transfectar amb el gen *APC*) sense arribar a la significació estadística. Pel que fa a les cèl·lules transfectades amb la resta de variants no es van observar diferències significatives malgrat la tendència a incrementar la tumorigenicitat d'*APC* N1026S. Interpretem que la variabilitat intrínseca de l'experiment impedeix veure diferències en el cas que hi fossin. En contrast amb DLD-1.

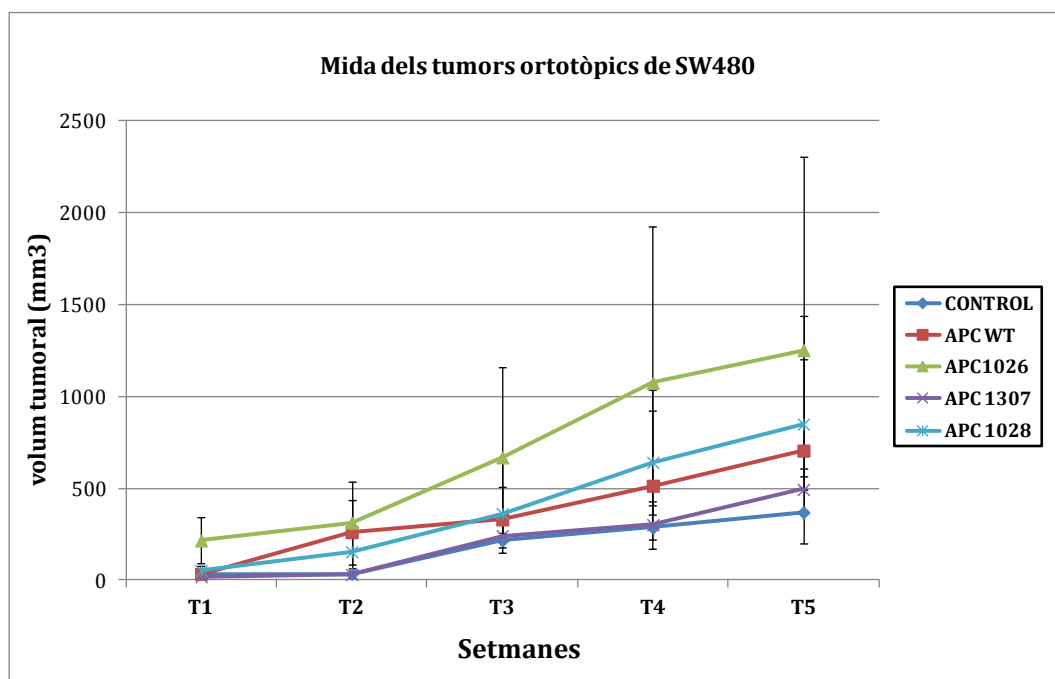


Figura 54: Representació gràfica del creixement tumoral de les cèl·lules SW480 injectades en els ratolins.

l'experiment aquí era informatiu ja que detectàvem les mutacions del transgen al DNA dels tumors ortotòpics en el moment del sacrifici. La figura 55 mostra les seqüències de la línia estable SW480 - APCwt, on veiem que tenim en heterozigosis el pic de la mutació del gen APC endogen c.4348C>T i el gen APCwt exogen. Per altra banda la seqüència del DNA del tumor ortotòpic també es veu que està en heterozigosis, per tant les cèl·lules mantienien el transgen durant el creixement tumoral.

RESULTATS

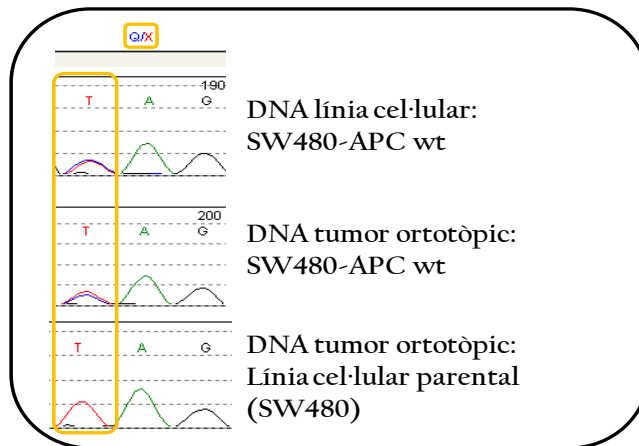


Figura 55: Seqüències del DNA de la línia cel·lular SW480-APCwt, del tumor ortotòpic a partir d'aquesta línia cel·lular i el DNA del tumor ortotòpic derivat de cèl·lules SW480 sense transfectar amb APC (parentals).

A les cèl·lules estables SW480-APC N1026S detectem més clarament el transgen que el DNA del gen endogen, ja que la mutació de la línia parental c.4348C>T, que provoca un canvi a la proteïna p.Q1338 Δ , pràcticament no es detecta ni a la línia cel·lular ni al tumor ortotòpic. Això permet detectar l'al·lel N1026S del gen exogen més clarament. (figura 56)

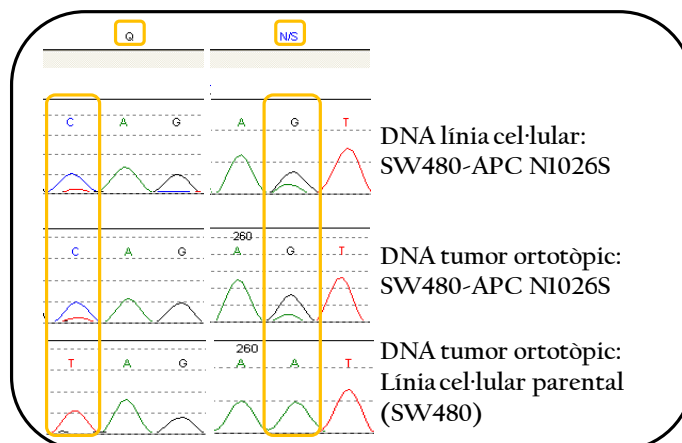


Figura 56: Seqüències del DNA de la línia cel·lular SW480-APC N1026S del tumor ortotòpic a partir d'aquesta línia cel·lular i el DNA del tumor ortotòpic derivat de cèl·lules SW480 sense transfectar amb APC (parentals).

RESULTATS

Pel que fa a SW480-APC S1028R el transgen es detecta de manera semblant a la línia cel·lular i al tumor ortotòpic (figura 57).

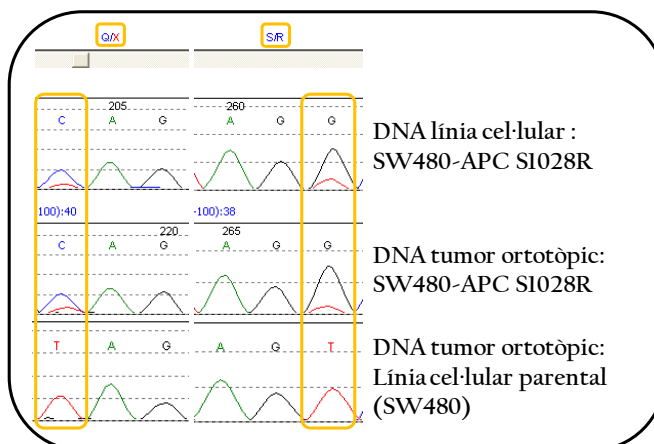


Figura 57: Seqüències del DNA de la línia cel·lular SW480-APC S1028R, del tumor ortotòpic a partir d'aquesta línia cel·lular i el DNA del tumor ortotòpic derivat de cèl·lules SW480 sense transfectar amb APC (parentals).

Pel que fa a SW480-APC I1307K el transgen en la línia cel·lular està en heterozigosis amb el DNA del gen endogen i el tumor també està en heterozigosi. De totes maneres en aquest cas hi havia àrees del tumor que perdien el transgen (dades no mostrades). (figura 58)

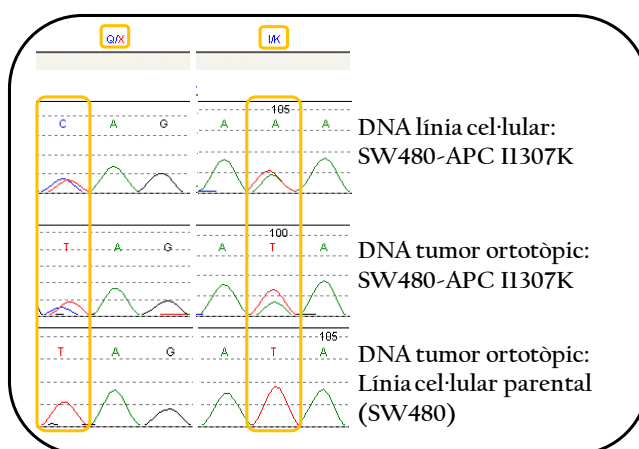


Figura 58: Seqüències del DNA de la línia cel·lular SW480-APC I1307K, del tumor ortotòpic a partir d'aquesta línia cel·lular i el DNA del tumor ortotòpic derivat de cèl·lules SW480 sense transfectar amb APC (parentals).

8. Resum dels experiments de caracterització funcional de les variants *missense* del gen *APC*.

Les taules següents (25 i 26) resumeixen tots els resultats obtinguts amb en els experiments realitzats per la caracterització funcional de les variants *missense* estudiades.

Taula 25: Resum dels experiments realitzats amb les línies cel·lulars.

Cèl·lules	Transfeccions	Experiments	Resultats
DLD-1	Transitòries	Assaig Luciferasa	No s'han observat diferències entre les variants.
		Expressió de gens de la via WNT	Sembla que els nivells <i>c-myc</i> són més elevats a les cèl·lules transfectades amb les variants <i>missense</i> però no observem diferències significatives.
	Estables	Transcripció	Totes les variants tenen la transcripció significativament més elevada que la variant salvatge.
		WB	No observem diferències en el nivell de β -catenina entre les cèl·lules transfectades amb les variants i les transfectades amb la variant salvatge.
		Ratolins	Els resultats no han estat informatius.
SW480	Transitòries	Assaig Luciferasa	Totes les variants semblen tenir una transcripció més elevada que la variant salvatge, però tan sols les variants S1028R i E1317Q mostren diferències significatives.
		Expressió de gens de la via WNT	Sembla que els nivells <i>c-myc</i> són més elevats a les cèl·lules transfectades amb les variants <i>missense</i> , a més per la variant I1307K aquestes diferències són significatives
	Estables	Transcripció	Totes les variants tenen la transcripció significativament més elevada que la variant salvatge, menys la variant E1317Q.
		WB	Els nivells de β -catenina citoplasmàtica a les cèl·lules transfectades amb la variant salvatge són 2-3 cops més baixos que les cèl·lules parentals i les transfectades amb les variants S1028R i I1307K
		Ratolins	El creixement tumoral no va ser informatiu, però les mutacions es mantenen durant el creixement tumoral.

RESULTATS

Taula 26: Resum dels experiments realitzats amb el BIAcore T100.

Fragments proteics	Mutació	Resultats
APC 4x15 AA	N1026S	El fragment amb la mutació té menys afinitat per β -catenina
	L1129S	El fragment amb la mutació té la mateixa afinitat per β -catenina que el fragment salvatge
	S1028R	El fragment amb la mutació té menys afinitat per β -catenina
APC 3x20 AA	I1307K	El fragment amb la mutació té menys afinitat per β -catenina
	E1317K	Les gràfiques semblen mostrar que la variant no afecta la interacció amb β -catenina. Però la KD del fragment amb la variant és semblant al de la variant I1307K.

9. Avaluació de l'impacte funcional de l'al·lel I1307K en la progressió tumoral.

Es va voler avaluar l'impacte funcional de la variant I1307K en la progressió tumoral de càncer de còlon en tumors desenvolupats en pacients que se'ls havia identificat la mutació. Es volia fer una comparació de mostres de teixit normal i tumoral del mateix pacient i comprovar si tumors dels pacients que compartien el mateix al·lel compartien el mateix espectre mutacional del gen APC així com el dels altres gens.

Per realitzar l'estudi es van escollir 8 casos portadors de l'al·lel APC I1307K, dels quals disposàvem de DNA genòmic de limfòcits i teixit colònic parafinat normal i tumoral. De les mostres de teixit vam extreure DNA i RNA, a la taula 27 es mostra les quantitats de material que es va obtenir un cop realitzada l'extracció.

RESULTATS

Taula 27: Quantitats totals de DNA i RNA extrets de les mostres dels 8 portadors de la variant APC I1307K.

Mostres	Normal		Tumor	
	DNA Limfòcits	RNA Bloc de parafina	DNA Bloc de parafina	RNA Bloc de parafina
10749	40ng	582.5ng	130ng	120ng
12621	88ng	363.2ng	113ng	2745ng
12632	47ng	933.3ng	143ng	1834ng
12952	14ng	198.1ng	253ng	1006.5ng
13090	26ng	461ng	72ng	1021.6ng
13500	12ng	485ng	132ng	1716.5ng
14166	458ng	626.8ng	169.7ng	2247ng
14222	478ng	651.8ng	124.6ng	2646ng

Tot seguit es va procedir a preparar les llibreries tant de DNA com de RNA per posteriorment realitzar la seqüenciació de les mostres per seqüenciació massiva amb la plataforma d'*Illumina HiSeq 2500*.

Malauradament els resultats obtinguts no van ser informatius, ja que hi havia molta contaminació de seqüències repetitives i el *coverage* de les regions de més interès, com ara el gen *APC* no era suficient com per arribar a cap conclusió.

Com malauradament l'anàlisi del espectre mutacional en pacients no va poder ser possible, vam analitzar mitjançant la seqüenciació per tècniques convencionals (Sanger) la regió MCR dels tumors induïts en ratolins amb els transfectants estables amb la variant *APC* I1307K, per comprovar si la variant induïa una hipermutació d'aquesta regió degut a la generació de 8 adenosines consecutives. Per fer aquest anàlisi vam seleccionar entre 4 i 6 àrees diferents de 4 tumors diferents derivats de cadascun dels transfectants. En cap d'aquestes mostres es van detectar mutacions addicionals en la seqüència polyA. Cal tenir en compte que en aquests models cel·lulars el gen *APC* endògen està inactivat i representen estadis avançats de la progressió tumoral on la presència d'instabilitat genètica és inequívoca. Interpretarem aquest resultat negatiu com una evidència indirecta però clara de que la seqüència

generada per la mutació I1307K no és extraordinàriament procliu a adquirir mutacions somàtiques addicionals.

Part II.

10. Estudi mutacional del gen *UNC5C*: gen candidat de predisposició a càncer colorectal

En els últims anys s'han descrit mutacions germinals en el gen *UNC5C* com a possibles causes de la agregació de càncer de còlon en una porció petites de famílies (Coissieux et al., 2011). Basat en aquests fets vam decidir estudiar l'estat mutacional d'aquest gen en la nostre sèrie (descrita en la taula 11 del apartat de materials i mètodes) de casos familiars en els quals encara no s'hi ha trobat la causa genètica de la seva agregació de CCR.

Al criatge inicial es van identificar un total de 13 variants en els 562 casos analitzats (474 càncer no polipós familiar o càncer colorectal a edats joves i 88 poliposis) que bé s'havien detectat prèviament a molt baixa freqüència a la població general (MAF<1%) o bé no havien estat reportades prèviament. En l'anàlisi mutacional del gen *UNC5C* mitjançant la seqüenciació per Sanger es van confirmar 7 d'aquestes variants: T311M, D353N, D412A, R603C, A668T, S737N i la D747G. Cal afegir que durant la seqüenciació directa de les mostres es va identificar una variant addicional, la A628K. En la figura 59 està representada la localització en la proteïna *UNC5C* de les mutacions identificades. Aquestes 8 variants confirmades eren mutacions *missense* de les quals es van realitzar l'estudi *in-silico* a nivell de *RNA* i de proteïna. També es va realitzar l'estudi de co-segregació de la mutació amb la malaltia en aquelles famílies de les quals disposàvem de DNA dels familiars afectes i no afectes de càncer. Per altra banda, d'aquells casos que es disposava de mostra tumoral es va realitzar l'estudi dels nivells de metilació de les illes CpG del promotor del gen.

RESULTATS

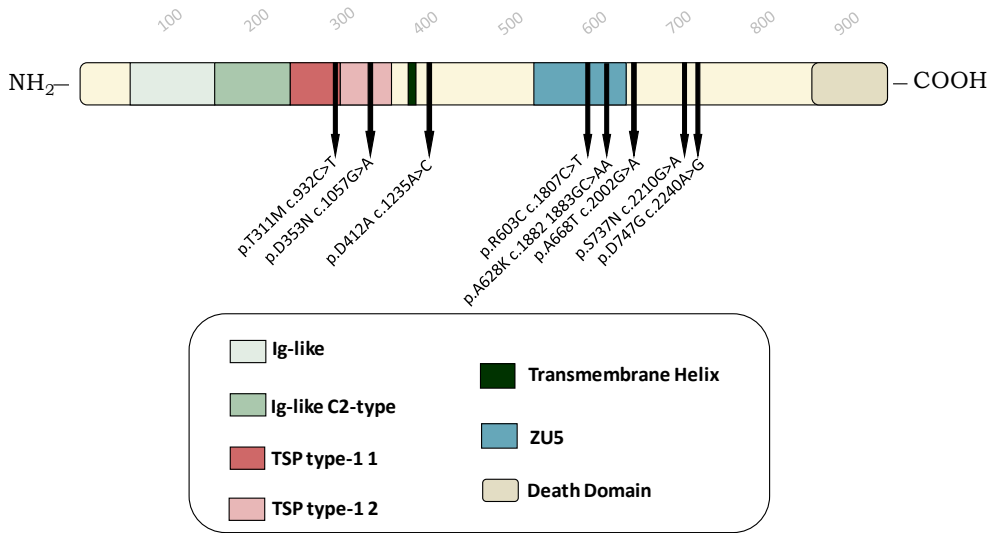


Figura 59: Representació de les mutacions trobades en la proteïna UNC5C.

