

VARIANTS DEL GEN *APC* I CÀNCER COLORECTAL

Memòria presentada per
Mireia Menéndez i Vilà

Per optar al Grau de
Doctor

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Gabriel Capellà Munar
a l'Institut Català d'Oncologia.

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

Programa de Doctorat de Genètica. Bienni 2002-2004.

Tutor: Rafael Romero Benedí

Gabriel Capellà Munar

Rafael Romero Benedí

Mireia Menéndez Vilà

Barcelona, juliol de 2007

Al Lluís

Als meus pares

A la meva germana

AGRAÏMENTS

Sou molts els qui, d'una manera o altra, heu contribuït a la realització d'aquesta tesi, i amb aquestes paraules us vull donar les gràcies a tots vosaltres.

Al meu director de tesi, Gabriel Capellá, per haver-me donat l'oportunitat d'endinsar-me en el món de la recerca, pel teu recolzament durant tots aquests anys de treball i la confiança dipositada en la meva feina.

A la Sara González, per tots els esforços dedicats en aquesta tesi, per tot el què m'has ensenyat, per tants consells, per haver-me ajudat en tot moment i per facilitar el camí que m'ha portat fins aquí.

Als meus companys del laboratori, als d'ara i als que ja han marxat, mil gràcies per la vostra ajuda, per compartir alegries i maldecaps, per estar sempre disposats a donar un cop de mà, pels vostres ànims i consells i també per l'art culinari amb què alguns de vosaltres ens heu obsequiat en les trobades que hem organitzat plegats. Amb vosaltres he après ciència i moltes altres coses més. Gràcies per tantes bones estones i per la vostra amistat.

Als membres de la Unitat de Consell Genètic de l'ICO, per l'aportació de les dades clíniques dels pacients, i especialment a l'Ignacio Blanco, per la teva contribució i ajuda, sobretot en els aspectes més clínics de la tesi.

Al Víctor Moreno, el Joan Valls i l'Eli Guinó de l'ICO, per la realització de les anàlisis estadístiques i per estar sempre disposats a aclarir-me els dubtes que em sorgien d'aquestes anàlisis.

A l'Oriol Bachs, el Josep M Estanyol, la Xus Pujol, la Núria Canela i l'Ana Domínguez de l'Hospital Clínic, per haver-me obert les portes del vostre laboratori, on hi he passat moltes i molt bones estones aprenent a treballar amb proteïnes. Moltes gràcies per la vostra ajuda i col·laboració.

A l'Antonio Pineda, del CIPF de València, per la realització de les simulacions moleculars de les interaccions entre proteïnes, i per la teva sempre amable disponibilitat per explicar-me tot allò què havia de saber per poder fer una bona interpretació dels resultats.

Als meus amics, per tots aquest anys d'amistat en els què hem crescut junts, per tantes vivències compartides, per totes les sortides, festes, viatges, sopars, i per la infinitat de converses i rialles, que fan que la vida sigui "genial i fantàstica", fins i tot en aquesta última època d'estrès en la què he estat escrivint la tesi. Tenir uns amics com vosaltres és una gran sort.

Als pares del Lluís, a la Laura i a l'Óscar, per fer-me sentir com una més de la família. Fina, gràcies per la complicitat que sempre em vas mostrar; el teu record sempre ens acompanya.

Als meus pares, per estimar-me tant, per estar sempre al meu costat, per donar-me ànims i forces sempre que ho he necessitat, per tot el què m'heu ensenyat i per haver-me donat l'oportunitat d'arribar fins aquí. Gràcies per tot el què heu fet i feu per mi, i per haver-me fet sempre tan feliç.

A la meva germana. La teva arribada era el què més il·lusió em feia al món. Gràcies per la teva espontaneïtat i alegria, per compartir sempre amb tant entusiasme les teves opinions i inquietuds, per la teva sinceritat, per envair-nos sempre d'aire fresc, per ser com ets.

Lluís, gràcies per la teva manera de ser, de fer i d'estimar, pel teu suport incondicional, per tot el què hem viscut plegats, per trobar sempre el costat més alegre de la vida i fer-me somriure quan més ho he necessitat, i per la infinita paciència d'aquests últims mesos. Gràcies per fer-me tan feliç, per tants moments, per tot.

ABREVIATURES

AA	Aminoàcid
AFAP	<i>Attenuated Familial Adenomatous Polyposis</i>
AINEs	Antiinflamatoris No Esteroidals
APC	<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>
BER	<i>Base Excision Repair</i>
CCR	Càncer colorectal
CIN	<i>Chromosome instability</i>
CTNNB1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1
DAB	3-3'Diaminobenzidina
DNA	Àcid desoxiribonucleic
DTT	Ditiotreitol
FAP	<i>Familial Adenomatous Polyposis</i>
FBS	<i>Fetal Bovine Serum</i>
FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
FT	<i>Flow-through</i>
GSK3 β	<i>Glycogen synthase kinase 3β</i>
GST	<i>Glutathione S-transferase</i>
HNPCC	<i>Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer</i>
IPTG	Isopropil- β -D-tio-galactòsid
MAP	<i>MYH Associated Polyposis</i>
MCR	<i>Mutation Cluster Region</i>
MMR	<i>Mismatch repair genes</i>
MSI	<i>Microsatellite instability</i>
NES	<i>Nuclear export signals</i>
NLS	<i>Nuclear localization signals</i>
OR	<i>Odds Ratio</i>
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PMSF	<i>Phenylmethanesulphonylfluoride</i>
RER	<i>Replication error</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RMSD	<i>Root Mean Square Deviation</i>
RNA	Àcid ribonucleic
RUs	<i>Resonance Units</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecylsulfate polyacrilamide gel electrophoresis</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
SSCP	<i>Single-Strand Conformation Polymorphism</i>
TA	Temperatura ambient
TBE	Tris-borat-EDTA
TBS	<i>Tris-Buffered Saline</i>
TBST	<i>Tris-Buffered Saline-Tween</i>
TK	<i>Thymidine kinase</i>
Tm	<i>Melting temperature</i>
UV	Ultraviolat
WB	<i>Western Blotting</i>
WT	<i>Wild type</i>

ÍNDEX

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ.....	1
1. CÀNCER COLORECTAL	3
1.1 Epidemiologia del càncer colorectal.....	3
1.2 Anatomia patològica.....	4
1.2.1 Anatomia i histologia del còlon i recte	4
1.2.2 L'epiteli intestinal	5
1.2.3 Sequència adenoma-carcinoma	6
1.2.4 Estadiatge del càncer colorectal.....	6
2. BASES MOLECULARS DEL CÀNCER COLORECTAL.....	8
3. LA PROTEÏNA APC.....	11
3.1 Dominis funcionals de la proteïna APC.....	12
3.2 Funcions de la proteïna APC	15
3.2.1 APC a la via de senyalització Wnt.....	15
3.2.2 Migració i adhesió cel·lular	17
3.2.3 Control del cicle cel·lular.....	18
3.2.4 Apoptosi.....	18
3.2.5 Estabilitat cromosòmica.....	18
3.3. Impacte funcional de les mutacions del gen <i>APC</i>	19
4. CÀNCER COLORECTAL HEREDITARI.....	19
4.1 Càncer colorectal hereditari no polipós (HNPCC) o síndrome de Lynch	19
4.2 Síndromes poliposes.....	21
4.2.1 Poliposis Adenomatoses	22
4.2.1.1 Poliposi Adenomatosa Familiar (FAP)	22
4.2.1.2 Poliposi Adenomatosa Familiar Atenuada (AFAP)	23
4.2.1.3 Mutacions germinals i somàtiques del gen <i>APC</i>	24
4.2.1.4 Variants <i>missense</i> del gen <i>APC</i>	25
4.2.1.5 Correlacions genotip-fenotip	26
4.2.1.6 Poliposi Associada a <i>MYH</i> (MAP).....	27

4.2.2 Poliposis Hamartomatoses	28
4.2.2.1 Síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ)	28
4.2.2.2 Poliposi Juvenil Familiar.....	28
4.2.2.3 Síndrome de Cowden	28
4.2.2.4 Síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley	29
4.3 Consell genètic.....	29
HIPÒTESI	31
OBJECTIUS	35
MATERIALS I MÈTODES	39
1. INDIVIDUS.....	41
1.1 Controls i casos de CCR esporàdic	41
1.2 Casos de CCR hereditari	41
1.3 Adenomes colorectals esporàdics.....	42
2. IDENTIFICACIÓ DE VARIANTS I POLIMORFISMES DEL GEN <i>APC</i>	42
2.1 Identificació de variants del gen <i>APC</i> per SSCP.....	42
2.1.1 Preparació dels gels i condicions d'electroforesi	43
2.1.2 Tinció amb nitrat de plata	43
2.2 Identificació de variants del gen <i>APC</i> amb sondes d'hibridació fluorescents	44
2.3 Identificació de polimorfismes del gen <i>APC</i> per RFLP.....	47
2.4 Anàlisis estadístiques utilitzades per a l'estudi de la variant <i>APC D1822V</i>	47
3. ANÀLISI MOLECULAR DEL GEN <i>CTNNB1</i>	48
4. ANÀLISI MOLECULAR DEL GEN <i>MYH</i>	48
5. MÈTODES D'OBTENCIÓ I MANIPULACIÓ DEL DNA.....	48
5.1 Extracció del DNA	48
5.1.1 Extracció de DNA a partir de sang perifèrica.....	48
5.1.2 Extracció de DNA a partir de teixit congelat	49
5.2 Electroforesi del DNA	49
5.2.1 Electroforesi del DNA en gels d'agarosa	49
5.2.2 Electroforesi del DNA en gels d'acrilamida.....	49
5.3 Purificació del DNA	50

5.3.1 Purificació de productes de PCR.....	50
5.3.2 Purificació del DNA a partir de gels d'agarosa	50
5.3.3 Aïllament i purificació del DNA plasmídic	50
5.4 Seqüenciació del DNA	50
5.5 Vectors d'expressió gènica	51
5.5.1 Construcció pGEX-APC-4x15.....	52
5.6 Mutagènesi dirigida	53
5.7 Transformació bacteriana.....	53
6. MÈTODES DE DETECCIÓ DE PROTEÏNES.....	54
6.1 Electroforesi de proteïnes per SDS-PAGE.....	54
6.1.1 Sistema Mini-PROTEAN.....	54
6.1.2 Sistema NuPAGE	55
6.2 Transferència de proteïnes (<i>Western Blotting</i>) i immunodetecció.....	55
6.2.1 Sistema Mini-PROTEAN.....	56
6.2.2 Sistema NuPAGE	57
6.3 Immunohistoquímica de β -catenina	57
6.3.1 Tinció hematoxilina-eosina	57
6.3.2 Tinció de β -catenina	58
7. EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS I ANÀLISI DE LES SEVES INTERACCIONS.....	59
7.1 Obtenció de proteïnes recombinants	59
7.1.1 Expressió i purificació de proteïnes recombinants en procarïotes.....	59
7.1.2 Eliminació del domini GST de proteïnes recombinants	59
7.1.3 Quantificació de proteïnes.....	60
7.1.4 Precipitació de proteïnes amb àcid tricloroacètic (TCA).....	60
7.2 Anàlisi d'interaccions moleculars per cromatografia d'afinitat.....	60
7.2.1 Interacció de β -catenina amb els pèptids APC Asn1026 i Ser1026	60
7.2.2 Interacció de β -catenina amb les proteïnes de fusió APC-4x15-WT, Ser1026 i Ser1129.....	62
7.3 Anàlisi d'interaccions moleculars (proteïna - proteïna) per BIAcore	62
7.4 Anàlisi estructural de la interacció entre el pèptid APC Ser1026 i β -catenina	64

8. ASSAJOS FUNCIONALS AMB LÍNIES CEL·LULARS	64
8.1 Característiques de la línia cel·lular SW480.....	64
8.2 Transfeccions transitòries	65
8.3 Anàlisi dels nivells d'expressió d'APC, β -catenina i c-myc.....	66
8.3.1 Western Blotting	66
8.3.2 Immunocitoquímica.....	66
8.4 Assajos de l'activitat transcripcional.....	67
8.5 Transcripció reversa (RT) i PCR quantitativa (PCRq).....	67
8.6 Anàlisis estadístiques.....	68
RESULTATS	69
1. IDENTIFICACIÓ I ESTUDI DE VARIANTS DEL GEN <i>APC</i>	71
1.1 Variant <i>APC</i> G101E	73
1.2 Variant <i>APC</i> A2274V.....	76
1.3 Variant <i>APC</i> G2502S	77
1.4 Variant <i>APC</i> P2681L	78
2. VARIANT <i>APC</i> D1822V	79
2.1 Estudi d'associació cas-control	79
2.2 Determinació de pèrdua al·lèlica en teixits tumorals	83
3. VARIANT <i>APC</i> N1026S	86
3.1 Estudis moleculars	87
3.1.1 La variant N1026S a la família d'AFAP	87
3.1.2 Estudi poblacional.....	88
3.2 Estudis funcionals	89
3.2.1 Anàlisi de la interacció de β -catenina amb els pèptids <i>APC</i> Asn1026 i Ser1026 per cromatografia d'afinitat.....	89
3.2.2 Interacció de β -catenina amb els fragments <i>APC</i> -4x15-WT i Ser1026	91
3.2.2.1 Experiments de cromatografia d'afinitat.....	92
3.2.2.2 Experiments amb BIAcore	92
3.2.3 Anàlisi estructural de la interacció entre el pèptid <i>APC</i> Ser1026 i β -catenina	93

3.2.4 Efecte de la variant N1026S en la transcripció mitjançada pel complex β -catenina/Tcf-4	96
3.2.5 Efecte de la variant N1026S en la transcripció del gen <i>c-myc</i>	98
3.2.6 Estudi dels nivells de β -catenina i la seva distribució cel·lular a les cèl·lules SW480 transfectades	99
3.2.7 Estudi dels nivells de proteïna <i>c-myc</i> a les cèl·lules SW480 transfectades .	100
3.2.8 Detecció de β -catenina en teixits per immunohistoquímica.....	101
4. VARIANT APC L1129S.....	101
4.1 Estudis moleculars	102
4.1.1 Identificació de la variant L1129S a les famílies de poliposi.....	102
4.1.2 Estudi poblacional.....	103
4.2 Estudis funcionals	103
4.2.1 Interacció de β -catenina amb els fragments APC-4x15-WT i Ser1129	104
4.2.1.1 Experiments de cromatografia d'afinitat.....	104
4.2.1.2 Experiments amb BIAcore	104
4.2.2 Detecció de β -catenina en teixits per immunohistoquímica.....	105
DISCUSSIÓ	107
SUMARI.....	123
CONCLUSIONS	127
BIBLIOGRAFIA	131
ANNEXOS	145

INTRODUCCIÓ

1. CÀNCER COLORECTAL

1.1 Epidemiologia del càncer colorectal

El càncer colorectal (CCR) és actualment la segona causa de mort per càncer en la majoria dels països desenvolupats, tant en homes com en dones. Només en aquest darrer any, més de mig milió de persones d'arreu del món van morir a causa d'aquesta malaltia, que s'inicia amb l'aparició de pòlips adenomatosos benignes a l'epiteli colorectal, que amb el temps es transformaran en tumors malignes.

A Catalunya es diagnostiquen al voltant de 2.370 casos nous per any de CCR en homes i 2.900 en dones (estimació d'incidència a l'any 2005 segons el Pla Director d'Oncologia a Catalunya 2001-2004, Generalitat de Catalunya). El CCR és el segon càncer més freqüent en les dones (darrera del càncer de mama) i el tercer en els homes (darrera del càncer de pulmó i de pròstata), així com el més freqüent si es consideren els dos sexes alhora. La incidència ha tingut una tendència d'increment anual significativa en els últims anys (3,5% anual en els homes i 2,7% en les dones). Pel que fa a la mortalitat, el CCR és la segona causa de mort per càncer tant en els homes com en les dones amb 1.900 morts anuals.

L'edat més freqüent de presentació del CCR és entre la cinquena i setena dècada de la vida. A Catalunya l'edat mitjana d'incidència es situa al voltant dels 68 anys en els homes i dels 70 anys en les dones.

En el desenvolupament del CCR hi intervenen factors genètics i ambientals. El CCR és el resultat d'un procés gradual d'adquisició de noves característiques per part de les cèl·lules epitelials, és un procés continu d'acumulació de múltiples canvis genètics i epigenètics. Però la dieta, l'estil de vida i altres factors no genètics també tenen un fort impacte en el risc de desenvolupar CCR. Nombrosos estudis epidemiològics suggereixen que determinats factors ambientals, majoritàriament de tipus dietètic (Levin, 1992), juguen un paper molt important en el desenvolupament del CCR en la majoria d'individus. Hi ha, però, controvèrsies entre els diferents estudis a l'hora de clarificar quins poden ser els factors protectors (com per exemple, els vegetals i la fibra) i els factors de risc de la nostra dieta (Potter, 1999).

El CCR pot ser esporàdic, hereditari o familiar. La major part dels casos de CCR corresponen a formes esporàdiques (70-80%), mentre que una petita proporció d'aquests corresponen a formes hereditàries (<5%) (de la Chapelle, 2004). Les dues síndromes hereditàries més freqüents i ben estudiades són la Poliposi Adenomatosa Familiar (FAP, *Familial Adenomatous Polyposis*) i el Càncer Colorectal Hereditari No Polipós (HNPCC, *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*). Més endavant es

discutiran amb detall aquestes formes hereditàries de CCR (veure apartat 4). S'estima que en un 20-25% dels casos de CCR pot existir un component hereditari associat encara no ben establert, el què es coneix com CCR familiar; en aquestes famílies, el CCR es desenvolupa amb una freqüència superior a la del CCR esporàdic però no segueix el patró característic d'una síndrome hereditària (Burt, 2000; Winawer et al., 1997).

1.2 Anatomia patològica

1.2.1 Anatomia i histologia del còlon i recte

L'intestí gros es divideix en tres trams: el cec, el còlon i el tros final anomenat recte. Anatòmicament, el còlon es subdivideix en quatre trams: ascendent, transvers, descendent i sigmoide. A nivell clinicopatològic sovint es subdivideix en dues parts: còlon proximal o dret, que comprèn el cec, el còlon ascendent i el transvers; i còlon distal o esquerre, format pel còlon descendent, el sigmoide i el recte (Figura 1).

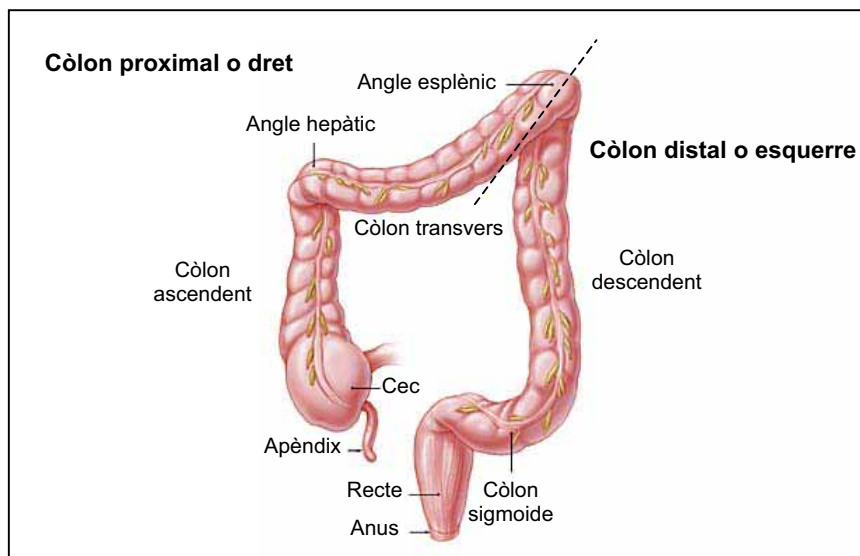


Figura 1. Representació esquemàtica de l'intestí gros.

L'intestí gros està format per diferents capes que són, de la llum cap a l'exterior: mucosa (cèl·lules epitelials, membrana basal, làmina pròpia i muscularis mucosa), submucosa, muscularis propia, subserosa i serosa (Figura 2).

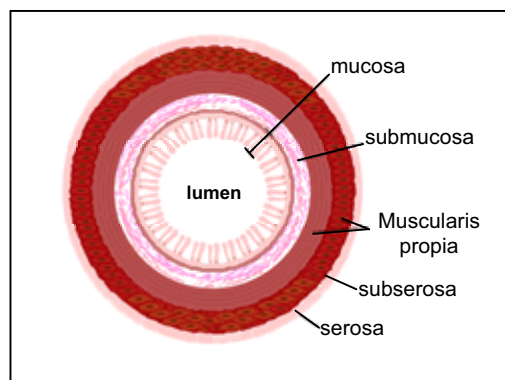


Figura 2. Esquema de la secció transversal de l'intestí gros.

1.2.2 L'epiteli intestinal

La capa més interna o luminal de l'intestí gros, la mucosa, és una monocapa de cèl·lules epitelials que presenta un elevat nombre d'invaginacions anomenades criptes de Lieberkühn. En el fons de les criptes hi trobem les cèl·lules mare (*stem cells*), que són cèl·lules indiferenciades totipotents que proliferen i donen lloc a la resta de fenotips cel·lulars, que migren cap a la superfície a mesura que es van diferenciant (Reya i Clevers, 2005) (Figura 3).

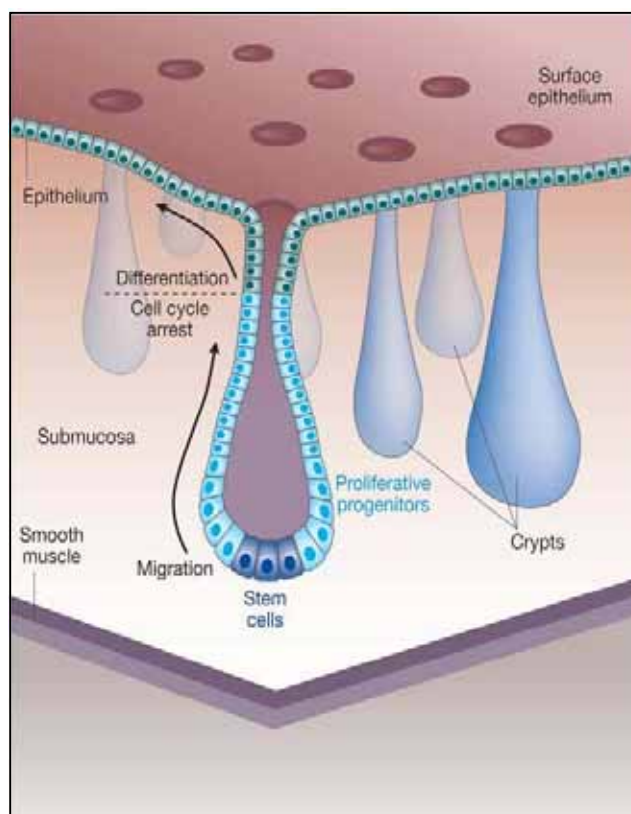


Figura 3. Anatomia de l'epiteli colorectal. Extret de Reya i Clevers, 2005.

Les cèl·lules mare generen cèl·lules progenitores que ocupen la tercera part més basal de la cripta, on es divideixen cada 12 hores aproximadament (van de Wetering et al., 2002). A la regió mitjana de la cripta, les cèl·lules es diferencien en un dels tres tipus cel·lulars del còlon: enteròcits o colonòcits, cèl·lules caliciformes i cèl·lules endocrines. A la superfície epitelial, les cèl·lules ja diferenciades pateixen un procés d'apoptosi i/o extrusió cap al lumen. El procés de renovació cel·lular és continu i triga aproximadament entre 3 i 5 dies (Potten i Loeffler, 1990).

Algunes de les característiques funcionals dels epitelis fan més probable que siguin susceptibles de ser l'origen d'un càncer: per una banda, alguns epitelis com l'intestinal pateixen un recanvi cel·lular força ràpid, i això facilita l'aparició d'errors replicatius i d'altres alteracions moleculars associades al càncer. També l'epiteli intestinal actua de barrera física a l'entrada d'elements nocius que podrien originar alteracions moleculars amb capacitat oncogènica. Els tumors epitelials suposen més d'un 80% de tots els tumors humans.

1.2.3 Sequència adenoma-carcinoma

En la progressió del CCR hi ha una seqüència d'esdeveniments molt ben definida, que va des de la proliferació de les criptes aberrants o hiperplàsia als adenomes benignes, després al carcinoma *in situ* i, finalment, al carcinoma invasor i metastàtic. Les primeres lesions en aparèixer són els focus de criptes aberrants. Després, algunes es transformen en adenomes primerencs, que aniran creixent i es transformaran en adenomes intermedis, i després en adenomes tardans. Amb el temps, els adenomes adquireixen una estructura més desorganitzada formada per cèl·lules que presenten displàsia i evolucionen cap a carcinomes. Es parla de càncer quan les cèl·lules invasives arriben a la membrana basal de l'epiteli. La detecció i extirpació dels adenomes, alguns dels quals podrien evolucionar cap a carcinomes, evita el desenvolupament de la malaltia.

1.2.4 Estadiatge del càncer colorectal

El pronòstic dels pacients amb CCR depèn de diversos factors. El factor predictiu més determinant és l'estadi del tumor, que es defineix en funció del seu grau d'invasió a través de les diferents capes de la paret intestinal, de l'afectació ganglionar i de la presència de metàstasis a distància. El tractament depèn, en gran mesura, de l'estadi en què es troba el tumor en el moment del diagnòstic. Per estadis inicials només és necessària la cirurgia; en canvi, per estadis més avançats també cal una teràpia adjuvant mitjançant la quimioteràpia (principalment mitjançant administració sistèmica de 5-fluorouracil en combinació amb oxaliplatí) i/o la radioteràpia. Després de la cirurgia i la resecció total del tumor, la resposta és diferent en funció de l'estadi del tumor i de l'aplicació o no de teràpies adjuvants.

L'estadi evolutiu del CCR pot establir-se d'acord amb la classificació de Dukes modificada per Astler i Coller (Astler i Coller, 1954) (Taula 1) o el sistema TNM de la *International Union Against Cancer* (Fleming et al., 1997) (Taula 2).

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 metàstasi ganglionar
D	Metàstasi a distància o invasió parietal d'òrgans adjacents

Taula 2. Classificació TNM per al càncer colorectal.

Categories T	Extensió que ocupa el tumor primari
Tx	La informació és incompleta i no es pot definir l'extensió del tumor
Tis	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 cap teixit veí
T4	El tumor envaeix altres òrgans o estructures
Categories N	Absència o presència de metàstasi als ganglis limfàtics
Nx	La informació és incompleta i no es coneix l'afectació de ganglis limfàtics
N0	No hi ha cap gangli afectat
N1	1-3 ganglis positius
N2	4 o més ganglis positius
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

El sistema TNM ens permet classificar els tumors en quatre estadis diferents. Aquesta classificació es correlaciona amb el pronòstic dels pacients. La detecció precoç del càncer en els primers estadis del desenvolupament és molt important perquè millora notablement la supervivència dels pacients (Taula 3).

Taula 3. Classificació del CCR pel sistema TNM i pronòstic dels pacients amb CCR en funció de l'estadi TNM.

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

La detecció i diagnòstic del CCR en fases inicials millora el pronòstic i les possibilitats de curació i, al mateix temps, possibilita una menor agressivitat terapèutica i una millor qualitat de vida. Per tant, la millor manera de prevenir el CCR és el diagnòstic en les primeres fases del tumor.

2. BASES MOLECULARS DEL CÀNCER COLORECTAL

El CCR és un bon model per estudiar les alteracions genètiques implicades en el desenvolupament de les neoplàsies al llarg de la seqüència adenoma-carcinoma ja que els tumors colòrectals malignes (carcinomes) provenen de tumors benignes preexistents (adenomes). A més, és possible obtenir mostres de tumors en diferents estadis de desenvolupament per fer els estudis genètics, des de petits adenomes fins a carcinomes metastàsics, tots ells ben caracteritzats histològicament. Això ha permès correlacionar els diferents estadis de progressió tumoral amb l'aparició i acumulació seqüencial d'alteracions en gens concrets, els quals inclouen gens supressors de tumors, oncogens i gens reparadors del DNA.

Durant el progrés del CCR es produeix una acumulació progressiva d'alteracions genètiques i epigenètiques que originen la transformació de les cèl·lules de l'epiteli colòrectal.

Fearon i Vogelstein (Fearon i Vogelstein, 1990) van proposar un model seqüencial d'alteracions genètiques associades als diferents estadis evolutius del CCR. En aquest model, el desenvolupament del CCR és el resultat de l'activació de determinats oncogenes (*KRAS*) i la inactivació de diversos gens supressors (*APC*, *DCC*, *DPC4/SMAD4*, *TP53*) (Figura 4).

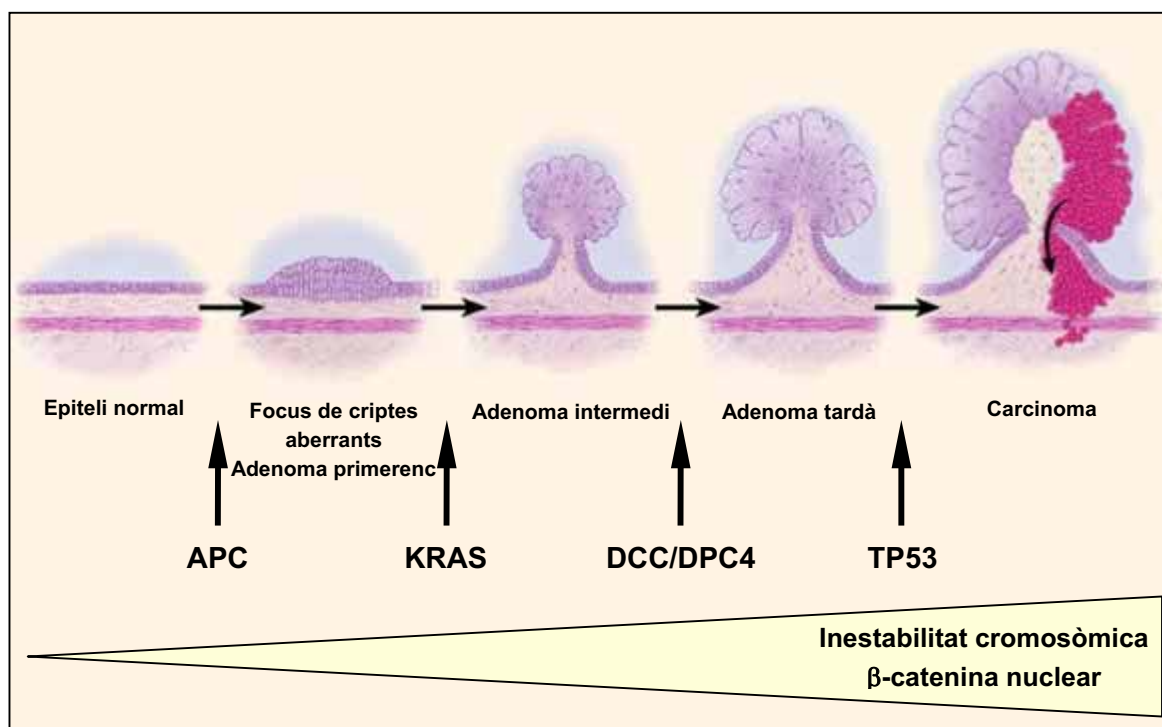


Figura 4. Model genètic de la carcinogènesi colorectal. Les mutacions del gen *APC* inicien el procés neoplàsic, i per a que els adenomes es transformin en carcinomes, són necessàries mutacions en altres gens com *KRAS*, *DCC/DPC4* o *TP53*. Finalment, alteracions en altres gens donen lloc a metàstasi. Modificat de Fearon i Vogelstein, 1990.