En la taula 28 es fa un resum de les característiques de les 8 variants *missense* del gen *UNC5C* trobades en la nostra sèrie: cinc d'elles són variants rares; dues són variants noves (p.D412A i la p.S737N) que no han estat reportades, ni en el 1000G (*1000 Genome Project*) (<http://www.1000genomes.org/>) ni en el ESP (*Exome Sequencing Project*) (<https://esp.gs.washington.edu/drupal/>). La vuitena mutació (p.A628K) no es troba en les bases de dades dels 1000G ni ESP, però ja havia estat reportada en un treball anterior pel grup de Coissieux et al. (Coissieux et al., 2011). A continuació es detalla per cadascuna de les mutacions trobades les característiques clíniques i les prediccions *in silico*.

Taula 28: Efecte de les mutacions trobades en el gen *UNC5C*.

Mutació	Freqüència al·lèlica MAF (1000G / ESP)	Predicció de la funció de la proteïna (puntuació)			Predicció de la estabilitat de la proteïna (ddG, Kcal/mol)				Predicció lloc d' <i>splicing</i> (HSF v3.0)	Estat somàtic
		PPH2	SIFT	Condel	CUPSAT	ERIS	I-Mutant3	PoPMuSIC		Metilació
c.932C>T (p.T311M)	rs200437262 (0.046%)	PrD (0.983) / PsD (0.765)	N (0.001)	D (0.531)	Desestabilitza (-0.69)	Estabilitza (-5.56)	Desestabilitza (-0.28)	Desestabilitza (0.48)	Crea zona donadora i altera ESE	n.d.
c.1057G>A (p.D353N)	rs145155041 (0.15%)	PsD (0.613) / N (0.166)	N (0.236)	N (0.492)	0.00	Desestabilitza (0.07)	Estabilitza (+0.01)	Estabilitza (-0.18)	Altera ESE	Sí (III.1)
c.1235A>C (p.D412A)	-	PrD (0.999 / 0.994)	D (0.001)	D (0.611)	n.d.	n.d.	Desestabilitza (-3.14)	n.d.	Disrupts ESE	Sí (II.3)
c.1807C>T (p.R603C)	rs139568380 (0.15%)	PrD (1 / 0.975)	N (0.114)	N (0.467)	Desestabilitza (-9.32)	Desestabilitza (1.38)	Desestabilitza (-0.89)	Desestabilitza (1.04)	No afecta	Sí (III.1)
c.1882_1883GC>AA (p.A628)	-	N (0.042 / 0.042)	N (0.87)	n.d.	Estabilitza (4.63)	Desestabilitza (5.71)	Desestabilitza (-1.46)	Desestabilitza (0.09)	n.d.	n.d.
c.2002G>A (p.A668T)	rs187196396 (0.02%)	PsD (0.813) / N (0.083)	D (0.003)	D (0.536)	Desestabilitza (-3.41)	Desestabilitza (3.48)	Desestabilitza (-0.58)	Desestabilitza (0.40)	No afecta	n.d.
c.2210G>A (p.S737N)	-	PrD (0.981) / PsD (0.843)	N (0.699)	N (0.461)	Desestabilitza (-0.77)	Desestabilitza (>10)	Desestabilitza (-0.24)	Desestabilitza (0.36)	No afecta	Sí (II.3 i III.1)
c.2240A>G (p.D747G)	rs146792764 (0.0077%)	PrD (0.983 / 0.982)	D (0.001)	D (0.582)	Desestabilitza (-0.44)	Estabilitza (-26.61)	Desestabilitza (-1.14)	Desestabilitza (0.28)	Creates donor site and disrupts ESE	Sí (II.2)

*N: Neutre; PrD: probablement patògena; D: Deletèria; n.d: no disponible; MAF: minor allele frequency

RESULTATS

• **UNC5C p.T311M**

Aquest canvi va ser identificat en una família diagnosticada de poliposi. El cas índex era un pacient amb diagnòstic de CCR i 40-50 pòlips al còlon als 53 anys. Per altra banda aquest pacient presentava una variant patogènica (p.G382D) i una VSD (p.R83Q) en el mateix al·lel de gen *MUTYH*. El seu pare va ser diagnosticat amb un CCR als 79 anys i d'un càncer de pell als 83 anys (figura 60). L'estudi de co-segregació va revelar que el pare no era portador de la variant p.T311M. No es va poder fer l'estudi a la mare, que va patir un càncer de mama als 67 anys, perquè no hi havia mostra disponible. Tampoc es va poder fer l'anàlisi a una tieta que va patir una leucèmia als 75 anys. Se li va realitzar l'estudi a la filla del cas índex de 29 anys, la qual no és portadora de la mutació, ni tampoc ha desenvolupat cap tumor. Pel que fa el fill de 23 anys no s'ha pogut fer l'estudi genètic.

Tal i com està resumit a la taula 28, per aquesta mutació, 2 dels 3 programes de predicció *in silico* de funció de la proteïna, la classifiquen com que la pot alterar, i a més 3 de 5 programes *in silico* de predicció de l'estabilitat de la proteïna la classifiquen com a desestabilitzadora. A més a més, sembla que altera i pot crear una zona activadora de *splicing* (*ESE: Exonic Splicing Enhancer*). Tot i així, es va realitzar l'estudi d'*splicing* en limfòcits del pacient, i no es va veure una alteració en el processament del RNA. No es va disposar de mostra tumoral d'aquest pacient, per la qual cosa, no es va poder fer l'estudi de l'estat de metilació del tumor.

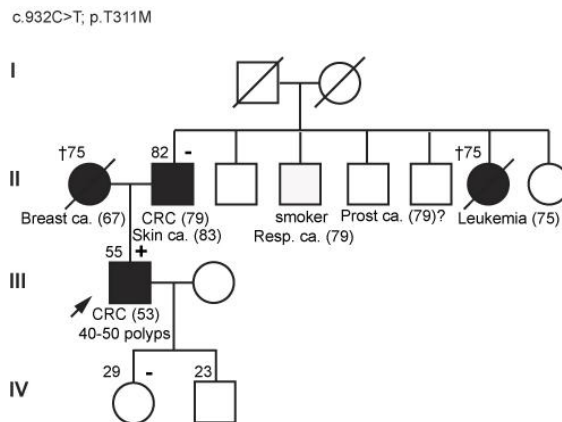


Figura 60: Arbre de la família amb la mutació p.T311M

RESULTATS

- **UNC5C p.D353N**

Aquesta variant es va detectar en una família que complia criteris de Bethesda i que el tumor analitzat va ser MSS. La proband va ser diagnosticada d'un CCR als 44 anys amb pòlips. En l'estudi de co-segregació no es va detectar la mutació en els tres familiars afectes, el pare diagnosticat de CCR als 71 també amb pòlips, i dos tiets, un diagnosticat també de CCR als 68 anys i també presentava pòlips, i un altra tiet diagnosticat de càncer de pell als 56, de pròstata als 69 i CCR als 70 (Figura 61). A més a més aquesta mutació havia estat reportada per Coissieux et al., (Coissieux et al., 2011) i va ser classificada com no patogènica.

En aquest cas tan sols el programa Polyphen-2 la classifica com que pot alterar la funció de la proteïna, els altres dos programes la classifiquen com a neutra. Per altra banda, només un programa de predicció de l'estabilitat de la proteïna la considera com desestabilitzadora. Tot i així, el programa de predicció del *splicing* considera que altera un lloc ESE. En aquest cas el tumor del pacient presentava metilació del promotor del gen *UNC5C*.

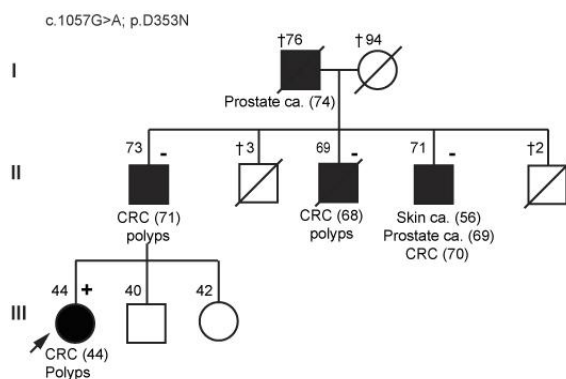


Figura 61: Arbre de la família amb la mutació p.D353N

- **UNC5C p.D412A**

El canvi p.D412A va ser detectat en un malalt que complia criteris de Bethesda i on el tumor analitzat va ser MSS. El cas índex era un pacient diagnosticat de CCR als 59 anys. Aquest pacient té un germà que va ser diagnosticat amb CCR als 52 anys i

RESULTATS

una filla també diagnosticada de CCR amb 39 anys (figura 62). L'anàlisi de co-segregació realitzat a la filla va revelar que ella no era portadora de la mutació però en el germà no es va poder realitzar l'estudi genètic. Per tant aquesta mutació no co-segrega amb la malaltia.

Tots els programes *in silico* prediuen que aquesta variant altera la funció de la proteïna, tot hi que no es troba en cap domini funcional. Pel que fa a la predicció de l'estabilitat de la proteïna tan sols un dels programes va poder valorar l'efecte de la variant i la classifica com a desestabilitzadora. I a més la predicció *d'splicing* prediu que destrueix un lloc ESE. En aquest pacient també es va detectar metilació en el promotor del gen *UNC5C*.

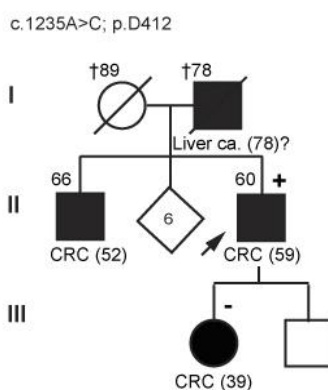


Figura 62: Arbre de la família amb la mutació p.D412A

- ***UNC5C* p.R603C**

Aquesta variant va ser detectada en una família diagnosticada de poliposi. El pacient, un home diagnosticat de CCR als 33 anys tenia al voltant de 33-49 pòlips petits i 2 pòlips adenomatosos túbul-vellosos amb displàsia moderada. Una tieta materna va patir un càncer cerebral als 68 anys i un tiet matern va tenir un càncer de tiroides als 40 anys (figura 63). En aquesta família no s'ha pogut fer l'estudi de co-segregació ja que no disposàvem de mostra dels familiars afectes de càncer.

Aquesta variant també va ser reportada anteriorment per Coissieux et al. (Coissieux et al., 2011) i la van classificar com no patogènica. El programa PolyPhen-2 la classifica com que pot alterar la funció de la proteïna, tot hi que es troba dins del

domini funcional pro-apoptòtic ZU5. El programa de predicció d'*splicing* la classifica com que no té cap efecte, però en canvi tots els programes de predicció de l'estructura de la proteïna la classifiquen com a desestabilitzadora. En aquest cas el tumor del pacient també presentava metilació del promotor del gen *UNC5C*.

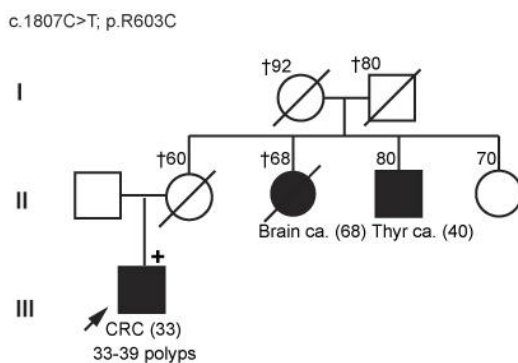


Figura 63: Arbre de la família amb la mutació p.R603C

- ***UNC5C* p.A628K**

Aquesta variant va ser detectada en una família diagnosticada de poliposi. El cas índex era un pacient que al moment del diagnòstic li van trobar 15 pòlips als 42 anys, però sense CCR. La seva mare va patir una neoplàsia de vesícula biliar als 63 anys (figura 64). L'estudi de co-segregació no es va poder realitzar, ja que no disposàvem de mostra dels familiars afectes, ni tampoc dels fills del pacient, dels quals tampoc es disposa d'informació addicional.

Tan sols dos dels programes de predicció *in silico* han pogut realitzar la predicció i la classifiquen com a neutra. Per altra banda, 3 dels 4 programes de predicció d'estabilitat de la proteïna la classifiquen com desestabilitzadora. Aquesta mutació va ser reportada com a patogènica pel grup de Coissieux (Coissieux et al., 2011). Ja que van comprovar que en tres famílies la mutació co-segregava amb la malaltia i que en estudis funcionals alterava la funció pro-apoptòtica del receptor, ja que està localitzada dins del domini funcional ZU5.

RESULTATS

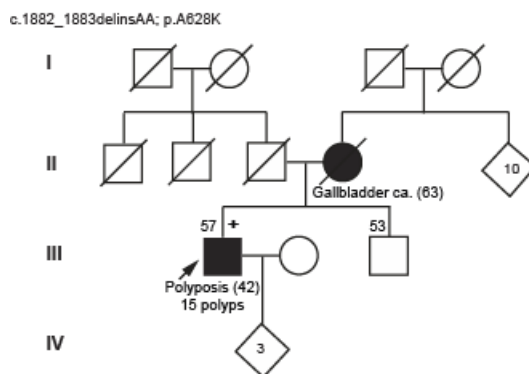


Figura 64: Arbre de la família amb la mutació p.A628K

• *UNC5C* p.A668T

La variant p.A668T va ser identificada en un cas dins d'una família diagnosticada de poliposis. El cas índex era un pacient amb 50 pòlips diagnosticats als 50 anys, però sense CCR. A més, la família hi ha un cas de CCR, un tiet per via paterna a la edat de 78 anys (figura 65), però del qual no disposàvem de mostra per poder realitzar l'estudi de co-segregació.

Aquesta variant es prediu com que no altera l'*splicing* de la proteïna. Per altra banda, tots els programes de predicció de funció la classifiquen com que altera la funció, i a més els 4 programes utilitzats per predir l'estabilitat de la proteïna la classifiquen com a desestabilitzadora. En aquest cas no es va poder valorar l'estat de la metilació del promotor del gen.

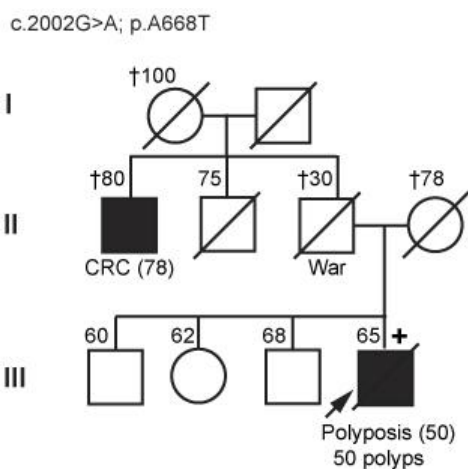


Figura 65: Arbre de la família amb la mutació p.A668T

RESULTATS

- **UNC5C p.S737N**

Aquesta variant va ser detectada en un malalt que complia criteris de Bethesda i on el tumor analitzat va ser MSS. El pacient va ser diagnosticat de CCR als 71 anys. La seva germana bessona també va ser diagnosticada de CCR als 69 anys, i a més també té dos germans diagnosticats de CCR als 60 i 69 anys. El cas índex té un fill que se li va detectar un adenoma vellós amb displàsia d'alt grau amb 41 anys (figura 66). L'estudi de co-segregació va revelar que el fill era portador de la mutació, però no disposàvem de mostra dels altres membres de la família afectes de càncer.

Aquesta variant tampoc es considera que alteri l'*splicing* de la proteïna, i tan sols el programa de predicció PolyPhen-2 la classifica com que pot alterar la seva funció. Tots els programes de predicció de l'estabilitat de la proteïna la classifiquen com desestabilitzadora. En els estudis de metilació va trobar metilació en el promotor del gen *UNC5C*.

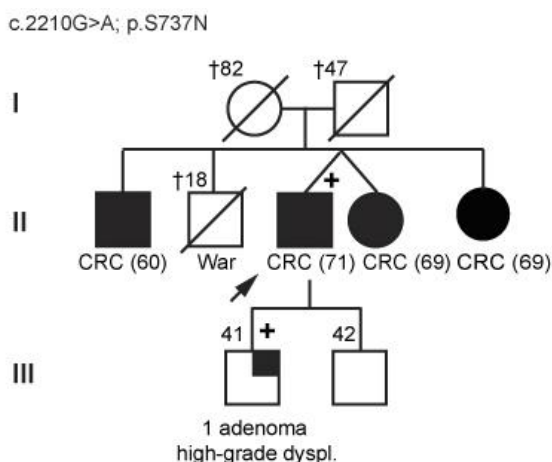


Figura 66: Arbore de la família amb la mutació p.S737N

- **UNC5C p.D747G**

Aquesta variant es va detectar en un malalt que complia criteris de Bethesda i on el tumor analitzat va ser MSS. El cas índex era un pacient amb 4 pòlips a l'edat de 39 anys. Un era un pòlip adenomatós i mixta amb hiperplàsia i un altre dels pòlips era un adenoma túbulo-vellós amb displàsia de baix grau. El seu pare va ser diagnosticat

RESULTATS

amb CCR als 62 anys i d'un càncer de pròstata als 69 anys (figura 67). Malauradament en aquesta família no es va poder realitzar l'estudi de co-segregació.

Tots els programes classifiquen aquesta mutació com que altera la funció de la proteïna i a més només un dels programes de predicció de l'estabilitat la classifica com no desestabilitzadora. A més a més el programa de predicció d'*splicing* la classifica com que altera un lloc ESE. Per altra banda el tumor del pacient també presentava metilació en el promotor del gen.