El gen supressor tumoral ***APC*** (*Adenomatous Polyposis Coli*) juga un paper clau en els estadis primerencs de la carcinogènesi colorectal humana, doncs la seva inactivació –originada per mutacions en els dos al·lells del gen–, és la responsable d'iniciar la cascada d'esdeveniments que donen lloc a la transformació maligna de l'epiteli del còlon. La pèrdua de funcionalitat del gen *APC* provoca la proliferació de l'epiteli normal, originant els focus de criptes aberrants, que són les lesions neoplàstiques més inicials, precursors dels adenomes primerencs.

Les mutacions germinals d'elevada penetrància del gen *APC* són responsables del 80-90% de casos de FAP, i les mutacions somàtiques en aquest gen són presents en un 80-85% dels carcinomes colorectals esporàdics (Strate i Syngal, 2005). El paper del gen *APC* serà extensament descrit en el següent capítol (veure apartat 3).

La subseqüent progressió tumoral s'associa a l'activació de l'oncogen **KRAS** (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), que provoca el creixement tridimensional de l'adenoma primerenc i la seva transformació cap a adenoma intermedi amb característiques histològiques velloses.

El gen *KRAS* codifica per la proteïna p21^{ras}, relacionada amb el control del creixement cel·lular. Aquesta proteïna s'adhereix a la cara interna de la membrana cel·lular, actua com a transmissor cap al nucli de senyals extracel·lulars de creixement cel·lular i pot trobar-se en dos estats funcionals. La forma activa (p21^{ras}-GTP) afavoreix l'activació de la cascada de les MAP quinases, i és llavors quan interacciona amb les molècules efectores que propaguen el senyal (Malumbres i Barbacid, 2003). La proteïna *KRAS* activada es desactiva ràpidament per la hidròlisi intrínseca del GTP, la qual afavoreix el retorn a la forma inactiva (p21^{ras}-GDP).

Les mutacions en el gen *KRAS* comporten l'activació permanent de p21^{ras}, que incrementa la transducció de senyal, augmentant així l'activitat proliferativa de la cèl·lula. *KRAS* es troba mutat aproximadament en un 40-60% dels CCR i la majoria de mutacions observades es troben als codons 12, 13, i 61 (Grady i Markowitz, 2002).

En la transició d'adenoma intermedi a adenoma tardà s'ha observat un augment de les pèrdues al·lèliques en la regió 18q21 (Fearon i Pierceall, 1995; Fearon i Vogelstein, 1990), una alteració cromosòmica que es detecta en un 70% dels carcinomes colorectals. S'han identificat dos gens supressors de tumors en aquest locus: **DCC** (*Deleted in Colorectal Cancer*) i **DPC4 (SMAD4)** (*Deleted in Pancreatic Cancer locus 4*). El gen *DCC* codifica per una proteïna de membrana homòloga a les molècules d'adhesió N-CAM i pot ser un factor important en el desenvolupament i/o progressió tumoral. El gen *SMAD4* codifica per una proteïna que participa en la via de transducció de senyals iniciada per TGF- β . Les mutacions en el gen *SMAD4*, presents en el 20% dels CCR, són responsables de la poliposi juvenil i comporten que la cèl·lula s'escapi del control negatiu exercit pel TGF- β sobre la proliferació cel·lular (Takaku et al., 1998).

Finalment, la inactivació del gen supressor tumoral **TP53** (*Tumor Protein p53*) es considera la base de la transició d'adenoma a carcinoma (Baker et al., 1989). Entre el 50-70% dels CCR tenen mutacions en aquest gen. El gen *TP53* codifica per la proteïna p53, una proteïna reguladora del cicle cel·lular que indueix parada del cicle quan hi ha dany al DNA, per a que es pugui reparar. Així, en el moment en que es produeix una lesió del DNA, hi ha un ràpid increment del nivells de TP53, que atura el cicle cel·lular a la fase G1 donant temps a la cèl·lula per a que repari el dany genètic. Si la cèl·lula no aconsegueix reparar el dany, a causa de l'excessiva acumulació de mutacions, TP53 indueix apoptosi. Les cèl·lules amb mutacions o pèrdues al·lèliques

de *TP53* no poden dur a terme aquestes funcions, per la qual cosa són incapaces d'aturar el procés neoplàstic (Hollstein et al., 1991).

L'acumulació d'aquestes alteracions genètiques, més que no pas l'ordre en què s'han adquirit, és la responsable de la transformació i progressió neoplàstica. També és important fer constar que probablement existeixen altres gens involucrats en la patogènesi del CCR esporàdic. De fet, diversos estudis han demostrat la presència de pèrdues d'heterozigositat en altres cromosomes (8p, 5q, 22q), el que suggereix la possible participació d'altres gens supressors avui per avui desconeguts (Castells et al., 1999).

La pèrdua de l'estabilitat genòmica es considera un pas clau en el procés de carcinogènesi ja que crea un ambient permissiu per a que es produeixin mutacions en gens supressors de tumors i oncogens. El CCR pot presentar, almenys, dos tipus d'instabilitat genòmica: instabilitat de microsatèl·lits (MSI, *microsatellite instability*) i instabilitat cromosòmica (CIN, *chromosome instability*) (Lengauer et al., 1998).

Els tumors dels casos d'HNPCC i un 8-15% dels tumors colorectals esporàdics es caracteritzen per la presència de múltiples errors en les seqüències repetitives del DNA (microsatèl·lits), que estan distribuïdes al llarg del genoma. Aquest fenomen s'anomena MSI i és degut a una acumulació d'errors en la replicació del DNA causada per la mutació dels gens de reparació de bases desaparellades del DNA (MMR, *mismatch repair*) *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*. Això resulta en una elevada taxa de mutació en tot el genoma, que és més evident en les zones amb tractes polyA o repeticions (CA)_n.

La instabilitat cromosòmica s'observa en un 85-92% dels tumors de CCR esporàdic i en la FAP. Els tumors amb CIN presenten una taxa de guanys i pèrdues cromosòmiques molt elevada. El model genètic proposat per Fearon i Vogelstein pel desenvolupament del CCR implica, fonamentalment, la via de la instabilitat cromosòmica. S'ha atribuït un paper molt important a *APC* en la generació d'aquesta instabilitat cromosòmica (Fodde et al., 2001).

3. LA PROTEÏNA APC

El gen *APC* es va localitzar l'any 1987 al cromosoma 5q21 mitjançant estudis de lligament (Bodmer et al., 1987; Leppert et al., 1987) i va ser l'any 1991 quan finalment va ser clonat, identificat i caracteritzat gràcies a la cerca d'alteracions en cèl·lules germinals (de pacients de FAP) i en cèl·lules somàtiques (de casos de CCR

esporàdic). D'aquesta manera es va arribar a demostrar la cosegregació de les mutacions d'*APC* amb la malaltia (Groden et al., 1991; Nishisho et al., 1991).

El gen *APC* consta de 8538 pb de seqüència codificant i està format per 15 exons. L'exó 15 és el més llarg, doncs compren més del 75% de la seqüència codificant i és la diana majoritària de les mutacions somàtiques i germinals identificades. El gen *APC* codifica per la proteïna APC, de 2843 aminoàcids (AA) i de massa molecular 312 kDa, que s'expressa en una àmplia varietat de teixits humans fetals i adults. A nivell cel·lular, la proteïna APC es localitza tant al nucli com al citoplasma, tot i que la seva distribució és predominantment citoplasmàtica (Brocardo et al., 2005).

3.1 Dominis funcionals de la proteïna APC

La proteïna APC consta de diferents dominis funcionals: domini d'homodimerització, repeticions armadillo, repeticions de 15 AA, repeticions de 20 AA, repeticions SAMP, domini bàsic, domini d'unió a EB1, domini d'unió a hDLG i PTP-BL, seqüències NES, seqüències NLS i dominis d'unió al DNA (Figura 5).

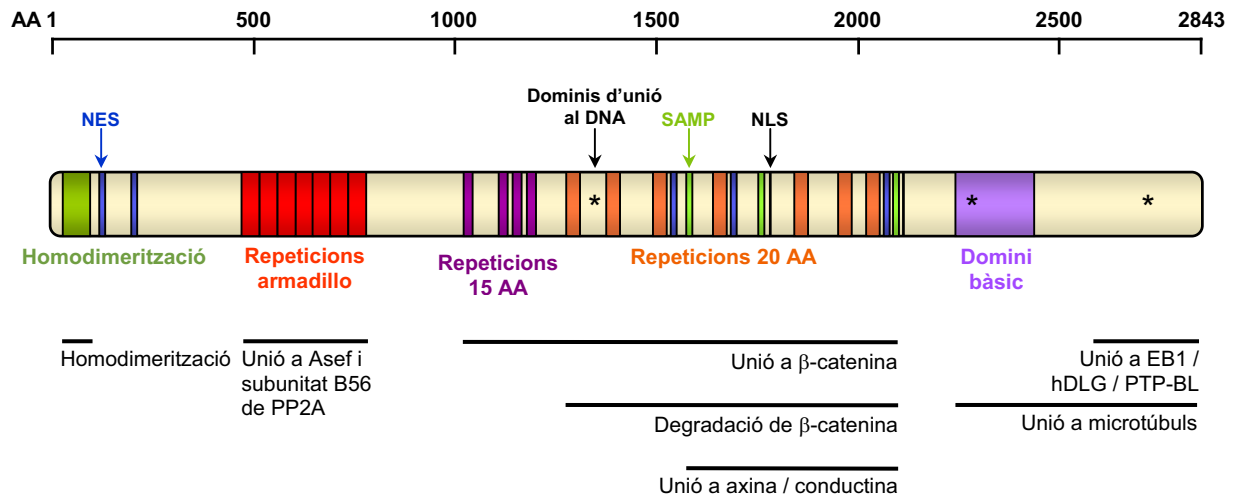


Figura 5. Dominis funcionals de la proteïna APC.

A l'extrem N-terminal de la proteïna es troba el **domini d'homodimerització**, format per repeticions de set residus hidrofòbics que permeten a la proteïna formar homodímers. S'ha descrit que els primers 45 AA ja són suficients per a l'homodimerització (Joslyn et al., 1993; Su et al., 1993a). La proteïna APC WT (*wild*

type) pot formar dímers tant amb la proteïna APC WT com amb la proteïna APC truncada. S'ha suggerit que les proteïnes APC truncades que mantenen la capacitat de formar homodímers amb la proteïna APC WT poden produir un efecte dominant negatiu reduint la funcionalitat de la proteïna WT (Dihlmann et al., 1999). En un altre estudi, però, s'ha observat que l'expressió simultània de proteïnes APC truncades i normals a l'epiteli intestinal de ratolins no dóna lloc a la formació d'adenomes (Oshima et al., 1995).

La **regió armadillo** consta de set repeticions de 42 AA. És una regió altament homòloga a les repeticions de la proteïna Armadillo, l'homòleg de β -catenina a *Drosophila*. Es localitza entre els AA 453-767 i està implicada en les interaccions proteïna-proteïna. S'han identificat dues proteïnes que s'uneixen a la regió armadillo: la subunitat reguladora B56 de la proteïna PP2A (*protein phosphatase 2A*) i Asef (*APC-stimulated guanine nucleotide exchange factor*). PP2A també s'uneix a l'axina, de manera que PP2A podria actuar com un antagonista de la fosforilació de la β -catenina per GSK3 β (*glycogen synthase kinase 3 β*), que marca la seva posterior degradació (Seeling et al., 1999). El complex APC-Asef podria regular l'estabilitat de la xarxa del citoesquelet d'actina (Kawasaki et al., 2000).

La regió central de la proteïna APC conté quatre **repeticions de 15 AA** que uneixen la β -catenina –un component important de la via Wnt i de les unions adherents–, i la plakoglobina (Rubinfeld et al., 1993; Su et al., 1993b). La quarta repetició, localitzada just a l'extrem C-terminal de la tercera repetició, ha estat recentment descrita (Eklof Spink et al., 2001). Però aquesta unió no condiciona la degradació de β -catenina, a no ser que la β -catenina també s'uneixi a la regió de les repeticions de 20 AA. Aquesta regió de repeticions de 15 AA, que compren els AA 1020-1187, és una regió molt conservada que es troba retinguda en la majoria de les proteïnes APC mutades, igual que la regió Armadillo.

La regió central de la proteïna APC conté sèries de set **repeticions de 20 AA** entre els AA 1265-2035 que uneixen i regulen a la baixa la β -catenina. La fosforilació d'aquesta regió per GSK3 β augmenta la capacitat d'APC d'unir-se a la β -catenina (Rubinfeld et al., 1996). La regulació a la baixa de la β -catenina depèn de la presència de com a mínim tres de les set repeticions de 20 AA (Rubinfeld et al., 1997). A la majoria de proteïnes truncades els falten totes o la majoria d'aquestes repeticions, i això suggereix que la pèrdua d'aquesta zona dóna un avantatge de creixement.

Entre les repeticions de 20 AA es localitzen tres **repeticions SAMP** (Ser-Ala-Met-Pro) que uneixen l'axina i el seu homòleg, conductina (Behrens et al., 1998; Kishida et al., 1998), dues proteïnes inhibidores de la via Wnt.

A l'extrem C-terminal, entre els AA 2200 i 2400, es localitza el **domini bàsic**, una regió enriquida amb AA bàsics (Arg, Lys) i residus de prolina. Aquest domini és una regió d'unió a microtúbuls i estimuladora de la polimerització de tubulina *in vitro* (Munemitsu et al., 1994).

Per altra banda, la **regió C-terminal** de l'APC juga un paper important en la progressió del cicle cel·lular o en el control del creixement mitjançant la unió a tres proteïnes diferents: EB1, hDLG i PTP-BL.

La proteïna APC s'associa indirectament als microtúbuls mitjançant la proteïna **EB1**, un membre de la família de les proteïnes d'unió a tubulina EB/RP (Su et al., 1995). EB1 està íntimament associada al centròmer, al fus mitòtic i als extrems distals positius dels microtúbuls en totes les fases del cicle cel·lular (Berrueta et al., 1998). Si s'elimina aquest domini d'unió a EB1, la proteïna APC encara es pot unir als microtúbuls pel domini bàsic, però ho fa indiscriminadament. La funció d'APC i EB1 és mantenir l'estabilitat genòmica modulant la integritat del fus mitòtic i la correcta segregació dels cromosomes. Els complexos APC/microtúbuls també intervenen en la migració cel·lular i/o l'adhesió.

Els AA 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** (Erdmann et al., 2000). 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. 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 la β -catenina o GSK3 β .

Recentment, diversos grups han identificat la presència de cinc senyals **NES** (*nuclear export signals*), dos a l'extrem N-terminal i tres a la regió de repeticions de 20 AA d'APC, concretament a la tercera, quarta i setena repetició (Henderson, 2000; Neufeld et al., 2000; Rosin-Arbesfeld et al., 2000). Aquestes seqüències NES, altament conservades, s'utilitzen per transportar la β -catenina nuclear cap al citoplasma per a la seva posterior degradació o incorporació a les unions adherents. L'absència d'aquestes seqüències NES dona lloc a l'acumulació de β -catenina al nucli, on activa els gens diana de la via Wnt (Rosin-Arbesfeld et al., 2003).

La proteïna APC també conté dos senyals de localització nuclear **NLS** (*nuclear localization signals*) entre els AA 1767-1772 i 2048-2053, necessaris per un òptim import nuclear de l'APC (Zhang et al., 2000). Mentre que la β -catenina entra al nucli independentment d'un senyal d'import nuclear, mitjançant la unió directa amb la maquinària del porus nuclear, la proteïna APC és massa gran per entrar al nucli sense la presència dels senyals NLS.

Quan APC es troba en el nucli, pot interaccionar directament amb el DNA per diverses regions. Els **dominis d'unió al DNA** es troben a la segona repetició de 20 AA, al domini bàsic i prop de l'extrem C-terminal. Aquests dominis s'uneixen preferencialment a les seqüències de DNA riques en A/T i podrien regular la transcripció directa o indirectament (Deka et al., 1999). Així doncs, si APC interacciona simultàniament amb els microtúbuls i amb el DNA, això podria indicar que juga un paper rellevant en la divisió cel·lular.

3.2 Funcions de la proteïna APC

Una de les funcions essencials de la proteïna APC és regular la via de senyalització Wnt, doncs el seu paper crític en la carcinogènesi recau en la seva funció com a regulador negatiu d'aquesta via (Fodde, 2002); però també intervé en altres processos com són: migració i adhesió cel·lular, control del cicle cel·lular, apoptosi i estabilitat cromosòmica (Peifer i Polakis, 2000).

3.2.1 APC a la via de senyalització Wnt

La proliferació i diferenciació cel·lulars a l'epiteli intestinal són processos regulats per la via Wnt, on el complex β -catenina/Tcf hi juga un paper molt important (van de Wetering et al., 2002) (Figura 6).

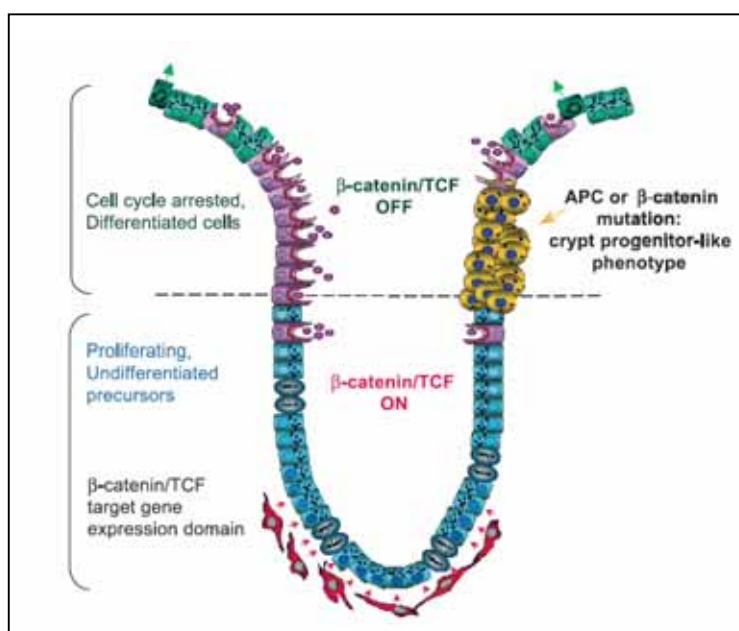


Figura 6. Representació esquemàtica d'una cripta del còlon. Al llarg de la cripta hi ha un gradient d'activació del complex β -catenina/Tcf que regula la proliferació i diferenciació cel·lulars. Extret de van de Wetering et al., 2002.

La proteïna APC juga un paper clau en la regulació de la via de senyalització Wnt, doncs uneix la β -catenina i regula la seva degradació (Munemitsu et al., 1995). La β -catenina és una proteïna multifuncional que juga un paper important tant en la regulació transcripcional (Behrens et al., 1996; Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997) com en les interaccions intercel·lulars (Peifer et al., 1992), doncs és un component de les unions adherents on uneix la proteïna transmembrana E-cadherina amb α -catenina i aquesta última connecta el complex amb el citoesquelet d'actina.

En absència de la senyal extracel·lular de Wnt (Figura 7, esquerra), la β -catenina lliure citoplasmàtica s'uneix a un complex proteic de destrucció format per axina, conductina, GSK3 β i APC (Behrens et al., 1998). En aquest complex, GSK3 β fosforila la β -catenina. Abans, però, CKI fosforila la β -catenina al residu Ser-45 per a que GSK3 β pugui fosforilar la β -catenina. Llavors, la β -catenina fosforilada per GSK3 β pot ser degradada pel sistema ubiquitina-proteasoma (Aberle et al., 1997). La fosforilació d'APC i d'axina per GSK3 β augmenta la capacitat d'unió de β -catenina al complex APC/axina i això facilita la fosforilació de la β -catenina i la seva posterior degradació (Ikeda et al., 1998).

Quan el lligand oncogènic Wnt-1 s'uneix al seu receptor transmembrana Frizzled, juntament amb el receptor LRP-5/6 (*Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5*), s'activa la via de transducció de senyal que resulta en l'activació de la proteïna citoplasmàtica Dsh (*Disheveled*), que inhibeix GSK3 β (Figura 7, dreta). Alhora, l'axina és translocada a la membrana on interacciona amb la cua intracel·lular d'LRP-5/6. Com a conseqüència, β -catenina no pot ser fosforilada per GSK3 β i per tant, no pot ser degradada, s'acumula al citoplasma i es dirigeix cap al nucli. Una vegada al nucli, s'uneix a factors de transcripció de la família Lef/Tcf, com per exemple a Tcf-4 (Behrens et al., 1996), activant la transcripció de gens diana involucrats en la transformació de l'epiteli del còlon, com per exemple *c-myc* (He et al., 1998), *ciclina D1* (Tetsu i McCormick, 1999), *PPAR δ* (He et al., 1999), *c-jun*, *fra-1* i *uPAR* (Mann et al., 1999) o *MMP7* (Crawford et al., 1999).

En absència de senyalització per Wnt, Lef/Tcf s'uneixen a repressors transcripcionals de la família Groucho o CtBP (*C-terminal-binding protein*) (Roose et al., 1998).

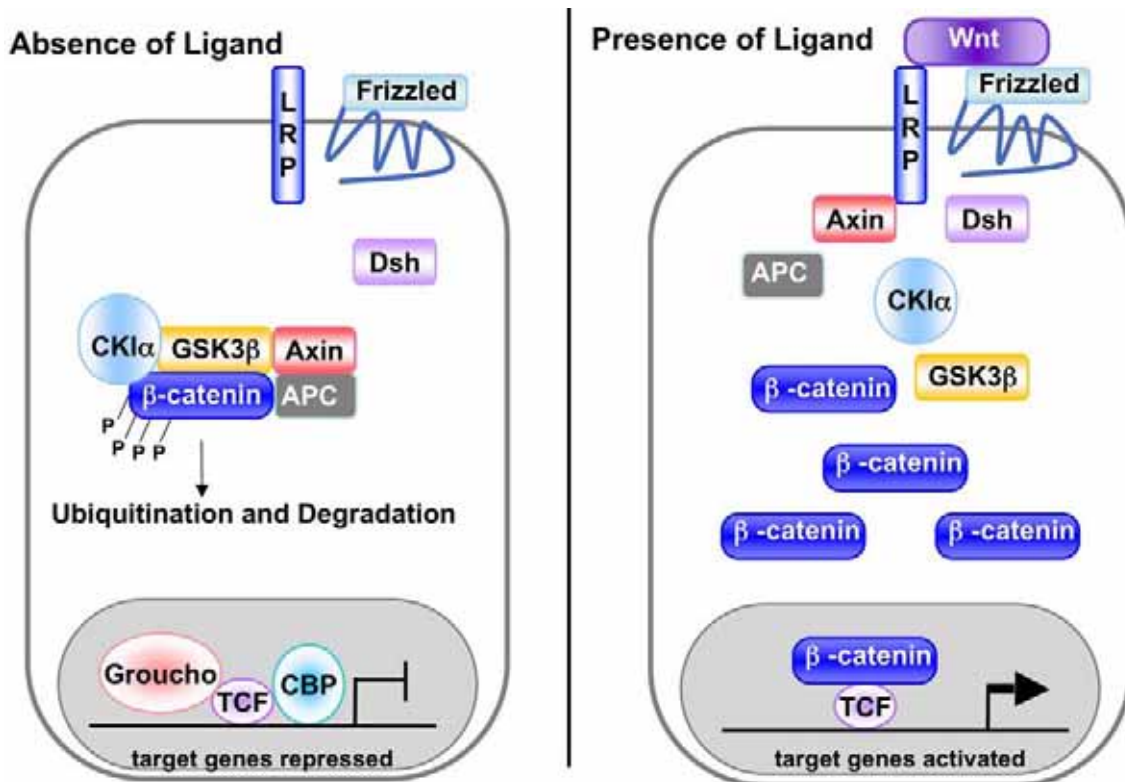


Figura 7. Via de senyalització de Wnt. En absència del lligand Wnt (esquerra), la β -catenina s'uneix al complex GSK3 β /APC/axina/conductina, que la fosforila per la seva posterior degradació. Els gens diana de Tcf estan reprimits per Groucho i CtBP. En presència de la senyal Wnt (dreta), Disheveled inactiva GSK3 β i no es pot formar el complex de destrucció, de manera que β -catenina no es degrada i es dirigeix al nucli on activa la transcripció de gens com *c-myc* o *ciclina D1*. Extret de www.wormbook.org.

3.2.2 Migració i adhesió cel·lular

La proteïna APC endògena es localitza als marges de les cèl·lules epitelials que estan migrant activament, on es troba unida als microtúbuls. S'observa un increment dels nivells cel·lulars d'APC a les zones de les criptes intestinals on la migració cel·lular cap a la superfície epitelial és fonamental. Per tant, es considera que APC regula la migració cel·lular mitjançant la seva associació amb els microtúbuls (Nathke et al., 1996).

A més de la regulació de la migració cel·lular, APC podria alterar les unions cel·lula-cel·lula competint amb les cadherines en la unió amb β -catenina. En les zones de l'epiteli intestinal on les cèl·lules migren activament, hi ha nivells elevats de la proteïna APC, que podria competir amb E-cadherina en la interacció amb β -catenina. Quan la β -catenina s'uneix a APC i és degradada pel complex de destrucció, hi ha menys β -catenina disponible per a E-cadherina, disminuint així el nombre d'unions adherents,

que afavoreix la migració de les cèl·lules (Nathke et al., 1996). Per tant, APC estaria involucrada en la regulació dinàmica del balanç entre migració i adhesió.

3.2.3 Control del cicle cel·lular

De la mateixa manera que altres supressors tumorals, com pRb o p53, la proteïna APC juga un paper important en el control de la progressió del cicle cel·lular. La sobreexpressió d'APC atura la progressió del cicle cel·lular de la fase G₀/G₁ a la fase S (Baeg et al., 1995). S'ha suggerit que el complex APC-hDLG és el responsable d'aquest efecte de manera independent a l'efecte de β -catenina en el cicle cel·lular (Ishidate et al., 2000). A més, la interacció d'APC en el seu extrem C-terminal amb les proteïnes EB1 i RP1 també suggereix que APC té una funció en la regulació del cicle cel·lular. En llevats, la proteïna EB1 és necessària per al control del cicle cel·lular, mentre que RP1 tindria un paper en el control proliferatiu de les cèl·lules (Su et al., 1995).

3.2.4 Apoptosi

En l'epiteli del còlon, l'expressió d'APC està limitada a les cèl·lules de la part luminal de les criptes, que no són proliferatives i ja estan diferenciades. Després de l'apoptosi, les cèl·lules són abocades des de la superfície luminal de les criptes cap al lumen. APC podria tenir un paper indirecte en la regulació de l'apoptosi, doncs 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 et al., 1996).

3.2.5 Estabilitat cromosòmica

La inestabilitat cromosòmica és una característica que presenten la majoria dels CCR. En la majoria de tumors colorectals l'extrem C-terminal de la proteïna APC està delecionat. Com ja hem assenyalat anteriorment, a l'extrem C-terminal hi ha el domini bàsic, que s'uneix als microtúbuls i estimula la polimerització de tubulina *in vitro*; i el domini d'unió a EB1, una proteïna que s'associa al centròmer, al fus mitòtic i als extrems distals positius dels microtúbuls en totes les fases del cicle cel·lular. Per tant, s'ha hipotetitzat que la inactivació del gen *APC*, a més d'iniciar el procés de carcinogènesi activant la via Wnt, també podria ser responsable de la inestabilitat cromosòmica que s'observa en els estadis avançats de la progressió tumoral.

Un estudi recent ha demostrat que cèl·lules mare embrionàries de ratolí homozigotes pels al·lels *Min* o *Apc1638T* mostren moltes aberracions cromosòmiques i del fus mitòtic (Fodde et al., 2001). Així doncs, una de les funcions de l'APC és mantenir l'estabilitat genòmica modulant la integritat del fus mitòtic, i també mantenir la correcta segregació dels cromosomes.

3.3. Impacte funcional de les mutacions del gen *APC*

Les mutacions en els gens que formen part de la via Wnt donen lloc a l'activació dels gens diana regulats pel complex β -catenina/Tcf-4 i constitueixen un dels primers processos en el desenvolupament del CCR. Es considera que la mutació que inactiva funcionalment el gen *APC* és suficient per a que es desenvolupi un adenoma com a conseqüència de l'activació de la via de senyalització Wnt (Powell et al., 1992).

La pràctica totalitat dels tumors colorectals presenten alteracions en aquesta via, principalment secundària a mutacions en el gen *APC*, on l'efecte final comú és sempre l'estabilització de la β -catenina i la seva translocació a nucli, on activa la transcripció de gens diana implicats en el control del cicle cel·lular, progressió tumoral i diferenciació.

En el 15% de casos de CCR esporàdic en què no hi ha mutacions en *APC*, hi ha mutacions en altres elements de la via Wnt, com en els gens *GSK3 β* , *axinalconductina* o *CTNNB1*, gen que codifica per la β -catenina (Bienz i Clevers, 2000).

4. CÀNCER COLORECTAL HEREDITARI

El CCR hereditari representa <5% de tots els casos de CCR i hi podem distingir dos grups: les síndromes poliposes i les no poliposes. Dins les síndromes poliposes hi trobem la Poliposi Adenomatosa Familiar clàssica (FAP) i l'Atenuada (AFAP) (<1%), la poliposi associada al gen *MYH* (MAP, *MYH Associated Polyposis*) (<1%) i les poliposis hamartomatoses, un grup poc freqüent de poliposi. La síndrome no poliposa més important és l'HNPCC, també anomenada síndrome de Lynch (1-5%) (de la Chapelle, 2004).

L'estudi de les dues síndromes hereditàries més freqüents –FAP i HNPCC– ha resultat de gran importància; el coneixement dels factors implicats en el desenvolupament d'aquestes malalties hereditàries ha permès conèixer els mecanismes implicats en el desenvolupament del CCR esporàdic, ja que alguns dels gens que es troben mutats a nivell germinal a la FAP i a l'HNPCC, també tenen un paper clau en els casos de CCR esporàdic (Fearon i Vogelstein, 1990). També ha permès la identificació dels individus portadors de mutacions, i per tant, en situació de risc, als quals se'ls recomana el cribratge periòdic del còlon i recte (Giardiello et al., 2001).

4.1 Càncer colorectal hereditari no polipós (HNPCC) o síndrome de Lynch

El càncer colorectal hereditari no polipós (HNPCC), també conegut com a síndrome de Lynch, és una malaltia hereditària autosòmica dominant i és el més freqüent de tots

els CCR hereditaris. Representa entre un 1-5% del total de casos de CCR. Els pacients amb HNPCC poden desenvolupar, a una edat jove (cap als 45 anys d'edat), no només CCR, sinó també molts altres càncers extracolònics, com per exemple d'endometri, ovari, gàstric, conducte urinari (pelvis i urèter), cervell, conductes biliars o de l'intestí prim (Lynch i de la Chapelle, 2003).

L'HNPCC està associat a mutacions germinals en els gens de reparació de bases desaparellades del DNA (MMR), principalment *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* i *PMS2*. Un defecte en aquests gens provoca inestabilitat genòmica, fàcilment detectable, doncs s'originen múltiples errors de replicació (RER, *replication error*) en les seqüències repetitives del DNA (microsatèl·lits) dels tumors. Aquesta forma d'inestabilitat genòmica es denomina inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) i representa la característica principal de la síndrome de Lynch.

Les mutacions en *MLH1* i *MSH2* representen quasi el 90% de les mutacions identificades a les famílies d'HNPCC, mentre que les mutacions en *MSH6* suposen un 7-10% i les mutacions en la resta de gens són minoritàries (<5%). També s'han identificat mutacions en els gens *MSH3*, *EXO1* i *TGFbR2* en algunes famílies d'HNPCC, tot i que la seva significació clínica no està ben establerta (Peltomaki, 2003).