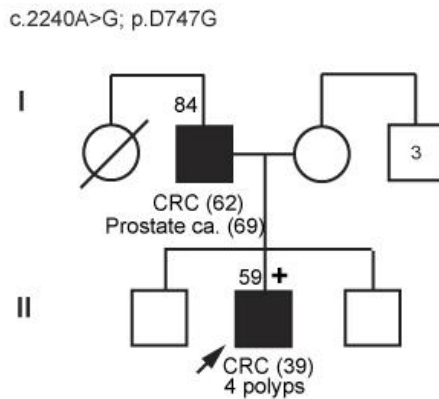


Figura 67: Arbre de la família amb la mutació p.D747G

En total hem identificat 8 variants *missense* de les quals sis havien estat prèviament reportades. De les cinc ja reportades a bases de dades públiques la freqüència ha estat sempre molt baixa, així que no es pot descartar que siguin polimorfismes poc freqüents. Tres d'aquestes mutacions p.D353N, la p.R603C i p.A628K, havien estat identificades per Coissieux en famílies amb càncer colorectal familiar (Coissieux et al., 2011). Cal remarcar que la mutació A628K la van classificar com a patogènica ja que co-segregava amb la malaltia i van comprovar que afecta la funció pro-apoptòtica de la proteïna. Malauradament, nosaltres no hem pogut comprovar si en la nostra família la mutació co-segrega amb la malaltia ja que no disposàvem de mostra per fer l'estudi.

En els estudis de co-segregació tan sols la mutació p.S737N sembla que co-segrega amb la malaltia. Com que els programes *in silico* no prediuen que aquesta

mutació pugui alterar la funció de la proteïna no podem postular que aquesta variant sigui la causa de CCR en aquesta família.

Per les variants p.A668T i p.D747G no es va poder fer cap anàlisi de co-segregació ja que no disposàvem de mostra dels familiars afectes. Totes dues però ja havien estat reportades amb anterioritat i encara que els programes de predicció *in silico* prediuen que poden tenir un efecte tant en la funció de la proteïna com en la seva estabilitat, cap de les dues es troben en un domini funcional. En el cas de la mutació p.D747G el programa de predicció d'*splicing* la classifica com que altera un lloc acceptor d'*splicing*, però com no disposàvem de limfòcits no es va poder fer l'estudi d'*splicing* per poder-ho comprovar. Per altra banda, tots els tumors analitzats han presentat alts nivells de metilació del promotor del gen *UNC5C*, suggerint que els dos al·lels són silenciats durant la progressió tumoral, tal com van reportar en l'estudi de Coissieux et al, 2011. Per tant, dins de la nostra sèrie tan sols hem trobat una variant, la p.A628K, ja reportada, en el gen *UNC5C* que pugui explicar l'agregació familiar de CCR en les nostres famílies.

DISCUSSION



1. Caracterització funcional de l'al·lel I1307K del gen APC

El primer objectiu principal del nostre treball ha estat intentar esbrinar si el mecanisme patogènic que explicaria el risc augmentat de I1307K del gen *APC* està lligat a un increment de l'activació de la via de senyal Wnt o bé, a una hipermutabilitat en el gen *APC*. La variant *APC* I1307K ha estat identificada en el 6% dels controls jueus Ashkenazi (Laken et al., 1997) i al voltant del 28% de les famílies Ashkenazi amb història de CCR. Són molts els estudis epidemiològics que han aprofundit en el rol de l'al·lel I1307K en el risc de càncer colorectal (resumits a la taula 29). L'efecte de la variant oscil·la entre 1,4 a 2,17 i la major part d'aquests estudis epidemiològics coincideixen en que l'efecte de la variant I1307K és moderat, i que aquest risc està associat al desenvolupament de CCR i no pas al desenvolupament d'adenomes. També remarquen que és molt probable que aquest al·lel tingui un origen comú en totes les poblacions jueves, ja que s'ha comprovat que comparteixen un haplotip entre elles, i no tan sols es troba en la població jueva Ashkenazi.

Taula 29: Resum dels estudis epidemiològics sobre la variant d'APC I1307K i el risc de desenvolupar càncer colorectal i/o adenomes

Autors	Any	Títol	Tipus d'estudi	Conclusions
Steve J. Laken et al.	1997	Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC	Epidemiològic	La variant es va trobat en el 6% dels controls jueus Ashkenazi i al voltant del 28% de les famílies Ashkenazi amb historial de CCR.
Trevor Woodage et al.	1998	The APC I1307K allele and cancer risk in a community-based study of Ashkenazi Jews	Epidemiològic	Portadors I1307K tenen un risc lleugerament més elevat de desenvolupar càncer
Rozen P. et al.	1999	Prevalence of the I1307K APC gene variant in Israeli Jews of differing ethnic origin and risk for colorectal cancer	Epidemiològic	La variant I1307K pot representar un gen de susceptibilitat per CCR, o altres tipus de càncer en Jueus Ashkenazi. També explica, en part, la major incidència de càncer colorectal en els israelians europeus.
Prior TW. et al.	1999	The I1307K polymorphism of the APC gene in colorectal cancer	Epidemiològic	La mutació I1307K es troba només en poblacions Jueves Ashkenazi
Yaek Patael et al.	1999	Common origin of the I1307K APC polymorphism in Ashkenazi and non-Ashkenazi Jews	Epidemiològic	El polimorfisme I1307K en els individus jueus, no es limita als ashkenazi i probablement reflecteix una mutació fundadora
Jing Yin et al.	1999	Low prevalence of the APC I1307K sequence in Jewish and non-Jewish patients with inflammatory bowel disease	Epidemiològic	És poc probable que I1307K contribueixi significativament a l'augment del risc de càncer colorectal associat a IBD
Drucker L. et al.	2000	Adenomatous polyposis coli I1307K mutation in Jewish patients with different ethnicity: prevalence and phenotype	Epidemiològic	El fenotip i la taxa d'incidència diferencial del CCR entre els portadors d'APC I1307K de diversos grups ètnics suggereixen baixa penetrància

Autors	Any	Títol	Tipus d'estudi	Conclusions
Johnson KA. et al.	2000	Response to genetic counseling and testing for the APC I1307K mutation	Epidemiològic	L'associació entre la mutació APC I1307K el risc de càncer de còlon va ser recolzat per una correlació entre les dades d'antecedents personals o familiars de CCR o pòlips i la mutació.
Sapna Syngal et al.	2000	Phenotypic characteristics associated with the APC gene I1307K mutation in Ashkenazi Jewish patients with colorectal polyps.	Epidemiològic	La mutació s'associa amb un augment moderat risc de neoplàsia
Stern HS. et al.	2001	APC I1307K increases risk of transition from polyp to colorectal carcinoma in Ashkenazi Jew	Epidemiològic	I1307K està associat amb una predisposició significativa al carcinoma però no a l'adenoma
Evertsson S. et al.	2001	APC I1307K and E1317Q variants are rare or do not occur in Swedish colorectal cancer patients	Epidemiològic	No es troba la variant a la població Sueca
Silverberg MS. et al.	2001	Carrier rate of APC I1307K is not increased in inflammatory bowel disease patients of Ashkenazi Jewish origin	Epidemiològic	Aquesta mutació no explica l'augment de la susceptibilitat CRC associada a IBD
Bahar AY. et al.	2001	The frequency of founder mutations in the BRCA1, BRCA2, and APC genes in Australian Ashkenazi Jews: implications for the generality of U.S. population data	Epidemiològic	La mutació es troba en el mateix percentatge en la població Canadenca que en la Nord Americana.
Shtoyerman-Chen R. et al.	2001	The I1307K APC polymorphism: prevalence in non-Ashkenazi Jews and evidence for a founder effect.	Epidemiològic	La variant I1307K comparteixen un haplotip comú en totes les poblacions jueves independentment del seu origen ètnic.

Autors	Any	Títol	Tipus d'estudi	Conclusions
Rozen P, et al.	2002	Clinical and screening implications of the I1307K adenomatous polyposis coli gene variant in Israeli Ashkenazi Jews with familial colorectal neoplasia. Evidence for a founder effect.	Epidemiològic	I1307K es va trobar en el 6,2% dels participants d'Ashkenazi, en l'1,5% dels participants del grup control no-Ashkenazi (P = 0,02), i en el 10,7% dels Ashkenazies amb neoplàsia en la família.
Strul H., et al.	2003	The I1307K adenomatous polyposis coli gene variant does not contribute in the assessment of the risk for colorectal cancer in Ashkenazi Jews.	Epidemiològic	Els portadors de la variant no tenen un risc incrementat de CCR. OR de 1,4 (95% CI, 0.89–2.3).
Fidder HH. et al.	2005	Genetic analyses in consecutive israeli jewish colorectal cancer patients.	Epidemiològic	La mutació I1307K està associada a un risc moderat de CCR, però l'edat d'inici no sembla ser anterior i aquesta variant no està associada amb un fenotip de múltiples pòlips del còlon.
Rennert G, et al.	2006	Colorectal polyps in carriers of the APC I1307K polymorphism	Epidemiològic	Portadors de la variant van ser significativament més propensos que els no portadors de tenir pòlips.
Liang J. et al.	2013	APC polymorphisms and the risk of colorectal neoplasia: a HuGE review and meta-analysis	Epidemiològic	Jueus Ashkenazi portadors de la variant I1307K presenten un risc significativament major de neoplàsia colorectal, amb una OR de 2,17
Boursi B. et al.	2013	The APC p.I1307K polymorphism is a significant risk factor for CRC in average risk Ashkenazi Jews	Epidemiològic	La variant APC p.I1307K és un factor de risc important per a CCR en risc mitjà en els Jueus Ashkenazi, similar a tenir una història familiar de CCR.

Aquesta mutació provoca un canvi d'aminoàcid d'una isoleucina a una lisina, i està localitzada entre les dues primeres repeticions de 20 AA del domini funcional d'interacció i regulació de la β -catenina citoplasmàtica. Per aquest motiu, vam decidir estudiar l'efecte que té aquest canvi en la regulació dels nivells de β -catenina. Hem evidenciat que la variant *APC* I1307K mostra un nivell d'activació de la via Wnt augmentat, probablement mediat per una menor afinitat per β -catenina, pel que pot incrementar el risc de desenvolupar càncer colorectal.

Per analitzar l'impacte de la variant en la funció de la proteïna vam utilitzar varies estratègies (assajos de transcripció mitjançada per β -catenina/TCF-4, expressió de gens de la via Wnt, estudi de la interacció APC- β -catenina i estudis d'expressió de la proteïna), ja que havien estat utilitzades en un treball anterior per avaluar la patogenicitat d'una variant *missense*, la variant N1026S que havia estat identificada en una família amb poliposi atenuada (Menendez et al., 2008).

Els assajos de la transcripció mitjançada per β -catenina/TCF-4 amb la tècnica del gen reporter Luciferasa els vam realitzar tant amb transfectants transitoris com estables. En els experiments fets amb la línia cel·lular SW480 la proteïna APC amb la mutació I1307K no semblava tenir la mateixa capacitat de disminuir els nivells de transcripció que la variant salvatge. Malgrat que en tots els experiments es veia la mateixa tendència, els resultats no eren significatius, ja que les desviacions estàndards eren molt elevades. Malauradament, quan es van fer els experiments amb les cèl·lules DLD-1 no es va evidenciar cap diferència.

Això ens va portar a considerar que l'assaig no era prou sensible a les nostres mans per evidenciar de manera inequívoca un efecte activador moderat de la variant sobre l'activitat transcripcional del complex β -catenina/TCF-4. Així que, vam produir unes cèl·lules transfectades amb les variants del gen *APC* de forma estable, i on esperàvem obtenir uns resultats entre els experiments amb menys variabilitat. Els resultats obtinguts amb la variant *APC* I1307K transfectada de forma estable, amb ambdues línies cel·lulars, DLD-1 i SW480, van mostrar que la variant augmentava els nivells de transcripció mitjançada pel complex β -catenina/TCF-4 quan es compara amb la variant salvatge.

S'ha de tenir en compte, que el sistema TOP/FOP inicialment desenvolupat al laboratori de H. Clevers no és un sistema fàcil d'estandarditzar. Aquest sistema inclou la utilització de tres plasmidis, el de la mutació d'interès, el plasmidi TOP o FOP (que és el control de transcripció basal) i el de la renilla que permet analitzar la eficiència de la transfecció. Per tant els resultats s'expressen després de corregir pels nivells de transcripció basal de les línies cel·lulars amb els plasmidis TOP/FOP i la renilla. A més, tant en els transfectants estables com els transitoris es tenia en compte el percentatge de cèl·lules positives per APC evidenciades per fluorescència, ja que el plasmidi d'APC utilitzat produïa una proteïna de fusió d'APC amb fluorescència. És evident que tots aquests passos introdueixen molta variabilitat i que aquesta pot emmascarar efectes modestos com els que anticipàvem per la variant I1307K. El nostre desenvolupament metodològic ens ha permès evidenciar de manera clara aquest efecte moderat sobre la transcripció quan hem utilitzat transfectants estables en dues línies cel·lulars.

Si aquest impacte sobre la transcripció és cert, s'hauria de correlacionar amb un augment dels nivells de β -catenina tant citoplasmàtica com nuclear. Per determinar si realment aquest efecte es podria explicar per una major concentració de β -catenina en les cèl·lules SW480 transfectades de forma estable, vam realitzar Westerns Blots d'extractes de citoplasma i nuclears. En aquest assaig hem vist que realment les cèl·lules SW480 transfectades amb la variant APC I1307K presenten gairebé tres cops més de β -catenina en el seu citoplasma el que implica que la introducció del nou al·lel no canvia la expressió respecte a les cèl·lules parentals. En canvi a les cèl·lules transfectades amb la variant salvatge la quantitat de β -catenina citoplasmàtica baixava de manera important. Cal destacar la rellevància del model cel·lular escollit ja que aquest efecte no el vam veure a les cèl·lules DLD-1 i en cap cas vam poder evidenciar diferències en la concentració de β -catenina nuclear. Atribuïm aquests resultats negatius a la manca de sensibilitat analítica del nostre assaig, doncs ambdues cèl·lules (SW480 i DLD-1) tenen una mutació truncant d'APC amb pèrdua de l'al·lel salvatge, el que comporta una gran acumulació de β -catenina citoplasmàtica i nuclear. És lògic assumir que una transfecció transitòria no pugui evidenciar canvis

subtils que potser són més fàcils de detectar en transfeccions estables. En les nostres mans només vam ser capaços d'evidenciar canvis en la transfecció estable de SW480 i no en DLD-1, fet que atribuïm a diferències entre els dos models cel·lulars. Aquests resultats demostren la importància i necessitat d'utilitzar diferents sistemes cel·lulars per poder evidenciar canvis funcionals en mutacions *missense* i alhora entendre la magnitud d'aquests canvis. En les nostres mans SW480 ha funcionat mentre que DLD-1 no ha estat informatiu. Per tal de guanyar coherència experimental fora bo repetir els experiments amb una nova línia cel·lular on es reproduïssin els resultats de SW480. Cal insistir en la necessitat de millorar la reproductibilitat dels resultats en aquests assajos. La possibilitat d'utilitzar transfeccions estables amb vectors vírics pot ser una alternativa a considerar. Val a dir que Azzopardi et al., van observar també un molt modest increment en l'activitat transcripcional mitjançada per β -catenina per l'al·lel I1307K en un sistema experimental menys sofisticat i utilitzant una sola línia cel·lular (Azzopardi et al., 2008).

De forma paral·lela vam mirar els nivells d'expressió dels gens relacionats en la via Wnt. Primer vam comprovar que els nivells d'expressió del gen *APC* fossin comparables entre totes les cèl·lules transfectades, DLD-1 i SW480, ja que d'aquesta manera veiem si els resultats obtinguts en l'assaig de transcripció i d'expressió dels gens de la via Wnt es podien atribuir a l'efecte funcional de la variant i no als seus nivells d'expressió. Pel que fa als nivells d'expressió de *c-myc*, en l'anàlisi en la línia cel·lular SW480, la variant *APC* I1307K té uns nivells d'expressió significativament superior dels que tenen les cèl·lules transfectades amb la variant *APC**wt*. I en les cèl·lules DLD-1 també mostra una tendència a ser més elevat el nivell de *c-myc* per la variant *missense* que per la variant salvatge. Aquesta és una altra evidència que la variant pot tenir un efecte activador de la proliferació cel·lular. En canvi, els nivells d'expressió del gen *Axin2* eren inhibits per I1307K en les cèl·lules SW480 malgrat que la sobreexpressió de β -catenina hauria d'activar la seva expressió. No tenim una explicació plausible per aquests resultats d'*axina* més enllà de les possibles limitacions del model emprat.

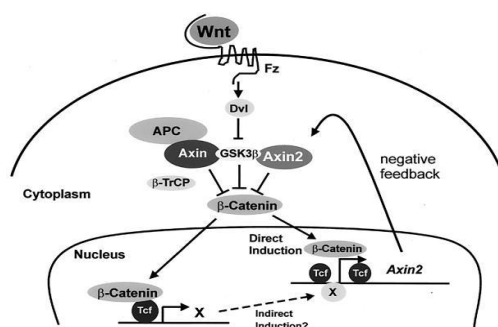


Figura 68: La via Wnt indueix la transcripció d'Axin2, que al mateix temps actua de regulador negatiu de la mateixa. (Extreta de (Jho et al., 2002))

Prova de la dificultat de disposar de models reproduïbles va ser la observació de que als transfectants estables amb *APC^{wt}* es produïa una sobreexpressió molt evident del gen *c-myc*. Aquest resultat en el control ens impedia treure conclusions de la resta de transfectants. Finalment, hem optat per prescindir d'aquestes observacions.