Per tal d'establir uns criteris diagnòstics uniformes de l'HNPCC, l'any 1991 es van publicar els criteris d'Amsterdam I (Vasen et al., 1991) (Taula 4). L'any 1999 es van proposar uns nous criteris (Amsterdam II) que incloïen els càncers extracolònics associats a l'HNPCC (Vasen et al., 1999) (Taula 4). Paral·lelament al descobriment de la MSI i la seva alta freqüència en el CCR associat a l'HNPCC, es van proposar l'any 1997 els criteris de Bethesda per a la identificació de tumors candidats a realitzar l'anàlisi d'MSI (Rodríguez-Bigas et al., 1997), que han estat revisats recentment (Umar et al., 2004) (Taula 4). Aquests criteris permeten la identificació d'individus amb risc de desenvolupar HNPCC i candidats a l'estudi d'MSI o d'immunohistoquímica (IHQ) de les proteïnes *MLH1*, *MSH2* i *MSH6*. En aquests casos, el diagnòstic definitiu d'HNPCC dependrà de la identificació d'una mutació germinal en els gens reparadors del DNA.

Taula 4. Criteris d'Amsterdam I, II i de Bethesda revisats, per al diagnòstic de l'HNPCC.

CRITERIS D'AMSTERDAM I (l'individu els ha de complir TOTS)
<ul style="list-style-type: none"> - Tres o més familiars amb CCR, un d'ells familiar de 1r grau dels altres dos - Dues generacions successives afectes - Almenys un tumor diagnosticat abans dels 50 anys - Exclusió de la poliposi adenomatosa familiar - Els tumors han de ser confirmats mitjançant un estudi histopatològic
CRITERIS AMSTERDAM II (l'individu els ha de complir TOTS)
<ul style="list-style-type: none"> - Tres o més familiars amb CCR o un tumor associat a HNPCC, un d'ells familiar de 1r grau dels altres dos - Dues generacions successives afectes - Almenys un tumor diagnosticat abans dels 50 anys - Exclusió de la poliposi adenomatosa familiar - Els tumors han de ser confirmats mitjançant un estudi histopatològic
CRITERIS DE BETHESDA REVISATS (l'individu n'ha de complir un d'ells)
<ul style="list-style-type: none"> - CCR diagnosticat abans dels 50 anys - Presència de CCR sincrònic o metacrònic, o de CCR i un tumor associat a HNPCC, 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 HNPCC, i amb un dels càncers diagnosticats abans dels 50 anys - CCR i dos o més familiars de 1r o 2n grau amb un tumor associat a HNPCC independentment de l'edat del diagnòstic

En els darrers anys s'ha demostrat que la vigilància periòdica mitjançant colonoscòpies millora el pronòstic dels individus pertanyents a famílies amb criteris d'HNPCC. Així, la realització d'una colonoscòpia cada 2-3 anys s'associa a una disminució de la probabilitat de desenvolupar CCR i a un augment de la supervivència (Jarvinen et al., 2000).

4.2 Síndromes poliposes

Les poliposis gastrointestinals es caracteritzen per la presència de múltiples pòlips amb afectació preferent de l'àrea colorectal. Constitueixen un grup de patologies

d'escassa incidència, però amb característiques molt variades que precisen d'una individualització correcta per a que es pugui realitzar un tractament adequat.

Síndromes de Poliposis Gastrointestinals Hereditàries:

- Poliposis Adenomatoses
 - Poliposi Adenomatosa Familiar (FAP)
 - Poliposi Adenomatosa Familiar Atenuada (AFAP)
 - Poliposi Associada a *MYH* (MAP)

- Poliposis Hamartomatoses
 - Síndrome de Peutz-Jeghers
 - Poliposi Juvenil Familiar
 - Síndrome de Cowden
 - Síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley

4.2.1 Poliposis Adenomatoses

4.2.1.1 Poliposi Adenomatosa Familiar (FAP)

La Poliposi Adenomatosa Familiar clàssica (FAP) és una malaltia hereditària autosòmica dominant caracteritzada per l'aparició de múltiples pòlips adenomatosos al còlon i recte (>100 pòlips) durant la segona o tercera dècada de vida. Els pacients amb FAP tenen un risc de desenvolupar CCR proper al 100% si no són tractats de manera preventiva. Els adenomes, uniformement distribuïts al còlon i recte, són inicialment benignes, però si als pacients no se'ls realitza una colectomia profilàctica, un o més adenomes progressarà inevitablement a carcinoma entre els 40 i els 50 anys d'edat (Fearhead et al., 2001; Lynch i de la Chapelle, 2003).

La incidència de la FAP és d'un cas per cada 7.000-10.000 individus independentment de la població analitzada (Kinzler i Vogelstein, 1996; Potter, 1999), i la penetrància d'aquest síndrome és quasi del 100%. S'estima que la FAP és responsable de fins a l'1% del total de casos de CCR. Un 80-90% de famílies amb FAP presenten mutacions germinals d'elevada penetrància en el gen *APC* que, com hem vist, juga un paper clau en els estadis primerencs de la carcinogènesi colorectal.

Aproximadament un 70% dels pacients de FAP, a més de la patologia colorectal, també presenten manifestacions extracolòniques com adenomes gastroduodenals, osteomes, quists epidèrmics, hipertròfia congènita de l'epiteli pigmentari de la retina i tumors desmoides. Més rarament presenten carcinomes papil·lars de tiroides, tumors

cerebrals i hepatoblastomes en la infància. Es denomina síndrome de Gardner a la FAP quan s'acompanya de manifestacions extracolòniques i síndrome de Turcot si s'acompanya de tumors en el sistema nerviós central. Algunes d'aquestes manifestacions extracolòniques, sobretot els tumors desmoides i els tumors del tracte gastrointestinal superior, són la major causa de mortalitat en els pacients de FAP després de la cirurgia (Fearnhead et al., 2001).

Es recomana el cribratge periòdic anual del còlon i recte dels pacients per sigmoidoscòpia flexible, començant als 10-12 anys d'edat en pacients amb un diagnòstic genètic de FAP (detecció de mutacions en el gen *APC*) o en membres de la família en situació de risc que encara no s'han fet l'anàlisi genètic (Winawer et al., 2003). La sigmoidoscòpia es repetirà anualment fins als 25 anys, i si encara són negatives, es podran espaiar passant a ser biennals fins als 35 anys, triennals fins als 45 anys i, posteriorment, cada 5-10 anys a partir dels 46 anys. Si en algun moment es detecta algun adenoma es realitzarà una colonoscòpia total cada 6-12 mesos fins la cirurgia. En la majoria de pacients es realitza una colectomia (resecció quirúrgica del còlon, total o parcial) preventiva quan el número d'adenomes fa inviable el seu control endoscòpic, per reduir el risc de desenvolupar un CCR (Vasen, 2000).

4.2.1.2 Poliposi Adenomatosa Familiar Atenuada (AFAP)

L'AFAP és una variant de la FAP que es diferencia de la forma clàssica per la presència d'un nombre inferior de pòlips (generalment més de 15 i sempre menys de 100; una mitjana de 40-50), localitzats preferentment al còlon dret. L'edat d'aparició dels adenomes o del CCR acostuma a ser de 10 a 15 anys més tardana que en la FAP clàssica (Knudsen et al., 2003). Els individus amb AFAP normalment no tenen hipertròfia congènita de l'epiteli de la retina, però poden presentar adenomes duodenals, pòlips fúngics gàstrics i rares vegades tumors desmoides (Knudsen et al., 2003). Així doncs, les característiques clíniques bàsiques de l'AFAP són: un curs moderat de la malaltia, una aparició tardana dels adenomes i carcinomes colorectals i una molt limitada expressió de manifestacions extracolòniques.

Clínicament, les famílies d'AFAP amb un baix nombre de pòlips es poden solapar fenotípicament amb les d'HNPCC. Generalment s'havia acceptat que l'AFAP seguia un patró autosòmic dominant, igual que la forma clàssica, però amb un índex de mutacions *de novo* en el gen *APC* superior. Recentment, s'ha descrit que fins un 30% de les AFAP segueixen un patró d'herència autosòmic recessiu, i molts d'aquests casos s'han associat a alteracions en el gen *MYH* (Sieber et al., 2003).

Als familiars en situació de risc es recomana oferir-los una colonoscòpia completa a partir dels 15-25 anys, en funció de l'edat de presentació de la malaltia en els familiars

afectes. L'exploració es repeteix cada cinc anys fins a arribar als 30 anys; a partir d'aquest moment es recomana una colonoscòpia cada dos anys fins als 74 anys; i a partir d'aquesta edat s'individualitza cada cas segons la patologia associada i l'estat general. Es recomana realitzar colectomia profilàctica en aquells casos amb múltiples adenomes en què no es pot assegurar un total control mitjançant colonoscòpia, per evitar el desenvolupament del CCR.

4.2.1.3 Mutacions germinals i somàtiques del gen APC

La majoria (98%) de mutacions germinals en el gen *APC* associades a la poliposi són mutacions *nonsense* (30%) o *frameshift* (68%) que donen lloc a una proteïna truncada a la regió C-terminal (Galiatsatos i Foulkes, 2006). La resta són variants *missense*, grans delecions (Sieber et al., 2002) o mutacions d'*splicing* (Aretz et al., 2004; Montera et al., 2001).

En un 20-30% de pacients amb FAP clàssica i en un 90% de pacients d'AFAP no es detecta la mutació germinal en el gen *APC* pels mètodes de cribratge rutinaris (Galiatsatos i Foulkes, 2006; Sieber et al., 2002; Venesio et al., 2004). La utilització de noves tècniques que permeten detectar grans delecions com l'MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) (Aretz et al., 2005) o la QMPSF (*Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent fragments*) (E.Castellsagué, dades no publicades), ha permès la identificació de grans delecions en el gen *APC* en un 10-15% dels pacients de FAP clàssica als que no se'ls havia identificat cap mutació en el gen mitjançant els mètodes convencionals de detecció de mutacions. Aquestes grans delecions del gen *APC* no s'han identificat en pacients d'AFAP (Sieber et al., 2002). Una altra possibilitat és la presència de variants *missense* que podrien escapar-se de la seva detecció per la utilització de mètodes de cribratge com el PTT (*Protein Truncation Test*), prèviament utilitzat com a mètode de primera línia. Heinimann et al. van descriure que fins el 13% de les mutacions en *APC* no són detectades per PTT (Heinimann et al., 2001). Avui en dia, quan la tècnica del PTT ha estat substituïda per altres tècniques d'identificació de mutacions, com la seqüenciació directa del DNA i altres mètodes de cribratge, el número de variants del gen *APC* identificades és cada vegada més elevat. Recentment també s'ha descrit que un 10-30% dels pacients de FAP i AFAP sense mutacions en el gen *APC* tenen mutacions en el gen *MYH* (Nieuwenhuis i Vasen, 2007).

La major part de les mutacions germinals del gen *APC* es localitzen entre els codons 157 i 1595, i els dos codons més freqüentment mutats es troben a les posicions 1061 (11%) i 1309 (17%), essent les mutacions al codó 1309 les que s'associen a un fenotip més sever.

D'acord amb la hipòtesi de Knudson, el desenvolupament dels adenomes colorectals en els pacients amb poliposi és degut a que, a part de la mutació del gen *APC* a la línia germinal, les cèl·lules adquireixen una mutació somàtica addicional a l'altre al·lel del gen o bé la pèrdua de l'altre al·lel (LOH, *Loss of Heterozygosity*) (Knudson, 1993). Recentment s'ha vist que el tipus de mutació somàtica d'*APC* ve condicionada per la localització de la mutació germinal (Lamlum et al., 1999; Rowan et al., 2000; Sieber et al., 2006), el què suposaria una variació significativa de la hipòtesi del *two-hit* de Knudson que pressuposava que les dues mutacions eren independents. Si la mutació germinal es troba entre els codons 1194 i 1392, llavors hi ha una pèrdua de l'al·lel WT com a segon *hit*. Si la mutació germinal es troba fora d'aquesta regió, llavors el segon *hit* és una mutació truncant a la regió MCR (*Mutation Cluster Region*). Aquesta regió MCR es troba entre els codons 1286 i 1513, coincidint l'extrem 3' del MCR amb l'extrem 3' de la tercera repetició de 20 AA, i conté el 80% de les mutacions somàtiques presents en *APC* (Miyoshi et al., 1992b), essent els codons més freqüentment mutats els que es troben a les posicions 1309 (7%), 1450 (8%) i 1554 (5%).

4.2.1.4 Variants missense del gen APC

Com acabem d'assenyalar, la substitució de tècniques com el PTT per altres tècniques d'identificació de mutacions, com la seqüenciació directa del DNA, ha permès augmentar el percentatge d'identificació de variants del gen *APC*. Tant en la FAP clàssica com atenuada, s'han identificat, en la línia germinal, diverses variants *missense* en el gen *APC* que donen lloc a canvis d'un sol AA, com la I1307K, E1317Q o D1822V (Frayling et al., 1998; Heinemann et al., 2001; Laken et al., 1997; Lamlum et al., 2000; Rozek et al., 2006; Ruiz-Ponte et al., 2001; Slattery et al., 2001; Wallis et al., 1999; Woodage et al., 1998), però el seu potencial patogènic és encara motiu de controvèrsia, el què en limita la seva utilitat en el consell genètic (Frayling et al., 1998; Woodage et al., 1998).

La variant I1307K (Ile a Lys) és una variant *missense* amb penetrància incompleta, identificada en un 6% de controls Ashkenazi, que confereix un increment del risc de desenvolupar tumors colorectals, incloent-hi nombrosos adenomes (Frayling et al., 1998; Laken et al., 1997; Woodage et al., 1998).

La variant E1317Q origina una transversió de G a C que condueix a la substitució de Glu a Gln. S'ha suggerit que aquesta alteració contribueix a una predisposició a desenvolupar adenomes colorectals, i menys a carcinomes, tant en la població Ashkenazi com en la població no-jueva amb una penetrància baixa i variable (Frayling et al., 1998; Lamlum et al., 2000). Però recentment s'ha descrit, en un estudi cas-control realitzat en una població del nord d'Israel, que aquesta variant no sembla estar associada a un increment del risc de desenvolupar CCR (Rozek et al., 2006).

La variant del gen *APC* més comuna és la D1822V, que origina un canvi d'aspartat a valina al codó 1822 degut a una transversió d'A a T. Inicialment es va suggerir que la variant en homozigosi podria haver estat la causant de la FAP en un pacient, alhora que es va considerar patogènica en dos pacients amb CCR sense FAP (Wallis et al., 1999). Més tard es va descriure que la variant tenia una freqüència al·lèlica del 10-23% en poblacions control europees i americanes (Ruiz-Ponte et al., 2001; Slattery et al., 2001). Per tant, és lògic especular sobre la possibilitat que aquesta variant incrementi el risc de desenvolupar CCR, ja sigui esporàdic o hereditari. Només un estudi ha avaluat el paper d'aquesta variant en la patogènesi del CCR, mostrant que la variant no tenia cap efecte principal sobre el risc; però sí que hi havia un menor risc de desenvolupar càncer de còlon per aquells individus amb el genotip TT diagnosticats després dels 65 anys o que tenien una dieta pobra en greixos (Slattery et al., 2001).

Per avaluar la contribució de les variants *missense* al desenvolupament del CCR, s'utilitzen, generalment, diversos criteris com la cosegregació de la variant amb la malaltia a la família, l'absència de la variant a la població control, la localització de la variant dins la proteïna, la naturalesa de la substitució de l'AA i la conservació del codó afectat al llarg de l'evolució. Desafortunadament, aquests criteris són sovint insuficients per poder predir el significat de les variants *missense*, reforçant així la necessitat de realitzar assajos funcionals.

4.2.1.5 Correlacions genotip-fenotip

Existeix, des del punt de vista estadístic, una bona correlació genotip-fenotip, de tal manera que la localització de la mutació germinal d'*APC* condiciona la severitat i l'espectre clínic de la malaltia (Galiatsatos i Foulkes, 2006; Nagase et al., 1992a; Nieuwenhuis i Vasen, 2007).

A la **poliposi clàssica**, les mutacions germinals del gen *APC* es troben entre el codó 157 (exó 4) i el codó 1595 (exó 15). Aquests pacients desenvolupen de centenars a milers d'adenomes a la segona o tercera dècada de vida, i la mitjana d'edat d'aparició del CCR en els pacients no tractats és d'aproximadament 42 anys (Nagase et al., 1992a). A la regió MCR es localitzen les mutacions que originen les poliposis més severes (>5000 adenomes colorectals), en les que l'edat d'aparició de la poliposi se situa entre la primera i segona dècada de vida i la mitjana d'edat d'aparició del CCR és d'aproximadament 34 anys (Nagase et al., 1992a). Les mutacions al codó 1309 s'associen al fenotip més sever i a una edat més jove d'aparició de la malaltia (Caspari et al., 1994).

Els pacients amb **poliposi atenuada** (<100 adenomes colorectals) tendeixen a presentar mutacions germinals en tres regions característiques del gen *APC*: abans del codó 157 (extrem 5'), a l'exó 9 i després del codó 1595 (extrem 3') (Soravia et al., 1998; Spirio et al., 1993). En aquests pacients, l'edat d'aparició de la malaltia és més tardana.

S'han establert també correlacions genotip-fenotip de les **manifestacions extracolòniques** en la poliposi. Així, la hipertròfia congènita de l'epiteli pigmentari de la retina està associada amb mutacions entre els codons 311 i 1444 del gen *APC*, els tumors desmoides amb mutacions entre els codons 1444 i 1580, i els tumors del tracte gastrointestinal superior amb mutacions a l'exó 4 i entre els codons 564 i 1465 (Galiatsatos i Foulkes, 2006; Nieuwenhuis i Vasen, 2007).

4.2.1.6 Poliposi Associada a MYH (MAP)

Recentment s'ha demostrat que mutacions germinals bial·lèliques en el gen *MYH* –gen que codifica per una DNA glicosilasa implicada en la reparació del DNA (BER, *Base Excision Repair*)–, originen la Poliposi Associada a *MYH* (MAP), una síndrome de poliposi autosòmica recessiva sovint indistingible en les seves manifestacions clíniques de les formes clàssiques o atenuades de la FAP (Al-Tassan et al., 2002).

Alguns pacients amb MAP presenten manifestacions extracolòniques, com pilomatricomes, pòlips duodenals i càncer gàstric d'aparició precoç, indicant-nos que aquests trets no estan restringits només a pacients amb mutacions germinals en el gen *APC*.

Fins ara, les mutacions bial·lèliques en el gen *MYH* s'han identificat només en famílies diagnosticades de FAP o AFAP, i expliquen fins una tercera part dels pacients amb AFAP. Dels pacients amb un fenotip de FAP clàssic i sense cap mutació identificada en el gen *APC*, un 7,5% tenen dues mutacions germinals en el gen *MYH* (Sieber et al., 2003). Dues variants, Y165C i G382D, suposen el 75% de les variants identificades en el gen *MYH* en caucàsics.

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

La contribució de les mutacions en *MYH* al desenvolupament del CCR és d'un 1% o menys. Actualment el nombre total de famílies afectes és reduït, el què impedeix poder establir correlacions genotip-fenotip.

4.2.2 Poliposis Hamartomatoses

Les síndromes de poliposi hamartomatosa són un grup poc freqüent de poliposi on els pacients desenvolupen múltiples pòlips hamartomatosos a una edat jove. Tot i que primerament aquests pòlips no es van considerar neoplàstics, s'ha vist que aquests pacients tenen una predisposició a desenvolupar CCR. La millora en el coneixement de la base genètica d'aquestes malalties està ajudant al diagnòstic i classificació dels pacients.

4.2.2.1 Síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ)

La síndrome de Peutz-Jeghers és una malaltia hereditària autosòmica dominant d'elevada penetrància que es caracteritza per l'aparició de múltiples pòlips hamartomatosos en el tracte gastrointestinal, generalment a l'intestí prim, la zona colorectal i l'estómac; també es caracteritza per la pigmentació mucocutània i un risc elevat de patir neoplàsies (intestí prim, estómac, còlon, pàncrees, mama i ovari, entre altres) (Dunlop, 2002). Aproximadament el 50% dels casos són hereditaris i la resta esporàdics. En un 20-63% dels casos de SPJ el gen *LKB1* apareix mutat.

4.2.2.2 Poliposi Juvenil Familiar

La síndrome de poliposi juvenil és la síndrome de poliposi hamartomatosa més freqüent. S'hereta mitjançant un patró d'herència autosòmica dominant amb una penetrància variable, encara que aproximadament un terç dels casos no presenten història familiar (Desai et al., 1995). Els pacients presenten pòlips en tot el tracte gastrointestinal i el risc de desenvolupar càncer colorectal, gàstric o duodenal és molt elevat. El síndrome de poliposi juvenil pot ser causat per mutacions en la línia germinal tant de *SMAD4/DPC4/MADH4* com d'*ALK3/BMPR1A*, tot i que aproximadament un terç dels casos no mostren canvis en aquests gens.

4.2.2.3 Síndrome de Cowden

La síndrome de Cowden es caracteritza per presentar un patró d'herència autosòmic dominant. La síndrome de Cowden és única dins de les síndromes hamartomatoses, doncs els pòlips acostumen a presentar-se en els elements ectodèrmics o endodèrmics (Schreibman et al., 2005). Els hamartomatomes afecten la pell, l'intestí, les mames i la glàndula tiroides. Els pòlips es localitzen al llarg de tot el trajecte gastrointestinal. No s'ha descrit un augment del risc de càncer gastrointestinal, però sí un augment del risc de càncer de mama (25-50%), de tiroides (10%) i d'endometri (5-10%). La síndrome de Cowden es deu a mutacions a la línia germinal de l'homòleg de la fosfatasa i tensina (*PTEN*).

4.2.2.4 Síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley

La síndrome de Bannayan-Ruvalcaba-Riley presenta un patró d'herència autosòmica dominant. Els pòlips es localitzen principalment a la llengua i al còlon. Existeixen manifestacions extracolòniques com macrocefàlia, retard mental o miopatia per dipòsits de greix. Fins ara no s'ha descrit un augment del risc de lesions neoplàstiques. En alguns pacients s'han identificat mutacions en el gen *PTEN* a la línia germinal, suggerint que aquest és un dels gens responsables de la malaltia (Schreibman et al., 2005).

4.3 Consell genètic

La identificació dels individus en situació de risc de desenvolupar una possible síndrome de predisposició hereditària al CCR, com la FAP, l'AFAP o l'HNPCC, és fonamental per a disminuir la morbiditat i mortalitat de la malaltia. Des de la introducció del diagnòstic molecular predictiu, s'ha facilitat la identificació dels individus en situació de risc que permet, a més d'una valoració individualitzada del risc de desenvolupar càncer, recomanar estratègies de prevenció i cribratge adequades. És per això que després de realitzar el diagnòstic de la malaltia en qualsevol membre de la família, s'ha de remetre al pacient i als seus familiars a una Unitat de Consell Genètic per tal de rebre assessorament genètic.

En el procés de consell genètic s'avalua el risc personal i familiar de susceptibilitat hereditària al càncer mitjançant la realització d'una exhaustiva història clínica sobre els antecedents familiars i personals de càncer. El diagnòstic genètic de la FAP es basa en l'estudi molecular de la seqüència codificant del gen *APC* del cas índex. En cas de ser l'estudi negatiu, cal estudiar la presència de grans delecions en el gen. En el cas de sospita d'AFAP, cal orientar l'estudi genètic basant-se en si existeix o no història familiar d'AFAP amb patró d'herència autosòmica dominant. En el cas d'existir s'iniciarà l'estudi mitjançant l'anàlisi del gen *APC* en línia germinal; si no existeix, s'iniciarà l'estudi mitjançant l'anàlisi del gen *MYH*. Davant una situació d'HNPCC, la realització d'IMS o la tinció per IHQ de les proteïnes reparadores és una estratègia efectiva per seleccionar els individus candidats a un estudi genètic dels gens MMR.

El diagnòstic genètic és molt important perquè en aquelles famílies on s'hagi identificat la mutació causant de la malaltia, s'ofereix l'estudi directe predictiu als individus de risc de la família, i el cribratge endoscòpic es realitzarà només en els individus portadors de la mutació (Winawer et al., 2003). Si en una família on s'ha identificat la mutació patogènica, aquesta no es detecta en un familiar en risc, aquest es treu del programa de cribratge i passa a tenir el risc de desenvolupar CCR de la població general (Galiatsatos i Foulkes, 2006; Winawer et al., 2003).

HIPÒTESI

Les mutacions germinals d'elevada penetrància del gen *APC* que originen una proteïna truncada són les responsables de la majoria de casos de poliposi, mentre que les variants *missense*, que canvien un aminoàcid de la proteïna, es detecten en una minoria dels casos. S'han identificat diverses variants en el gen *APC*, però el seu potencial patogènic és encara motiu de controvèrsia, el què limita la utilitat de la seva detecció en el consell genètic.

Per avaluar la contribució de les variants del gen *APC* en el desenvolupament del CCR, s'utilitzen, generalment, diversos criteris com la cosegregació de la variant amb la malaltia a la família, l'absència de la variant a la població control, la localització de la variant dins la proteïna, la naturalesa de la substitució de l'aminoàcid i la conservació del codó afectat al llarg de l'evolució. Però aquests criteris són sovint insuficients per poder predir el significat biològic de les variants, reforçant així la necessitat de realitzar assajos funcionals.

La nostra hipòtesi és que les variants del gen *APC* podrien incrementar el risc de desenvolupar CCR tant esporàdic com hereditari. L'estudi de la presència de les variants en la població control i en les diferents poblacions de CCR esporàdic i hereditari, juntament amb la realització d'anàlisis funcionals, podrien ajudar a conèixer l'impacte de les variants del gen *APC* en el desenvolupament del CCR.

OBJECTIUS

Objectiu general

Determinar el significat funcional de les variants identificades en el gen *APC* en pacients afectes de Poliposi Adenomatosa Familiar en relació al risc de desenvolupar CCR tant esporàdic com hereditari.

Objectius específics

1. Determinar la freqüència de les variants del gen *APC* en la nostra població control i en les poblacions de CCR esporàdic i hereditari.
2. Avaluar la interacció entre la variant D1822V del gen *APC* i diversos factors genètics, dietètics i ambientals en relació al risc de desenvolupar CCR mitjançant estudis d'associació de tipus cas-control.
3. Analitzar l'impacte funcional de les variants N1026S i L1129S del gen *APC*.

MATERIALS I MÈTODES

1. INDIVIDUS

Es va estudiar la presència de les variants identificades en el gen *APC* en diferents grups: controls, casos de CCR esporàdic i casos de CCR hereditari (FAP, AFAP i HNPCC). Tots els individus van ser informats i van donar el seu consentiment per escrit per participar en l'estudi i permetre que les seves mostres biològiques fossin analitzades genèticament, d'acord amb la declaració de Helsinki. El comitè ètic local va revisar i aprovar el protocol d'estudi.

1.1 Controls i casos de CCR esporàdic

Els casos de CCR esporàdic són pacients amb un nou diagnòstic de CCR que van ser atesos a l'Hospital de Bellvitge de l'Hospitalet de Llobregat entre el gener de 1996 i el desembre de 1998. Els controls van ser seleccionats a l'atzar entre els pacients admesos en el mateix hospital durant el mateix període. Els principals grups de diagnòstic dels controls van ser: medicina interna (22%), cirurgia digestiva aguda (19%), urologia (17%), gastroenterologia (16%) i cirurgia ortopèdica (15%). Finalment, un total de 394 casos i 326 controls aparellats per edat i sexe van ser inclosos en aquest estudi, dissenyat per valorar les interaccions entre gen i ambient en relació al risc de desenvolupar CCR (Cox et al., 2004; Landi et al., 2003). Els casos de CCR esporàdic i els controls van ser entrevistats personalment per personal qualificat utilitzant qüestionaris de factors de risc. També es van utilitzar qüestionaris de la història dietètica prèviament validats (EPIC Group of Spain, 1997a), focalitzats en el promig del consum d'aliments individuals un any abans del diagnòstic de la malaltia. El consum de nutrients es va estimar amb taules de composició dels aliments desenvolupades especialment per al qüestionari (EPIC Group of Spain, 1997b). Els factors de risc més importants explorats van ser la història familiar de càncer, especialment de CCR (com a mínim un parent de primer grau amb un tumor colorectal; altres síndromes hereditàries van ser excloses) o la història personal d'adenomes simptomàtics (valorats per una endoscòpia prèvia evidenciant qualsevol tipus d'adenoma).

1.2 Casos de CCR hereditari

Un total de 266 pacients afectes de CCR hereditari atesos a la Unitat de Consell Genètic de l'Institut Català d'Oncologia han estat inclosos a l'estudi: 98 pacients no relacionats de FAP clàssica, 40 pacients no relacionats de FAP Atenuada, 35 pacients no relacionats d'HNPCC RER- definits pels Criteris d'Amsterdam tipus I o II i 93 pacients no relacionats HNPCC-like RER- (definits per un dels següents criteris: absència de només un dels criteris d'Amsterdam; diagnòstic de CCR abans dels 45 anys; o tenir dos o més tumors HNPCC-relacionats) (Winawer et al., 2003).

En les famílies on es van identificar les variants en el gen *APC*, es van realitzar estudis de cosegregació per determinar si la variant cosegregava amb la malaltia.

1.3 Adenomes colorectals esporàdics

Un total de 78 pacients que es van sotmetre a una colonoscòpia després d'un test de sang oculta en femtes amb resultat positiu es van incloure a l'estudi, que avaluava l'associació de la variant D1822V amb la presència d'adenomes. Tots els pacients eren participants d'un programa de cribratge poblacional ofert a totes les persones amb edats compreses entre els 50 i els 65 anys que vivien a l'Hospitalet de Llobregat. Trenta-quatre van ser diagnosticades d'adenomes (24 presentaven un adenoma i 10 tenien de dos a cinc adenomes). Els 44 individus restants no manifestaven cap malaltia colorectal.

2. IDENTIFICACIÓ DE VARIANTS I POLIMORFISMES DEL GEN *APC*

L'anàlisi molecular de la regió codificant del gen *APC* en membres afectes de famílies amb FAP i AFAP es va realitzar mitjançant les tècniques de PCR i seqüenciació directa. Aquesta estratègia ha permès la identificació de les següents variants del gen *APC*: G101E, K957N, N1026S, L1129S, I1307K, E1317Q, D1822V, A2274V, G2502S i P2681L.

En aquest treball s'ha estudiat la presència d'algunes de les variants identificades en el gen *APC* en el DNA germinal de diferents grups d'individus mitjançant les tècniques de SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*) i discriminació al·lèlica amb sondes d'hibridació fluorescents. També s'han analitzat els polimorfismes intragènics c.5465A>T (D1822V), c.4479A>G i c.5880A>G del gen *APC* per RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) en el DNA tumoral de casos de CCR esporàdic per tal d'estudiar la pèrdua d'heterozigositat al codó 1822.

2.1 Identificació de variants del gen *APC* per SSCP

Es va analitzar la presència de les variants G101E i L1129S del gen *APC* en el DNA germinal dels diferents grups d'individus (controls, casos de CCR esporàdic i casos de CCR hereditari) utilitzant la tècnica de SSCP. Aquesta tècnica permet detectar mutacions puntuals presents en fragments de menys de 400 pb en condicions d'electroforesi no desnaturalitzants, doncs aquestes molècules de DNA de cadena senzilla que difereixen en una única base formen estructures secundàries diferents i, per tant, migren també de manera diferent. Els fragments a analitzar per aquesta tècnica s'obtenen mitjançant amplificació per PCR. Les condicions d'amplificació per

PCR de les variants G101E i L1129S del gen *APC* es mostren a la Taula 5 de l'annex I. Per corroborar els resultats obtinguts, les mostres que per SSCP eren positives per la variant, es van tornar a amplificar per PCR, es van purificar i es van seqüenciar amb els mateixos encebadors que els utilitzats per a l'amplificació.