Un cop evidenciat que I1307K semblava tenir un efecte moderat sobre la transcripció mitjançada per β-catenina/Tcf-4 vam estudiar si aquest efecte s'associava a un descens de l'afinitat de proteïna APC mutada per la β-catenina. La mutació I1307K està localitzada en el bell mig del domini d'interacció i regulació d'APC amb β-catenina, que queda totalment alterat en les mutacions truncants del gen *APC*. No és una regió cristal·litzable, però sí que es podia anticipar que es podria sintetitzar *in vitro* i analitzar la interacció amb β-catenina ja que teníem experiència en la síntesi del domini d'interacció d'APC amb β-catenina format per 4 repeticions de 15 AA on està ubicada la mutació N1026S. Afortunadament, va resultar relativament senzill la síntesi del domini de les tres primeres repeticions de 20 AA i avaluar si canvis en aquesta zona del domini tenen una repercussió directa amb la capacitat d'interacció de la proteïna APC amb la β-catenina. Hem observat que I1307K interfereix de manera clara amb la interacció d'APC per β-catenina amb diferències tant en l'afinitat com en la cinètica de la interacció entre les dues molècules, el que reforça la solidesa de les nostres observacions. Val la pena destacar que totes aquestes alteracions no es reflecteixen en canvis predits pels programes *in silico* Polyphen, Condel o SIFT. Aquesta discrepància és una altra prova de la necessitat de

disposar de múltiples evidències abans de classificar una variant. L'impacte sobre l'afinitat i la cinètica d'associació-dissociació estan en concordança amb els assajos dels nivells de transcripció mitjançada pel complex β -catenina/TCF-4 en ambdues línies cel·lulars.

L'assaig BIAcore és un mètode potent i sensible per estudiar interaccions, però que no està exempt de limitacions experimentals. En les nostres mans ha estat clau immobilitzar els fragments d'APC per mitjà d'un anticòs anti-GST el que permetia exposar el domini d'interacció d'una manera clara sense modificar la proteïna sintetitzada. Un cop assolides les condicions experimentals idònies vam obtenir resultats coherents i significatius fent tres rèpliques per totes les concentracions de β -catenina utilitzades. En conjunt els assajos *in vitro* evidenciaven que hi havia un impacte modest però clar de l'al·lel I1307K sobre la funció reguladora de la proteïna APC sobre la via Wnt.

Vam voler complementar aquests estudis *in vitro* amb estudis *in vivo* per tal d'avaluar el possible impacte sobre la tumorigenicitat. En resultats publicats anteriorment, les cèl·lules SW480 transfectades de forma estable amb l'*APCwt*, quan eren injectades de forma subcutània en ratolins no produïen creixement tumoral. Per contra les cèl·lules parentals (SW480 sense transfectar amb el gen *APC*) sí que eren capaces de formar tumor quan eren injectades a ratolins (Faux et al., 2004). Així vam injectar en el subcutani de ratolins atímics els transfectants estables esperant obtenir resultats similars per la línia cel·lular transfectada amb *APCwt*. Per altra banda esperàvem que les cèl·lules transfectades amb el gen *APC* amb la mutació *missense* tingués un creixement intermedi entre les cèl·lules parentals i les transfectades amb el gen *APCwt*. En les nostres mans totes les cèl·lules transfectades, tant amb el gen *APCwt* com amb la variant, creixen més ràpidament que les cèl·lules parentals el que implica que no hem estat capaços de reproduir el model descrit per Faux et al., 2004.

Això podria ser degut a que el nostre model experimental no és exactament igual ja que no hem seleccionat clons. Nosaltres hem utilitzat un plasmidi diferent que produïa una proteïna de fusió amb fluorescència. Varem injectar cèl·lules positives per la proteïna fluorescent, que varen ser seleccionades per citometria de flux,

mitjançant la tècnica de *sorting* i per tant ja partíem d'una mostra cel·lular més heterogènia que en l'estudi previ. Això podria explicar, en part, la gran heterogeneïtat en el creixement tumoral dins dels mateixos grups, que pot emascarar possibles efectes sobre el creixement tumoral. En qualsevol cas, considerem que, a les nostres mans, el nostre sistema experimental no és capaç d'evidenciar diferències en el creixement *in vivo* de les variants.

Si bé l'assaig tumorogènic no el considerem interpretable es poden obtenir més dades d'aquest experiment. Per exemple, és intrigant la progressiva desaparició del transgen amb la variant *APC* I1307K al llarg del creixement tumoral en el ratolí, tant en les cèl·lules SW480 com en les DLD-1, malgrat que el transgen s'expressa de manera estable *in vitro*. Aquesta pèrdua de l'al·lel no es fa evident en les cèl·lules SW480 quan s'han analitzat altres mutacions (i.e. S1028R, veure a sota) o amb l'al·lel wt. Per contra en els transfectants estables de DLD-1, hem observat la pèrdua del transgen de totes les variants durant el creixement tumoral en ratolins. És possible que estiguem davant d'una altra limitació de les cèl·lules DLD-1 però no podem descartar que la pèrdua de l'al·lel de risc ofereixi un avantatge de creixement.

Una altra possible explicació sobre el mecanisme patogènic de l'al·lel I1307K era que la presumpta naturalesa hipermutable de la zona de 8(A) incrementava la inestabilitat genètica en el gen *APC*. Aquest canvi d'una timina (T) a una adenina (A) és susceptible a acumular mutacions somàtiques en l'àrea MCR del gen *APC* per error de la polimerasa a l'hora de replicar el DNA, incrementant d'aquesta manera el risc de càncer (els treballs publicats sobre el tema estan recollits a la taula 30). De fet s'ha associat la generació de la mutació (c.3924_3925insA) resultat d'una inserció d'una adenina addicional com característica d'aquests tumors (P. Zauber et al., 2014).

DISCUSSIÓ

Taula 30: Resum dels estudis moleculars sobre la variant d'APC I1307K i les mutacions relacionades amb la regió hipermutable.

Autors	Any	Títol	Tipus d'estudi	Conclusions
Robert Gryfe, et al.,	1998	Somatic instability of the APC I1307K allele in colorectal neoplasia	Molecular	L'al·lel APC I1307K contribueix un augment de la mutabilitat potencial d'APC a través de la inestabilitat en la regió de 8(A).
Robert Gryfe, et al.	1999	Inherited colorectal polyposis and cancer risk of the APC I1307K polymorphism.	Molecular	L'al·lel APC I1307K condueix a un augment de l'inactivació del gen APC i directament representa el 42% de les neoplàsies colorectals que desenvolupen els portadors.
Zauber NP. et al.,	2003	The characterization of somatic APC mutations in colonic adenomas and carcinomas in Ashkenazi Jews with the APC I1307K variant using linkage disequilibrium.	Molecular	La regió de 8(A) consecutives és realment inestable i fomenta el desenvolupament de noves mutacions somàtiques.
Zauber NP. et al.,	2005	Clinical and genetic findings in an Ashkenazi Jewish population with colorectal neoplasms	Molecular	La variant està clarament associada a una inserció d'adenina addicional somàtica a la regió dels codons 1306-1309.
Zauber P. et al.,	2014	Colorectal tumors from APC*11307K carriers principally harbor somatic APC mutations outside the A8 tract.	Molecular	La mutació c.3924_3925insA pot ser atribuïble a la mutació I1307K.

Per últim vam intentar analitzar la progressió tumoral en pacients portadors de la mutació APC I1307K, malauradament no vam obtenir cap resultat satisfactori, ja que a la hora d'analitzar les seqüències obtingudes per la seqüenciació massiva els nostres resultats estaven molt saturats de seqüències repetitives i els gens d'interès, com per exemple APC, estaven molt poc representats. Creiem que una de les causes més probables d'aquests resultats és que partíem de molt poca quantitat de teixit i que a més les mostres eren de teixit parafinat molt antic. Aquests dos factors molt possiblement van fer que el material genètic obtingut fos escàs i que estigués altament degradat. Malgrat que ja queda fora d'aquesta tesi estem recollint mostres de teixit de tumors que han desenvolupat els portadors de la variant. Els que s'han recollit fins la data tenen més material disponible, el que fa anticipar més possibilitats d'èxit de l'anàlisi. Confiem en que en futur proper puguem respondre a la pregunta de si els tumors segueixen un mateix patró mutacional degut a la regió hipermutable que es genera, de vuit adenines consecutives, en la regió MCR del gen APC.

Com a sistema experimental alternatiu hem utilitzat tumors induïts amb cèl·lules transfectades amb I1307K. Malgrat hem utilitzat tècniques de seqüenciació convencionals i hem estudiat diferents àrees del tumor per tal de tenir major sensibilitat analítica i un millor estimació de la heterogeneïtat, no hem estat capaços de demostrar un increment de la taxa de mutacions en MCR del gen *APC* ni tampoc hem evidenciat l'adquisició de la mutació específica c.3924_3925insA. Aquesta evidència experimental indirecta no sembla recolzar la importància de la inestabilitat genètica per explicar el risc augmentat lligat a la variant *APC* I1307K.

En resum, hem demostrat que la variant *APC* I1307K té un efecte en la funció de la proteïna APC i que pot estar incrementant el risc de desenvolupar càncer per una sobre activació de la via de senyalització Wnt, ja que la mutació té un impacte en la interacció entre la proteïna APC amb la β -catenina. Els nostres resultats tenen més valor si considerem que la mutació no està localitzada dins d'una repetició ni pertany a un domini funcional inequívoc. Simplement pertany a una zona gran, implicada en la unió a β -catenina pel que es podria no haver detectat cap afectació. L'efecte subtil observat encaixa amb el fet que modifica el risc a desenvolupar càncer sense ser una variant d'alta penetrància. Per tant, que un portador de la variant desenvolupi un CCR depèn d'altres factors com podria ser l'associació amb altres al·lells de risc, els factors ambientals, etc.

2. Caracterització funcional d'altres variants *missense* del gen *APC*

Una part dels assajos com els que hem utilitzat per avaluar l'impacte funcional de la variant I1307K es poden utilitzar per conèixer millor l'impacte d'altres mutacions *missense* com ja havia fet el nostre grup amb la mutació N1026S. Per aquesta raó també hem volgut analitzar el possible impacte funcional de l'al·lel *APC* E1317Q. És considerada una variant de baixa penetrància pel desenvolupament d'adenomes i carcinomes colorectals, però tot hi així segueix havent una gran controvèrsia ja que en molts estudis està considerada com a polimorfisme. Per altra banda hi ha molt poca literatura que descriu els detalls moleculars d'aquesta variant en teixit

tumoral (P. Zauber, Marotta, & Sabbath-Solitare, 2013). Aquesta variant està localitzada a la mateixa regió que la I1307K, per tant pot afectar a la interacció de la proteïna APC amb la β -catenina, i podria tenir un impacte en la via de transducció de senyals Wnt.

Per la variant *APC* E1317Q l'impacte funcional que hem obtingut no és tan evident com el de la variant *APC* I1307K. Quan vam analitzar els nivells de transcripció mitjançada pel complex β -catenina/TCF-4 en cèl·lules transfectades no vam tenir resultats concordants amb les dues cèl·lules utilitzades i curiosament aquestes discrepàncies es donaven tant amb els transfectants estables com els transitoris. Els resultats de l'estudi d'expressió de gens de la via Wnt tampoc va ser concloent. En la mateixa línia, els estudis d'afinitat indiquen una petita diferència en l'afinitat de la variant per β -catenina respecte a la variant salvatge, però aquest efecte sembla ser menor que l'observat per la variant I1307K. Per tant, la variant d'*APC* E1317Q mostra un menor impacte funcional en la proteïna que la variant I1307K en línia amb la consideració de polimorfisme que atorga la majoria de la literatura.

Finalment i dins el mateix bloc d'experiments vam avaluar l'impacte de la variant *APC* S1028R no descrit anteriorment, i que va ser identificat en una família afecta d'AFAP. Aquesta darrera mutació està localitzada a la mateixa regió que la variant *APC* N1026S identificada en una família afecta d'AFAP (Menendez et al., 2008). Hem evidenciat que la mutació incrementa la transcripció mitjançada per β -catenina així com la concentració de β -catenina citoplasmàtica. En l'assaig d'interacció, s'observa que la mutació S1028R afecta de manera clara l'afinitat per β -catenina i ho fa de manera més clara que la mutació N1026S prèviament caracteritzada (Menendez et al., 2008). Pel que fa a la cinètica de creixement dels estudis *in vivo* injectant els transfectants estables no va ser molt informativa. Les variants amb les mutacions *missense* *APC* N1026S i *APC* S1028R creixien més ràpidament que la variant *APC**wt* sense que les diferències siguin significatives. És important destacar que en aquest cas l'expressió del transgen es manté i incrementa mentre les cèl·lules creixen *in vivo*.

Si mirem de manera global els resultats obtinguts amb la variant S1028R podem concloure que és una variant *missense* amb un impacte funcional clar *in vitro* i *in vivo*.

Aquesta mutació provoca un canvi d'aminoàcid de serina a arginina en un residu altament conservat en el codó 1028 del domini d'unió d'APC amb β -catenina. Específicament, aquest canvi té lloc en la primera repetició de 15AA d'aquest domini, i per tant es troba dins d'un domini funcional de la proteïna en una seqüència altament conservada en l'evolució. Els programes de predicció *in silico* de la funció i estabilitat de la proteïna classifiquen la variant S1028R com a patològica. A més a, la predicció d'afinitat del canvi S1028R és compatible amb la menor afinitat per la β -catenina del pèptid d'APC amb la variant S1028R comparat amb el pèptid N1026S.

En el treball realitzat anteriorment en el nostre grup (Menendez et al., 2008), i utilitzant altres programes de predicció d'estructures vam evidenciar que la cadena lateral de l'Asn1026 de la proteïna APC forma un pont d'hidrogen amb la Ser1028, per tant seria probable que el canvi de serina a arginina tingui un efecte a la funcionalitat del domini, semblant al impacte que es va observar en l'estudi anterior. L'estudi *in silico* de l'estructura de la primera repetició de 15AA del domini d'interacció amb β -catenina, ja va predir que la mutació afectava els contactes terciaris entre els residus Asn1026 i Ser1028 d'APC tal i com es mostra a la figura 69.

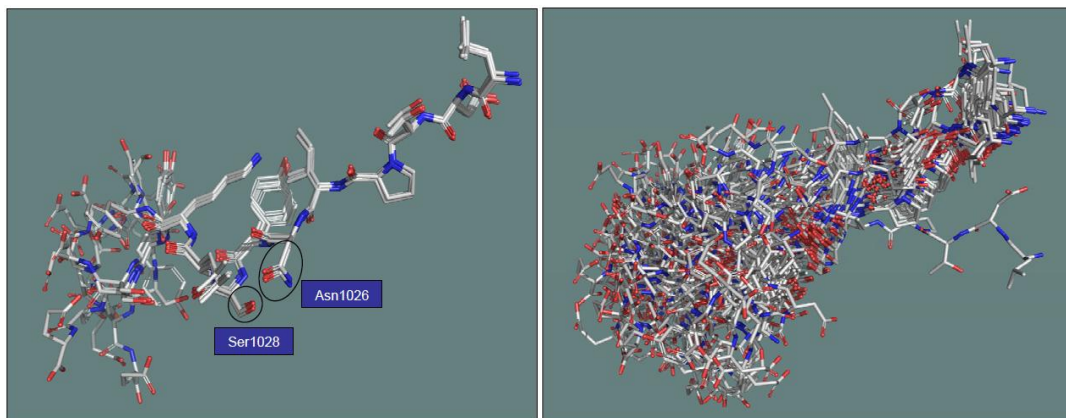


Figura 69: Solapament d'alt grau dels 7 multi-agrupaments que van obtenir amb el programa docking amb el pèptid APCwt. La proximitat de la Asn1026 i la Ser1028 explica perquè les cadenes laterals d'aquests dos residus formen un pont d'hidrogen, en canvi al canviar Asn1026 per Ser 1026 no es forma cap estructura consens ja que es trenca el pont d'hidrogen. (Menendez et al., 2008))

Els resultats obtinguts sobre l'estabilitat i afinitat de la mutació S1028R confirmen el que ja havíem anticipat i podem concloure que la proteïna té un efecte clar en el domini d'unió d'APC amb β -catenina. Respecte a la seva patogenicitat s'ha de ser cautelós ja que l'arbre familiar no ens confirma si aquesta mutació co-segrega amb la malaltia ja que els individus de la quarta generació portadors de la mutació són molt joves.

En els últims anys l'ús de la seqüenciació massiva de nova generació per analitzar panells de gens o exomes o fins i tot genomes ja s'aplica en diagnòstic genètic per poder identificar la possible causa de l'agregació familiar de càncer. Això ha fet incrementar de forma exponencial el nombre de VSD (variant de significat desconegut) identificades, que molt sovint són canvis *missense*, *silents* o mutacions que es troben en regions no codificants de les que es desconeixen les seves repercussions en la funcionalitat de la proteïna. Tant a Menendez et al. 2008 com en aquest treball hem demostrat que és possible fer una caracterització funcional de les variants *missense* que es troben en la regió d'unió i regulació de la β -catenina en la proteïna APC. Però aquests assajos són complexes i la seva interpretació no és automàtica ja que la proteïna APC és una molècula molt gran que té molts dominis i múltiples funcions dins la cèl·lula.

En el treball de Thompson et al. 2014 (Thompson et al., 2014), està descrit l'algoritme per classificar les VSD dels gens MMR, proposat pel Variant Interpretation Committee de l'InSight, basat en l'atribució de diferent pesos relatius a múltiples línies d'evidència sobre una variant que inclouen la naturalesa molecular de la mutació, el grau d'agregació familiar i de co-segregació, les alteracions moleculars presents en el tumors o la freqüència al·lèlica en bases de dades, entre d'altres. Es van consensuar unes guies, que s'actualitzen regularment, per a la classificació que permeten catalogar les variants en 5 categories amb impacte clínic (veure imatge 70 a sota).