2.1.1 Preparació dels gels i condicions d'electroforesi

Després de visualitzar els productes amplificats en un gel d'agarosa, es van resoldre les mostres en gels d'acrilamida al 8% no desnaturalitzants de 50 cm de llarg, 30 cm d'ample i 4 mm de gruix. Per a la preparació del gel es van barrejar els següents reactius: 6 ml de Tris-borat-EDTA (TBE) 10x (890 mM Tris, 890 mM àcid bòric, 20 mM EDTA, pH 8,3), 12 ml de solució d'acrilamida:bisacrilamida (29:1) al 40%, 600 µl de persulfat amònic (APS) al 10%, 25 µl de TEMED (N, N, N', N',-tetra-metiletilen-diamina) i 42 ml d'aigua bidestil·lada.

Els vidres, abans de muntar-los, es van tractar amb diferents solucions: al vidre gran s'hi van escampar 800 µl de SIGMACOTE (Sigma Chemical Co.), una solució de silicona repel·lent que evita que s'hi enganxi el gel, i el vidre petit es va tractar amb una solució que contenia GORP (γ -metacriloxipropil-trimetoxisilan, Sigma Chemical Co.), que facilita que el gel s'enganxi al vidre i així després es pot tenyir sense que es trenqui. La solució del GORP estava formada per 150 µl d'àcid acètic al 10%, 5 ml d'etanol absolut i 5 µl de GORP. Es va escampar tot el volum damunt del vidre, es va deixar actuar durant 5 min i a continuació es va netejar el vidre amb etanol al 70% fins que va quedar ben sec.

Finalment es van muntar els vidres amb els separadors de 4 mm de gruix i les pintes, i es van subjectar amb pinces. Es va deixar polimeritzar el gel un mínim de dues hores. Els productes amplificats es van diluir amb el tampó de càrrega DLB (93% formamida desionitzada, 0,01 M EDTA, 0,01 M NaOH, 0,01% blau de brom fenol i 0,01% xilè cianol) en un volum final de 12 µl (es van fer dilucions 1/2, 1/3 o 1/4 segons la intensitat de les bandes observades en el gel d'agarosa). Es van desnaturalitzar les mostres 3 min a 95 °C i es van mantenir en gel fins al moment de carregar-les. Es van carregar 4 µl de cada mostra en el gel d'acrilamida que prèviament havia estat sotmès a un camp elèctric de 20 W durant 15 min. L'electroforesi es va realitzar durant 13-15 h a 6 W. A cada gel s'hi va carregar un control positiu que mostrava el patró electroforètic característic de la variant.

2.1.2 Tinció amb nitrat de plata

Una vegada finalitzada l'electroforesi es va tenyir el gel amb nitrat de plata. Es va fixar el gel amb etanol al 10% durant 10 min, es va oxidar amb una solució d'àcid nítric a l'1% durant 3 min, es va rentar dues vegades amb aigua destil·lada, es va tenyir amb una solució de nitrat de plata (2 g/l) durant 20 min, es va rentar dues vegades amb aigua destil·lada i es va revelar amb una solució de carbonat sòdic (29,6 g de NaCO₃ i

450 µl de formaldehid al 37% en 1 l d'aigua). Primer es van afegir 300 ml de la solució de carbonat sòdic dins la cubeta on hi havia el gel fins que aquest es va enfosquir, i després es va afegir la resta del volum. Quan es va observar la intensitat desitjada de les bandes, el revelat es va aturar amb una solució d'àcid acètic al 10% durant 10 min. Després es va fer un rentat amb aigua destil·lada i es va deixar assecat el gel a temperatura ambient (TA) per a poder ser escanejat. Després es va tornar a posar el gel en aigua un mínim d'una hora perquè s'estovés, es va rascar amb l'ajuda d'un regle i dins d'una cubeta amb aigua es va estendre damunt d'un paper de filtre i es va assecat al buit a 85 °C. D'aquesta manera es van guardar els gels permanentment.

2.2 Identificació de variants del gen *APC* amb sondes d'hibridació fluorescents

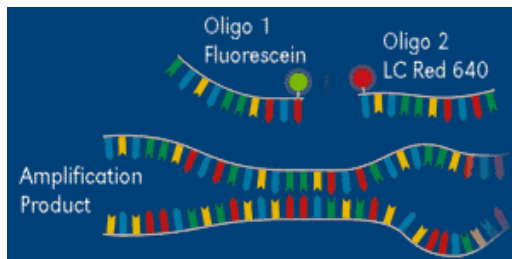
Es va analitzar la presència de les variants N1026S, D1822V, A2274V, G2502S i P2681L del gen *APC* en el DNA germinal dels diferents grups d'individus (controls, casos de CCR esporàdic i casos de CCR hereditari) mitjançant l'amplificació per PCR dels fragments corresponents i la posterior discriminació al·lèlica amb sondes d'hibridació fluorescents amb l'aparell Light Cycler 2.0 (Roche Molecular Biochemicals). Es va utilitzar el kit *Light Cycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes* (Roche Molecular Biochemicals), seguint les instruccions del fabricant.

Per cada variant es van dissenyar dos encebadors, que amplificaran el fragment per PCR, i dues sondes d'hibridació adjacents marcades amb diferents fluorocroms:

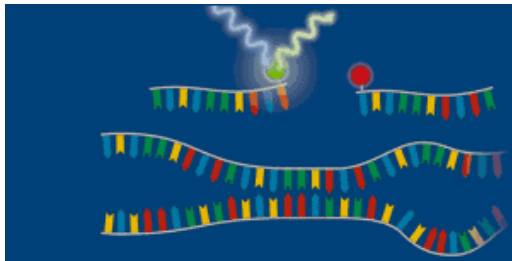
- **Sonda sensor:** Està marcada a l'extrem 3' amb fluoresceïna, que és el fluorocrom que actua com a donador de fluorescència. La sonda *sensor* cobreix la regió on es localitza la mutació i es pot dissenyar de manera que sigui totalment complementària a la seqüència WT o bé a la seqüència que conté la mutació.
- **Sonda anchor:** Està marcada a l'extrem 5' amb un dels dos fluorocroms *LightCycler Red fluorophore* (LC-Red640 o LC-Red705), que actuen com a acceptors de fluorescència i són els que emetran el senyal fluorescent. Està modificada a l'extrem 3' per fosforilació per evitar l'elongació.

La discriminació al·lèlica amb sondes d'hibridació fluorescents es basa en el fenomen FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). Quan la reacció s'escalfa, es produeix la desnaturalització del DNA i les sondes es separen i no emeten fluorescència. Quan la reacció es refreda, les sondes hibriden amb el DNA de manera que les dues sondes estan a prop. És llavors quan es genera el fenomen FRET entre els dos fluorocroms i es detecta la fluorescència. El fluorocrom donador és excitat per una font de llum de l'aparell Light Cycler i transfereix energia al fluorocrom acceptor,

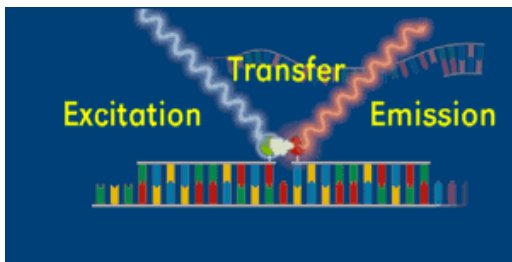
que allibera llum en una determinada longitud d'ona, i aquesta fluorescència emesa és mesurada per l'aparell (Figura 8). Només quan les dues sondes es troben a una distància de menys de 5 nucleòtids, la transferència d'energia és altament eficient.



Durant el procés de desnaturalització, a l'augmentar la temperatura, es separen les cadenes de DNA. Durant aquest procés, els encebadors i les sondes no s'uneixen al DNA i, per tant, les sondes no emeten fluorescència.



La sonda *sensor* està marcada a l'extrem 3' amb el fluorocrom donador, la fluoresceïna, que és excitada amb llum blava a 470 nm i emet llum verda a 530 nm. La sonda *anchor* està marcada a l'extrem 5' amb un dels dos fluorocroms acceptors (LC-Red640 o LC-Red705).



Quan es produeix una disminució de la temperatura, els encebadors i les sondes s'aparellen amb el DNA. Això fa que les dues sondes estiguin a prop, i l'excitació del fluorocrom donador per la llum blava resulta en una transferència d'energia al fluorocrom acceptor, que emet llum vermella a 640 o 705 nm.

Figura 8. Funcionament del fenomen FRET amb sondes d'hibridació fluorescentes

Per realitzar l'anàlisi molecular de les variants del gen *APC* amb sondes d'hibridació fluorescentes amb el sistema Light Cycler, en primer lloc es va realitzar l'amplificació per PCR del fragment on es localitza la variant:

- **Desnaturalització del DNA**

A 95 °C, el DNA es desnaturalitza i els encebadors i les sondes no s'uneixen al DNA, de manera que les sondes no emeten fluorescència.

- **Aparellament**

Quan disminueix la temperatura i la reacció arriba a la temperatura d'aparellament, els encebadors i les sondes s'uneixen al DNA, de manera que es genera el fenomen

FRET entre els dos fluorocroms i l'energia emesa pel fluorocrom donador excita el fluorocrom acceptor, que emet fluorescència a 640 o 705 nm.

- **Elongació**

Després de l'aparellament, la temperatura augmenta a 72 °C i els encebadors elonguen les cadenes de DNA mitjançant la DNA polimerasa. A aquesta temperatura, les sondes no es poden mantenir unides al DNA, de manera que es separen i deixen d'emetre fluorescència.

L'increment de la fluorescència és proporcional a l'increment de molècules de DNA generades durant el procés d'amplificació. La formació dels productes de PCR es monitoritza i ens permet veure l'augment de fluorescència a temps real.

Després dels cicles d'amplificació, es va realitzar la discriminació al·lèlica mitjançant les corbes de fusió:

- **Desnaturalització del DNA**

Es desnaturalitza el DNA a 95 °C perquè es separin els encebadors i les sondes del DNA.

- **Unió de les sondes**

La temperatura disminueix i es manté a 40-50 °C durant uns 20 s perquè totes les sondes es puguin unir al DNA. Llavors es genera el fenomen FRET entre els dos fluorocroms i s'emet fluorescència.

- **Corbes de fusió**

Una vegada estan totes les sondes unides al DNA emetent fluorescència, es produeix una rampa d'escalfament on la temperatura augmenta lentament fins a 80 °C amb una taxa lineal de 0,1-0,2 °C/s. Durant aquesta rampa d'escalfament, les sondes que no hibriden amb un 100% de complementarietat al DNA es separaran abans que les sondes que hibriden amb un 100% de complementarietat, degut a que la seva temperatura de fusió (T_m , *melting temperature*) és menor. La T_m és la temperatura a la qual la meitat de les molècules de DNA estan desnaturalitzades. Això es traduirà en una disminució de la fluorescència emesa a diferents T_m que podem observar a temps real i això ens permet determinar el genotip de les diferents mostres. Un únic malaparellament entre la sonda *sensor* i el DNA pot produir una disminució de la T_m de 5-8 °C.

Els encebadors i les sondes d'hibridació utilitzats per a l'amplificació i la discriminació al·lèlica de les variants del gen *APC* es mostren a la Taula 6 de l'annex I. Les condicions d'amplificació i de discriminació al·lèlica per a cada fragment es mostren a la Taula 7 de l'annex I.

2.3 Identificació de polimorfismes del gen *APC* per RFLP

Es va confirmar per PCR-RFLP la pèrdua d'heterozigositat al codó 1822 del gen *APC* observada amb el Light Cycler en els teixits tumorals de casos de CCR esporàdic que eren heterozigots per la variant. Aquesta tècnica consisteix en l'amplificació de fragments de DNA específics mitjançant PCR i la posterior digestió amb enzims de restricció. Es va analitzar per PCR-RFLP el polimorfisme c.5465A>T (D1822V; rs459552) del gen *APC* juntament amb els dos polimorfismes propers c.4479A>G (rs41115) i c.5880A>G (rs465899), en teixits aparellats normal i tumoral de 92 casos del grup de CCR esporàdic.

Les condicions d'amplificació per PCR dels tres fragments del gen *APC* es mostren a la Taula 5 de l'annex I. Els productes de PCR, després de ser visualitzats en gels d'agarosa, es van digerir amb els corresponents enzims de restricció: *Bsa*JI (New England Biolabs) per al polimorfisme c.4479A>G, *Msp*I (New England Biolabs) per al polimorfisme c.5880A>G i *Mbo*II (New England Biolabs) per al polimorfisme c.5465A>T (veure les condicions de digestió a la Taula 8 de l'annex I). Els productes de la digestió es van visualitzar per electroforesi en gels d'acrilamida al 9%. Totes les digestions incloïen una mostra de genotip conegut com a control positiu de digestió. Es va considerar que hi havia pèrdua al·lèlica quan s'observava visualment una disminució de la intensitat d'almenys un 50% o l'absència completa d'un al·lel en el DNA tumoral comparat amb el DNA parella de mucosa normal. En un subgrup de casos (10 de 25), la inspecció visual ocular es va correlacionar amb anàlisis densitomètrics amb el programa Phoretics (Phoretics 1D software; Phoretics International).

2.4 Anàlisis estadístiques utilitzades per a l'estudi de la variant *APC* D1822V

Es van testar les freqüències genotípiques en casos i controls per assegurar-nos que seguien l'equilibri de Hardy-Weinberg. Per testar la hipòtesi d'associació entre els factors de risc i la variant D1822V, es van utilitzar mètodes multivariants basats en models de regressió logística. Per cada grup es van calcular les *odds ratios* (ORs) i els respectius intervals de confiança (IC) del 95%. Per incrementar el poder estadístic, es va calcular el risc combinant els heterozigots amb els homozigots per la variant, contra la categoria referent d'homozigotitzat per l'al·lel més freqüent assumint un model dominant.

Els tests per la tendència lineal de les ORs es van calcular utilitzant la variable categoritzada com a quantitativa després d'assignar una puntuació lineal a cada categoria. Els p-valors es van calcular amb tests de raó de versemblança (*likelihood ratio tests*). Es va utilitzar un nivell de significació a dues cues del 5% per avaluar la significació.

Els tests per veure les interaccions entre el genotip i les exposicions es van dur a terme comparant el canvi en la desviació ($-2 \cdot \log$ versemblança) entre el model amb els efectes principals i el model que també inclou el terme interacció (producte dels efectes principals).

Totes les anàlisis es van ajustar per edat i sexe. Quan es van estudiar les interaccions amb les variables de dieta, les anàlisis també es van ajustar a l'índex de massa corporal i a la ingesta total d'energia. Les densitats dels nutrients es van calcular dividint la ingesta estimada de nutrients entre el total d'ingesta energètica.

3. ANÀLISI MOLECULAR DEL GEN *CTNNB1*

Per descartar la presència de mutacions en el gen *CTNNB1* en el cas índex de la família d'AFAP portadora de la variant *APC* N1026S, es va amplificar per PCR l'exó més freqüentment mutat (exó 3) del gen que codifica per la β -catenina (*CTNNB1*). Les condicions d'amplificació per PCR de l'exó 3 del gen *CTNNB1* es mostren a la Taula 5 de l'annex I. El producte amplificat es va visualitzar en un gel d'agarosa, es va purificar i es va seqüenciar amb els mateixos encebadors que els emprats per a l'amplificació.

4. ANÀLISI MOLECULAR DEL GEN *MYH*

Per descartar la presència de les dues variants més prevalents del gen *MYH*, la Y165C i la G382D, en els casos índexs de les famílies de FAP o d'AFAP on no s'havia identificat cap mutació patogènica en el gen *APC*, es van analitzar aquestes dues variants per discriminació al·lèlica amb el Light Cycler.

Els encebadors i les sondes d'hibridació utilitzats per a l'amplificació i la discriminació al·lèlica de les variants del gen *MYH* es mostren a la Taula 6 de l'annex I. Les condicions d'amplificació i de discriminació al·lèlica per a cada fragment es mostren a la Taula 7 de l'annex I.

5. MÈTODES D'OBTENCIÓ I MANIPULACIÓ DEL DNA

5.1 Extracció del DNA

5.1.1 Extracció de DNA a partir de sang perifèrica

El DNA germinal es va extreure a partir de sang perifèrica dels individus participants amb el kit *FlexiGene DNA* (Qiagen), d'acord amb les instruccions del fabricant. Breument, es van lisar els limfòcits, es van centrifugar els nuclis cel·lulars, es va resuspendre el pellet amb un tampó desnaturalitzant i amb proteases per digerir les

proteïnes, es va precipitar el DNA amb isopropanol, es va rentar amb etanol al 70%, es va assecat i es va rehidratar amb tampó 10 mM Tris-Cl pH 8,5. A continuació, es va determinar la concentració i la puresa del DNA per espectrofotometria i electroforesi del DNA en gels d'agarosa.

5.1.2 Extracció de DNA a partir de teixit congelat

En alguns casos de CCR esporàdic i hereditari, el DNA també es va extreure a partir de teixit fresc normal i/o tumoral congelat amb OCT pel mètode estàndard de fenol/cloroform. Es van tallar set seccions de 10 µm de gruix del teixit i abans de fer l'extracció del DNA, es van rentar amb 1 ml de PBS 1x (*Phosphate-Buffered Saline*, 1,47 mM KH₂PO₄, 4,29 mM Na₂HPO₄ × 7H₂O, 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl) i es van centrifugar a 14.000 rpm durant 5 min per eliminar les restes d'OCT.

5.2 Electroforesi del DNA

5.2.1 Electroforesi del DNA en gels d'agarosa

L'electroforesi en gels d'agarosa és un mètode senzill, ràpid i eficient per separar, visualitzar i identificar fragments de DNA, els quals es separen en funció de la seva mida, aplicant un voltatge constant al gel d'entre 50 i 120 volts.

Generalment els gels es preparen amb percentatges d'agarosa que oscil·len entre el 0,8 i el 3%, en funció de la mida dels fragments de DNA a separar. Per separar fragments d'entre 0,4 i 6 kb s'utilitzen gels a l'1% i per separar fragments més petits s'utilitzen percentatges superiors, fins al 3%.

L'agarosa es dissol en TBE 1x i s'hi afegeix bromur d'etidi, un agent intercalant dels àcids nucleics, per a la posterior visualització del DNA per mitjà de l'aplicació d'una font de llum ultraviolada (UV).

5.2.2 Electroforesi del DNA en gels d'acrilamida

Els gels d'acrilamida s'utilitzen per separar, visualitzar i identificar fragments petits de DNA (5-500 pb). Es van preparar gels d'acrilamida al 9% en TBE 1x amb un 0,15% d'APS i un 0,06% de TEMED, als quals se'ls va aplicar un voltatge constant de 260 volts. Després de l'electroforesi es van tenyir amb una solució de 2 ng/µl de bromur d'etidi i després de destenyir-los en aigua destil·lada, es va visualitzar el DNA per mitjà de l'aplicació d'una font de llum UV.

5.3 Purificació del DNA

5.3.1 Purificació de productes de PCR

Els productes de PCR es van purificar amb el kit *JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit* (Genomed), d'acord amb les instruccions del fabricant.

5.3.2 Purificació del DNA a partir de gels d'agarosa

Els fragments de DNA poden ser recuperats i purificats dels gels d'agarosa de baix punt de fusió, per poder ser utilitzats en aplicacions posteriors. Una vegada s'han separat bé els fragments en els gels d'agarosa (generalment a l'1%), es retalla la banda o bandes a recuperar amb un bisturí, sota il·luminació ultraviolada de baixa energia. Finalment es purifica la banda retallada amb el kit de purificació de fragments de DNA *QIAquick Gel Extraction Kit* (Quiagen), d'acord amb les instruccions del fabricant.

5.3.3 Aïllament i purificació del DNA plasmídic

Per aïllar i purificar el DNA plasmídic de les soques d'*E. Coli* es van utilitzar diferents protocols segons la quantitat i puresa que en volíem obtenir. Així, es va utilitzar el kit *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen) per aïllar i purificar fins a 20 µg de DNA plasmídic i el kit *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) per a obtenir-ne fins a 500 µg, d'acord amb les instruccions del fabricant.

El DNA obtingut per *miniprep* es va eluir amb 50 µl d'aigua bidestil·lada i el DNA precipitat obtingut per *maxiprep* es va dissoldre amb 200-300 µl d'aigua bidestil·lada. A continuació es va quantificar el DNA obtingut i es va visualitzar en un gel d'agarosa.

5.4 Seqüenciació del DNA

Els productes de PCR purificats es van seqüenciar amb el kit *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems) per electroforesi capil·lar utilitzant el seqüenciador automàtic ABI Prism 3730 (Applied Biosystems) dels Serveis Científicotècnics de la Universitat de Barcelona. La reacció de seqüència conté 1 µl de *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, 1,5 µl de *BigDye v3.1 Sequencing Buffer (5x)*, 3,2 pmols d'encebadors, el volum de DNA adequat segons la intensitat de la banda observada en el gel d'agarosa (1-5 µl) i aigua bidestil·lada fins un volum final de 10 µl. Les condicions de la reacció de seqüenciació van ser les següents: 25 cicles de 30 s a 96 °C, 15 s a la temperatura d'aparellament dels encebadors menys 5 °C, i 4 min a 60 °C. Una vegada acabada la reacció de seqüència es va precipitar el DNA amb etanol per eliminar les restes de nucleòtids no incorporats. Les seqüències es van alinear amb el programa *Seqman* (Lasergene, DNASTar).

5.5 Vectors d'expressió gènica

A continuació es descriuen els vectors plasmídics utilitzats en els diferents experiments:

- **pCMV-APC**

Vector d'expressió sota el control del promotor CMV (citomegalovirus). Conté el gen APC WT clonat a la diana BamHI. Conté un gen de resistència a ampicil·lina. Aquest plasmidi va ser cedit pels Drs. B. Vogelstein i K. Kinzler (Johns Hopkins University, Baltimore, MD).

- **pCMV-APC1309Δ**

Vector d'expressió sota el control del promotor CMV (citomegalovirus). Conté el gen APC amb una mutació truncant al codó 1309, clonat a la diana BamHI. Conté un gen de resistència a ampicil·lina. Aquest plasmidi va ser cedit pels Drs. B. Vogelstein i K. Kinzler (Johns Hopkins University, Baltimore, MD).

- **pGEX-4T1**

Vector d'expressió de 4,9 Kb amb un promotor *tac* induïble per IPTG (isopropil-β-D-tio-galactòsid). Conté un gen codificant per GST (*glutathione S-transferase*) i una seqüència d'AA diana per la trombina. Conté un gen de resistència a ampicil·lina.

- **pCDNA 3.1**

Vector d'expressió de 5,4 Kb (Invitrogen) amb un promotor CMV (citomegalovirus). Conté un gen de resistència a ampicil·lina.

- **pGEX-6P3-β-catenina**

Vector d'expressió amb un promotor *tac* induïble per IPTG que conté el gen β-catenina. Conté un gen codificant per GST i una seqüència d'AA diana per l'enzim *PreScission protease*. Conté un gen de resistència a ampicil·lina. Aquest plasmidi va ser cedit per la Dra. M. Duñach (Universitat Autònoma de Barcelona).

- **pTOPFLASH**

Vector d'expressió de 5,5 Kb que conté dos sets de tres còpies WT 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**

Vector d'expressió de 5,5 Kb que conté dos sets de tres còpies mutades de la seqüència d'unió a Tcf-4 en direcció 5' del promotor constitutiu TK i del gen *Firefly* luciferasa. Aquest plasmidi va ser cedit per la Dra. E. Sancho (Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona).

- ***phRL-TK***

Conté el gen *Renilla* luciferasa sota el control del promotor constituïu TK. Aquest plasmidi va ser cedit per A. Vinyals (Institut de Recerca Oncològica).

5.5.1 Construcció pGEX-APC-4x15

Es va clonar un fragment del gen *APC* que conté les quatre repeticions de 15 AA del domini d'unió a β -catenina (AA 1014-1197) dins el plasmidi pGEX-4T1, per formar la construcció pGEX-APC-4x15:

- ***Reacció de PCR***

L'amplificació per PCR del fragment *APC* 4x15 es va fer a partir del cDNA del gen *APC* del plasmidi pCMV-*APC* utilitzant encebadors específics. A l'encebador *forward* se li va afegir una diana *EcoRI* i al *reverse* una diana *XhoI*, les dues als seus extrems 5'. Els encebadors utilitzats i les condicions d'amplificació del fragment *APC* 4x15 es mostren a la Taula 5 de l'annex I. Després de visualitzar el fragment amplificat en un gel d'agarosa, es va purificar i es va seqüenciar amb els mateixos encebadors que els emprats per a l'amplificació.

- ***Digestió del DNA amb enzims de restricció***

Es va fer una digestió doble del fragment *APC* 4x15 amplificat i purificat i del plasmidi pGEX-4T1 purificat, amb els enzims de restricció *EcoRI* i *XhoI* (Roche), segons les indicacions del fabricant (veure les condicions de digestió a la Taula 8 de l'annex I). Després de la digestió, el plasmidi pGEX-4T1 digerit es va carregar en un gel d'agarosa de baix punt de fusió a l'1% i després de l'electroforesi es va retallar la banda del plasmidi i es va purificar amb el kit *QIAquick Gel Extraction Kit* (Quiagen), d'acord amb les instruccions del fabricant. El fragment *APC* 4x15 digerit es va purificar amb el kit *JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit* (Genomed), d'acord amb les instruccions del fabricant.

- ***Lligació dels fragments de DNA***

Una vegada purificats els productes de digestió, es va procedir a fer la lligació utilitzant el kit *Rapid DNA Ligation kit* (Roche), seguint les instruccions del fabricant. Es van barrejar 3 μ l de l'insert, 1 μ l del plasmidi, 2 μ l de *DNA Dilution Buffer 5x* i aigua bidestil·lada fins un volum final de 10 μ l. Després es van afegir 10 μ l de *T4 DNA Ligation Buffer 2x*, es va barrejar i finalment es va afegir 1 μ l de *T4 DNA Ligase* (5 U/ μ l). Després de barrejar-ho, es va incubar durant 10 min a TA. A continuació, es van transformar bacteris *E. Coli* competents amb el producte de la lligació (veure apartat 5.7). Per seleccionar els plasmidis que havien incorporat l'insert dels que no l'havien incorporat, es va aïllar i purificar el DNA plasmídic de totes les colònies que havien crescut i es va digerir aquest producte de lligació (pGEX-APC-4x15) amb els enzims *EcoRI* i *XhoI* (Roche), segons les indicacions del fabricant (veure les

condicions de digestió a la Taula 8 de l'annex I). Després es van carregar els productes de digestió en un gel d'agarosa al 0,8% i es va poder comprovar quines colònies havien incorporat el plasmidi amb l'insert. Posteriorment, es va verificar l'absència de mutacions de l'insert *APC* 4x15 per seqüenciació directa amb els mateixos encebadors que els emprats per a l'amplificació.

5.6 Mutagènesi dirigida

Es van generar les mutacions puntuals Asn1026 → Ser i Leu1129 → Ser als plasmidis pCMV-*APC* i pGEX-*APC*-4x15 amb el kit *QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene), seguint les instruccions del fabricant. Per a generar el canvi d'asparragina (Asn) a serina (Ser) al codó 1026, es va dissenyar l'encebador *forward* 5'-CTAGATACACCAATAAGTTATAGTCTTAAATATTC-3' que conté un canvi d'adenina (A) a guanina (G) a la posició corresponent al nucleòtid 3077 del gen *APC*, mostrat en negreta, i el *reverse*, que és idèntic i complementari. Per generar el canvi de leucina (Leu) a serina (Ser) al codó 1129, es va dissenyar l'encebador *forward* 5'-GTAAGCCAGTCTTCGTGTCAAGAAGATGAC -3' que conté un canvi de timina (T) a citosina (C) a la posició corresponent al nucleòtid 3386 del gen *APC*, mostrat en negreta, i el *reverse*, que és idèntic i complementari.

Es va fer una PCR amb la DNA polimerasa *Pfu Turbo* per obtenir els plasmidis amb les mutacions. En el cas del plasmidi pCMV-*APC* les condicions de PCR van ser: 95 °C 30 s i 15 cicles de 95 °C 30 s, 55 °C 1 min i 68 °C 20 min. Per al plasmidi pGEX-*APC*-4x15, les condicions van ser: 95 °C 30 s i 15 cicles de 95 °C 30 s, 55 °C 1 min i 68 °C 8 min. Després de l'amplificació, els productes de PCR es van digerir amb l'enzim de restricció *DpnI* per tal de degradar les cadenes de DNA parental metilades. Finalment es van transformar bacteris competents amb els plasmidis mutats. Per comprovar si els plasmidis havien incorporat la mutació, es va aïllar el DNA plasmídic d'algunes colònies a l'atzar i es van seqüenciar els fragments corresponents dels inserts. Per altra banda, per comprovar que no s'havia generat cap alteració en la mida dels plàsmids i dels inserts, es va digerir el DNA plasmídic amb els enzims *EcoRI* i *XhoI* (Roche) per als plasmidis pGEX-*APC*-4x15 i amb *BamHI* (New England Biolabs) per als plasmidis pCMV-*APC*, segons les indicacions del fabricant (veure les condicions de digestió a la Taula 8 de l'annex I). Després es van visualitzar els productes de digestió en un gel d'agarosa al 0,8%.

5.7 Transformació bacteriana

Per amplificar els plasmidis mitjançant la transformació bacteriana es van utilitzar els bacteris *E. Coli* competents *One Shot TOP10 Competent Cells* (Invitrogen), seguint el protocol de xoc tèrmic recomanat per la casa comercial.

Es van descongelar en gel 25 µl de bacteris competents per a cada transformació/l·ligació. Es van afegir de 50 a 200 ng de DNA plasmídic o de 1 a 5 µl del producte de l·ligació o de mutagènesi. Es va barrejar amb suavitat i es va incubar en gel durant 30 min. Llavors es van incubar els tubs a 42 °C durant exactament 30 s, després es van posar 2 min en gel, es van afegir, a cada tub, 250 µl de medi SOC estèril (2% triptona, 0,5% extracte de llevat, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl, 10 mM MgSO i 20 mM glucosa) prèviament escalfat a 37 °C, i es van incubar els tubs durant 1 h a 37 °C en agitació. A continuació es van sembrar de 20 a 200 µl de cada transformació en plaques d'LB (Luria-Bertani)-agar estèrils (1% triptona, 0,5% extracte de llevat, 1% NaCl, 1,5% agar, pH 7,5) suplementades amb l'antibiòtic adequat (50 µg/ml d'ampicil·lina i/o 30 µg/ml de kanamicina) i es van incubar les plaques tota la nit a 37 °C.

A l'endemà es van seleccionar les colònies que havien crescut i es va fer un segon creixement a 37 °C durant tota la nit en 3 ml de medi LB líquid estèril (1% triptona, 0,5% extracte de llevat, 1% NaCl, pH 7,5) suplementat amb l'antibiòtic adequat a fi d'aïllar el DNA plasmídic a partir d'1 ml del creixement. Els 2 ml restants es van guardar amb glicerol a -80 °C per a posteriors creixements.

6. MÈTODES DE DETECCIÓ DE PROTEÏNES

6.1 Electroforesi de proteïnes per SDS-PAGE

L'electroforesi en gels de poliacrilamida amb dodecil sulfat sòdic (SDS-PAGE, *Sodium dodecylsulfate polyacrilamide gel electrophoresis*) és el sistema més emprat per la separació de proteïnes en funció del seu pes molecular.

Es va utilitzar el sistema *Mini-PROTEAN* de BioRad per a l'electroforesi de proteïnes de pes molecular de fins a 150-200 kDa i el sistema *NuPAGE* d'Invitrogen per separar proteïnes d'elevat pes molecular, com la proteïna APC, de 312 kDa.

6.1.1 Sistema *Mini-PROTEAN*

Per a l'electroforesi de proteïnes amb el sistema *Mini-PROTEAN* (BioRad) es van utilitzar gels d'1 o 1,5 mm de gruix que consten d'una part que anomenem gel concentrador (*stacking*) amb un percentatge d'acrilamida del 3,6% (3,6% acrilamida, 0,1% N',N'-bis-metilen-acrilamida, 125 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS, 0,25% TEMED, 0,13% APS), que permet alinear les proteïnes abans de ser separades i d'una part que anomenem gel separador (*resolving*) amb un percentatge d'acrilamida entre el 8 i el 15% (8-15% acrilamida, 0,22-0,4% N',N'-bis-metilen-acrilamida, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1% SDS, 0,14% TEMED, 0,065% APS), que permet la separació de les proteïnes en funció del seu pes molecular.

Es va col·locar el gel a la cubeta d'electroforesi i es van carregar de 5 a 50 µg de proteïna amb tampó de mostra 1x (2% SDS, 0,5 mg/ml DTT –ditiotreitòl–, 10% glicerol, 0,1mg/ml blau de brom fenol). Abans de carregar les mostres al gel, es van desnaturalitzar a 100 °C durant 3 min i es van centrifugar a 14.000 rpm durant 30 s a TA. Es va utilitzar el marcador de pes molecular *BenchMark Prestained Protein Ladder* (Invitrogen). L'electroforesi es va dur a terme en tampó d'electroforesi (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicina, 0,1% SDS) a 120 V durant 1 h i 30 min.

6.1.2 Sistema NuPAGE

Per poder separar proteïnes d'elevat pes molecular, com la proteïna APC, es van utilitzar els gels de poliacrilamida comercials *NuPAGE Novex 3-8% Tris-Acetate Gel* (Invitrogen) d'1 mm de gruix. Aquests gels tenen un gradient d'acrilamida del 3 al 8% que permet realitzar una bona separació de proteïnes d'elevat pes molecular.

Per lisar els pellets de les cèl·lules transfectades que teníem guardats a -80 °C, es van afegir 300 µl de tampó de mostra 1x a cada pellet (aprox. $0,5-1 \times 10^6$ cèl·lules): 75 µl de *NuPAGE LDS Sample Buffer (4X)*, 30 µl de *NuPAGE Sample Reducing Agent (10X)* i aigua bidestil·lada fins un volum de 300 µl.

Els pellets de les cèl·lules es van mantenir a -80 °C fins el moment d'afegir-hi el tampó de mostra. Després d'afegir el tampó, es van pipetejar les mostres i a partir de llavors es van mantenir sempre en gel. Es van sonicar durant 3 períodes de 15 s, es van deixar reposar 5 min en gel i es van centrifugar a 14.000 rpm durant 10 min a 4 °C. Després es van desnaturalitzar les mostres a 100 °C durant 3 min, es van refredar en gel durant 2 min i es van centrifugar a 14.000 rpm durant 30 s a TA. Es van carregar al gel de 10 a 20 µl de cada mostra i 10 µl de marcador d'elevat pes molecular *HiMark Pre-stained HMW Protein Standard* (Invitrogen). Per a l'electroforesi es va utilitzar el tampó d'electroforesi comercial *NuPAGE Tris-Acetate SDS Running Buffer* (Invitrogen). Es va preparar tampó d'electroforesi 1x (50 ml de 20x *NuPAGE Tris-Acetate SDS Running Buffer* i 950 ml d'aigua destil·lada), dels quals 600 ml es van posar a la cambra exterior de la cubeta d'electroforesi *XCell SureLock Mini-Cell* (Invitrogen) i 200 ml es van barrejar amb 500 µl d'antioxidant *NuPAGE Antioxidant* (Invitrogen) i es van posar a la cambra interior de la cubeta. L'electroforesi es va dur a terme durant 1 h a 150 V.

6.2 Transferència de proteïnes (*Western Blotting*) i immunodetecció

Una vegada separades les proteïnes per SDS-PAGE es va procedir a fer la transferència electroforètica de les proteïnes a les membranes corresponents i la posterior detecció de la proteïna d'interès mitjançant anticossos específics.

Els anticossos primaris emprats van ser:

- Anti- β -catenina (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY): anticòs monoclonal de ratolí utilitzat a dilució 1:500. Epítop: AA 571-781.
- Anti-GST (Upstate Biotechnology, Inc.): anticòs policlonal de conill utilitzat a dilució 1:500.
- Anti-APC (OP44; Oncogene Research Products, San Diego): anticòs monoclonal de ratolí utilitzat a dilució 1:100. Epítop: AA 1-35.
- Anti-actina (C4; MP Biomedicals, Irvine, CA): anticòs monoclonal de ratolí utilitzat a dilució 1:1.000.
- Anti-c-myc (9E10; Sigma): anticòs monoclonal de ratolí utilitzat a dilució 1:1.000.

Els anticossos secundaris emprats van ser:

- *Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP Conjugate* (BioRad): anticòs policlonal de cabra anti IgG de ratolí utilitzat a dilució 1:2.000
- *Goat Anti-Rabbit IgG (H+L)-HRP Conjugate* (BioRad): anticòs policlonal de cabra anti IgG de conill utilitzat a dilució 1:2.000

6.2.1 Sistema Mini-PROTEAN

Les proteïnes separades per SDS-PAGE es van transferir a la membrana *Immobilon-P* de PVDF de porus 0,45 μ m (Millipore). La membrana es va tallar a la mida del gel i es va submergir primer amb metanol durant 2 min i després 2 min en aigua bidestil·lada. Després es va equilibrar el gel que conté les proteïnes i la membrana durant 10 min en tampó de transferència (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM Glicina, 0,02% SDS i 20% Metanol), juntament amb dos trossos de paper Whatman i dues esponges de la mateixa mida. El muntatge de transferència es va col·locar dins la cubeta, que es va omplir amb tampó i es van transferir les proteïnes durant 2 h i 30 min a 60 V a 4 °C.

Després de la transferència, per assegurar-nos que les proteïnes s'havien transferit correctament, es va tenyir la membrana amb Roig de Ponceau (Sigma) durant 2-5 min en agitació, i després es va rentar amb aigua destil·lada per treure l'excés de colorant fins a observar el patró de bandes de les proteïnes. Es va rentar la membrana amb PBS 1x i es va incubar amb solució de bloqueig (5% de llet en pols dissolta en PBS 1x) durant 1 h a TA en agitació. Posteriorment, es va incubar amb l'anticòs primari corresponent diluït en una solució que contenia un 1% BSA i un 0,5% de llet en pols en TBS (*Tris-Buffered Saline*) (20 mM Tris-HCl i 150 mM NaCl, pH 7,4) durant tota la nit a 4 °C en agitació.

A l'endemà es van fer tres rentats de 5 min en agitació a TA amb TBST (0,05% Tween-20 en TBS) i es va incubar la membrana amb l'anticòs secundari corresponent diluït en una solució que contenia un 1% BSA i un 0,5% de llet en pols en TBS durant

45 min a TA en agitació. Després es van fer 2 rentats de 5 min en agitació a TA amb TBST, un rentat de 5 min en agitació a TA amb TBS i es va revelar amb el sistema de detecció per quimioluminescència ECL (Pierce) i amb pel·lícules fotogràfiques *Hyperfilm* (Amersham Biosciences) amb diferents temps d'exposició.

6.2.2 Sistema NuPAGE

Després de l'electroforesi, les proteïnes es van transferir a la membrana *Invitrolon* de PVDF de porus 0,45 µm (Invitrogen), que abans de la transferència es va submergir primer amb metanol durant 30 s i després 2 min en aigua bidestil·lada. Es van equilibrar tots els components de la transferència durant 10 min en tampó de transferència 1x, que es va preparar amb 25 ml de *NuPAGE Transfer Buffer (20X)*, 500 µl de *NuPAGE Antioxidant*, 50 ml de Metanol i aigua bidestil·lada fins un volum de 500 ml. Després es va fer el muntatge de transferència, que es va col·locar dins la cubeta *XCell SureLock Mini-Cell*. Es va omplir amb tampó i es van transferir les proteïnes durant 1 h a 15 V a TA.

Després de la transferència, per assegurar-nos que les proteïnes s'havien transferit correctament, es va tenyir la membrana amb Roig de Ponceau (Sigma) i després es va treure l'excés de colorant amb aigua destil·lada fins a observar el patró de bandes de les proteïnes. Es va rentar la membrana amb PBS 1x i es va incubar en solució de bloqueig (10% de llet en pols dissolta en TBST) durant 1 h a TA en agitació. Després es va incubar amb l'anticòs primari corresponent diluït en una solució que contenia un 5% de llet en pols dissolta en TBST durant tota la nit a 4 °C en agitació. Com a control de càrrega es va analitzar l'actina per a totes les mostres.

A l'endemà es van fer tres rentats de 10 min en agitació a TA amb TBST i es va incubar la membrana amb l'anticòs secundari corresponent diluït en un 5% de llet en pols en TBST durant 1 h a TA en agitació. Després es van fer 3 rentats de 15 min en agitació a TA amb TBST, un rentat de 15 min en agitació a TA amb TBS i es va revelar amb el sistema de detecció per quimioluminescència ECL (Pierce), amb plaques d'autoradiografia *Hyperfilm* (Amersham Biosciences) durant diferents temps d'exposició.

6.3 Immunohistoquímica de β-catenina

6.3.1 Tinció hematoxilina-eosina

Es van tallar els teixits parafinats en seccions de 3 µm de gruix amb el micròtom, es van estendre els talls en un bany amb aigua a 37 °C, es van dipositar en portaobjectes prèviament tractats amb poli-L-lisina (Sigma) al 50% i es van deixar assecar a l'estufa a 37 °C durant tota una nit. Les mostres es van desparafinar mitjançant una bateria de 4 xilols, 3 etanols absoluts, 3 etanols al 96% i 1 etanol al 70%. Les mostres van estar

10 min en cada xilol i 5 min en cada etanol. Després es van hidratar amb aigua bidestil·lada durant 5 min i es van tenyir durant 10 min amb una solució d'hematoxilina de Harris (Merck) prèviament filtrada. A continuació es van rentar les mostres amb aigua de l'aixeta, es van posar en una solució d'HCl a l'1% fins que es van tornar més vermelloses i després es van posar en aigua amoniaca fins que es van tornar blavoses. Després es van tenyir amb una solució d'eosina (Merck) al 25% en etanol al 80% durant 10 min, i es van deshidratar mitjançant una bateria ràpida (1 min a cada cubeta) d'1 etanol al 70%, 3 etanols al 96%, 3 etanols absoluts i 4 xilols (en xilol es poden quedar més estona). Les mostres es van muntar amb DPX i es van observar les preparacions en un microscopi òptic.

6.3.2 Tinció de β -catenina

Després de desparafinar els talls i hidratar-los amb aigua bidestil·lada durant 5 min, es van permeabilitzar amb tampó citrat sòdic 1x a pH 6 al microones durant 3 min a màxima potència. Després de deixar refredar les mostres a TA durant 20 min, es van rentar amb PBS 1x durant 5 min i es va inhibir l'activitat peroxidasa endògena amb una solució d'aigua oxigenada al 3% en aigua destil·lada durant 5 min. Es va fer un rentat de 5 min amb aigua destil·lada, dos rentats de 5 min amb PBS 1x i un rentat de 5 min amb Tritó X-100 al 0,1% en PBS 1x. A continuació es van incubar les mostres amb sèrum de cabra a una dilució 1:5 en PBS 1x durant 2 h a TA a una cambra humida fosca i després es van incubar les mostres amb 100 μ l d'anticòs primari anti- β -catenina (BD Transduction Laboratories, Lexington, KY) a una dilució 1:100 en PBS 1x a la cambra humida fosca a 4 °C durant tota la nit.

A l'endemà es van fer tres rentats de 5 min amb Tritó X-100 al 0,1% en PBS 1x i es van incubar les mostres amb 100 μ l d'anticòs secundari *Envision anti-mouse* (Dako) durant 30 min a TA a la cambra humida fosca. Després es van fer tres rentats de 5 min amb Tritó X-100 al 0,1% en PBS 1x i es van revelar les mostres amb una solució de 3-3'Diaminobenzidina (DAB, Dako) com a cromogen, d'acord amb les instruccions del fabricant.

Després del revelat, es van rentar les mostres amb aigua de l'aixeta, es van contra-tenyir amb hematoxilina diluïda durant 1-2 min, es van rentar amb abundant aigua corrent de l'aixeta i es van deshidratar amb una bateria ràpida (1 min a cada cubeta) d'1 etanol al 70%, 3 etanols al 96%, 3 etanols absoluts i un xilol. Les mostres es van muntar amb DPX i es van observar les preparacions en un microscopi òptic.

A cada assaig d'immunohistoquímica, el teixit utilitzat com a control positiu va ser teixit de bufeta amb elevada expressió de β -catenina, i aquest mateix teixit es va fer servir també com a control negatiu, al qual no s'hi va afegir l'anticòs primari. De totes les mostres analitzades, es va obtenir un control negatiu.

7. EXPRESSIÓ DE PROTEÏNES RECOMBINANTS I ANÀLISI DE LES SEVES INTERACCIONS

7.1 Obtenció de proteïnes recombinants

7.1.1 Expressió i purificació de proteïnes recombinants en procarïotes

Es van expressar en *E. Coli* les proteïnes de fusió GST-APC-4x15-WT, GST-APC-4x15-Ser1026, GST-APC-4x15-Ser1129, GST- β -catenina i la proteïna GST lliure, i posteriorment es van purificar per cromatografia d'afinitat. Es va fer créixer un inòcul dels bacteris que guardàvem congelats a -80 °C amb glicerol, transformats amb els plasmidis pGEX-APC-4x15-WT, pGEX-APC-4x15-Ser1026, pGEX-APC-4x15-Ser1129, pGEX-6P3- β -catenina i pGEX-4T1, en 200 ml de LB amb l'antibiòtic corresponent en agitació a 37 °C durant tota la nit.

A l'endemà es van afegir 40 ml del creixement en 1 litre de LB i es va deixar en agitació a 37 °C fins que el creixement va assolir una densitat òptica a 600 nm de 0,3-0,6. Llavors es va induir l'expressió de les proteïnes afegint IPTG a una concentració final de 0,1 mM i incubant durant 3 hores més a 37 °C en agitació. Després es van centrifugar els bacteris a 3.000 rpm durant 30 min a 4 °C, es van resuspendre en 4 ml de PBS 1x (10 mM EDTA, pH 7,5) amb inhibidors de proteases (1 μ g/ml Leupeptin, 10 μ g/ml Aprotinin, 1 mM PMSF-*phenylmethanesulphonylfluoride*-) i es van lisar per sonicació en dos períodes de 30 s, mantenint sempre la solució en gel. A continuació es va afegir 1 mM de PMSF i 1% Tritó X-100 i es va deixar 1 h en gel. Després es va centrifugar a 10.000 rpm durant 15 min a 4 °C, es va descartar el pellet i es van purificar les proteïnes a partir de la fracció soluble.

La fracció soluble es va incubar durant 1 h a 4 °C en rotació amb 500 μ l de resina *Glutathione-Sepharose 4B* (Amersham Biosciences), prèviament rentada amb PBS 1x amb inhibidors de proteases. Després de la incubació es van fer rentats successius amb PBS 1x amb inhibidors de proteases per eliminar la proteïna no unida a la resina. Seguidament es va dur a terme l'elució de la proteïna que es trobava unida a la resina amb 10 mM de glutatió reduït en 50 mM Tris-HCl pH 8,0 i 5 mM DTT.

La proteïna obtinguda es va dialitzar amb 10 mM Tris pH 7,5 i glicerol a una concentració final del 10%, durant 18 h en agitació a 4 °C. Finalment, la proteïna ja dialitzada es va quantificar per Bradford, es va carregar en un gel SDS-PAGE, es va visualitzar per tinció del gel amb la solució de blau de Coomassie (0,2% de blau de Coomassie, 45% de metanol i 10% d'acètic) durant 30 min i es va destenyir el gel amb una solució que contenia un 45% de metanol i un 10% d'acètic.

7.1.2 Eliminació del domini GST de proteïnes recombinants

El domini GST es va eliminar de la proteïna de fusió GST- β -catenina per digestió amb l'enzim *PreScission protease* (Amersham Biosciences), d'acord amb les instruccions

del fabricant. Es van digerir 50-100 µg de GST-β-catenina amb 20 unitats d'enzim durant 4 h a 4 °C en rotació. Després, per comprovar que el domini GST s'havia separat de la β-catenina, es van separar els productes de digestió en un gel SDS-PAGE i es van visualitzar per tinció amb blau de Coomassie.

Llavors, per poder obtenir la β-catenina lliure tant de la GST com de l'enzim *PreScission protease*, es va incubar el producte de digestió amb 100 µl de resina *Glutathione-Sepharose 4B* durant 1h a 4 °C en rotació, es va centrifugar a 2.500 rpm durant 3 min, es va incubar el sobrenedant amb 100 µl de nova resina durant 1h a 4 °C en rotació i es va tornar a centrifugar a 2.500 rpm durant 3 min. Després de la centrifugació, tant la GST com l'enzim *PreScission protease* romandran units a la resina. Es va carregar la β-catenina lliure de GST (sobrenedant) en un gel SDS-PAGE i es va visualitzar per tinció amb blau de Coomassie, per comprovar que no quedaven restes de GST o d'enzim.

7.1.3 Quantificació de proteïnes

La quantificació de proteïnes es va realitzar amb el kit Bio-Rad Protein Assay (BioRad), basat en el mètode de Bradford, seguint les instruccions del fabricant. Es va extrapolar la concentració de la proteïna a partir dels valors d'una recta patró obtinguda a partir de concentracions conegudes de la proteïna BSA.

7.1.4 Precipitació de proteïnes amb àcid tricloroacètic (TCA)

Per concentrar les proteïnes, aquestes es van precipitar amb TCA. Primer es va afegir àcid tricloroacètic (TCA) a les mostres a una concentració final del 10%, es van barrejar bé els mostres amb vòrtex, es van incubar durant 10 min en gel i es van centrifugar a 14.000 rpm durant 10 min a 4 °C. Després es van descartar els sobrenedants, es van rentar els pellets amb acetona freda amb vòrtex i es van centrifugar a 14.000 rpm durant 10 min a 4 °C. Després de descartar els sobrenedants, es van deixar assecar les mostres precipitades en gel i finalment s'hi van afegir 20 µl de tampó de mostra 1x (2% SDS, 0,5 mg/ml DTT, 10% glicerol, 0,1 mg/ml blau de brom fenol).

7.2 Anàlisi d'interaccions moleculars per cromatografia d'afinitat

7.2.1 Interacció de β-catenina amb els pèptids APC Asn1026 i Ser1026

Es van generar dues columnes d'afinitat acoblant 3 mg dels pèptids Asn1026 i Ser1026, respectivament, a 3,5 ml de *CNBr-activated Sepharose 4B* (Amersham Biosciences). Els pèptids Asn1026 (LDTPINNYSLKYSDEQ) i Ser1026 (LDTPISSYSLKYSDEQ) es van sintetitzar al Servei de Proteòmica dels Serveis Científicotècnics (Universitat Pompeu Fabra). Aquests pèptids comprenen la primera

repetició de 15 AA d'unió a β -catenina (AA1021-1035) de la proteïna APC. El pèptid Asn1026 correspon a la repetició WT i el pèptid Ser1026 correspon a la repetició on s'ha introduït un canvi d'AA d'Asparagina (N) a Serina (S) a la posició corresponent al codó 1026 de la proteïna APC.

Es va preparar 1 gr de resina *CNBr-activated Sepharose 4B*, que equival a 3,5 ml de columna. Es va resuspendre la resina amb 15 ml d'1 mM HCl, es va rentar durant 15 min a TA en rotació i es va centrifugar a 3.000 rpm durant 5 min a 4 °C. Aquest rentat es va fer dues vegades. L'excés de solució es va eliminar en un filtre de vidre connectat al buit. Llavors es van afegir 4 ml de tampó d'unió (100 mM NaHCO₃ i 500 mM NaCl, pH 8,3) a la resina i es va dividir en dos tubs, a cadascun dels quals es van afegir 3 mg de cada pèptid dissolt en 500 μ l de tampó d'unió. Es va incubar la resina amb els pèptids durant 3 h a TA en rotació suau. Després es van centrifugar els tubs a 3.000 rpm durant 5 min a 4 °C i el sobrenedant es va reservar per a fer un Bradford, per comprovar que tot el pèptid s'havia unit a la resina. Per eliminar l'excés de lligand, la resina es va rentar amb 10 volums de tampó d'unió en un filtre de vidre connectat al buit. Després dels rentats, es va afegir tampó de bloqueig (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0) per bloquejar els grups que reaccionen amb amines lliures no unides als pèptids. Per fer els enllaços covalents permanents, es van fer 3 cicles de rentats alternatius amb tampó àcid (100 mM NaCH₃COO i 500 mM NaCl, pH 4,0) i bàsic (100 mM Tris-HCl i 500 mM NaCl, pH 8,2). Després es va rentar la resina unida als pèptids amb 15 ml de tampó de rentat (50 mM KCl, 50 mM HEPES, 1 mM MgCl₂ i 1 mM EDTA, pH 7,6) i es va abocar en dues columnes, una per a cada pèptid.

Primer es van incubar les columnes amb tampó de rentat amb un 0,1% de BSA, per a bloquejar la resina unida als pèptids, durant 30 min a 4 °C en rotació. Després es van dipositar 2 ml de cada resina, ja bloquejades, a dues columnes noves on, després de rentar-les amb tampó de rentat, es van incubar amb 20 μ g de GST- β -catenina purificada en 1 ml de tampó de rentat durant 30 min a 4 °C en rotació. Després de la incubació es va recollir la primera fracció que s'obté (FT, *flow-through*) i es van rentar les columnes extensament amb 500 ml de tampó de rentat 300 mM KCl. Després del rentat, es va recollir la última fracció del rentat (GST- β -catenina no unida) i la GST- β -catenina unida es va eluir, primer amb 3 ml del tampó d'elució A (tampó de rentat 1 M KCl, pH 7,6) i després amb 3 ml del tampó d'elució B (tampó àcid: 100 mM NaCH₃COO i 500 mM NaCl, pH 4,0). Les columnes finalment es van rentar amb 10 ml de tampó de rentat i es van recollir les dues primeres fraccions. Les columnes es van regenerar amb 10 ml de tampó de rentat 3 M KCl i es van guardar a 4 °C amb PBS 1x amb un 0,1% d'azida sòdica.

Per comprovar que la β -catenina no s'unia als pèptids pel domini GST, es va fer el mateix experiment, amb les columnes regenerades, incubant 20 μ g de GST lliure, com

a control. Les fraccions obtingudes a cada pas es van precipitar amb TCA, es van separar per SDS-PAGE i es van analitzar per *Western Blotting* (WB).

7.2.2 Interacció de β -catenina amb les proteïnes de fusió APC-4x15-WT, Ser1026 i Ser1129

Es van generar quatre columnes d'afinitat acoblant 2,4 mg de les proteïnes de fusió GST-APC-4x15-WT, GST-APC-4x15-Ser1026 i GST-APC-4x15-Ser1129 i de GST, respectivament, a 2 g de resina *CNBr-activated Sepharose 4B* seguint el protocol descrit a l'apartat 7.2.1. Les proteïnes de fusió GST-APC-4x15-Ser1026 i GST-APC-4x15-Ser1129 contenen les quatre repeticions de 15 AA del domini d'unió a β -catenina (AA 1014-1197) de la proteïna APC, on s'ha generat un canvi d'asparagina a serina a la posició corresponent al codó 1026 i un canvi de leucina a serina a la corresponent al codó 1129, respectivament.

Es va dipositar 1 ml de cada resina, ja bloquejada, a quatre columnes noves on, després de rentar-les amb tampó de rentat, es van incubar amb 20 μ g de β -catenina purificada sense GST en 1 ml de tampó de rentat durant 30 min a 4 °C en rotació. Després de la incubació es van fer els mateixos rentats que els descrits a l'apartat 7.2.1 i es van recollir les fraccions corresponents.

La β -catenina unida es va eluir, en aquest cas, primer amb 1 ml de tampó de rentat 500 mM KCl, després amb 1 ml de tampó de rentat 700 mM KCl, després amb 1 ml de tampó d'elució A (tampó de rentat 1 M KCl, pH 7,6) i finalment amb 1 ml del tampó d'elució B (tampó àcid: 100 mM NaCH₃COO i 500 mM NaCl, pH 4,0).

Les columnes finalment es van rentar amb 10 ml de tampó de rentat i es van recollir les dues primeres fraccions. Les columnes es van regenerar amb 10 ml de tampó de rentat 3 M KCl i es van guardar a 4 °C amb PBS 1x amb un 0,1% d'azida sòdica. També es van incubar les columnes regenerades amb 20 μ g de GST lliure, com a control. Les fraccions obtingudes a cada pas es van precipitar amb àcid tricloroacètic (TCA), es van separar per SDS-PAGE i es van analitzar per WB.

7.3 Anàlisi d'interaccions moleculars (proteïna - proteïna) per BIAcore

La tècnica BIAcore (Biomolecular Interaction Analysis) permet estudiar la interacció entre biomolècules en temps real. Es basa en un fenomen òptic: el principi de ressonància del plasmó de superfície (SPR, *Surface Plasmon Resonance*). En il·luminar amb una llum polaritzada una interfície entre medis de diferent índex de refracció separats per una làmina de material conductor, s'aprecia una "ombra" en la reflexió. L'angle d'aquesta "ombra" amb la interfície depèn directament de l'índex de refracció del medi situat a la cara oposada a les llums incident i reflectida. 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 representa 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.

Els assajos d'interacció es van fer amb l'aparell BIAcore 1000 (Biacore AB) dels Serveis Científicotècnics de la UB. Es poden utilitzar diferents tipus de xips que es diferencien bàsicament en el tipus de superfície on s'immobilitza el lligand. El xip més comú és el xip CM5, en el qual s'ha dipositat una matriu de dextrà carboximetilat sobre la superfície d'or. El lligand s'immobilitza covalentment mitjançant la formació d'enllaços amida. Cada xip consta de quatre canals diferents, i a cada canal s'hi pot unir covalentment una proteïna. 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.

En el nostre experiment, primer es va activar la superfície del xip amb 1-ethyl-3-(3-dimethylaminoropyl)carbodiimide (EDC) i N-hydroxysuccinimide (NHS). Després es van immobilitzar covalentment $0,07 \text{ pmols/mm}^2$ (2.800 RUs) de les proteïnes de fusió GST-APC-4x15-WT, GST-APC-4x15-Ser1026 o GST-APC-4x15-Ser1129 a la superfície d'un xip CM5 mitjançant la formació d'enllaços amida, a una velocitat de flux de $10 \text{ }\mu\text{l/min}$, d'acord amb les instruccions del fabricant. Finalment, l'excés de grups reactius es van desactivar amb $70 \text{ }\mu\text{l}$ d'1 M ethanolamine-HCl, pH 8,5.

Una vegada immobilitzades les proteïnes, es van injectar diferents concentracions de β -catenina purificada sense GST en tampó HBS-EP (0,15 M NaCl, 0,01 M HEPES pH 7,4, 3 mM EDTA i 0,005% surfactant P20) a la superfície del xip a una velocitat de $30 \text{ }\mu\text{l/min}$. En un primer experiment es van injectar les següents concentracions de β -catenina: $0,5 \text{ }\mu\text{M}$, $1 \text{ }\mu\text{M}$, $2 \text{ }\mu\text{M}$, $3 \text{ }\mu\text{M}$ i $4 \text{ }\mu\text{M}$, i després, per fer l'experiment per triplicat, es va escollir injectar β -catenina a una concentració de $2 \text{ }\mu\text{M}$, doncs era la concentració que ens permetia obtenir unes corbes de bona qualitat sense la necessitat d'injectar grans quantitats de proteïna.

Finalment, la superfície del xip es va regenerar amb un 0,05% de SDS després de cada injecció a una velocitat de $30 \text{ }\mu\text{l/min}$. L'associació, dissociació i regeneració es van seguir en temps real. Com a control de cada experiment, es va injectar β -catenina en un canal del xip on no hi havia lligand immobilitzat. Els sensogrames es van analitzar utilitzant el *BIAevaluation Software* (v 4.1, Biacore AB).

7.4 Anàlisi estructural de la interacció entre el pèptid APC Ser1026 i β -catenina

Per tenir un millor coneixement dels efectes biològics de la variant N1026S es va dur a terme una anàlisi estructural detallada del complex APC/ β -catenina basat en l'estructura cristal·litzada per raigs-X (Eklof Spink et al., 2001) dipositada a la base de dades PDB (*Protein Data Bank*) (codi ID 1JPP), corresponent a la primera repetició de 15 AA d'unió a β -catenina de la proteïna APC unida a la regió de repeticions armadillo de la β -catenina. Aquesta anàlisi es va fer en col·laboració amb Antonio Pineda, del Centro de Investigación Príncipe Felipe (València). Es va utilitzar el programa PyMOL (<http://www.pymol.org>) per recrear els àtoms absents a l'arxiu PDB (cadena lateral dels residus Lys1030 i Asp1033) i per generar un pèptid que contenia un residu Ser a la posició 1026 (pèptid Ser1026).

El programa de càlcul de dinàmica molecular GROMACS (Van Der Spoel et al., 2005) ha estat dissenyat especialment per a realitzar simulacions de molècules bioquímiques amb un gran nombre d'interaccions. El programa realitza un procés de minimització d'energia que té com a objectiu trobar un mínim local d'energia. Així doncs, es va minimitzar l'energia dels dos pèptids (WT i Ser1026) amb el programa GROMACS abans de realitzar el procés de *docking* (procés d'unió d'una proteïna amb d'altres proteïnes o amb un lligand per mitjà dels llocs d'unió). Aquest pas es va dur a terme per assegurar que el procés de *docking* s'iniciaria amb estructures amb la conformació de menor energia, particularment per al pèptid Ser1026, l'estructura del qual s'havia generat *de novo* amb el programa PyMOL.

Per analitzar les conseqüències estructurals de la variant N1026S en la interacció entre el pèptid d'APC i la β -catenina, es va utilitzar el programa AutoDock (Morris et al., 1998), que calcula potencials d'afinitat atòmica per a cadascun dels tipus atòmics definits per al substrat, i es van generar un conjunt de conformacions per als dos complexos. El protocol de *docking* va incorporar, durant la definició dels angles actius de torsió, les limitacions dels contactes polars obtingudes del procés de minimització d'energia.

8. ASSAJOS FUNCIONALS AMB LÍNIES CEL·LULARS

8.1 Característiques de la línia cel·lular SW480

En aquest estudi hem utilitzat la línia cel·lular SW480 (ATCC CCL-228), que va ser cedida pel Dr. Miquel Angel Peinado (IDIBELL-Institut de Recerca Oncològica). És una línia epitelial humana establerta a partir d'un adenocarcinoma primari de còlon. Aquestes cèl·lules creixen en monocapa, tenen la proteïna APC endògena truncada al codó 1338 (canvi de CAG a TAG al codó 1338) i presenten una elevada activitat transcripcional mitjançada per β -catenina/Tcf-4. Aquestes cèl·lules van créixer en medi DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12) (BioWhittaker, Walkersville, MD)

suplementades amb un 10% d'FBS (*Fetal Bovine Serum*) (Gibco) i un 1% de penicil·lina/estreptomicina (Gibco) a 37 °C i 5% CO₂. Els cultius utilitzats eren lliures d'infecció per micoplasma.

8.2 Transfeccions transitòries

Per la transfecció de DNA a les cèl·lules SW480 es va utilitzar el reactiu *Lipofectamine™ Reagent* (Invitrogen), de naturalesa lipídica, i per augmentar l'eficiència de la transfecció es va utilitzar el reactiu *PLUS™ Reagent* (Invitrogen), d'acord amb les instruccions del fabricant.