DISCUSSIÓ

Class 5 (pathogenic)	Class 4 (likely pathogenic)	Class 3 (uncertain)	Class 2 (likely not pathogenic)	Class 1 (not pathogenic)
Nonsense/frameshift or Large deletion or Large duplication confirmed to encode a frameshift leading to NMD or Full inactivation of variant allele by splicing aberration or PP > 0.99 or 4 points evidence: Abrogated function or CMMRD or different background haplotypes Co segregation with disease (-LR of 10:1) ≥2 tumors with LS molecular phenotype Absence in 1000 Genomes Project	Canonical splice site, untested for splicing or PP = 0.95–0.99 or 2 points of evidence: Abrogated function or CMMRD or different background haplotypes Co segregation with disease (-LR of 5:1) or ≥2 tumors with LS molecular phenotype	PP = 0.05–0.949 or Insufficient evidence to classify	AF ≥ 1% in specific ancestry group or Synonymous or intronic variant with no mRNA aberration or PP = 0.001–0.049 or 2 points of evidence if proficient function, otherwise 3 points of evidence: Proficient function or co-occurrence with no CMMRD AF = 0.01–1% No co segregation with disease (-LR of 0.01:1) ≥3 MSS CRC or inconsistent IHC tumors Odds ratio with upper 95% CI < 4 in case-control studies	AF ≥ 1% in control reference groups or PP < 0.001 or 3 points of evidence if proficient function, otherwise 4 points of evidence: Proficient function or co-occurrence with no CMMRD AF = 0.01–1% No co segregation with disease (-LR of 0.01:1) ≥3 MSS CRC or inconsistent IHC tumors Odds ratio with upper 95% CI < 4 in case-control studies

Imatge 70: Informació de les 5 categories de classificació de l'Insight per classificar les VSD en els gens MMR. (Extret de: (Thompson et al., 2014)).

Aquest grup de treball, després d'arribar a un acord sobre com valorar la informació clínica, epidemiològica i molecular més estandarditzada (MSI, immunohistoquímica de les proteïnes reparadores i assajos d'splicing) va abordar la valoració dels assajos funcionals, en aquest cas lligats a defectes en la inestabilitat en microsatèl·lits. En la imatge de sota (figura 71) es mostra el seu arbre de decisió finalment acordat on, a la part superior, s'evidencia la informació que s'ha d'aportar quant a la detecció d'alteracions en el splicing del RNA. Tot i que en l'algoritme no s'esmenta la necessitat d'estandarditzar els mètodes analítics utilitzats, hi ha consens sobre la informació que han de proporcionar. D'altra banda, quan s'arriben als assajos funcionals a nivell de proteïna, el Comitè va consensuar criteris més astringents, ja que la majoria d'aquests assajos, com els utilitzats en la present tesi, no estan adequadament estandarditzats. Per variants en els gens MMR exigien tenir resultats concordants en 2 assajos desenvolupats en laboratoris diferents. Aquests

requeriments també eren exigits pels WB o els assajos de localització subcel·lular de proteïnes. Aquest algoritme (Figura 71) reflecteix la necessitat de desenvolupar assajos fiables i reproduïbles que mereixin l'aprovació dels clínics.

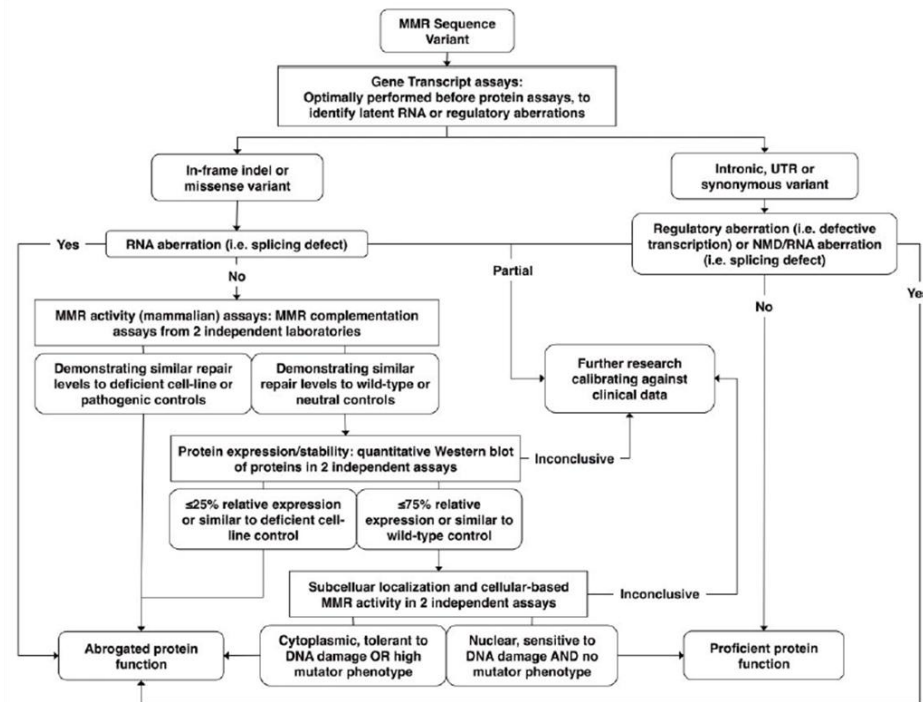


Figura 71: Arbre d'algoritme que s'ha de seguir per la classificació de les variants dels gens MMR.

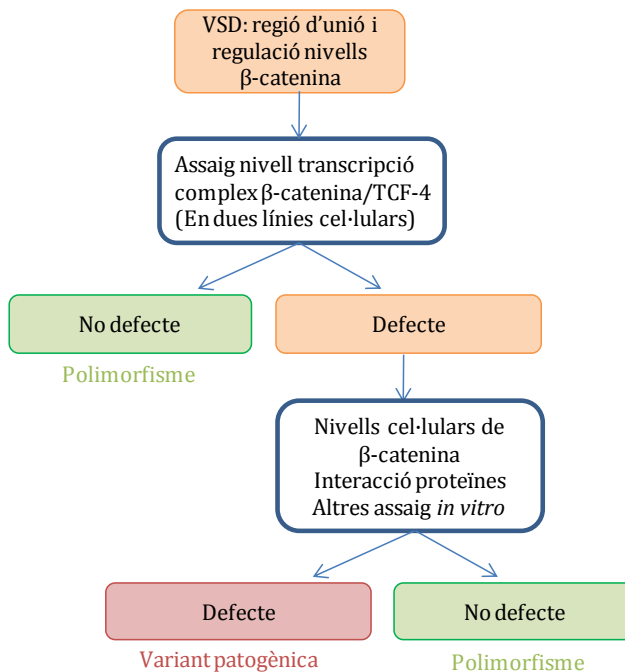
Finalment, cal destacar que aquest comitè no atribueix cap valor clínic a les prediccions *in silico* de les mutacions *missense* que molts altres grups han considerat com rellevants. Els algoritmes *in silico* de predicció de funció són una eina, que molts grups consideren molt útil per interrogar les variants *missense*, per tenir una de les primeres aproximacions del seu possible efecte en la funció. El 75-90% dels valors de predicció dels algoritmes de classificació *in silico* concorden amb altres anàlisi que estan en ús (Chan et al., 2007). Tot i així, no deixen de ser prediccions amb una precisió del 80%, pel tant, la seva aplicació a la clínica han de ser complementada amb altres eines d'interpretació, com són els assajos funcionals i l'anàlisi de co-segregació de les variants amb la malaltia dins de les famílies. A més, com que cada algoritme es basa en diferents característiques, pot haver incongruències entre els resultats predictius per un mateix canvi entre els diferents programes de predicció

(Tavtigian, Greenblatt, Lesueur, Byrnes, & Group, 2008). Es fàcil imaginar que aquest algoritme de classificació de les VSD en els gens MMR anirà evolucionant amb el temps i que s'intentarà a extrapolar a altres gens i assajos funcionals.

Els assajos desenvolupats aquí per avaluar si les variants *missense* tenen un efecte en la funció de la proteïna APC, no han estat reproduïts exactament igual en altres laboratoris. Però per exemple, l'anàlisi de l'activitat transcripcional mitjançada pel complex β -catenina/TCF-4 mitjançant l'assaig del gen reporter també va ser realitzat pel grup d'Azzopardi et al. (Azzopardi et al., 2008), per interrogar en el gen *APC* les variants *missense* I1307K i E1317Q, entre altres, en la línia cel·lular SW480. En aquest treball van concloure que aquestes dues mutacions afectaven la funció de la proteïna APC. Si seguim les directrius establertes per aquest comitè, podríem dir que l'estudi de l'activitat transcripcional per les variants I1307K i E1317Q ha estat desenvolupat en dos laboratoris independents, i a més els resultats obtinguts per la mutació *APC* I1307K són concordants, per tant el valor dels resultats guanyarien més pes.

Una proposta d'algoritme per la classificació de variants *missense* que es troben en els dominis d'interacció amb β -catenina, podria ser l'estudi de l'activitat transcripcional, ja no sols en dos laboratoris independents, sinó que els assajos s'haurien de realitzar amb dues línies cel·lulars, ja que com hem comprovat poden haver-hi discrepàncies segons la línia cel·lular que s'utilitzi. Altres assajos que creiem que s'haurien de realitzar, és l'estudi d'interacció entre proteïnes per la tècnica de SRP (BIAcore) i/o cromatografia d'afinitat. Per últim, amb la utilització de línies cel·lulars transfectades de forma estable, es pot analitzar mitjançant Western Blot, els nivells de β -catenina i veure d'aquesta manera, si la variant afavoreix que hi hagi una acumulació en el citoplasma, la qual cosa podria facilitar que la β -catenina entrés al nucli i activés els gens de la via Wnt. La figura 72 representa de forma esquemàtica la proposta d'algoritme per la classificació de les VSD que es trobin en el domini d'interacció i/o regulació de β -catenina. També en aquest algoritme s'hi podria afegir

els estudis *in silico* de predicció de funció, com un primer pas per interrogar el possible efecte de les variants.



Imatge 72: Proposta d'algoritme per l'estudi de l'impacte funcional en variants del gen APC en el domini d'unió i regulació dels nivells de β -catenina.

Igual que per les VSD en els gens MMR, en aquest cas també es podria classificar les variants en diferents nivells de patogenicitat, ja que com hem comprovat en aquests treball, cada variant *missense*, mostra diferències en el nivell d'afectació de la proteïna APC amb la interacció amb β -catenina. És a dir, per la variant S1028R s'observa una clara afectació de la interacció entre la β -catenina i l'APC, en canvi l'afectació en la interacció entre les dues proteïnes causada per la variant E1317Q és molt lleu. I entre aquestes dues variants, trobem la variant I1307K que afecta de forma clara la interacció de les dues proteïnes però d'una manera menys severa que la variant S1028R.

3. Anàlisi mutacional del gen *UNC5C*

En una gran part de famílies on es veu una agregació de càncer de còlon sense inestabilitat de microsatèl·lits es continua desconeixent el seu component genètic. Molts grups estan treballant per poder identificar de forma molecular quins són els gens que poden explicar aquesta agregació familiar. Aquests estudis han identificat alguns dels gens que expliquen la agregació de càncer de còlon en grups reduïts de famílies, com és el cas dels gens *FAN1*, *OGG1*, *BUB1*, *SEMA4A*, *RSP20* o *FOCAD* (de Voer et al., 2013; Garre et al., 2011; Nieminen et al., 2014; Schulz et al., 2014; Segui et al., 2015; Weren et al., 2015)etc. Aquesta heterogeneïtat de gens causants del càncer probablement mostra que la categoria de Càncer Colorectal familiar tipus X (CCRF-X) agrupa més d'una síndrome hereditària de predisposició al CCR. (Ku et al., 2012; Valle, 2014).

Com ja hem comentat, s'han descrit mutacions germinals en el gen *UNC5C* com a responsables de l'agregació de càncer de còlon en una porció petita de famílies sense altres alteracions conegudes (Coissieux et al., 2011). En aquest estudi hem identificat 8 pacients portadors d'una variant *missense*, tres de les quals, p.D353N, p.R603C i la p.A628K, ja van ser reportades per Coissieux et al. En aquest treball previ les dues primeres, p.D353N i p.R603C, es trobaven en una freqüència semblant en casos i controls i no co-segregen amb la malaltia. La variant p.D353N tampoc co-segrega amb la malaltia en la família que hem analitzat. En canvi no hem pogut fer l'estudi de co-segregació per la R603C. La tercera mutació reportada, la p.A628K, ja va ser reportada com a patogènica en el treball de Coissieux et al., i és l'única que, en la nostra sèrie, podria explicar l'agregació familiar de CCR.

Tot i que hem reportat variants noves o molt poc freqüents en casos amb agregació familiar de CCR, no aportem evidència addicional que ens ajudi a confirmar o descartar que el gen *UNC5C* predisposa al desenvolupament del càncer colorectal hereditari. De les altres 5 variants tan sols hem confirmat que la variant p.S737N co-segrega amb la malaltia, però aquesta variant no està localitzada en cap domini funcional del receptor, per tant el seu impacte sobre la funció pro-apoptòtica del receptor no és clara.

L'estudi somàtic dels tumors sovint aporta informació que permet confirmar o descartar el possible impacte funcional d'un nou gen. Coissieux et al, 2011 van demostrar que la metilació del promotor del gen *UNC5C* era present als tumors analitzats, el que suggeria que aquest era un *second hit* que confirmava el presumpte rol de gen supressor de tumors. Els nostres resultats van confirmar en primera instància aquestes observacions però en ampliar la sèrie de casos analitzats s'ha vist que la metilació no és específica del teixit tumoral sinó que també es dona a la mucosa normal aparellada. A més, aquesta hipermetilació no està restringida als tumors associats a aquestes famílies sinó que és un fenomen quasi universal als tumors esporàdics (Valle L, comunicació personal). Aquesta observació apunta a un escenari més complex i dificulta la interpretació dels resultats somàtics. En aquest context la plausibilitat biològica és rellevant. *UNC5C* és un receptor per netrina a l'igual que ho és el gen *DCC*. En resultats publicats ja fa anys es va presentar evidència sòlida que qüestionava el rol de *DCC* en la tumorigènesi colorectal (Fazeli et al., 1997) que havia estat senyalat com molt rellevant pel laboratori de Bert Vogelstein (Mehlen & Fearon, 2004) (Fearon et al., 1990). El recent desenvolupament d'un model animal que desenvolupa tumors amb baixa freqüència un cop s'ha inactivat genèticament l'activitat pro-apoptòtica de *DCC* ha revitalitzat el possible rol de *DCC* com un gen supressor de tumors *bona fide* (Castets et al., 2012).

Dels nostres resultats es deriva que no podem ni confirmar ni descartar que *UNC5C* tingui un paper rellevant en la predisposició al càncer colorectal hereditari. És evident que la evidència que aportem és encara incompleta i que es podria completar amb nous experiments que no hem fet, en alguns casos per manca de material biològic, i en altres per manca de temps. En aquelles variants on els estudis *in silico* de predicció de l'estabilitat de la proteïna les classifiquen com a desestabilitzadores, com per exemple amb la variant p.S737N, caldria confirmar aquesta predicció amb estudis d'expressió de la proteïna. En alguns casos no podem saber si co-segrega o no amb la malaltia bé per manca de material disponible bé perquè la edat del portador no

DISCUSSIÓ

permet saber si s'ha expressat o no encara la presumpta predisposició. Finalment en alguns casos fora indicat explorar l'impacte funcional de l'activitat pro-apoptòtica tal com va fer el grup de Coissieux.

CONCLUSIONS



CONCLUSIONS

- Per la variant *APC* I1307K hem observat un nivell d'activació de la via Wnt incrementat, probablement mediat per una més baixa afinitat per β -catenina, pel que pot incrementar el risc de desenvolupar càncer colorectal. Però en canvi no hem trobat mutacions associades a la variant, que s'expliquessin per una hipermutabilitat associada a formació de la regió de 8 adenines consecutives.
- La mutació *APC* S1028R és molt probable que sigui la responsable de la Poliposi Adenomatosa Familiar Atenuada en el pacient on es va identificar la mutació. Els resultats funcionals obtinguts per la variant *APC* E1317Q no són concloents.
- Hem desenvolupat assajos in vitro que permeten caracteritzar funcionalment les variants localitzades en els dominis d'unió i regulació dels nivells de β -catenina de la proteïna APC.
- No hem identificat mutacions en el gen *UNC5C* que aportin evidència addicional que ajudi a confirmar o descartar que el gen *UNC5C* té un paper rellevant en el càncer colorectal hereditari.

BIBLIOGRAFIA



A

- Abal, M., Obrador-Hevia, A., Janssen, K. P., Casadome, L., Menendez, M., Carpentier, S., . . . Robine, S. (2007). APC inactivation associates with abnormal mitosis completion and concomitant BUB1B/MAD2L1 up-regulation. *Gastroenterology*, *132*(7), 2448-2458. doi: 10.1053/j.gastro.2007.03.027
- Abdel-Rahman, W. M., Ollikainen, M., Kariola, R., Jarvinen, H. J., Mecklin, J. P., Nystrom-Lahti, M., . . . Peltomaki, P. (2005). Comprehensive characterization of HNPCC-related colorectal cancers reveals striking molecular features in families with no germline mismatch repair gene mutations. *Oncogene*, *24*(9), 1542-1551. doi: 10.1038/sj.onc.1208387
- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A., & Kemler, R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J*, *16*(13), 3797-3804.
- Adzhubei, I., Jordan, D. M., & Sunyaev, S. R. (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*, Chapter 7, Unit7 20. doi: 10.1002/0471142905.hg0720s76
- Al-Tassan, N., Chmiel, N. H., Maynard, J., Fleming, N., Livingston, A. L., Williams, G. T., . . . Cheadle, J. P. (2002). Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet*, *30*(2), 227-232.
- Aoki, K., & Taketo, M. M. (2007). Adenomatous polyposis coli (APC): a multi-functional tumor suppressor gene. *Journal of Cell Science*, *120*(0021-9533 (Print)).
- Aretz, S., Uhlhaas, S., Caspari, R., Mangold, E., Pagenstecher, C., Propping, P., & Friedl, W. (2004). Frequency and parental origin of de novo APC mutations in familial adenomatous polyposis. *Eur J Hum Genet*, *12*(1), 52-58.
- Aretz, S., Uhlhaas, S., Sun, Y., Pagenstecher, C., Mangold, E., Caspari, R., . . . Friedl, W. (2004). Familial adenomatous polyposis: aberrant splicing due to missense or silent mutations in the APC gene. *Hum Mutat*, *24*(5), 370-380. doi: 10.1002/humu.20087
- Arnold, S., Buchanan, D. D., Barker, M., Jaskowski, L., Walsh, M. D., Birney, G., . . . Spurdle, A. B. (2009). Classifying MLH1 and MSH2 variants using bioinformatic prediction, splicing assays, segregation, and tumor characteristics. *Hum Mutat*, *30*(5), 757-770.
- Astler, V. B., & Collier, F. A. (1954). The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg*, *139*(6), 846-852.
- Auclair, J., Busine, M. P., Navarro, C., Ruano, E., Montmain, G., Desseigne, F., . . . Wang, Q. (2006). Systematic mRNA analysis for the effect of MLH1 and

MSH2 missense and silent mutations on aberrant splicing. *Hum Mutat*, 27(2), 145-154.

Azzopardi, D., Dallosso, A. R., Eliason, K., Hendrickson, B. C., Jones, N., Rawstorne, E., . . . Cheadle, J. P. (2008). Multiple rare nonsynonymous variants in the adenomatous polyposis coli gene predispose to colorectal adenomas. *Cancer Res*, 68(2), 358-363. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5733

B

Baeg, G. H., Matsumine, A., Kuroda, T., Bhattacharjee, R. N., Miyashiro, I., Toyoshima, K., & Akiyama, T. (1995). The tumour suppressor gene product APC blocks cell cycle progression from G0/G1 to S phase. *Embo J*, 14(22), 5618-5625.

Behrens, J. (1998). Functional Interaction of an Axin Homolog, Conductin, with -Catenin, APC, and GSK3. *Science*, 280(5363), 596-599. doi: 10.1126/science.280.5363.596

Bellido, F., Pineda, M., Aiza, G., Valdes-Mas, R., Navarro, M., Puente, D. A., . . . Valle, L. (2015). POLE and POLD1 mutations in 529 kindred with familial colorectal cancer and/or polyposis: review of reported cases and recommendations for genetic testing and surveillance. *Genet Med*. doi: 10.1038/gim.2015.75

Bellido, F., Pineda, M., Sanz-Pamplona, R., Navarro, M., Nadal, M., Lazaro, C., . . . Valle, L. (2014). Comprehensive molecular characterisation of hereditary non-polyposis colorectal tumours with mismatch repair proficiency. (1879-0852 (Electronic)).

Berrueta, L., Kraeft, S. K., Tirnauer, J. S., Schuyler, S. C., Chen, L. B., Hill, D. E., . . . Bierer, B. E. (1998). The adenomatous polyposis coli-binding protein EB1 is associated with cytoplasmic and spindle microtubules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(18), 10596-10601.

Betz, B., Theiss, S., Aktas, M., Konermann, C., Goecke, T. O., Moslein, G., . . . Royer-Pokora, B. (2010). Comparative in silico analyses and experimental validation of novel splice site and missense mutations in the genes MLH1 and MSH2. *J Cancer Res Clin Oncol*, 136(1), 123-134.

Bolocan, A., Ion D Fau - Stoian, R. V., Stoian Rv Fau - Serban, M. B., & Serban, M. B. (2011). Map syndrome (MYH Associated Polyposis) colorectal cancer, etiopathological connections. (1844-122X (Print)). doi: D - NLM: PMC3056415 OTO - NOTNLM

Bougatef, K., Marrakchi, R., Ouerhani, S., Sassi, R., Moussa, A., Kourda, N., . . . Ben Ammar Elgaaied, A. (2009). No evidence of the APC D1822V missense variant's pathogenicity in Tunisian patients with sporadic

BIBLIOGRAFIA

- colorectal cancer. *Pathol Biol (Paris)*, 57(3), e67-71. doi: 10.1016/j.patbio.2008.01.004
- Boursi, B., Sella, T., Liberman, E., Shapira, S., David, M., Kazanov, D., . . . Kraus, S. (2013). The APC p.I1307K polymorphism is a significant risk factor for CRC in average risk Ashkenazi Jews. *Eur J Cancer*, 49(17), 3680-3685. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2013.06.040>
- Boyle, P., & Levin, B. (2008). *World Cancer Report 2008*. (P. Boyle & B. Levin Eds.). Lyon, France: IARC Press, International Agency for Research on Cancer.
- Bray, F., Ren, J. S., Masuyer, E., & Ferlay, J. (2013). Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*, 132(5), 1133-1145.
- Brieger, A., Plotz G Fau - Raedle, J., Raedle J Fau - Weber, N., Weber N Fau - Baum, W., Baum W Fau - Caspary, W. F., Caspary Wf Fau - Zeuzem, S., . . . Trojan, J. (2005). Characterization of the nuclear import of human MutLalpha. (0899-1987 (Print)).
- Burt, R. W. (2000). Colon cancer screening. *Gastroenterology*, 119(3), 837-853.

C

- Calvert, P. M., & Frucht, H. (2002). The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med*, 137(7), 603-612.
- Cáncer hereditario*. (2010). (I. Roche Ed. II ed.). Madrid: Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM).
- Cartegni, L., Chew, S. L., & Krainer, A. R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet*, 3(4), 285-298. doi: 10.1038/nrg775
- Cartegni, L., Wang, J., Zhu, Z., Zhang, M. Q., & Krainer, A. R. (2003). ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. *Nucleic Acids Res*, 31(13), 3568-3571.
- Casey, G., Lindor, N. M., Papadopoulos, N., Thibodeau, S. N., Moskow, J., Steelman, S., . . . Haile, R. (2005). Conversion analysis for mutation detection in MLH1 and MSH2 in patients with colorectal cancer. *JAMA*, 293(7), 799-809.
- Castellsague, E., Gonzalez, S., Guino, E., Stevens, K. N., Borrás, E., Raymond, V. M., . . . Capella, G. (2010). Allele-specific expression of APC in adenomatous polyposis families. *Gastroenterology*, 139(2), 439-447, 447 e431.
- Castets, M., Broutier, L., Molin, Y., Brevet, M., Chazot, G., Gadot, N., . . . Mehlen, P. (2012). DCC constrains tumour progression via its dependence receptor activity. *Nature*, 482(7386), 534-537. doi: 10.1038/nature10708

- Coissieux, M. M., Tomsic, J., Castets, M., Hampel, H., Tuupanen, S., Andrieu, N., . . . Mehlen, P. (2011). Variants in the netrin-1 receptor UNC5C prevent apoptosis and increase risk of familial colorectal cancer. *Gastroenterology*, *141*(6), 2039-2046. doi: 10.1053/j.gastro.2011.08.041
- Colnot, S., Niwa-Kawakita, M., Hamard, G., Godard, C., Le Plenier, S., Houbron, C., . . . Perret, C. (2004). Colorectal cancers in a new mouse model of familial adenomatous polyposis: influence of genetic and environmental modifiers. *Lab Invest*, *84*(12), 1619-1630. doi: 10.1038/labinvest.3700180
- Cotton, R. G., & Scriver, C. R. (1998). Proof of "disease causing" mutation. *Hum Mutat*, *12*(1), 1-3.
- Curtin, K., Slattery, M. L., & Samowitz, W. S. (2011). CpG island methylation in colorectal cancer: past, present and future. *Patholog Res Int*, *2011*, 902674. doi: 10.4061/2011/902674
- Chan, P. A., Duraisamy S Fau - Miller, P. J., Miller Pj Fau - Newell, J. A., Newell Ja Fau - McBride, C., McBride C Fau - Bond, J. P., Bond Jp Fau - Raevaara, T., . . . Greenblatt, M. S. (2007). Interpreting missense variants: comparing computational methods in human disease genes CDKN2A, MLH1, MSH2, MECP2, and tyrosinase (TYR). (1098-1004 (Electronic)).
- Chao, E. C., Velasquez, J. L., Witherspoon, M. S., Rozek, L. S., Peel, D., Ng, P., . . . Lipkin, S. M. (2008). Accurate classification of MLH1/MSH2 missense variants with multivariate analysis of protein polymorphisms-mismatch repair (MAPP-MMR). *Hum Mutat*, *29*(6), 852-860.
- Chubb, D., Broderick, P., Frampton, M., Kinnersley, B., Sherborne, A., Penegar, S., . . . Houlston, R. S. (2015). Genetic diagnosis of high-penetrance susceptibility for colorectal cancer (CRC) is achievable for a high proportion of familial CRC by exome sequencing. *J Clin Oncol*, *33*(5), 426-432. doi: 10.1200/JCO.2014.56.5689

D

- Dallosso, A. R., Jones, S., Azzopardi, D., Moskvina, V., Al-Tassan, N., Williams, G. T., . . . Cheadle, J. P. (2009). The APC Variant p.Glu1317Gln predisposes to colorectal adenomas by a novel mechanism of relaxing the target for tumorigenic somatic APC mutations. *Hum Mutat*, *30*(10), 1412-1418. doi: 10.1002/humu.21089
- de Voer, R. M., Geurts van Kessel, A., Weren, R. D., Ligtenberg, M. J., Smeets, D., Fu, L., . . . Kuiper, R. P. (2013). Germline mutations in the spindle assembly checkpoint genes BUB1 and BUB3 are risk factors for colorectal cancer. *Gastroenterology*, *145*(3), 544-547. doi: 10.1053/j.gastro.2013.06.001

- Dikovskaya, D., Schiffmann, D., Newton, I. P., Oakley, A., Kroboth, K., Sansom, O., . . . Nathke, I. S. (2007). Loss of APC induces polyploidy as a result of a combination of defects in mitosis and apoptosis. *J Cell Biol*, 176(2), 183-195. doi: 10.1083/jcb.200610099
- Dominguez-Valentin, M., Therkildsen, C., Da Silva, S., & Nilbert, M. (2015). Familial colorectal cancer type X: genetic profiles and phenotypic features. *Mod Pathol*, 28(1), 30-36. doi: 10.1038/modpathol.2014.49
- Donehower, L. A., Creighton, C. J., Schultz, N., Shinbrot, E., Chang, K., Gunaratne, P. H., . . . Wheeler, D. (2013). MLH1-silenced and non-silenced subgroups of hypermutated colorectal carcinomas have distinct mutational landscapes. *J Pathol*, 229(1), 99-110. doi: 10.1002/path.4087
- Dukes. (1932). The classification of cancer of the rectum. *The Journal of pathology*, 35, 323.
- Dundar, M., Caglayan, A. O., Saatci, C., Karaca, H., Baskol, M., Tahiri, S., & Ozkul, Y. (2007). How the I1307K adenomatous polyposis coli gene variant contributes in the assessment of risk of colorectal cancer, but not stomach cancer, in a Turkish population. *Cancer Genet Cytogenet*, 177(2), 95-97. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2007.05.015
- Dunlop, M. G. (2002). Guidance on gastrointestinal surveillance for hereditary non-polyposis colorectal cancer, familial adenomatous polypolis, juvenile polyposis, and Peutz-Jeghers syndrome. *Gut*, 51 Suppl 5, V21-27.

E

- Eklof Spink, K., Fridman, S. G., & Weis, W. I. (2001). Molecular mechanisms of beta-catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC-beta-catenin complex. *Embo J*, 20(22), 6203-6212. doi: 10.1093/emboj/20.22.6203

F

- Faux, M. C., Ross, J. L., Meeker, C., Johns, T., Ji, H., Simpson, R. J., . . . Burgess, A. W. (2004). Restoration of full-length adenomatous polyposis coli (APC) protein in a colon cancer cell line enhances cell adhesion. *Journal of Cell Science*. doi: 10.1242/jcs
- Fazeli, A., Dickinson, S. L., Hermiston, M. L., Tighe, R. V., Steen, R. G., Small, C. G., . . . Weinberg, R. A. (1997). Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature*, 386(6627), 796-804.
- Fearnhead, N. S., Britton, M. P., & Bodmer, W. F. (2001). The ABC of APC. *Hum Mol Genet*, 10(7), 721-733.

BIBLIOGRAFIA

- Fearon, E. R., Cho, K. R., Nigro, J. M., Kern, S. E., Simons, J. W., Ruppert, J. M., . . . et al. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science*, 247(4938), 49-56.
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61(5), 759-767.
- Feng, M., Fang, X., Yang, Q., Ouyang, G., Chen, D., Ma, X., . . . Xie, W. (2014). Association between the APC gene D1822V variant and the genetic susceptibility of colorectal cancer. *Oncol Lett*, 8(1), 139-144. doi: 10.3892/ol.2014.2102
- Ferrari, P., Jenab, M., Norat, T., Moskal, A., Slimani, N., Olsen, A., . . . Riboli, E. (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), 2065-2072. doi: 10.1002/ijc.22966
- Filipe, B., Baltazar, C., Albuquerque, C., Fragoso, S., Lage, P., Vitoriano, I., . . . Nobre Leitao, C. (2009). APC or MUTYH mutations account for the majority of clinically well-characterized families with FAP and AFAP phenotype and patients with more than 30 adenomas. *Clin Genet*, 76(3), 242-255. doi: 10.1111/j.1399-0004.2009.01241.x
- Fleming, I. D., Phillips, J. L., Menck, H. R., Murphy, G. P., & Winchester, D. P. (1997). The National Cancer Data Base report on recent hospital cancer program progress toward complete American Joint Committee on Cancer/TNM staging. *Cancer*, 80(12), 2305-2310.
- Fodde, R. (2002). The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 38(7), 867-871.
- Fodde, R. (2003). The multiple functions of tumour suppressors: it's all in APC. *Nat Cell Biol*, 5(3), 190-192.
- Francisco, I., Albuquerque, C., Lage, P., Belo, H., Vitoriano, I., Filipe, B., . . . Pereira, A. D. (2011). Familial colorectal cancer type X syndrome: two distinct molecular entities? *Fam Cancer*, 10(4), 623-631. doi: 10.1007/s10689-011-9473-7
- Frayling, I. M., Beck, N. E., Ilyas, M., Dove-Edwin, I., Goodman, P., Pack, K., . . . Tomlinson, I. P. (1998). The APC variants I1307K and E1317Q are associated with colorectal tumors, but not always with a family history. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(18), 10722-10727.

G

- Galiatsatos, P., & Foulkes, W. D. (2006). Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol*, 101(2), 385-398. doi: 10.1111/j.1572-0241.2006.00375.x
- García, M. A., & Arenas, A. F. (2014). 30 Pólipos colorrectales y poliposis intestinal. from

BIBLIOGRAFIA

- <http://www.elsevierinstituciones.com/ficheros/booktemplate/9788475927220/files/Capitulo30.pdf>
- Garre, P., Briceno, V., Xicola, R. M., Doyle, B. J., de la Hoya, M., Sanz, J., . . . Caldes, T. (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), 1701-1712. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2491
- Gershoni-Baruch, R., Patael, Y., Dagan, Figer, A., Kasinetz, L., Kadouri, E., . . . Friedman, E. (2000). Association of the I1307K APC mutation with hereditary and sporadic breast/ovarian cancer: more questions than answers. *Br J Cancer*, *83*(2), 153-155. doi: 10.1054/
- Giovannucci, E. (2006). The epidemiology of vitamin D and colorectal cancer: recent findings. (0267-1379 (Print)).
- Goel, A., Xicola, R. M., Nguyen, T. P., Doyle, B. J., Sohn, V. R., Bandipalliam, P., . . . Llor, X. (2010). Aberrant DNA methylation in hereditary nonpolyposis colorectal cancer without mismatch repair deficiency. *Gastroenterology*, *138*(5), 1854-1862. doi: S0016-5085(10)00102-2 [pii] 10.1053/j.gastro.2010.01.035
- Goldgar, D. E., Easton, D. F., Byrnes, G. B., Spurdle, A. B., Iversen, E. S., & Greenblatt, M. S. (2008). Genetic evidence and integration of various data sources for classifying uncertain variants into a single model. *Hum Mutat*, *29*(11), 1265-1272.
- Gonzalez-Perez, A., & Lopez-Bigas, N. (2011). Improving the assessment of the outcome of nonsynonymous SNVs with a consensus deleteriousness score, Condel. *Am J Hum Genet*, *88*(4), 440-449.
- Grady, W. M. (2007). Making the case for DCC and UNC5C as tumor-suppressor genes in the colon. *Gastroenterology*, *133*(6), 2045-2049. doi: 10.1053/j.gastro.2007.10.034
- Gruber, S. B. (2006). New developments in Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) and mismatch repair gene testing. *Gastroenterology*, *130*(2), 577-587.
- Gryfe, R., Di Nicola, N., Lal, G., Gallinger, S., & Redston, M. (1999). Inherited Colorectal Polyposis and Cancer Risk of the APC I1307K Polymorphism. *Am J Clin Pathol*, *64*, 378-384.
- Guidugli, L., Carreira, A., Caputo, S. M., Ehlen, A., Galli, A., Monteiro, A. N., . . . consortium, E. (2014). Functional assays for analysis of variants of uncertain significance in BRCA2. *Hum Mutat*, *35*(2), 151-164. doi: 10.1002/humu.22478
- Gylfe, A. E., Sirkia, J., Ahlsten, M., Jarvinen, H., Mecklin, J. P., Karhu, A., & Aaltonen, L. A. (2010). Somatic mutations and germline sequence variants in patients with familial colorectal cancer. *Int J Cancer*, *127*(12), 2974-2980. doi: 10.1002/ijc.25529

H

- Hahnloser, D., Petersen, G. M., Rabe, K., Snow, K., Lindor, N. M., Boardman, L., . . . Thibodeau, S. N. (2003). The APC E1317Q Variant in Adenomatous Polyps and Colorectal Cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, *12*(10), 1023-1028.
- Half, E., Bercovich, D., & Rozen, P. (2009). Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis*, *4*, 22. doi: 10.1186/1750-1172-4-22
- Hall, M. J., Liberman, E., Dulkart, O., Galazan, L., Sagiv, E., Shmueli, E., . . . Arber, N. (2009). Risk of colorectal neoplasia associated with the adenomatous polyposis coli E1317Q variant. *Ann Oncol*, *20*(9), 1517-1521. doi: 10.1093/annonc/mdp023
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, *100*(1), 57-70.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646-674. doi: S0092-8674(11)00127-9 [pii] 10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hargest, R., & Williamson, R. (1995). Expression of the APC gene after transfection into a colonic cancer cell line. *Gut*, *37*(6), 826-829.
- He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., . . . Kinzler, K. W. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, *281*(5382), 1509-1512.
- Heinen, C. D. (2010). Genotype to phenotype: analyzing the effects of inherited mutations in colorectal cancer families. *Mutat Res*, *693*(1-2), 32-45. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.09.004
- Heinen, C. D., & Juel Rasmussen, L. (2012). Determining the functional significance of mismatch repair gene missense variants using biochemical and cellular assays. (1897-4287 (Electronic)). doi: D - NLM: PMC3434035 EDAT- 2012/07/25 06:00 MHDA- 2012/07/25 06:01 CRDT- 2012/07/25 06:00 PHST- 2012/04/19 [received] PHST- 2012/06/28 [accepted] PHST- 2012/07/23 [aheadofprint] AID - 1897-4287-10-9 [pii] AID - 10.1186/1897-4287-10-9 [doi] PST - epublish
- Heinimann, K., Thompson, A., Locher, A., Furlanetto, T., Bader, E., Wolf, A., . . . Dobbie, Z. (2001). Nontruncating APC Germ-line Mutations and Mismatch Repair Deficiency Play a Minor Role in APC Mutation-negative Polyposis. *Cancer Res*, *61*(20), 7616-7622.
- Henderson, B. R. (2000). Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol*, *2*, 653 - 660.
- Herbst, A., Jurinovic, V., Krebs, S., Thieme, S. E., Blum, H., Göke, B., & Kolligs, F. T. (2014). Comprehensive analysis of β -catenin target genes in colorectal

carcinoma cell lines with deregulated Wnt/ β -catenin signaling. *BMC Genomics*, 15(74).