El dia anterior a la transfecció es van sembrar 1×10^6 de cèl·lules SW480 en plaques de 60 mm. Al dia següent, després de comprovar que les cèl·lules estaven entre un 50-70% de confluència, es van cotransfectar transitòriament les següents quantitats de plasmidis a cada placa:

- 0,5 µg del plasmidi pTOPFLASH o pFOPFLASH.
- 50 ng del plasmidi phRL-TK.
- 3 µg del plasmidi d'expressió pCMV-APCWT, pCMV-APC1309Δ o pCMV-APCN1026S, o 3 µg del plasmidi buit pCDNA 3.1.

La combinació dels diferents plasmidis donava lloc a 8 condicions experimentals diferents. Es van fer aquests vuit experiments per duplicat i triplicat en tres dies independents, obtenint un total d'onze rèpliques.

Per cada condició experimental es van afegir les quantitats indicades dels diferents plasmidis (un total de 3,55 µg de DNA per placa) a un tub amb 250 µl de DMEM-F12 sense sèrum, es va barrejar amb vòrtex, s'hi van afegir 6 µl de PLUS, es va tornar a barrejar amb vòrtex i es va incubar la barreja 15 min a TA. Mentrestant, es van afegir 9,5 µl de Lipofectamina a 250 µl de DMEM-F12 sense sèrum i es va barrejar amb vòrtex. Després es va afegir la barreja DNA-PLUS a la Lipofectamina, es va barrejar amb pipeta i es va incubar durant 15 min a TA. Mentrestant es van rentar les cèl·lules dues vegades amb DMEM F-12 sense sèrum escalfat a 37 °C i, passats els 15 min d'incubació, es va afegir la barreja final de la transfecció a les cèl·lules, pipetejant bé la barreja amb el medi de la placa. Es va incubar durant 4 h i 30 min a l'incubador, a 37 °C i 5% CO₂, i després es va eliminar el medi, es va rentar amb DMEM-F12 complet (suplementat amb un 10% d'FBS i un 1% de Penicil·lina/Estreptomicina), s'hi van afegir 3 ml de medi complet i es va deixar a l'incubador durant 24 h.

A les 24 h, es va eliminar el medi, es van posar les plaques en gel, es van rentar les cèl·lules amb 1 ml de PBS 1x fred, es van recollir les cèl·lules amb un *scraper* i es

van dividir en tres tubs. Es van centrifugar a 2.500 rpm durant 5 min a 4 °C i els pellets es van guardar a -80 °C, per a posteriorment fer l'anàlisi d'expressió proteica, l'assaig de l'activitat transcripcional i l'extracció d'RNA per a fer les RT-PCRs quantitatives del gen *c-myc*.

8.3 Anàlisi dels nivells d'expressió d'APC, β -catenina i c-myc

8.3.1 Western Blotting

Per comprovar el nivell d'expressió de les proteïnes APC WT, APC 1309 Δ i APC N1026S, i poder confirmar que s'havien expressat correctament després de la transfecció, es va fer l'extracció de proteïnes a partir dels pellets de les cèl·lules transfectades que teníem guardats a -80 °C i posteriorment es va fer l'anàlisi de l'expressió de la proteïna APC mitjançant WB amb el sistema *NuPAGE* (Invitrogen), utilitzant l'anticòs anti-APC (veure llistat d'anticossos a l'apartat 6.2). També es va analitzar per WB l'expressió d'altres proteïnes (β -catenina, c-myc i actina) en les cèl·lules transfectades amb el sistema *Mini-PROTEAN* (BioRad) (veure llistat d'anticossos a l'apartat 6.2).

8.3.2 Immunocitoquímica

Per a realitzar la immunocitoquímica es van sembrar les cèl·lules SW480 a les 24 h de ser transfectades sobre cobreobjectes de vidre en plaques de 24 pous i es van deixar a l'incubador tota la nit. A l'endemà les cèl·lules es van rentar dues vegades amb PBS 1x, es van fixar amb paraformaldehid al 4% en PBS 1x durant 20 min, es van rentar amb aigua bidestil·lada i després amb PBS 1x durant 5 min. A continuació es va inhibir l'activitat peroxidasa endògena incubant les cèl·lules amb peròxid d'hidrogen al 3% en aigua bidestil·lada durant 10 min, es van rentar amb aigua bidestil·lada durant 5 min i es van permeabilitzar amb Tritó X-100 al 0,1% en PBS 1x durant 15 min. Després de bloquejar les cèl·lules amb una dilució 1:5 de sèrum de cabra en PBS 1x durant 1 h, es van incubar amb l'anticòs primari (1:200 anti- β -catenina) diluït en PBS 1x durant 2 h (veure llistat d'anticossos a l'apartat 6.2). Després d'un rentat de 5 min amb Tritó X-100 al 0,1% en PBS 1x, es van incubar amb l'anticòs secundari *Envision anti-mouse* (Dako) durant 30 min. Després es van rentar 5 min amb Tritó X-100 al 0,1% en PBS 1x i es van revelar amb una solució de DAB (Dako) com a cromogen, d'acord amb les instruccions del fabricant.

Després del revelat, es van rentar les cèl·lules amb aigua de l'aixeta, es van contra-tenyir amb hematoxilina diluïda durant 1-2 min, es van rentar amb abundant aigua corrent de l'aixeta i es van deshidratar amb una bateria ràpida (1 min a cada cubeta) d'1 etanol al 70%, 3 etanols al 96%, 3 etanols absoluts i un xilol. Finalment es van

muntar els cobreobjectes sobre portaobjectes amb DPX i es van observar les preparacions en un microscopi òptic.

8.4 Assajos de l'activitat transcripcional

Es va analitzar l'activitat transcripcional mitjançada per β -catenina/Tcf-4 de les cèl·lules SW480 transfectades amb els diferents plasmidis. Les activitats *Firefly* i *Renilla* luciferasa es van determinar amb un luminòmetre utilitzant el kit *Dual-Luciferase Reporter Assay System* (Promega) 24 h després de la transfecció. Per lisar els pellets de les cèl·lules transfectades que teníem guardats a -80 °C, es van afegir 100 μ l de PLB 1x (*Passive Lysis Buffer*) a cada pellet, es van pipetejar bé les mostres, es van incubar durant 15 min a TA i es van vortexar. Després es van fer dos cicles de congelació-descongelació posant les mostres en neu carbònica i després en un bany a 37 °C. A continuació es van centrifugar a 10.000 rpm durant 5 min a 4 °C i es van transferir els sobrenedants a uns tubs nous. Es van transferir 10 μ l de mostra a un tub de polipropilè especial per al luminòmetre i s'hi van afegir 50 μ l de LAR II (*Luciferase Assay Reagent II*), es va pipetejar la barreja 2 o 3 vegades i es va fer la primera lectura al luminòmetre (activitat *Firefly* luciferasa). Després es van afegir 50 μ l del reactiu Stop & Glo (per cada mostra: 50 μ l de *Buffer Stop & Glo* + 1 μ l de *Substrat Stop & Glo*), es va vortexar la mostra i es va fer la segona lectura al luminòmetre (activitat *Renilla* luciferasa).

Per cada mostra, les activitats TOPFLASH i FOPFLASH es van normalitzar per l'activitat *Renilla*, que és un control intern de l'eficiència de la transfecció. L'activitat transcripcional mitjançada per β -catenina/Tcf-4 es va determinar per la *ratio* TOP/FOP, que corregeix la transcripció no específica. Els experiments es van realitzar en quatre dies independents per duplicat i triplicat i es van obtenir onze rèpliques.

8.5 Transcripció reversa (RT) i PCR quantitativa (PCRq)

Per analitzar els nivells d'expressió del gen *c-myc* 24 hores després de les transfeccions en les cèl·lules SW480, es va utilitzar la tècnica de la PCR quantitativa (PCRq) a partir de cDNA. La tecnologia de la PCR quantitativa a temps real combina el mètode d'amplificació amb la utilització de molècules de fluorocrom per poder monitoritzar pas a pas i de manera quantificable el procés d'amplificació d'un segment específic de DNA d'interès. Hi ha diferents mètodes que utilitzen fluorocroms inespecífics, com el *SYBR Green*, que s'incorpora al DNA de doble cadena o el sistema *Taqman* (Applied Biosystems), que utilitza sondes específiques dissenyades per unir-se a determinades seqüències del DNA.

Es va extreure l'RNA de les cèl·lules SW480 transfectades amb els vectors d'expressió i els plasmidis pFOPFLASH i phRL-TK, utilitzant el reactiu

Trizol (Invitrogen), d'acord amb les instruccions del fabricant. Després, 500 ng de RNA es van retrotranscriure a cDNA utilitzant els oligonucleòtids pdN6 i la *transcriptasa reversa* MMLV (Invitrogen). A continuació es va dur a terme l'amplificació del gen *c-myc* per PCRq amb el sistema *LightCycler 2.0* (Roche) i la metodologia de detecció del *SYBR Green*, utilitzant encebadors específics: *forward* (exó 1), 5'-GCTGCTTAGACGCTGGATTTT-3' i *reverse* (exó 2), 5'-CTGCTGCTGCTGCTGGTAGAAG-3'. Es va utilitzar la β -2-microglobulina com a control intern per a la normalització.

8.6 Anàlisis estadístiques

Per avaluar les diferències entre l'APC WT i l'APC N1026S respecte l'activitat transcripcional mitjançada per β -catenina/Tcf-4 i l'expressió de *c-myc*, es va utilitzar un model de regressió lineal ajustat per l'efecte del dia. Els resultats obtinguts es van expressar en escala logarítmica (base dos) dels quocients per normalitzar les dades. Es van utilitzar els diagrames de caixa (*box plots*) per visualitzar i interpretar els efectes observats respecte la categoria basal representada per APC WT. Els diagrames de caixa són una representació gràfica de mesures de posició d'una variable, que empra el mínim, el màxim i els quartils. Mitjançant la visualització d'aquestes mesures es pot avaluar la simetria i la distribució de les dades. La significació es va avaluar utilitzant els paràmetres estimats del model i els seus errors estàndards. Per analitzar les diferències entre l'APC WT i l'APC N1026S respecte la seva unió a β -catenina observades amb el BIAcore, es van avaluar els valors de RU_{max} . A l'obtenir tres corbes per cada condició, per avaluar la significació es va realitzar el test Mann-Whitney, que és un test conservatiu per a variables no paramètriques. Per a l'avaluació de la significació es va emprar una prova unilateral i es va establir un nivell de significació de 0,05.

RESULTATS

1. IDENTIFICACIÓ I ESTUDI DE VARIANTS DEL GEN APC

L'anàlisi molecular de la regió codificant del gen *APC* realitzat en 138 famílies espanyoles amb FAP (n= 98) i AFAP (n= 40) al Laboratori de Recerca Translacional de l'Institut Català d'Oncologia mitjançant les tècniques de PCR i seqüenciació directa, ha permès la identificació de mutacions germinals en 59/98 (60%) famílies de FAP i en 9/40 (23%) famílies d'AFAP. De totes les mutacions identificades, les variants *missense* de significat biològic desconegut representen un 7% (4/62) de les mutacions identificades en les famílies de FAP, i un 56% (5/9) de les identificades en les famílies d'AFAP (Figura 9).

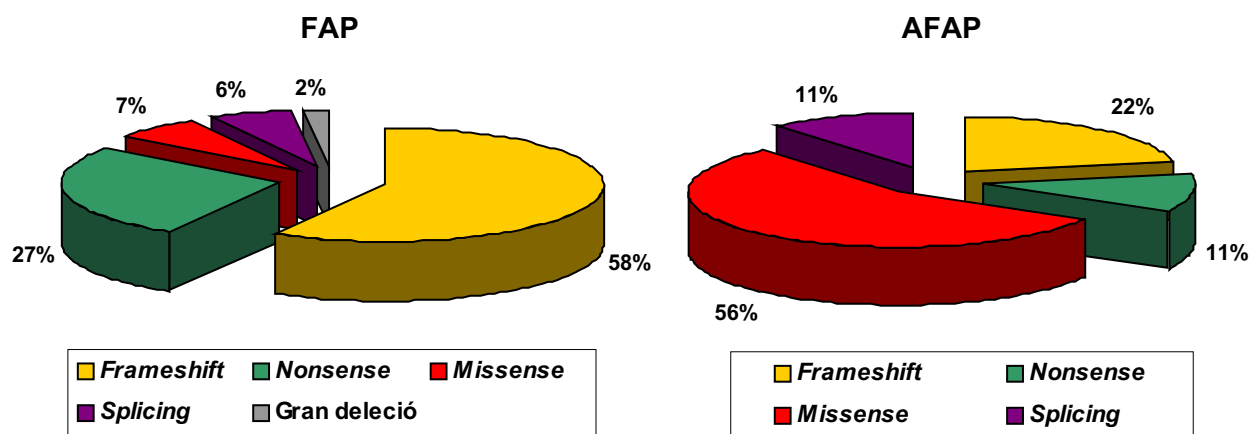


Figura 9. Naturalesa de les mutacions identificades en les famílies de poliposi estudiades.

En total es van identificar deu variants *missense* del gen *APC*: G101E, K957N, N1026S, L1129S, I1307K, E1317Q, D1822V, A2274V, G2502S i P2681L. A la Figura 10 es mostra la distribució de les variants al llarg el gen i de la proteïna APC.

En quatre de les famílies de FAP clàssica es van identificar les variants G101E, K957N, L1129S i A2274V. De les 40 famílies d'AFAP estudiades, es van identificar mutacions en 9 famílies, de les quals 5 eren variants candidates a tenir un efecte patogènic en la funcionalitat de la proteïna APC: N1026S, L1129S, I1307K, E1317Q i P2681L. Les altres dues variants identificades, D1822V i G2502S, ja s'havien descrit en diverses publicacions com a polimorfismes presents a la població control, que podrien conferir un risc incrementat de CCR (Miyoshi et al., 1992b; Nagase et al., 1992b; Ruiz-Ponte et al., 2001; Slattery et al., 2001; Tranah et al., 2005; Wallis et al., 1999; Zhou et al., 2004).

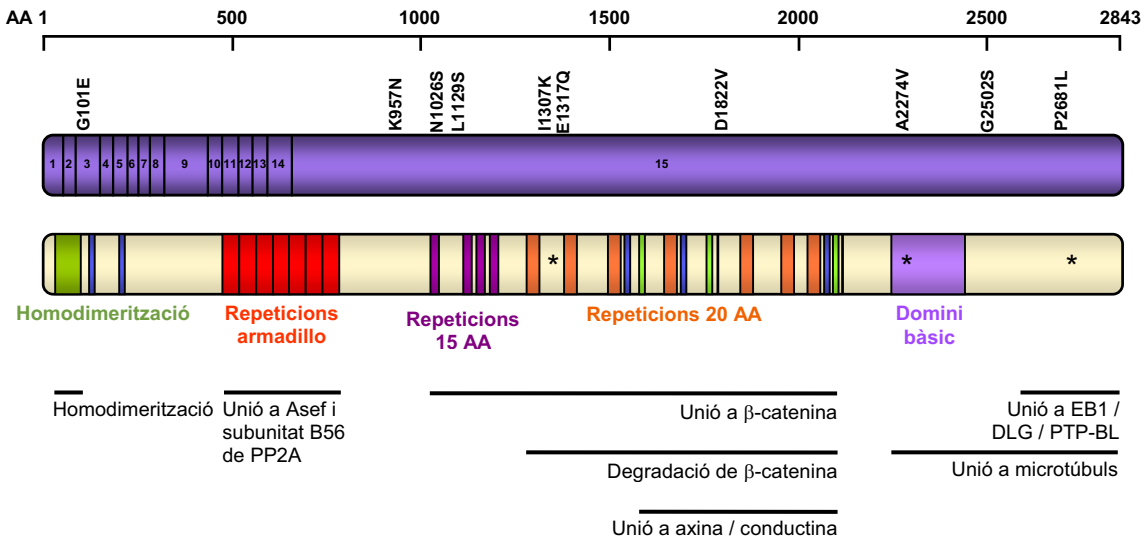


Figura 10. Localització de les variants identificades en el gen APC. Es mostra la localització de les deu variants al llarg dels 15 exons del gen APC, i la seva localització en els diferents dominis funcionals de la proteïna APC.

En el nostre estudi s'han caracteritzat amb diferent profunditat set d'aquestes deu variants: G101E, N1026S, L1129S, D1822V, A2274V, G2502S i P2681L. Les variants K957N, I1307K i E1317Q no han estat estudiades per diferents motius. La variant K957N no es va incloure en el nostre estudi perquè es va identificar en una família de FAP on ja s'havia identificat la mutació causant de la malaltia, una mutació clarament patogènica al codó 934 que originava una proteïna truncada. D'altra banda, la variant ashkenazi I1307K ja ha estat extensament estudiada i sembla rellevant només per aquesta població jueva, on s'ha descrit que confereix un increment del risc de desenvolupar tumors colorectals, incloent-hi nombrosos adenomes (Frayling et al., 1998; Woodage et al., 1998); i la E1317Q no es va prioritzar ja que l'evidència prèvia que l'associava al desenvolupament d'adenomes colorectals amb una penetrància baixa i variable, suggeria que no ajudaria massa al consell genètic de la família (Frayling et al., 1998; Lamlum et al., 2000).

Es va avaluar la freqüència de les variants identificades en el gen APC mitjançant les tècniques de SSCP i discriminació al·lèlica amb sondes d'hibridació fluorescentes, en un total de 394 casos de CCR esporàdic i 326 controls aparellats per edat i sexe, i un total de 266 pacients afectes de CCR hereditari atesos a la Unitat de Consell Genètic de l'Institut Català d'Oncologia: 98 pacients no relacionats de FAP clàssica, 40 pacients no relacionats de FAP Atenuada, 35 pacients no relacionats d'HNPCC RER-definits pels Criteris d'Amsterdam tipus I o II i 93 pacients no relacionats HNPCC-like RER- (criteris descrits a Materials i Mètodes). Els resultats obtinguts de l'estudi molecular de les variants G101E, N1026S, L1129S, D1822V, A2274V, G2502S i P2681L en els diferents grups d'individus es resumeixen a la Taula 9.

Taula 9. Genotips de les variants del gen *APC* en les diferents poblacions seleccionades.

Variants <i>APC</i>	Controls	Casos CCR esporàdic	FAP ^a	AFAP ^b	HNPCC ^c	HNPCC- like ^c
G101E						
GG	137	94	97	26	14	54
GA	0	0	1	0	0	0
AA	0	0	0	0	0	0
N	137	94	98	26	14	54
N1026S						
AA	203	236	98	39	13	54
AG	0	0	0	1	0	0
GG	0	0	0	0	0	0
N	203	236	98	40	13	54
L1129S						
TT	200	230	97	19	14	51
TC	0	2	1	1	0	0
CC	0	0	0	0	0	0
N	200	232	98	20	14	51
D1822V						
AA	197	224	58	17	20	68
AT	84	108	27	7	13	24
TT	16	14	5	2	2	1
N	297	346	90	26	35	93
A2274V						
CC	200	232	86	25		
CT	1	1	1	0		
TT	0	0	0	0		
N	201	233	87	25		
G2502S						
GG	143	141	88	24		
GA	2	4	1	1		
AA	0	0	0	0		
N	145	145	89	25		
P2681L						
CC	203	233	92	24		
CT	0	0	0	1		
TT	0	0	0	0		
N	203	233	92	25		

^a Més de 100 adenomes colorectals

^b Menys de 100 adenomes colorectals

^c Criteris descrits a Materials i Mètodes

1.1 Variant *APC* G101E

La variant G101E (c.302G>A) del gen *APC* no ha estat descrita fins ara i origina un canvi de glicina a glutamat a l'exó 3 del gen, al domini d'homodimerització. Aquesta

variant es va identificar a la línia germinal d'un individu d'una família de FAP. L'individu índex (III 3) va ser diagnosticat d'una poliposi severa als 32 anys d'edat (Figura 11). Es va seqüenciar tota la regió codificant del gen *APC* en aquest individu, i les dues úniques alteracions identificades van ser la variant G101E i la deleció c.2800_2803delACTT, que originava una proteïna truncada (p.T934SfsX20).

Una vegada identificades aquestes dues alteracions a l'individu índex, es van analitzar en el seu germà (III 1) i en la seva mare (II 2) mitjançant l'amplificació per PCR del fragment corresponent i la posterior seqüenciació directa del producte amplificat. El seu germà (III 1) havia estat diagnosticat d'una poliposi severa als 33 anys d'edat i es va morir als 35 anys, però disposàvem d'una mostra de teixit inclòs en parafina per a realitzar l'estudi genètic. La seva mare (II 2), de 72 anys d'edat, no s'havia fet fins aquell moment cap colonoscòpia. No es va poder dur a terme l'estudi molecular en el seu pare (II 1), que es va morir als 76 anys d'edat, i del que no disposàvem d'informació clínica.

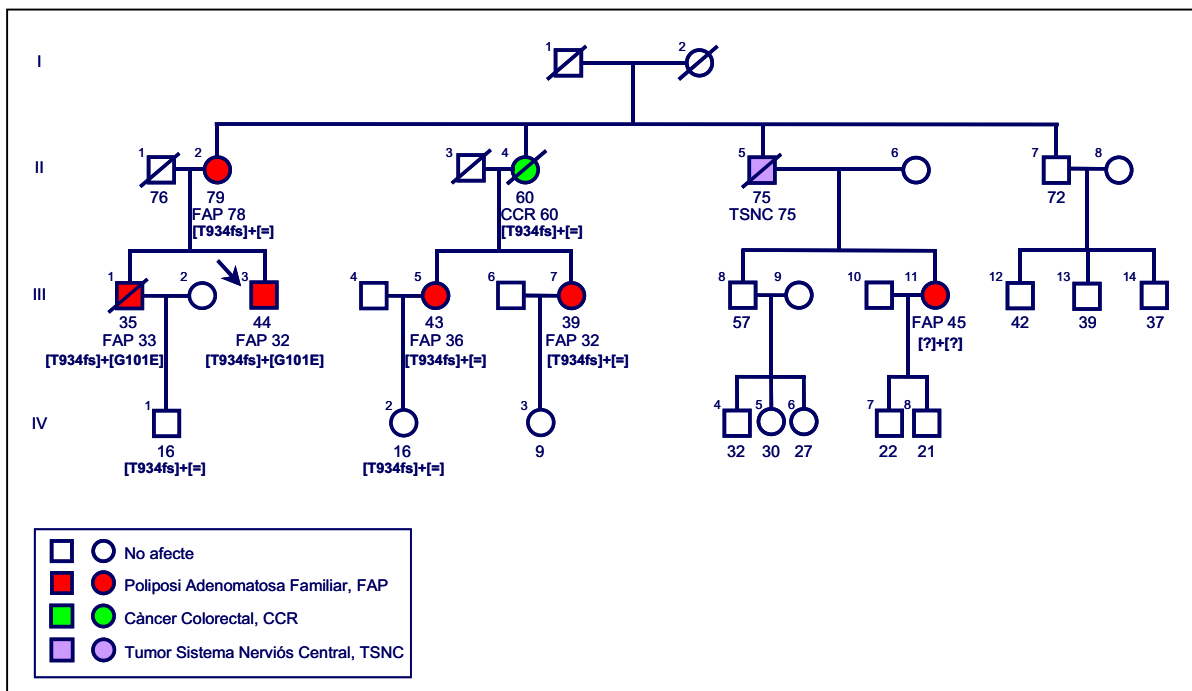


Figura 11. Arbre genealògic de la família de FAP on es va identificar la variant G101E. La fletxa indica el cas índex. Es mostren les edats dels individus, el tipus de malaltia, l'edat del diagnòstic, i s'indica també si els individus són portadors de la mutació T934fs [T934fs], de la variant G101E [G101E] o no portadors [=]. Si es desconeix el genotip s'indica amb el símbol [?].

Els resultats de l'anàlisi molecular ens indicaven que el germà de l'individu índex (III 1) era portador tant de la variant G101E com de la mutació p.T934fs, i que la seva mare

(II 2) era portadora de la mutació p.T934fs, però no era portadora de la variant G101E. Semblava, doncs, que els individus III 1 i III 3 havien heretat la variant G101E del pare (II 1). Ens va sorprendre el fet que la mare (II 2), tot i ser portadora de la mutació p.T934fs, que origina una proteïna truncada, no havia manifestat cap símptoma característic de la FAP amb 72 anys d'edat. Les dades de què disposàvem en aquell moment suggerien que la variant G101E podria tenir un efecte modificador que afavoria el desenvolupament de la poliposi, doncs dels tres individus estudiats, tots tres portadors de la mutació p.T934fs, només els portadors de la variant G101E havien manifestat la malaltia, i a més, a una edat jove i amb un fenotip molt sever.

Es va realitzar l'estudi molecular de la variant G101E a les diferents poblacions mitjançant la tècnica de SSCP (Figura 12), que va mostrar que cap de la resta dels casos de CCR (0/94 esporàdics i 0/191 hereditaris) o controls (0/137) analitzats eren portadors de la variant G101E (Taula 9). Així doncs, l'absència de la variant a la població control reforçava la hipòtesi d'un possible efecte patogènic de la variant en el desenvolupament de la poliposi.

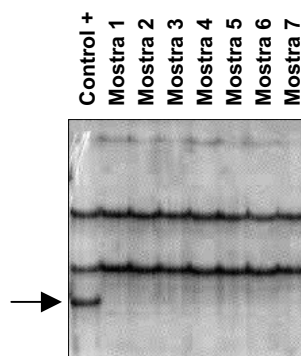


Figura 12. Detecció de la variant G101E per SSCP. Electroforesi en un gel d'acrilamida al 8% no desnaturalitzant on s'analitza la presència de la variant G101E en diferents mostres. A cada gel sempre s'hi va carregar com a control positiu una mostra amb la variant G101E, que mostrava un patró electroforètic diferent al de les mostres negatives (assenyalat a la figura amb una fletxa).

Un temps més tard, es va aconseguir mostra d'uns altres tres individus afectes de la família (II 4, III 5 i III 7), als quals se'ls va realitzar l'anàlisi molecular de les dues alteracions identificades a la família. L'individu II 4 es va morir als 60 anys a conseqüència d'un CCR, i els individus III 5 i III 7 havien estat diagnosticats de poliposi als 36 i als 32 anys, respectivament (Figura 11). Aquests tres individus eren portadors de la mutació p.T934fs, però no presentaven la variant G101E, i mostraven el mateix fenotip que el dels individus III 1 i III 3, portadors de la variant G101E. A més, finalment es va realitzar una colonoscòpia a la mare de l'individu índex (II 2), que

era portadora de la mutació p.T934fs però no de la variant, i es van detectar 200 adenomes al llarg del còlon i recte. Per tant, amb els resultats obtinguts, podem concloure que la variant G101E no és la responsable de la FAP en aquesta família i no tenim evidències que indiquin que la variant tingui una funció modificadora del fenotip de la malaltia.

1.2 Variant APC A2274V

La variant A2274V (c.6821C>T) del gen APC origina un canvi d'alanina a valina al domini bàsic d'unió a microtúbuls de l'exó 15 del gen. Va ser identificada a la línia germinal d'una pacient de la qual no disposàvem de la informació clínica completa, però segons l'informe mèdic, era una pacient amb FAP que havia desenvolupat un CCR. Es va seqüenciar tota la regió codificant del gen APC en aquesta pacient, i es van identificar les següents alteracions: la variant A2274V (rs34919187), el polimorfisme p.L2401L (rs2229994) i el polimorfisme c.*86C>A (rs1804197) a la regió 3' no codificant. Es va descartar la presència de les dues variants més freqüents del gen MYH, la Y165C i la G382D. Una de les germanes de la pacient índex, també amb FAP i diagnosticada d'un CCR als 52 anys, no era portadora de la variant A2274V. Així doncs, no sembla que la variant A2274V sigui la responsable de la FAP en aquesta família ni que tingui una funció modificadora del fenotip de la malaltia.

Es va determinar la presència de la variant A2274V a les diferents poblacions incloses en aquest estudi utilitzant la tècnica de discriminació al·lèlica amb el Light Cycler (Figura 13).

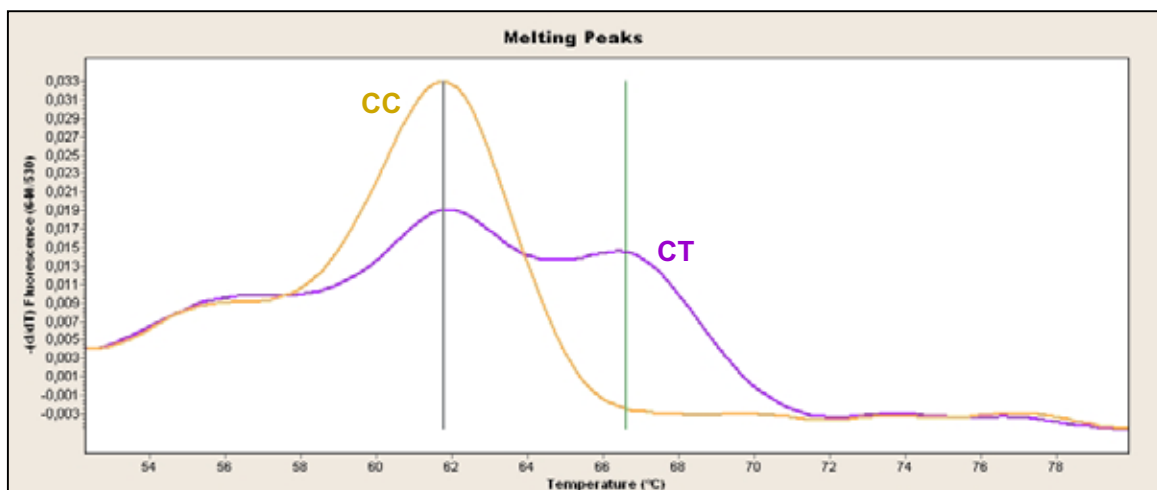


Figura 13. Determinació del genotip A2274V mitjançant discriminació al·lèlica amb sondes d'hibridació fluorescentes amb el Light Cycler. La sonda *sensor* ha estat dissenyada per hibridar amb total complementarietat amb l'al·lel T, de manera que la mostra homozigota CC té una temperatura de fusió de 61,8 °C i la mostra heterozigota CT presenta dos pics, un a 61,8 °C i l'altre a 66,7 °C.

Es va identificar la variant en 1 dels 201 individus control (0,5%), en 1 dels 233 casos de CCR esporàdic (0,43%), i no es va identificar en cap individu d'AFAP (0/25) ni en cap dels altres individus de FAP (0/86) (Taula 9). Les dades de què disposem juntament amb les d'un estudi accessible a la xarxa (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>) on identifiquen la variant en 1/39 (2,6%) individus control, ens suggereixen que la variant A2274V podria ser un polimorfisme sense cap efecte funcional. Tot i així, seran necessaris estudis addicionals per obtenir resultats concloents de l'efecte d'aquesta variant en el desenvolupament de la poliposi.

1.3 Variant APC G2502S

La variant G2502S (c.7504G>A) del gen *APC*, identificada a la línia germinal d'un individu d'una família d'AFAP, origina un canvi de glicina a serina al domini bàsic d'unió a microtúbuls de l'exó 15 del gen. Aquesta variant ja havia estat descrita anteriorment com un polimorfisme (Miyoshi et al., 1992b; Nagase et al., 1992b; Zhou et al., 2004). Posteriorment, es va publicar un estudi on es demostrava que no hi havia cap associació entre la variant G2502S i el risc de desenvolupar CCR o adenomes colorectals (Tranah et al., 2005). Actualment es considera que la variant G2502S és un polimorfisme (rs2229995); l'estudi molecular de la variant en 298 individus control de diferents poblacions ha mostrat que es troba en heterozigosi amb una freqüència genotípica del 3,4% (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>).

Es va determinar la freqüència de la variant G2502S a les diferents poblacions incloses en el nostre estudi per discriminació al·lèlica (Figura 14).

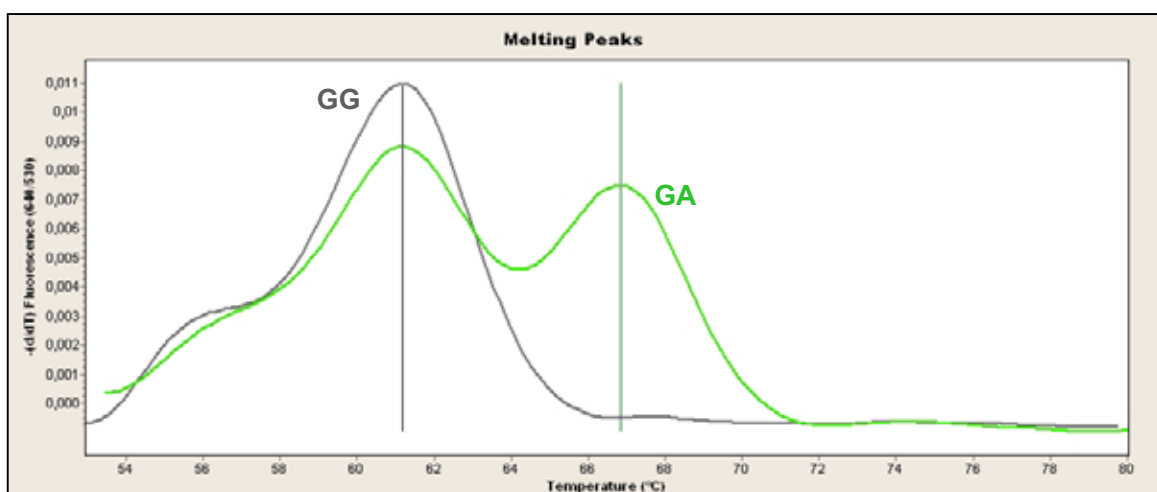


Figura 14. Determinació del genotip G2502S mitjançant discriminació al·lèlica amb sondes d'hibridació fluorescentes amb el Light Cycler. La mostra homozigota GG té una temperatura de fusió de 61,2 °C i la mostra heterozigota GA presenta un pic a 61,2 °C i l'altre a 66,9 °C, doncs la sonda *sensor* hibrida amb total complementarietat amb l'al·lel A.

En el nostre estudi (Taula 9), la variant G2502S es va identificar en heterozigosi en 2/145 (1,38%) individus control, en 4/145 (2,76%) individus de CCR esporàdic, en 1/89 (1,12%) famílies de FAP i en cap altre cas d'AFAP (0/24). Així doncs, els resultats obtinguts indiquen que la variant es pot considerar un polimorfisme sense cap implicació clínica.

1.4 Variant APC P2681L

La variant P2681L (c.8042C>T) del gen *APC*, no descrita fins ara i que origina un canvi de prolina a leucina a la regió C-terminal, va ser identificada a la línia germinal d'un individu d'una família d'AFAP, del qual no disposàvem de la informació clínica completa. Va ser diagnosticat d'AFAP als 70 anys i va desenvolupar un tumor al Sistema Nerviós Central als 72 anys. Després de seqüenciar tota la regió codificant del gen *APC*, la variant P2681L va ser la única alteració que s'hi va identificar. Es es va descartar la presència de les dues variants més freqüents del gen *MYH*, la Y165C i la G382D. A la família hi havia un germà de l'individu índex amb poliposi de diagnòstic tardà, al qual se li havia realitzat una colectomia total, però no teníem mostra d'aquest individu i no es van poder realitzar estudis de cosegregació a la família.

L'anàlisi de la freqüència de la variant P2681L a les diferents poblacions (Figura 15), va mostrar que cap dels altres casos de CCR (0/233 esporàdics i 0/116 hereditaris) o controls (0/203) analitzats eren portadors d'aquesta variant (Taula 9). Amb les dades de què disposem resta oberta la possibilitat de que aquesta variant sigui patogènica. S'haurien de realitzar estudis funcionals per obtenir resultats concloents de l'efecte d'aquesta variant en el desenvolupament de la poliposi atenuada.

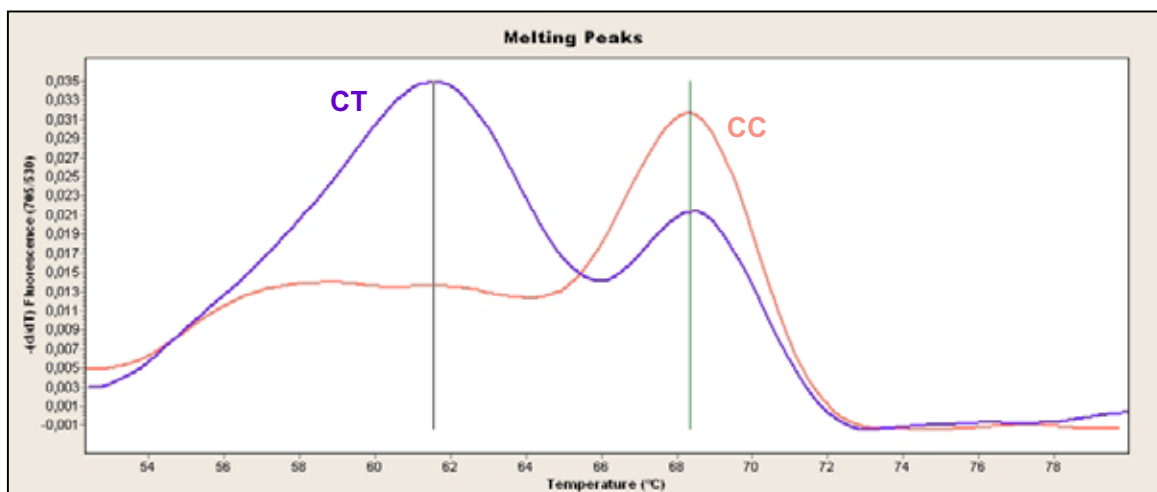


Figura 15. Determinació del genotip P2681L mitjançant discriminació al·lèlica amb sondes d'hibridació fluorescentes amb el Light Cycler. La sonda *sensor* hibrida amb total complementarietat amb l'al·lel C, de manera que la mostra homozigota CC té una temperatura de fusió de 68,3 °C i la mostra heterozigota CT presenta dos pics: una a 61,6 i l'altre a 68,3°C.

En els apartats 2, 3 i 4 dels Resultats es mostren els resultats de l'estudi, més detallat, que s'ha realitzat de les variants *APC* D1822V, *APC* N1026S i *APC* L1129S.

2. VARIANT *APC* D1822V

Els resultats corresponents a aquest apartat es troben recollits a l'article *Menéndez et al. (2004) Colorectal Cancer Risk and the APC D1822V Variant, Int. J. of Cancer, 112, 161-163*, que està inclòs com annex a la memòria de la present tesi (Annex II) (Menendez et al., 2004).

2.1 Estudi d'associació cas-control

Una de les variants més freqüents del gen *APC* és la D1822V (c.5465A>T), que origina un canvi d'aspartat a valina al codó 1822, a la regió de repeticions de 20 AA de l'exó 15 que uneix i regula a la baixa la β -catenina. Es va analitzar la presència de la variant D1822V en 297 controls, 346 casos de CCR esporàdic i 244 pacients afectes de CCR hereditari: 90 pacients no relacionats de FAP, 26 pacients no relacionats d'AFAP, 35 pacients no relacionats d'HNPCC RER- definits pels Criteris d'Amsterdam tipus I o II i 93 pacients no relacionats HNPCC-like RER- (Figura 16, Taula 9). Les principals característiques dels casos de CCR esporàdic i dels controls estudiats es mostren a la Taula 10.

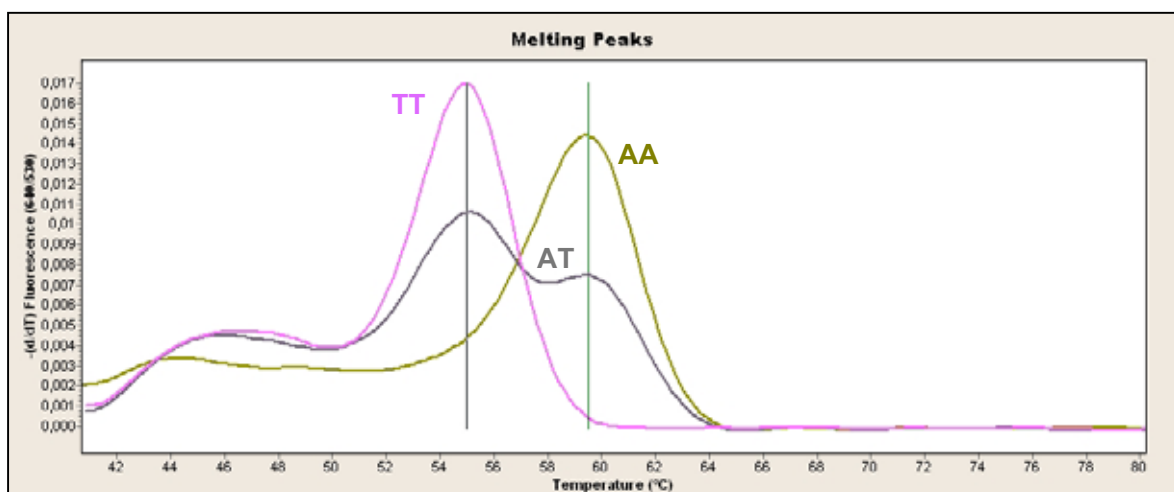


Figura 16. Anàlisi per corbes de fusió dels tres possibles genotips de la variant D1822V amb el Light Cycler. La sonda *sensor* ha estat dissenyada per hibridar amb total complementarietat amb l'al·lel A, de manera que la mostra homozigota AA té una temperatura de fusió més elevada ($T_m = 59,4$ °C) que la mostra homozigota TT ($T_m = 55,1$ °C). La mostra heterozigota AT presenta dos pics a les mateixes temperatures que les respectives mostres homozigotes.

Taula 10. Característiques demogràfiques i d'exposicions ambientals dels casos de CCR esporàdic i de la població control.

	Casos/Controls	OR ^a (95% IC)	P-valor d'associació
Sexe			
Home	212/161	1,0	
Dona	134/136	0,94 (0,65 - 1,35)	
Edat			
[24,63)	113/117	1,0	
[63,73)	116/85	1,41 (0,95 - 2,09)	
[73,92]	117/95	1,29 (0,87 - 1,91)	
Història Familiar de càncer			
No	161/158	1,0	0,001
Càncer colorectal	53/17	3,23 (1,77 - 5,88)	
Altres càncers	132/122	1,15 (0,82 - 1,61)	
Història personal d'adenomes simptomàtics			
No	328/293	1,0	0,004
Sí	18/4	4,31 (1,44 - 12,9)	
Consum d'AINEs ^b			
No	325/255	1,0	0,001
Sí	21/42	0,39 (0,23 - 0,68)	
Proteïnes (densitat: grams per dia/calories) ^c			
Tercil inferior	129/82	1,0	0,20
Tercil mitjà	111/98	0,78 (0,52 - 1,17)	
Tercil superior	99/111	0,68 (0,45 - 1,04)	
Carbohidrats (densitat: grams per dia/calories) ^c			
Tercil inferior	108/102	1,0	0,60
Tercil mitjà	118/92	1,22 (0,82 - 1,81)	
Tercil superior	113/97	1,07 (0,72 - 1,59)	
Greixos (densitat: grams per dia/calories) ^c			
Tercil inferior	123/88	1,0	0,58
Tercil mitjà	109/100	0,84 (0,56 - 1,25)	
Tercil superior	107/103	0,82 (0,55 - 1,23)	
Consum diari d'alcohol (g)			
Mai	112/131	1,0	0,009
1-40	140/111	1,59 (1,06 - 2,40)	
>40	94/55	2,26 (1,33 - 3,85)	
Fumadors			
No fumador	177/164	1,0	0,88
Ex-fumador	109/79	0,95 (0,57 - 1,57)	
Fumador	60/54	0,87 (0,51 - 1,50)	

^a Odds ratios ajustades per edat i sexe.

^b Consum regular d'Antiinflamatoris No Esteroidals (AINEs) durant almenys 6 mesos consecutius.

^c Els punts de tall per les densitats dels nutrients són: 0,0416 i 0,084 per les proteïnes; 0,1217 i 0,139 pels carbohidrats i 0,0293 i 0,0356 pels greixos.

En aquest estudi cas-control la història familiar de CCR (almenys un parent de primer grau amb un tumor colorectal, però no amb altres càncers) augmenta el risc de desenvolupar CCR (OR = 3,23; 95% CI 1,77-5,88; p-valor = 0,001). També observem un elevat risc de desenvolupar CCR associat a la història personal d'adenomes simptomàtics, avaluada per la prèvia realització d'una endoscòpia per evidenciar qualsevol tipus d'adenoma (OR = 4,31; 95% CI 1,44-12,9; p-valor = 0,004). Un consum prolongat d'AINEs és un factor protector (OR = 0,39; 95% CI 0,23-0,68; p-valor = 0,001). Per contra, fumar no és un factor de risc en aquest estudi. No s'ha observat una modificació significativa del risc atribuïble al consum de macronutrients excepte pel consum d'alcohol, que està associat a un increment dosi-resposta del risc.

La freqüència de l'al·lel T al codó 1822 és del 19,5% a la nostra població control i del 19,7% en els casos de CCR esporàdic (Taula 11). Els genotips es troben en equilibri Hardy-Weinberg tant en casos com en controls. El genotip amb l'al·lel T no s'associa a un risc augmentat de desenvolupar CCR (OR per AT/TT = 1,06; 95% IC 0,76-1,48; p-valor = 0,72), i això es manté tant en casos de còlon (OR per AT/TT = 0,91; 95% IC 0,62-1,33; p-valor = 0,62) com de recte (OR per AT/TT = 1,35; 95% IC 0,88-2,07; p-valor = 0,17). No s'observa cap interacció amb el sexe o l'edat (dada no mostrada).

Taula 11. Risc de CCR esporàdic associat als genotips de l'APC 1822.

Genotips APC 1822	Casos CCR esporàdic N (%)	Controls N (%)	OR ^a (95% IC)
AA	224 (65)	197 (66)	1,0
AT	108 (31)	84 (28)	1,13 (0,80 - 1,60)
TT	14 (4)	16 (5)	0,71 (0,34 - 1,51)

^a Odds ratios ajustades per edat i sexe; P-valor d'associació = 0,48

Respecte als hàbits dietètics, no s'observa cap interacció de la variant amb el greix de la dieta (Taula 12) o amb altres nutrients analitzats (dades no mostrades), encara que el poder de detectar aquestes interaccions és limitat en aquest estudi degut a la mida de la mostra.

Taula 12. Interaccions entre alguns factors de risc i els genotips de l'APC 1822 per al risc de CCR.

	Casos/ Controls	AA OR ^a (95% IC)	Casos/ Controls	AT/TT OR ^a (95% IC)	P-valor interacció
Història familiar de càncer					
No càncer	103/106	1,0	58/52	1,14 (0,71 - 1,82)	0,83
Càncer colorectal	32/10	3,58 (1,65 - 7,74)	21/7	3,1 (1,25 - 7,7)	
Altres càncers	89/81	1,22 (0,81 - 1,84)	43/41	1,16 (0,7 - 1,95)	
Història personal d'adenomes simptomàtics					
No	216/193	1,0	112/100	0,99 (0,71 - 1,39)	0,02
Sí	8/4	1,91 (0,56 - 6,52)	10/0	Inf (1,96 - Inf) ^b	
Greixos (densitat: grams per dia/calories)^c					
Tercil inferior	77/55	1,0	46/33	0,86 (0,48 - 1,54)	0,87
Tercil mitjà	75/69	0,78 (0,48 - 1,28)	34/31	0,82 (0,44 - 1,5)	
Tercil superior	69/68	0,77 (0,47 - 1,27)	38/35	0,79 (0,44 - 1,44)	

^a Odds ratios ajustades per edat i sexe

^b Interval inferior de confiança estimat amb regressió logística exacta

^c Els punts de tall per densitat de greixos són 0,0293 i 0,0356

No s'observa cap interacció entre la història familiar de càncer i la variant (Taula 12). De totes maneres, es va decidir explorar més a fons aquesta qüestió analitzant una extensa cohort de 244 casos de CCR hereditari no relacionats (Taula 13). Les freqüències genotípiques de la variant D1822V no varien entre els individus afectes de FAP (n = 90) o AFAP (n = 26) en comparació amb els controls o els casos de CCR esporàdic. A més, en dues famílies de FAP analitzades, la variant no cosegrega amb la malaltia. Les freqüències genotípiques de la variant també són semblants en els individus afectes d'HNPCC (n = 35). En canvi, en els casos d'HNPCC-like (n = 93), observem una freqüència de l'al·lel T moderadament inferior comparada amb la dels controls. La naturalesa heterogènia d'aquest grup de pacients no ha fet possible la identificació d'un subgrup específic amb una freqüència inferior de l'al·lel T (Taula 13). Amb aquestes observacions podem concloure que l'al·lel T no està implicat en el desenvolupament del CCR hereditari.

Taula 13. Freqüències al·lèliques i genotípiques de la variant D1822V en individus amb un test positiu de sang oculta en femtes i en casos de CCR hereditari.

Genotips <i>APC</i> 1822	Colonoscòpia normal ^a	Colonoscòpia amb adenomes ^a	FAP ^b	AFAP ^c	HNPCC ^d	HNPCC- like ^d
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
AA	30 (68)	25 (73)	58 (64)	17 (65)	20 (57)	68 (73)
AT	13 (30)	7 (21)	27 (30)	7 (27)	13 (37)	24 (26)
TT	1 (2)	2 (6)	5 (6)	2 (8)	2 (6)	1 (1)
Freqüència al·lel T (%)	17,0	16,1	20,5	21,2	24,3	13,9
(95% IC)			(13,2-31,0)	(9,0-43,6)	(12,5-43,3)	(7,7-22,7)
N	44	34	90	26	35	93

^a Pacients amb un test de sang oculta en femtes positiu que es van sotmetre a una colonoscòpia en un programa de cribratge poblacional

^b Més de 100 adenomes colorectals

^c Menys de 100 adenomes colorectals

^d Criteris descrits a Materials i Mètodes

La història personal d'adenomes ha estat un factor de risc en el nostre estudi. A més, els individus homozigots AA amb una història personal d'adenomes simptomàtics tenen el doble de risc de desenvolupar CCR que els individus sense una història personal d'adenomes, essent aquest risc molt més elevat en els individus portadors de l'al·lel T (Taula 12). Aquests resultats suggereixen que la variant D1822V podria incrementar de forma modesta el risc de la transformació maligna dels adenomes. El seu impacte potencial podria ser gran ja que aquesta variant és molt freqüent. De tota manera, aquesta observació ha de ser agafada amb cautela tenint en compte la nostra mida mostral. Per tal d'avaluar si la variant podria tenir també un efecte en la iniciació del procés de transformació de l'epiteli normal a adenoma, es va estudiar l'associació de la variant D1822V amb la presència d'adenomes en un programa de cribratge poblacional amb una sèrie de 78 participants que es van sotmetre a una colonoscòpia després d'un test de sang oculta en femtes amb resultat positiu. La distribució dels genotips en els pacients amb adenoma/es és similar a la dels pacients sense lesions macroscòpiques (Taula 13; test khi quadrat p-valor = 0,51), descartant per tant un paper de la variant D1822V en iniciació de la formació de l'adenoma.

2.2 Determinació de pèrdua al·lèlica en teixits tumorals

Per aprofundir en el coneixement de l'associació de la variant D1822V amb el risc de CCR, es va estudiar la pèrdua d'heterozigotitat (LOH) al codó 1822 del gen *APC* en

teixits aparellats normal i tumoral de 92 dels 108 casos de CCR esporàdic heterozigots per la variant. Mitjançant la tècnica de discriminació al·lèlica amb el Light Cycler es va observar que en el teixit tumoral de 23 casos hi havia la completa pèrdua d'un dels dos al·lells i en 16, un possible desequilibri al·lèlic. A la Figura 17 es mostren dos casos de CCR esporàdic (A i B) on s'ha observat, amb el Light Cycler, la pèrdua completa de l'al·lel A i de l'al·lel T al codó 1822, respectivament.

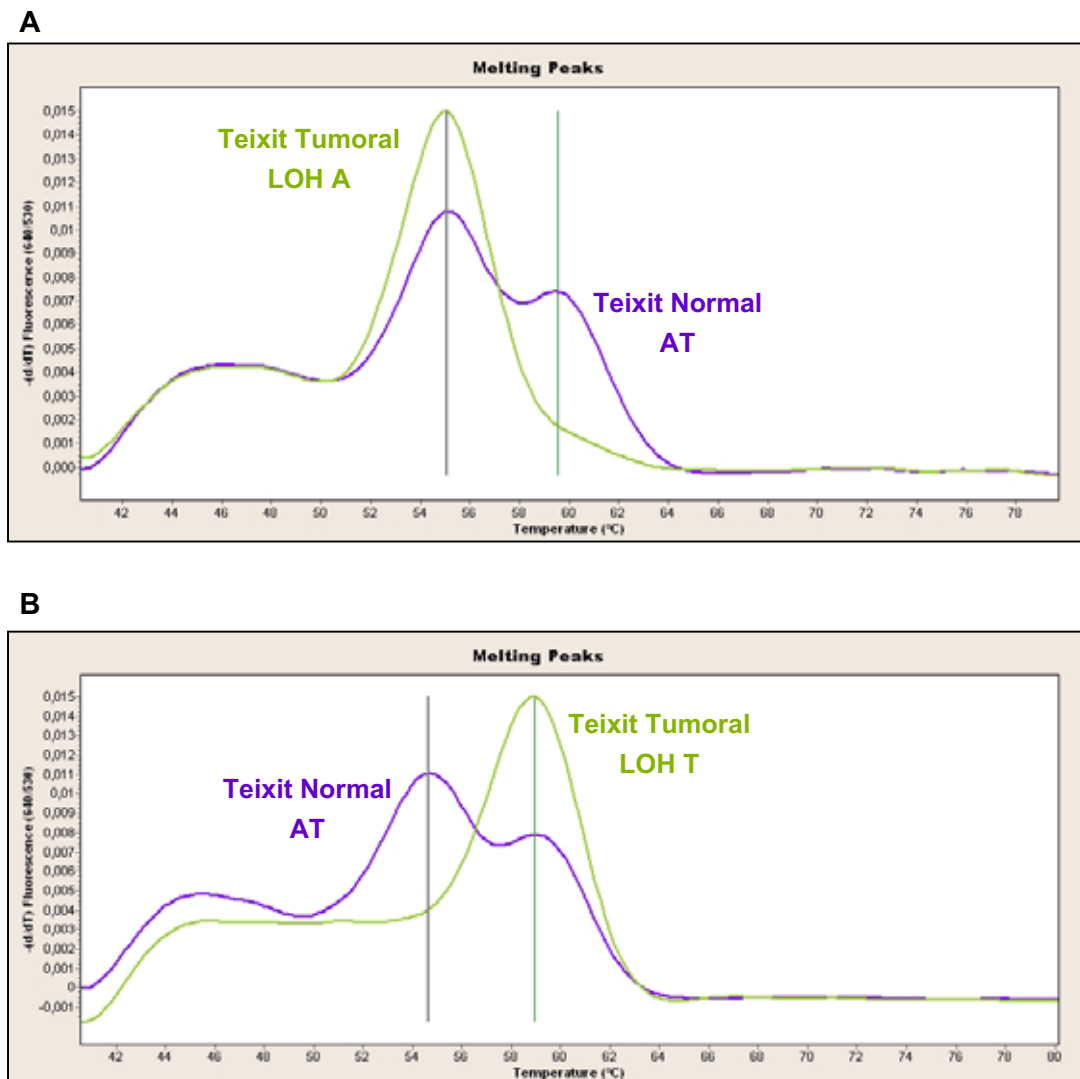


Figura 17. Anàlisi de LOH al codó 1822 per discriminació al·lèlica amb el Light Cycler. (A) En el teixit normal de la mostra heterozigota s'observen els dos pics a les diferents temperatures, mentre que en el teixit aparellat tumoral s'observa la pèrdua completa de l'al·lel A, doncs només s'observa un pic a 55,1 °C. **(B)** En aquest cas, en el teixit tumoral s'observa la pèrdua completa de l'al·lel T, doncs només s'observa un pic a 59,4 °C.

Finalment, mitjançant la tècnica de PCR-RFLP, es va confirmar la pèrdua preferencial d'un dels dos al·lels al codó 1822 en un total de 25 casos, mentre que els 14 casos restants no van ser valorables. A la Figura 18 es mostra l'LOH dels mateixos casos A i B, aquesta vegada analitzada amb la tècnica de PCR-RFLP.

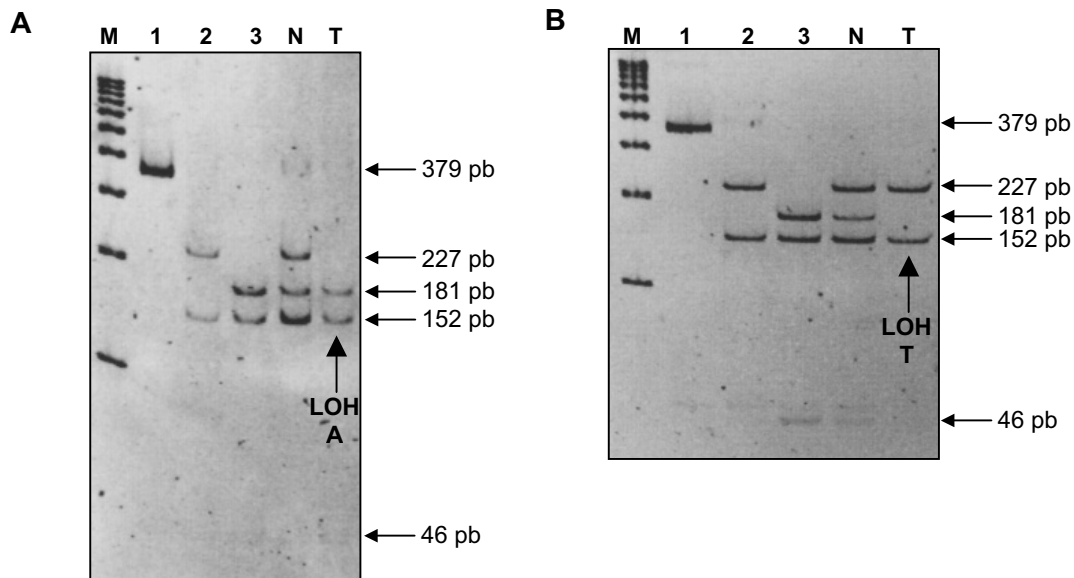


Figura 18. Anàlisi de LOH al codó 1822 per RFLP. En els dos gels (mostres A i B), el carril 1 és el producte de PCR de cada cas sense digerir. El carril 2 és un control de digestió homozigot AA, que presenta una diana de restricció per MbolI que genera dos fragments de 227 i 152 pb. El carril 3 és un control de digestió homozigot TT, que presenta dues dianes de restricció que generen tres fragments de 181, 152 i 46 pb. **(A)** En el teixit normal de la mostra heterozigota (N), la digestió amb MbolI genera quatre fragments de 227, 181, 152 i 46 pb, mentre que en el teixit aparellat tumoral (T) s'observa la pèrdua de l'al·lel A, doncs es perd el fragment de 227 pb. **(B)** En aquest cas, també heterozigot, en el teixit normal (N) la digestió genera els quatre fragments i en el teixit tumoral (T) s'observa la pèrdua de l'al·lel T, doncs només es generen dos fragments de 227 i 152 pb. M és el marcador de pes molecular.

Per PCR-RFLP, es va observar que la pèrdua d'heterozigositat comprenia una regió que arribava, almenys, fins la zona on es localitzen els dos polimorfismes propers c.4479A>G i c.5880A>G. En resum, l'al·lel A es va perdre en 13/25 casos i l'al·lel T en 12/25, de manera que no observem una pèrdua preferencial de cap dels dos al·lels. Tampoc es van observar diferències entre els tumors de còlon (7/13 casos perden l'al·lel A i 7/12 l'al·lel T) i els recte (6/13 casos perden l'al·lel A i 5/12 l'al·lel T).

3. VARIANT APC N1026S

Els resultats corresponents a aquest apartat es troben recollits a l'article sotmès a *Gastroenterology* (GASTRO-D-07-00070), titulat *Functional characterization of the novel APC N1026S variant associated with Attenuated Familial Adenomatous Polyposis*, que està inclòs com annex a la memòria de la present tesi (Annex III).

Es va identificar la variant APC N1026S (c.3077A>G), no descrita fins ara, en una família d'AFAP. Aquesta variant dona lloc a un canvi d'asparragina a serina en un residu altament conservat de l'exó 15 del gen APC, localitzat a la primera de les quatre repeticions de 15 AA que regulen la unió d'APC amb β -catenina (Figura 19).

1021	LDTPIN YSLKYSDEQ	LNSGRQSPSQNERWARPKHII EDEIKQSEQRQSRNQSTTYP
1077	VYTESTDDKHLKFPHPFGQQECVSPYRSRGANGSETNRVGSNHGINQNVSQLCQE	
1133	DDYE DDKPTN YSERYSEEEQHEE EERPTN YSIKYNEEKRH VDQPID YSLKYATDI	

Figura 19. Seqüència d'AA corresponent a la regió de les quatre repeticions de 15 AA de la proteïna APC d'unió a β -catenina. Aquesta regió, altament conservada, comprèn els AA 1021-1187. Les quatre repeticions de 15 AA es mostren subratllades en groc. El residu Asn del codó 1026, localitzat a la primera de les quatre repeticions de 15 AA, es mostra en negreta.

L'alineament múltiple de la seqüència corresponent a la primera repetició de 15 AA de la proteïna APC de diferents espècies amb el programa ClustalW (www.ebi.ac.uk) ens indica que el residu 1026 es troba altament conservat en vertebrats (mamífers, peixos i amfibis) i que la substitució del residu en *Drosophila melanogaster* és una substitució conservada (Figura 20).

<i>Homo sapiens</i>	1021	L D T P I N Y S L K Y S D E Q
<i>Macaca mulatta</i>	1021	L D T P I N Y S L K Y S D E Q
<i>Bos taurus</i>	1021	L D T P I N Y S L K Y S D E Q
<i>Rattus norvegicus</i>	1021	L D T P I N Y S L K Y S D E Q
<i>Mus musculus</i>	1021	L D T P I N Y S L K Y S D E Q
<i>Monodelphis domestica</i>	1021	L D T P I N Y S L K Y S D E Q
<i>Xenopus tropicalis</i>	1021	L D T P I N Y S L K Y S D E Q
<i>Takifugu rubripes</i>	1021	L D T P I N Y S L K Y S D E Q
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	1021	L D T P I N Y S L K Y S D E Q
<i>Drosophila melanogaster</i>	1021	E E Q P I D Y S V K Y S E N A
		: ** : ** : ** : ** :

Figura 20. Alineament múltiple de la primera repetició de 15 AA de la proteïna APC en diferents espècies. El residu 1026 està ressaltat amb un requadre. El símbol "*" indica que els residus de la columna són idèntics en totes les seqüències de l'alineament. El símbol ":" indica que hi ha substitucions conservades.

Per altra banda, l'estructura cristal·litzada de la primera repetició de 15 AA d'APC (AA 1021-1035) unida a la regió armadillo de la β -catenina (AA 150-545 i 558-663) (Eklof Spink et al., 2001), ens indica que la cadena lateral del residu Asn1026 de l'APC forma un pont d'hidrogen amb el residu Asp390 de la β -catenina i amb el residu Ser1028 de l'APC.

La localització de la variant dins la proteïna, la naturalesa de la substitució de l'AA i la conservació del codó al llarg de l'evolució van ser els primers indicadors de que la variant N1026S podria ser la causant de la malaltia. Aquestes dades suggerien que la variant APC N1026S podria afectar la interacció de la proteïna APC amb la β -catenina.