Hofstra, R. M., Osinga, J., & Buys, C. H. (1997). Mutations in Hirschsprung disease: when does a mutation contribute to the phenotype. *Eur J Hum Genet*, 5(4), 180-185.

I

Ikeda, S., Kishida, M., Matsuura, Y., Usui, H., & Kikuchi, A. (2000). GSK-3 β -dependent phosphorylation of adenomatous polyposis coli gene product can be modulated by beta-catenin and protein phosphatase 2A complexed with Axin. *Oncogene*, 19(4), 537-545. doi: 10.1038/sj.onc.1203359

Ishidate, T., Matsumine A Fau - Toyoshima, K., Toyoshima K Fau - Akiyama, T., & Akiyama, T. (2000). The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase. *Oncogene*(0950-9232 (Print)).

Jass, J. R., Cottier Ds Fau - Jeevaratnam, P., Jeevaratnam P Fau - Pokos, V., Pokos V Fau - Holdaway, K. M., Holdaway Km Fau - Bowden, M. L., Bowden Ml Fau - Van de Water, N. S., . . . Browett, P. J. (1995). Diagnostic use of microsatellite instability in hereditary non-polyposis colorectal cancer. (0140-6736 (Print)).

J

Jelsig, A. M., Qvist N Fau - Brusgaard, K., Brusgaard K Fau - Nielsen, C. B., Nielsen Cb Fau - Hansen, T. P., Hansen Tp Fau - Ousager, L. B., & Ousager, L. B. (2014). Hamartomatous polyposis syndromes: a review. (1750-1172 (Electronic)). doi: D - NLM: PMC4112971 EDAT- 2014/07/16 06:00 MHDA- 2015/03/31 06:00 CRDT- 2014/07/16 06:00 PHST- 2014/04/08 [received] PHST- 2014/06/19 [accepted] PHST- 2014/07/15 [aheadofprint] AID - 1750-1172-9-101 [pii] AID - 10.1186/1750-1172-9-101 [doi] PST - epublish

Jho, E. h., Zhang, T., Domon, C., Joo, C. K., Freund, J. N., & Costantini, F. (2002). Wnt/ -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Mol Cell Biol*, 22(4), 1172-1183. doi: 10.1128/mcb.22.4.1172-1183.2002

Johns, L. E., & Houlston, R. S. (2001). A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. (0002-9270 (Print)).

Jonkers, J., & Berns, A. (2002). Conditional mouse models of sporadic cancer. *Nat Rev Cancer*, 2(4), 251-265. doi: 10.1038/nrc777

K

- Kashfi, S. M., Golmohammadi, M., Behboudi Farahbakhsh, F., Nazemalhosseini Mojarad, E., Azimzadeh, P., Norouzinia, M., . . . Zali, M. R. (2015). Novel Missense Mutation at Codon 2774 (C.8321 G>A) p.S2774N of APC Gene in a Denovo Case of Familial Adenomatous Polyposis. (1735-3947 (Electronic)).
- Kaufmann, A., Vogt, S., Uhlhaas, S., Stienen, D., Kurth, I., Hameister, H., . . . Aretz, S. (2009). Analysis of rare APC variants at the mRNA level: six pathogenic mutations and literature review. *J Mol Diagn*, *11*(2), 131-139. doi: 10.2353/jmoldx.2009.080129
- Kawasaki, Y. (2000). Asef, a Link Between the Tumor Suppressor APC and G-Protein Signaling. *Science*, *289*(5482), 1194-1197. doi: 10.1126/science.289.5482.1194
- Kawasaki, Y., Sato, R., & Akiyama, T. (2003). Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumour cells. *Nat Cell Biol*, *5*(3), 211-215.
- Kishida, S., Yamamoto, H., Ikeda, S., Kishida, M., Sakamoto, I., Koyama, S., & Kikuchi, A. (1998). Axin, a negative regulator of the wnt signaling pathway, directly interacts with adenomatous polyposis coli and regulates the stabilization of beta-catenin. *J Biol Chem*, *273*(18), 10823-10826.
- Knudsen, A. L., Bisgaard, M. L., & Bulow, S. (2003). Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer*, *2*(1), 43-55.
- Knudson, A. G. (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(23), 10914-10921.
- Knudson, A. G. (2002). Cancer genetics. *Am J Med Genet*, *111*(1), 96-102. doi: 10.1002/ajmg.10320
- Knudson, A. G., Jr. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *68*(4), 820-823.
- Kohler, E. M., Chandra, S. H., Behrens, J., & Schneikert, J. (2009). Beta-catenin degradation mediated by the CID domain of APC provides a model for the selection of APC mutations in colorectal, desmoid and duodenal tumours. *Hum Mol Genet*, *18*(2), 213-226. doi: 10.1093/hmg/ddn338
- Kohler, E. M., Derungs, A., Daum, G., Behrens, J., & Schneikert, J. (2008). Functional definition of the mutation cluster region of adenomatous polyposis coli in colorectal tumours. *Hum Mol Genet*, *17*(13), 1978-1987. doi: 10.1093/hmg/ddn095
- Kolligs, F. T., Bommer, G., Ouml, & Ke, B. (2002). Wnt/Beta-Catenin/Tcf Signaling: A Critical Pathway in Gastrointestinal Tumorigenesis. *Digestion*, *66*(3), 131-144. doi: 10.1159/000066755

- Korinek, V. (1997). Constitutive Transcriptional Activation by a beta -Catenin-Tcf Complex in APC-/- Colon Carcinoma. *Science*, 275(5307), 1784-1787. doi: 10.1126/science.275.5307.1784
- Krausova, M., & Korinek, V. (2014). Wnt signaling in adult intestinal stem cells and cancer. *Cell Signal*, 26(3), 570-579. doi: 10.1016/j.cellsig.2013.11.032
- Ku, C. S., Cooper, D. N., Wu, M., Roukos, D. H., Pawitan, Y., Soong, R., & Iacopetta, B. (2012). Gene discovery in familial cancer syndromes by exome sequencing: prospects for the elucidation of familial colorectal cancer type X. *Mod Pathol*, 25(8), 1055-1068. doi: 10.1038/modpathol.2012.62
- Kuiper, R. P., Vissers, L. E., Venkatachalam, R., Bodmer, D., Hoenselaar, E., Goossens, M., . . . Ligtenberg, M. J. (2011). Recurrence and variability of germline EPCAM deletions in Lynch syndrome. *Hum Mutat*, 32(4), 407-414.
- Kumar, P., Henikoff S Fau - Ng, P. C., & Ng, P. C. (2013). Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. (1750-2799 (Electronic)).
- Kury, S., Garrec, C., Airaud, F., Breheret, F., Guibert, V., Frenard, C., . . . Bezieau, S. (2014). Evaluation of the colorectal cancer risk conferred by rare UNC5C alleles. *World J Gastroenterol*, 20(1), 204-213. doi: 10.3748/wjg.v20.i1.204

L

- Laken, S. J., Petersen, G. M., Gruber, S. B., Oddoux, C., Ostrer, H., Giardiello, F. M., . . . Vogelstein, B. (1997). Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet*, 17(1), 79-83.
- Lamlum, H., Al Tassan, N., Jaeger, E., Frayling, I., Sieber, O., Reza, F. B., . . . Tomlinson, I. (2000). Germline APC variants in patients with multiple colorectal adenomas, with evidence for the particular importance of E1317Q. *Hum Mol Genet*, 9(15), 2215-2221.
- Lamlum, H., Ilyas, M., Rowan, A., Clark, S., Johnson, V., Bell, J., . . . Tomlinson, I. (1999). The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nat Med*, 5(9), 1071-1075.
- Lastella, P., Surdo, N. C., Resta, N., Guanti, G., & Stella, A. (2006). In silico and in vivo splicing analysis of MLH1 and MSH2 missense mutations shows exon- and tissue-specific effects. *BMC Genomics*, 7, 243.
- Lehrer, S., Diamond, E. J., Stone, N. N., Droller, M. J., Stock, R. G., Stone, M., . . . Kornreich, R. (2003). Elevated serum triiodothyronine (t3) in Ashkenazi

- Jewish prostate cancer patients carrying the I1307k allele of the APC (adenopolyposis coli) gene. *Urol Oncol*, 21(2), 101-104.
- Lehrer, S., McCurdy, L. D., Stock, R. G., Kornreich, R., Stone, N. N., & Eng, C. (2000). Body mass, age, and the APC I1307K allele in Ashkenazi Jewish prostate cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet*, 122(2), 131-133. doi: S0165-4608(00)00291-0 [pii]
- Liberman, E., Kraus, S., Sagiv, E., Dulkart, O., Kazanov, D., & Arber, N. (2007). The APC E1317Q and I1307K polymorphisms in non-colorectal cancers. *Biomed Pharmacother*, 61(9), 566-569. doi: 10.1016/j.biopha.2007.08.016
- Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., . . . 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(2), 78-85.
- Lindor, N. M., Rabe, K., Petersen, G. M., Haile, R., Casey, G., Baron, J., . . . Seminara, D. (2005). Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA*, 293(16), 1979-1985.
- Liu, J., Xing, Y., Hinds, T. R., Zheng, J., & Xu, W. (2006). The third 20 amino acid repeat is the tightest binding site of APC for beta-catenin. *J Mol Biol*, 360(1), 133-144. doi: 10.1016/j.jmb.2006.04.064
- Lynch, H. T. (2008). Familial Cancer. Foreword. *Fam Cancer*, 7(1), 1-2. doi: 10.1007/s10689-007-9168-2
- Lynch, H. T., & de la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*, 348(10), 919-932.
- Lynch, H. T., Lynch, P. M., Lanspa, S. J., Snyder, C. L., Lynch, J. F., & Boland, C. R. (2009). Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet*, 76(1), 1-18.
- Llor, X., Pons, E., Xicola, R. M., Castells, A., Alenda, C., Pinol, V., . . . Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological, A. (2005). Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam criteria without involvement of the mutator pathway. *Clin Cancer Res*, 11(20), 7304-7310. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-05-0965

M

- Ma, X., Zhang, B., & Zheng, W. (2013). Genetic variants associated with colorectal cancer risk: comprehensive research synopsis, meta-analysis, and epidemiological evidence. *Gut*, 63(2), 326-336.
- Macklin, M. T. (1960). Inheritance of cancer of the stomach and large intestine in man. (0027-8874 (Print)).

BIBLIOGRAFIA

- Matsumine, A., Ogai, A., Senda, T., Okumura, N., Satoh, K., Baeg, G. H., . . . Akiyama, T. (1996). Binding of APC to the human homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Science*, 272(5264), 1020-1023.
- McCartney, B. M., & Nathke, I. S. (2008). Cell regulation by the Apc protein Apc as master regulator of epithelia. *Curr Opin Cell Biol*, 20(2), 186-193. doi: 10.1016/j.ceb.2008.02.001
- Mehlen, P., & Fearon, E. R. (2004). Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol*, 22(16), 3420-3428. doi: 10.1200/JCO.2004.02.019
- Menendez, M., Gonzalez, S., Blanco, I., Guino, E., Peris, M., Peinado, M. A., . . . Moreno, V. (2004). Colorectal cancer risk and the APC D1822V variant. *Int J Cancer*, 112(1), 161-163. doi: 10.1002/ijc.20361
- Menendez, M., Gonzalez, S., Obrador-Hevia, A., Dominguez, A., Pujol, M. J., Valls, J., . . . Capella, G. (2008). Functional characterization of the novel APC N1026S variant associated with attenuated familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*, 134(1), 56-64. doi: 10.1053/j.gastro.2007.10.009
- Middeldorp, A., van Eijk, R., Oosting, J., Forte, G. I., van Puijenbroek, M., van Nieuwenhuizen, M., . . . van Wezel, T. (2012). Increased frequency of 20q gain and copy-neutral loss of heterozygosity in mismatch repair proficient familial colorectal carcinomas. *Int J Cancer*, 130(4), 837-846. doi: 10.1002/ijc.26093
- Millot, G. A., Carvalho, M. A., Caputo, S. M., Vreeswijk, M. P., Brown, M. A., Webb, M., . . . Group, E. C. F. A. W. (2012). A guide for functional analysis of BRCA1 variants of uncertain significance. *Hum Mutat*, 33(11), 1526-1537. doi: 10.1002/humu.22150
- Miyoshi, Y., Nagase, H., Ando, H., Horii, A., Ichii, S., Nakatsuru, S., . . . Nakamura, Y. (1992). Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet*, 1(4), 229-233.
- Montera, M., Piaggio, F., Marchese, C., Gismondi, V., Stella, A., Resta, N., . . . Marenzi, C. (2001). A silent mutation in exon 14 of the APC gene is associated with exon skipping in a FAP family. *J Med Genet*, 38(12), 863-867.
- Morin, P. J., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1996). Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(15), 7950-7954.
- Mueller-Koch, Y., Vogelsang, H., Kopp, R., Lohse, P., Keller, G., Aust, D., . . . Holinski-Feder, E. (2005). Hereditary non-polyposis colorectal cancer: clinical and molecular evidence for a new entity of hereditary colorectal cancer. *Gut*, 54(12), 1733-1740. doi: 10.1136/gut.2004.060905

BIBLIOGRAFIA

- Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B., & Polakis, P. (1995). Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 3046-3050.
- Munemitsu, S., Souza, B., Muller, O., Albert, I., Rubinfeld, B., & Polakis, P. (1994). The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. *Cancer Res*, 54(14), 3676-3681.
- Munteanu, I., & Mastalier, B. (2014). Genetics of colorectal cancer. (1844-3117 (Electronic)). doi: D - NLM: PMC4316127 OTO - NOTNLM
- Muto, T., Bussey, H. J., & Morson, B. C. (1975). The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*, 36(6), 2251-2270.

N

- Nagase, H., Miyoshi, Y., Horii, A., Aoki, T., Ogawa, M., Utsunomiya, J., . . . Nakamura, Y. (1992). Correlation between the location of germ-line mutations in the APC gene and the number of colorectal polyps in familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res*, 52(14), 4055-4057.
- Nakagawa, H., Yan H Fau - Lockman, J., Lockman J Fau - Hampel, H., Hampel H Fau - Kinzler, K. W., Kinzler Kw Fau - Vogelstein, B., Vogelstein B Fau - De La Chapelle, A., & De La Chapelle, A. (2002). Allele separation facilitates interpretation of potential splicing alterations and genomic rearrangements. (0008-5472 (Print)).
- Naruse, H., Ikawa, N., Yamaguchi, K., Nakamura, Y., Arai, M., Ishioka, C., . . . Furukawa, Y. (2009). Determination of splice-site mutations in Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer) patients using functional splicing assay. *Fam Cancer*, 8(4), 509-517.
- Neufeld, K. L., Nix, D. A., Bogerd, H., Kang, Y., Beckerle, M. C., Cullen, B. R., & White, R. L. (2000). Adenomatous polyposis coli protein contains two nuclear export signals and shuttles between the nucleus and cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(22), 12085-12090. doi: 10.1073/pnas.220401797
- Nielsen, M., Hes, F. J., Nagengast, F. M., Weiss, M. M., Mathus-Vliegen, E. M., Morreau, H., . . . Vasen, H. F. (2007). Germline mutations in APC and MUTYH are responsible for the majority of families with attenuated familial adenomatous polyposis. *Clin Genet*, 71(5), 427-433. doi: CGE766 [pii]
10.1111/j.1399-0004.2007.00766.x
- Nieminen, T. T., O'Donohue, M. F., Wu, Y., Lohi, H., Scherer, S. W., Paterson, A. D., . . . Peltomaki, P. (2014). Germline mutation of RPS20, encoding a ribosomal protein, causes predisposition to hereditary nonpolyposis

BIBLIOGRAFIA

- colorectal carcinoma without DNA mismatch repair deficiency. *Gastroenterology*, 147(3), 595-598 e595. doi: 10.1053/j.gastro.2014.06.009
- Nieuwenhuis, M. H., & Vasen, H. F. (2007). Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): a review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol*, 61(2), 153-161. doi: 10.1016/j.critrevonc.2006.07.004

P

- Palles, C., Cazier, J. B., Howarth, K. M., Domingo, E., Jones, A. M., Broderick, P., . . . Tomlinson, I. (2013). Germline mutations affecting the proofreading domains of POLE and POLD1 predispose to colorectal adenomas and carcinomas. *Nat Genet*, 45(2), 136-144. doi: 10.1038/ng.2503
- Pastrello, C., Pin, E., Marroni, F., Bedin, C., Fornasari, M., Tibiletti, M. G., . . . Viel, A. (2011). Integrated analysis of unclassified variants in mismatch repair genes. *Genet Med*, 13(2), 115-124.
- Peltomaki, P. (2003). Role of DNA Mismatch Repair Defects in the Pathogenesis of Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 21(6), 1174-1179. doi: 10.1200/jco.2003.04.060
- Plon, S. E., Cooper, H. P., Parks, B., Dhar, S. U., Kelly, P. A., Weinberg, A. D., . . . Hilsenbeck, S. (2008). Genetic testing and cancer risk management recommendations by physicians for at-risk relatives. *Genet Med*, 13(2), 148-154.
- Poynter, J. N., Cooney, K. A., Bonner, J. D., White, K. A., Tomsho, L. P., Rennert, G., & Gruber, S. B. (2006). APC I1307K and the risk of prostate cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(3), 468-473. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-05-0584
- Puente, X. S., Pinyol, M., Quesada, V., Conde, L., Ordonez, G. R., Villamor, N., . . . Campo, E. (2011). Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature*, 475(7354), 101-105. doi: 10.1038/nature10113

R

- Regev, M., Barzilai, S. E., Figer, A., Zidan, J., Fidder, H. H., & Friedman, E. (2005). The I1307K APC mutation in a high-risk clinic setting: a follow-up study. *Clin Genet*, 67(4), 352-355. doi: 10.1111/j.1399.0004.2005.00412.x
- Rennert, G., Almog, R., Tomsho, L. P., Low, M., Pinchev, M., Chaiter, Y., . . . Gruber, S. B. (2005). Colorectal polyps in carriers of the APC I1307K

BIBLIOGRAFIA

- polymorphism. *Dis Colon Rectum*, 48(12), 2317-2321. doi: 10.1007/s10350-005-0167-9
- Reya, T., & Clevers, H. (2005). Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434(7035), 843-850. doi: 10.1038/nature03319
- Rodriguez-Bigas, M. A., Boland, C. R., Hamilton, S. R., Henson, D. E., Jass, J. R., Khan, P. M., . . . Srivastava, S. (1997). A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*, 89(23), 1758-1762.
- Rosin-Arbesfeld, R., Cliffe, A., Brabletz, T., & Bienz, M. (2003). Nuclear export of the APC tumour suppressor controls beta-catenin function in transcription. *Embo J*, 22(5), 1101-1113. doi: 10.1093/emboj/cdg105
- Rowan, A. J., Lamlum, H., Ilyas, M., Wheeler, J., Straub, J., Papadopolou, A., . . . Tomlinson, I. P. (2000). APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *PNAS*, 97(7), 3352-3357.
- Rozek, L. S., Rennert, G., & Gruber, S. B. (2006). APC E1317Q is not associated with Colorectal Cancer in a population-based case-control study in Northern Israel. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 15(11), 2325-2327. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-06-0504
- Ruiz-Ponte, C., Vega, A., Conde, R., Barros, F., & Carracedo, A. (2001a). The Asp1822Val variant of the APC gene is a common polymorphism without clinical implications. *J Med Genet*, 38.
- Ruiz-Ponte, C., Vega, A., Conde, R., Barros, F., & Carracedo, A. (2001b). The Asp1822Val variant of the APC gene is a common polymorphism without clinical implications. *J Med Genet*, 38(10), E33.

S

- Sanchez-de-Abajo, A., de la Hoya, M., van Puijenbroek, M., Tosar, A., Lopez-Asenjo, J. A., Diaz-Rubio, E., . . . Caldes, T. (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), 5729-5735.
- Sanchez-Tome, E., Rivera, B., Perea, J., Pita, G., Rueda, D., Mercadillo, F., . . . Urioste, M. (2015). Genome-wide linkage analysis and tumoral characterization reveal heterogeneity in familial colorectal cancer type X. *J Gastroenterol*, 50(6), 657-666. doi: 10.1007/s00535-014-1009-0
- Santibanez Koref, M., Wilson, V., Cartwright, N., Cunnington, M. S., Mathers, J. C., Bishop, D. T., . . . Burn, J. (2010). MLH1 Differential allelic expression in mutation carriers and controls. *Ann Hum Genet*, 74(6), 479-488.

BIBLIOGRAFIA

- Scott, R. J., Crooks, R., Rose, L., Attia, J., Thakkinstian, A., Thomas, L., . . . Meldrum, C. J. (2004). Germline Missense Changes in the APC Gene and Their Relationship to Disease. *Hered Cancer Clin Pract*, 2(2), 81 - 91.
- Schreibman, I. R., Baker, M., Amos, C., & McGarrity, T. J. (2005). The hamartomatous polyposis syndromes: a clinical and molecular review. *Am J Gastroenterol*, 100(2), 476-490. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.40237.x
- Schulz, E., Klampfl, P., Holzapfel, S., Janecke, A. R., Ulz, P., Renner, W., . . . Sill, H. (2014). Germline variants in the SEMA4A gene predispose to familial colorectal cancer type X. *Nat Commun*, 5, 5191. doi: 10.1038/ncomms6191
- Seeling, J. M., Miller, J. R., Gil, R., Moon, R. T., White, R., & Virshup, D. M. (1999). Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science*, 283(5410), 2089-2091.
- Segui, N., Mina, L. B., Lazaro, C., Sanz-Pamplona, R., Pons, T., Navarro, M., . . . Valle, L. (2015). Germline Mutations in FAN1 Cause Hereditary Colorectal Cancer by Impairing DNA Repair. *Gastroenterology*, 149(3), 563-566. doi: 10.1053/j.gastro.2015.05.056
- Senda, T., Iizuka-Kogo, A., Onouchi, T., & Shimomura, A. (2007). Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia. *Med Mol Morphol*, 40(2), 68-81. doi: 10.1007/s00795-006-0352-5
- Serafini, T., Kennedy Te Fau - Galko, M. J., Galko Mj Fau - Mirzayan, C., Mirzayan C Fau - Jessell, T. M., Jessell Tm Fau - Tessier-Lavigne, M., & Tessier-Lavigne, M. (1994). The netrins define a family of axon outgrowth-promoting proteins homologous to *C. elegans* UNC-6. (0092-8674 (Print)).
- Sharp, A., Pichert, G., Lucassen, A., & Eccles, D. (2004). RNA analysis reveals splicing mutations and loss of expression defects in MLH1 and BRCA1. *Hum Mutat*, 24(3), 272. doi: 10.1002/humu.9267
- Shin, S. K., Nagasaka, T., Jung, B. H., Matsubara, N., Kim, W. H., Carethers, J. M., . . . Goel, A. (2007). Epigenetic and genetic alterations in Netrin-1 receptors UNC5C and DCC in human colon cancer. *Gastroenterology*, 133(6), 1849-1857.
- Sieber, O. M., Heinemann, K., Gorman, P., Lamlum, H., Crabtree, M., Simpson, C. A., . . . Tomlinson, I. P. (2002). Analysis of chromosomal instability in human colorectal adenomas with two mutational hits at APC. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(26), 16910-16915. doi: 10.1073/pnas.012679099
- Sieber, O. M., Lamlum, H., Crabtree, M. D., Rowan, A. J., Barclay, E., Lipton, L., . . . Heinemann, K. (2002). Whole-gene APC deletions cause classical familial adenomatous polyposis, but not attenuated polyposis or "multiple" colorectal adenomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(5), 2954-2958.
- Sieber, O. M., Lipton, L., Crabtree, M., Heinemann, K., Fidalgo, P., Phillips, R. K., . . . Tomlinson, I. P. (2003). Multiple colorectal adenomas, classic

BIBLIOGRAFIA

- adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med*, 348(9), 791-799.
- Sieber, O. M., Segditsas, S., Knudsen, A. L., Zhang, J., Luz, J., Rowan, A. J., . . . Tomlinson, I. P. (2006). Disease severity and genetic pathways in attenuated familial adenomatous polyposis vary greatly but depend on the site of the germline mutation. *Gut*, 55(10), 1440-1448. doi: 10.1136/gut.2005.087106
- Slattery, M. L., Samowitz, W., Ballard, L., Schaffer, D., Leppert, M., & Potter, J. D. (2001). A molecular variant of the APC gene at codon 1822: its association with diet, lifestyle, and risk of colon cancer. *Cancer Res*, 61(3), 1000-1004.
- Spurdle, A. B., Couch, F. J., Hogervorst, F. B., Radice, P., & Sinilnikova, O. M. (2008). Prediction and assessment of splicing alterations: implications for clinical testing. *Hum Mutat*, 29(11), 1304-1313.
- Stadler, Z. K., Thom, P., Robson, M. E., Weitzel, J. N., Kauff, N. D., Hurley, K. E., . . . Offit, K. (2010). Genome-Wide Association Studies of Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(27), 4255-4267. doi: 10.1200/jco.2009.25.7816
- Stamos, J. L., & Weis, W. I. (2012). The -Catenin Destruction Complex. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(1), a007898-a007898. doi: 10.1101/cshperspect.a007898
- Stern, H. S., Viertelhausen, S., Hunter, A. G. W., O'Rourke, K., Cappelli, M., Perras, H., . . . Lagarde, A. E. (2001). APC I1307K increases risk of transition from polyp to colorectal carcinoma in Ashkenazi Jews. *Gastroenterology*, 120(2), 392-400. doi: 10.1053/gast.2001.21170
- Su, L. K., Burrell, M., Hill, D. E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., . . . Kinzler, K. W. (1995). APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res*, 55(14), 2972-2977.
- Su, L. K., Johnson, K. A., Smith, K. J., Hill, D. E., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1993). Association between wild type and mutant APC gene products. *Cancer Res*, 53(12), 2728-2731.
- Syngal, S., Fox, E. A., Li, C., Dovidio, M., Eng, C., Kolodner, R. D., & Garber, J. E. (1999). Interpretation of genetic test results for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: implications for clinical predisposition testing. *JAMA*, 282(3), 247-253.

T

- Tavtigian, S. V., Greenblatt, M. S., Lesueur, F., Byrnes, G. B., & Group, I. U. G. V. W. (2008). In silico analysis of missense substitutions using sequence-alignment based methods. *Hum Mutat*, 29(11), 1327-1336. doi: 10.1002/humu.20892

- Therkildsen, C., Jonsson G Fau - Dominguez-Valentin, M., Dominguez-Valentin M Fau - Nissen, A., Nissen A Fau - Rambech, E., Rambech E Fau - Halvarsson, B., Halvarsson B Fau - Bernstein, I., . . . Nilbert, M. (2013). Gain of chromosomal region 20q and loss of 18 discriminates between Lynch syndrome and familial colorectal cancer. (1879-0852 (Electronic)).
- Thiebault, K., Mazelin, L., Pays, L., Llambi, F., Joly, M. O., Scoazec, J. Y., . . . Mehlen, P. (2003). The netrin-1 receptors UNC5H are putative tumor suppressors controlling cell death commitment. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*(7), 4173-4178. doi: 10.1073/pnas.0738063100
- Thompson, B. A., Spurdle, A. B., Plazzer, J. P., Greenblatt, M. S., Akagi, K., Al-Mulla, F., . . . Genuardi, M. (2014). Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2,360 unique mismatch repair gene variants in the InSiGHT locus-specific database. *Nat Genet*, *46*(2), 107-115.
- Toda, K., Nagasaka, T., Umeda, Y., Tanaka, T., Kawai, T., Fuji, T., . . . Fujiwara, T. (2015). Genetic and epigenetic alterations of netrin-1 receptors in gastric cancer with chromosomal instability. *Clin Epigenetics*, *7*(1), 73. doi: 10.1186/s13148-015-0096-y
- Tournier, I., Vezain, M., Martins, A., Charbonnier, F., Baert-Desurmont, S., Olschwang, S., . . . Tosi, M. (2008). A large fraction of unclassified variants of the mismatch repair genes MLH1 and MSH2 is associated with splicing defects. *Hum Mutat*, *29*(12), 1412-1424.
- Toyota, M., Ahuja, N., Ohe-Toyota, M., Herman, J. G., Baylin, S. B., & Issa, J. P. (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*, 8681-8686.

U

- Umar, A., Boland, C. R., Terdiman, J. P., Syngal, S., de la Chapelle, A., Ruschoff, J., . . . Srivastava, S. (2004). Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*, *96*(4), 261-268.

V

- Valle, L. (2014). Genetic predisposition to colorectal cancer: where we stand and future perspectives. *World J Gastroenterol*, *20*(29), 9828-9849. doi: 10.3748/wjg.v20.i29.9828
- Valle, L., Perea, J., Carbonell, P., Fernandez, V., Dotor, A. M., Benitez, J., & Urioste, M. (2007). Clinicopathologic and pedigree differences in amsterdam I-positive hereditary nonpolyposis colorectal cancer families

BIBLIOGRAFIA

- according to tumor microsatellite instability status. *J Clin Oncol*, 25(7), 781-786.
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., . . . Clevers, H. (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, 111(2), 241-250.
- Vasen, H. F. (2000). When should endoscopic screening in familial adenomatous polyposis be started? *Gastroenterology*, 118(4), 808-809. doi: S0016508500792092 [pii]
- Vasen, H. F., Mecklin, J. P., Khan, P. M., & Lynch, H. T. (1991). The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum*, 34(5), 424-425.
- Vasen, H. F., Watson, P., Mecklin, J. P., & Lynch, H. T. (1999). New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*, 116(6), 1453-1456.

W

- Wallis, Y. L., Morton, D. G., McKeown, C. M., & Macdonald, F. (1999). Molecular analysis of the APC gene in 205 families: extended genotype-phenotype correlations in FAP and evidence for the role of APC amino acid changes in colorectal cancer predisposition. *J Med Genet*, 36(1), 14-20.
- Wang, L., Liu, X., Gusev, E., Wang, C., & Fagotto, F. (2014). Regulation of the phosphorylation and nuclear import and export of beta-catenin by APC and its cancer-related truncated form. *J Cell Sci*, 127(Pt 8), 1647-1659. doi: 10.1242/jcs.131045
- Weren, R. D., Venkatachalam, R., Cazier, J. B., Farin, H. F., Kets, C. M., de Voer, R. M., . . . Kuiper, R. P. (2015). Germline deletions in the tumour suppressor gene FOCAD are associated with polyposis and colorectal cancer development. *J Pathol*, 236(2), 155-164. doi: 10.1002/path.4520
- Winawer, S., Fletcher, R., Rex, D., Bond, J., Burt, R., Ferrucci, J., . . . Simmang, C. (2003). Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology*, 124(2), 544-560.
- Winawer, S. J., Fletcher, R. H., Miller, L., Godlee, F., Stolar, M. H., Mulrow, C. D., . . . Mayer, R. J. (1997). Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology*, 112(2), 594-642.
- Woodage, T., King, S. M., Wacholder, S., Hartge, P., Struewing, J. P., McAdams, M., . . . Brody, L. C. (1998). The APC1307K allele and cancer risk in a community-based study of Ashkenazi Jews. *Nat Genet*, 20(1), 62-65.

Woolf Cm Fau - Richards, R. C., Richards Rc Fau - Gardner, E. J., & Gardner, E. J. (1955). Occasional discrete polyps of the colon and rectum showing an inherited tendency in a kindred. (0008-543X (Print)). doi: D - CLML: 5528:2846:149:270:453:486 OTO - NLM

Y

Yamaguchi, S., Ogata, H., Katsumata, D., Nakajima, M., Fujii, T., Tsutsumi, S., . . . Kato, H. (2014). MUTYH-associated colorectal cancer and adenomatous polyposis. *Surg Today*, 44(4), 593-600. doi: 10.1007/s00595-013-0592-7

Yan, H., Papadopoulos, N., Marra, G., Perrera, C., Jiricny, J., Boland, C. R., . . . Vogelstein, B. (2000). Conversion of diploidy to haploidy. *Nature*, 403(6771), 723-724.

Z

Zauber, N. P., Sabbath-Solitare, M., Marotta, S., Zauber, A. G., Foulkes, W., Chan, M., . . . Bishop, D. T. (2005). Clinical and genetic findings in an Ashkenazi Jewish population with colorectal neoplasms. *Cancer*, 104(4), 719-729. doi: 10.1002/cncr.21230

Zauber, P., Bishop, T., Taylor, C., Sabbath-Solitare, M., Marotta, S., & Tomlinson, I. (2014). Colorectal tumors from APC*I1307K carriers principally harbor somatic APC mutations outside the A8 tract. *PLoS One*, 9(1), e84498. doi: 10.1371/journal.pone.0084498

Zauber, P., Marotta, S. P., & Sabbath-Solitare, M. (2013). Detailed molecular genetics of the APC*E1317Q mutation in tumor tissue suggest it may not be pathologically significant. *Diagn Mol Pathol*, 22(3), 161-163. doi: 10.1097/PDM.0b013e3182830889

Zhang, F., White, R. L., & Neufeld, K. L. (2000). Phosphorylation near nuclear localization signal regulates nuclear import of adenomatous polyposis coli protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(23), 12577-12582. doi: 10.1073/pnas.230435597