El nostre objectiu va ser analitzar el significat biològic i funcional de la variant APC N1026S per conèixer el seu paper en el desenvolupament de la poliposi. Es va realitzar, en primer lloc, un estudi de cosegregació de la variant amb la malaltia a la família d'AFAP on es va identificar. Després es va determinar la freqüència de la variant a la població control i a les diferents poblacions de CCR esporàdic i hereditari. Finalment es van realitzar assajos funcionals per investigar l'efecte de la variant en la interacció entre APC i β -catenina i el seu impacte en la transcripció mitjançada pel complex β -catenina/Tcf-4.

3.1 Estudis moleculars

3.1.1 La variant N1026S a la família d'AFAP

La variant N1026S, de significat incert, es va identificar a la línia germinal d'un individu d'una família d'AFAP. Es va seqüenciar tota la regió codificant del gen APC en aquest cas índex per descartar la presència d'altres mutacions en el gen i no s'hi va identificar cap altra mutació. També es va descartar la presència de mutacions a l'exó 3 del gen que codifica per la β -catenina (*CTNNB1*). Finalment, es va descartar la presència de les dues variants més freqüents del gen *MYH*, Y165C i G382D.

Tots els membres afectes de la família presentaven entre 10 i 100 adenomes al llarg de tot el còlon i l'edat del diagnòstic oscil·lava entre els 36 i 65 anys. A la Figura 21 es descriuen altres característiques clíniques de la família.

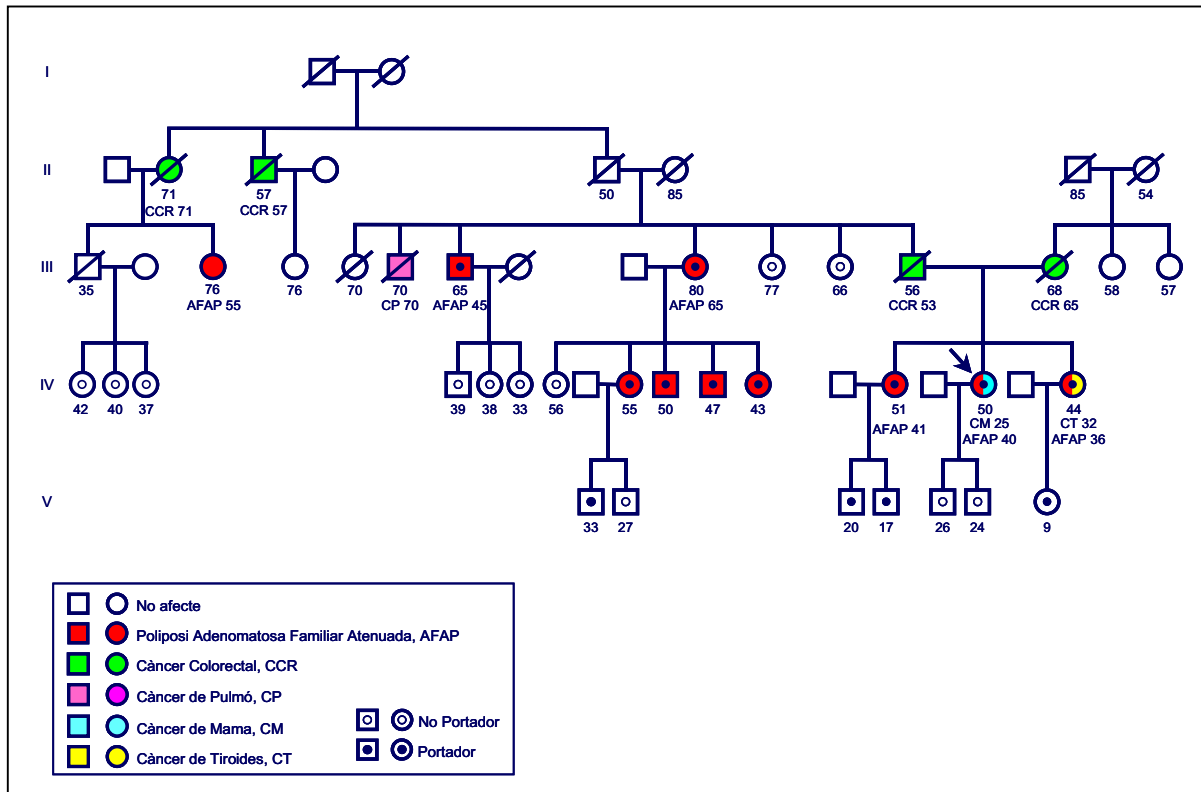


Figura 21. Arbre genealògic de la família d'AFAP on es va identificar la variant APC N1026S. La fletxa indica el cas índex. Es mostren les edats dels individus, el tipus de malaltia, l'edat del diagnòstic i s'indica també si els individus són portadors de la variant.

A les generacions II, III i IV es va observar que la variant cosegregava amb la malaltia en els nou membres afectes de la família estudiats, mentre que els nou membres sans estudiats, tres dels quals eren majors de 52 anys, no eren portadors de la variant (Figura 21). A la generació V, tres individus no són portadors de la variant i quatre individus són portadors que estan pendents de realitzar-se una colonoscòpia. La cosegregació de la variant N1026S amb la malaltia a la família d'AFAP era un indicador de que la variant N1026S podria ser la causant de la malaltia.

3.1.2 Estudi poblacional

Es va analitzar la presència de la variant N1026S en 203 controls, 236 casos de CCR esporàdic i 204 casos de CCR hereditari: 98 FAP, 39 AFAP, 13 HNPCC i 54 HNPCC-like (Figura 22). Cap dels altres casos de CCR (0/236 esporàdics i 0/204 hereditaris) o controls (0/203) analitzats eren portadors de la variant N1026S (Taula 9), fet que reforçava la nostra hipòtesi que la variant N1026S era la mutació causant de la malaltia.

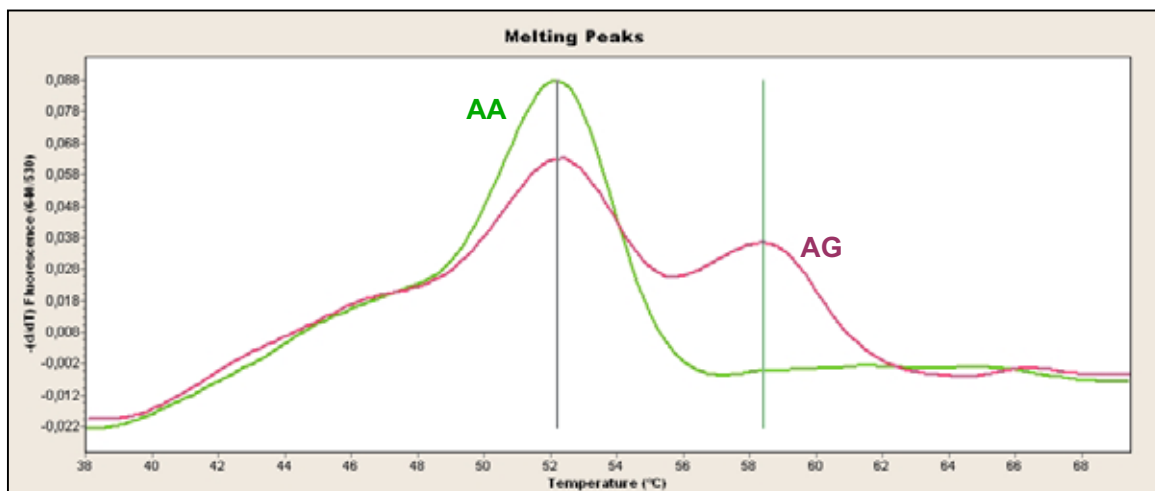


Figura 22. Anàlisi de la variant N1026S per discriminació al·lèlica amb el Light Cycler. La sonda *sensor* ha estat dissenyada per hibridar amb total complementarietat amb l'al·lel G, de manera que quan hibrida amb l'al·lel A, la seva temperatura de fusió és menor i es desenganxa abans. La mostra heterozigota AT presenta dos pics a les diferents temperatures de fusió.

3.2 Estudis funcionals

3.2.1 Anàlisi de la interacció de β -catenina amb els pèptids APC Asn1026 i Ser1026 per cromatografia d'afinitat

La localització de la variant al domini conservat d'unió a β -catenina ens va suggerir la possibilitat que la variant podria estar modificant la interacció entre APC i β -catenina i per tant, alterant la correcta degradació de la β -catenina. Amb l'objectiu d'avaluar si la variant alterava la unió d'APC amb β -catenina, es van dur a terme assajos de cromatografia d'afinitat amb els pèptids WT Asn1026 (LDTPINYSLKYSDEQ) i mutat Ser1026 (LDTPISYSLKYSDEQ), que comprenen la primera repetició de 15 AA d'unió a β -catenina (AA 1021-1035).

Es van unir covalentment 3 mg de cada pèptid a dues columnes d'afinitat i es van incubar amb 20 μ g de GST- β -catenina purificada. Després de la incubació es va recollir la primera fracció que s'obté, es van rentar les columnes extensament i es van recollir tant les dues primeres fraccions del rentat com la última fracció (GST- β -catenina no unida). Després, la GST- β -catenina unida es va eluir amb dos tampons diferents. Es va quantificar per WB tant la GST- β -catenina unida com la no unida. En el WB corresponent a la columna WT (Asn1026) incubada amb GST- β -catenina, observem GST- β -catenina en els eluïts (banda de 95 kDa) després dels rentats (Figura 23A). En canvi, en el WB de la columna Ser1026, observem que

tota la GST- β -catenina és recollida durant els rentats (Figura 23B). Aquests resultats ens indiquen que la variant N1026S bloqueja completament la unió de la GST- β -catenina a la primera repetició de 15 AA d'APC en aquestes condicions experimentals.

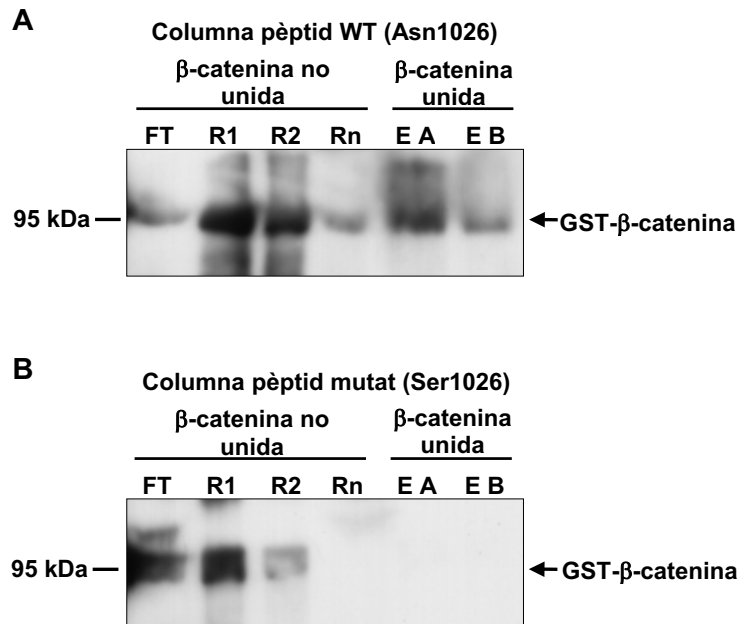


Figura 23. Interacció de GST- β -catenina amb els pèptids Asn1026 i Ser1026. La GST- β -catenina unida i no unida es va analitzar per WB amb un anticòs monoclonal anti- β -catenina. **(A)** A la columna Asn1026 observem la banda de 95 kDa corresponent a la GST- β -catenina en els eluïts. **(B)** En canvi, a la columna Ser1026, tota la GST- β -catenina és recollida en els rentats i no s'observa cap banda en els eluïts, indicant que la GST- β -catenina s'uneix al pèptid WT però no al mutat. Tots els experiments es van realitzar per triplicat. FT, *flow through*; R1, primer rentat; R2, segon rentat; Rn, últim rentat; EA, eluït tampó A; EB, eluït tampó B.

Quan les columnes es van incubar amb GST, no observàvem la banda de 28 kDa corresponent al GST en els eluïts, doncs tota la proteïna GST es recollia en els rentats tant a la columna Asn1026 com en la Ser1026 (Figures 24 A i B). Aquests resultats ens indiquen que la unió de la proteïna GST- β -catenina amb els pèptids és específica.

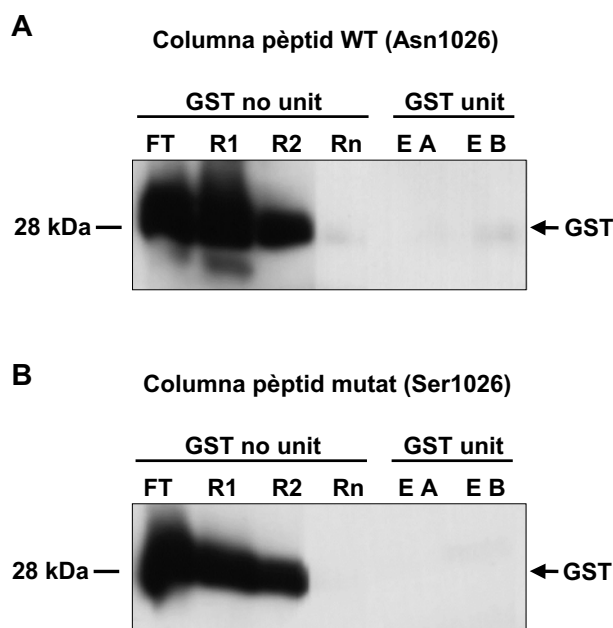


Figura 24. Interacció de GST amb els pèptids Asn1026 i Ser1026. La GST unida i no unida es va analitzar per WB amb un anticòs monoclonal anti-GST. A les dues columnes (**A** i **B**) tota la proteïna GST és recollida en els rentats. L'absència de GST en els eluïts indica que la unió de la GST- β -catenina als pèptids és específica. Tots els experiments es van realitzar per triplicat. FT, *flow through*; R1, primer rentat; R2, segon rentat; Rn, últim rentat; EA, eluït tampó A; EB, eluït tampó B.

3.2.2 Interacció de β -catenina amb els fragments APC-4x15-WT i Ser1026

Havíem observat que la variant N1026S impedia completament la unió de la β -catenina a la primera repetició de 15 AA d'APC. Però la regió central de la proteïna APC conté 4 repeticions de 15 AA que uneixen la β -catenina (Eklof Spink et al., 2001; Rubinfeld et al., 1993; Su et al., 1993b). Amb l'objectiu d'avaluar si la variant encara impedia la unió de la β -catenina quan les altres tres repeticions de 15 AA estaven presents, es van dur a terme assajos d'interacció proteïna-proteïna. Es van avaluar les diferències en la unió amb la β -catenina entre les proteïnes de fusió GST-APC-4x15-WT i GST-APC-4x15-Ser1026 (AA 1014-1197) per cromatografia d'afinitat i amb el BIAcore (Figura 25).

1014	MDDNDGE	L	D	T	P	I	N	Y	S	L	K	Y	S	D	E	Q	LNSGRQSPSQNERWARPKHII EDE
1060	IKQSEQRQSRNQSTTYPVYTESTDDKHLKFQPHFGQQECVSPYRSR																
1106	GANGSETNRVGSNHGINQNVSQSLCQEDDYE	DD	K	P	T	N	Y	S	E	R	Y	S	E	E	E	E	DDKPTNYSERYSEEE
1152	QHEE	E	E	R	P	T	N	Y	S	I	K	Y	N	E	E	K	RHVDPIDYSLKYATDIPSSQKQSF

Figura 25. Seqüència d'AA corresponent al fragment APC 4x15. Aquest fragment comprèn les quatre repeticions de 15 AA de la proteïna APC d'unió a β -catenina, que es mostren subratllades en groc. El residu Asn del codó 1026, localitzat a la primera de les quatre repeticions de 15 AA, es mostra en negreta.

3.2.2.1 Experiments de cromatografia d'afinitat

Es van unir covalentment 2,4 mg de les proteïnes de fusió GST-APC-4x15-WT, GST-APC-4x15-Ser1026 i GST sola a tres columnes d'afinitat, respectivament, i es van incubar amb 20 µg de β-catenina purificada sense GST. Després dels rentats, la β-catenina unida es va eluir amb quatre tampons diferents i es va quantificar per WB (Figura 26). No es va detectar β-catenina en els eluïts de la columna amb GST (imatges no mostrades), indicant que la unió de la β-catenina amb els fragments d'APC és específica.

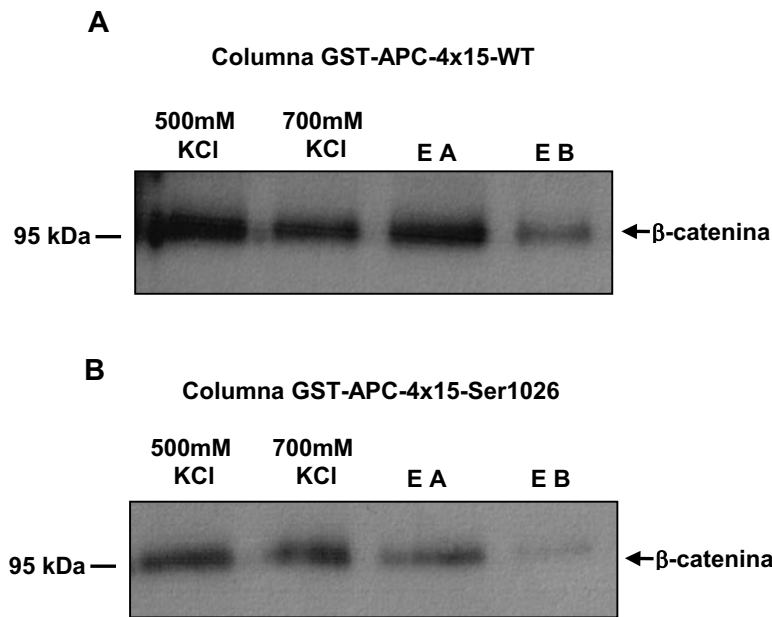


Figura 26. Interacció de β-catenina amb GST-APC-4x15-WT i GST-APC-4x15-Ser1026. La β-catenina unida es va eluir amb quatre tampons diferents (500 mM KCl, 700 mM KCl, EA i EB) i es va analitzar per WB amb un anticòs monoclonal anti-β-catenina. A la columna amb el fragment d'APC WT (**A**), observem més quantitat de β-catenina unida que a la columna Ser1026 (**B**), on la intensitat de les bandes és menor.

Els resultats del WB suggerien que hi havia una petita disminució en la interacció de la β-catenina amb la proteïna APC-4x15-Ser1026, si ho comparem amb la proteïna APC-4x15-WT. Vam decidir avaluar aquestes interaccions amb la tècnica BIAcore, una tècnica més precisa basada en el principi de ressonància del plasmó de superfície.

3.2.2.2 Experiments amb BIAcore

Una vegada immobilitzats 0,07 pmols/mm² (2.800 RUs) de les proteïnes de fusió GST-APC-4x15-WT i GST-APC-4x15-Ser1026 a la superfície del xip, es va injectar β-catenina purificada sense GST a una concentració de 2 µM. Posteriorment es va aturar la injecció de β-catenina, però es va mantenir un flux continu del tampó per a

obtenir la corba de dissociació. Finalment, es va injectar una solució de regeneració per induir la dissociació total de la β -catenina amb els lligands. Com a control de cada experiment, es va injectar β -catenina en un canal del xip on no hi havia lligand immobilitzat. L'associació, dissociació i regeneració es van seguir en temps real (Figura 27).

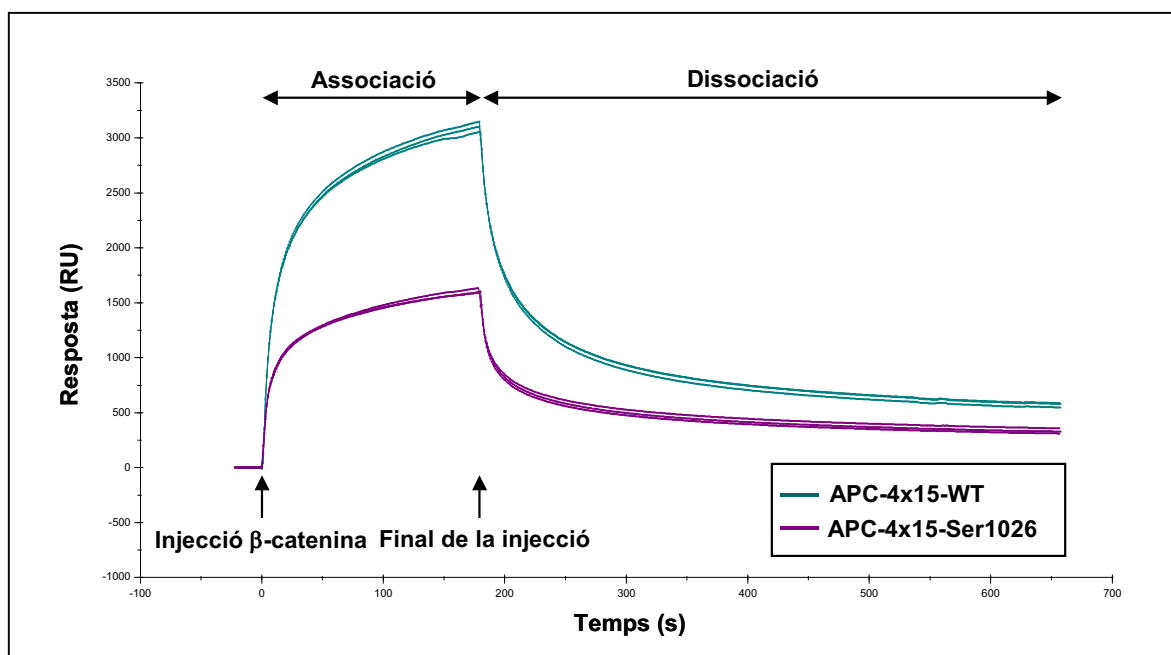


Figura 27. Sensograma mostrant les corbes d'associació i dissociació de la β -catenina amb les proteïnes de fusió APC-4x15-WT i APC-4x15-Ser1026. La resposta, en RUs, es va mesurar en funció del temps. Els experiments es van realitzar per triplicat.

Es va observar una diferència de 1.490 RUs (ΔR_{Umax}) en la unió amb la β -catenina entre les proteïnes APC 4x15 WT i mutada, essent aquesta unió molt més elevada amb la proteïna WT comparat amb la mutada (p -valor = 0,05). Aquests resultats ens indiquen que la variant N1026S, en presència de les altres tres repeticions de 15 AA, disminueix significativament la interacció d'APC 4x15 amb la β -catenina, comparat amb la proteïna WT.

3.2.3 Anàlisi estructural de la interacció entre el pèptid APC Ser1026 i β -catenina

Una vegada obtingudes les estructures dels pèptids WT i Ser1026 amb l'energia minimitzada, es va utilitzar el programa PyMOL per analitzar el nombre de contactes polars (per exemple, ponts d'hidrogen). Per al pèptid WT, l'RMSD (*Root Mean Square Deviation*) entre les coordenades disponibles del PDB i les minimitzades pel GROMACS era de només 0,083 Å. L'anàlisi inicial ens indicava que el pèptid WT tenia

quatre contactes polars [ND2(Asn1026)-OG(Ser1208), CO(Asn1026)-NH(Leu1029), CO(Tyr1027)-NH(Lys1030) i CO(Tyr1031)-NH(Glu1034)], mentre que el pèptid N1026S només tenia dos contactes polars [CO(Tyr1027)-NH(Lys1030), CO(Tyr1031)-NH(Glu1034)]. Des d'un punt de vista estructural, el canvi d'Asn1026 a Ser suprimeix els contactes terciaris entre els residus Asn1026 i Ser1028, donant lloc a un increment de la flexibilitat interna del pèptid.

En aquest punt, es va dur a terme el procés de *docking*, amb el programa AutoDock, per avaluar les conseqüències estructurals de la variant en la interacció amb la β -catenina, comparat amb el WT. La Figura 28 ens mostra que el mètode de *docking* ha estat validat i que funciona, ja que torna a calcular d'una manera correcta l'estructura del complex pèptid WT/ β -catenina amb molt poc error.

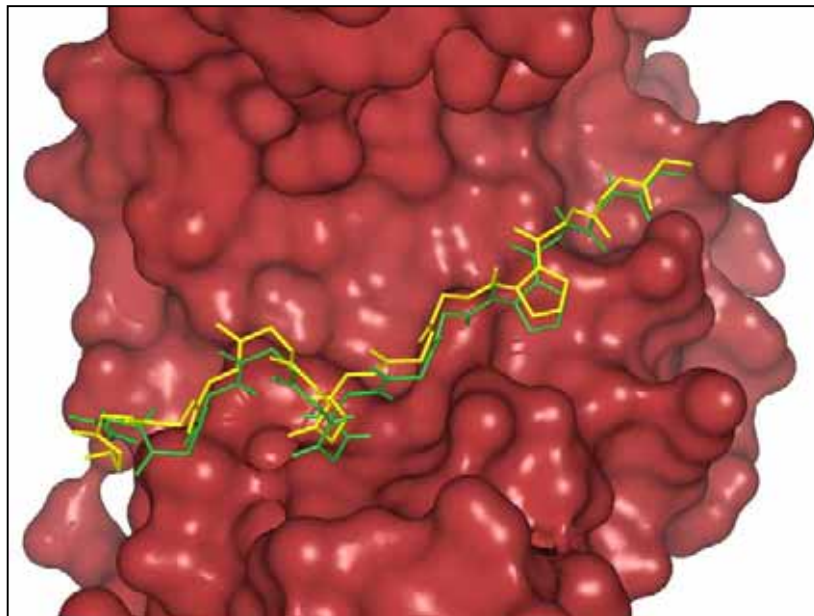


Figura 28. Detall de la interacció entre l'agrupament més freqüent generat pel programa AutoDock per al pèptid WT (verd) i l'estructura calculada per raigs-X dipositada en el PDB (groc) del mateix pèptid amb la β -catenina (representada en superfície). L'RMSD és de 0,42 Å entre les dues estructures indicant que el *redocking* va ser satisfactori i que els paràmetres utilitzats per al *docking* van ser raonables.

Les Figures 29 i 30 mostren el solapament dels agrupaments obtinguts durant el procés de *docking* per als pèptids WT i Ser1026, respectivament. Es demostra clarament que el pèptid WT és capaç de trobar la conformació correcta (*redocking*) i d'establir els mateixos contactes inter-moleculars per interaccionar amb la β -catenina (Figura 29). En canvi, per al pèptid Ser1026, el procés de *docking* és incapaç de generar una conformació d'unió consensuada, tal i com es reflexa per la falta d'agrupament (50 agrupaments per 50 conformacions generades) i per les conformacions tan diferents produïdes pel programa (Figura 30).

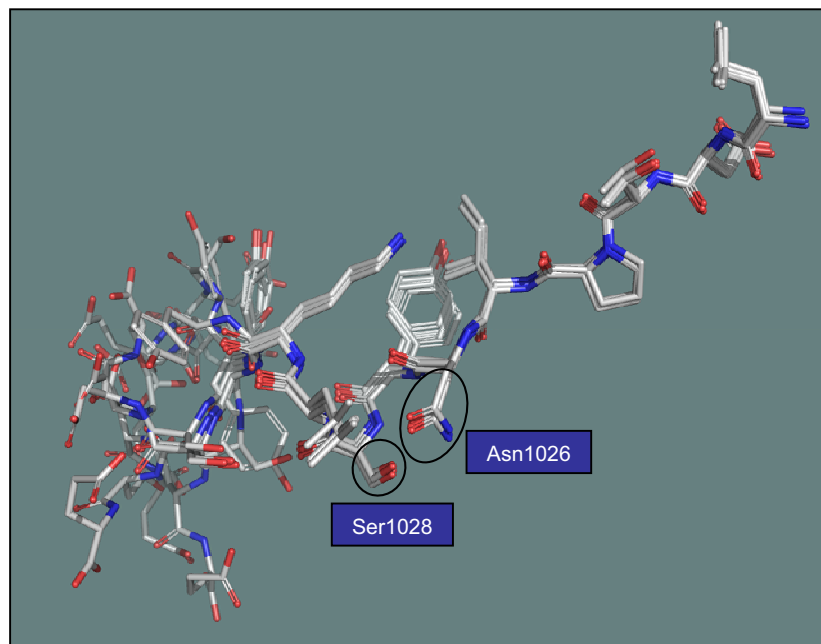


Figura 29. Solapament dels 7 multi-agrupaments obtinguts del *docking* del pèptid WT amb la β -catenina. El dibuix mostra l'elevat grau de solapament entre les conformacions generades, indicant la convergència del model obtingut per al pèptid WT en la seva interacció amb la β -catenina. La proximitat dels residus Asn1026 i Ser1028, il·lustrats a la figura, explica el motiu pel qual les cadenes laterals d'aquests dos residus formen un pont d'hidrogen.

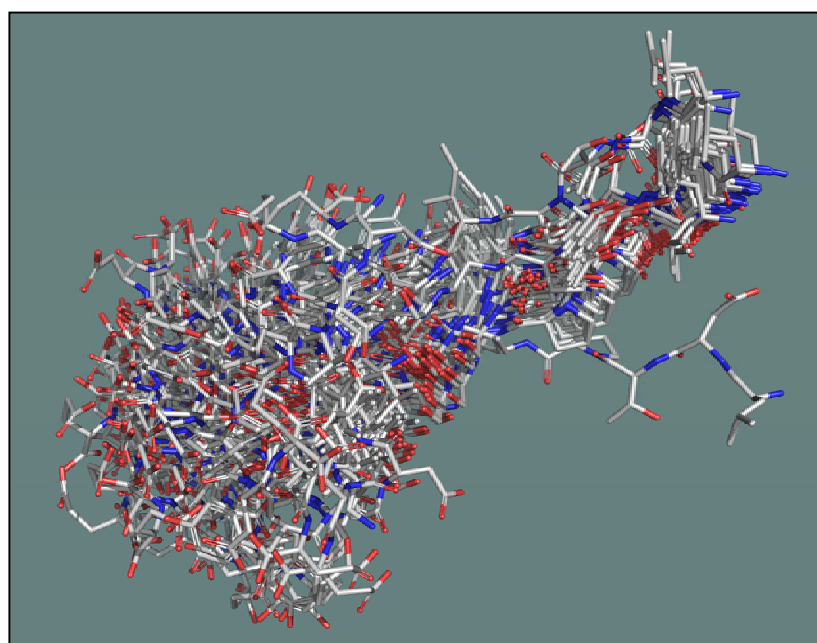


Figura 30. Solapament dels 50 agrupaments per a les 50 conformacions obtingudes del *docking* del pèptid mutat amb la β -catenina. En aquest cas, el programa no pot obtenir una estructura consensuada per al pèptid mutat Ser1026 en la seva interacció amb la β -catenina, probablement degut a la flexibilitat conformacional induïda per la variant.

A més, una anàlisi exhaustiva de les diferents conformacions generades pel pèptid Ser1026 mostrava que el nombre de contactes amb la β -catenina era clarament inferior que en el cas del pèptid WT, i que la mutació d'Asn1026 a Ser impedia la formació d'un enllaç d'hidrogen amb l'Asp390 de la β -catenina.

Finalment, es va observar que, de promig, el nombre de contactes polars interns mesurats amb l'AutoDock eren de 3,43 per al pèptid WT, i d'1,40 per al pèptid Ser1026. Des d'un punt de vista estructural, el pèptid Ser1026 és incapaç d'establir contactes estables amb la β -catenina com els que s'estableixen amb el pèptid WT, principalment degut a la flexibilitat del pèptid com a conseqüència de la falta de restriccions internes.

3.2.4 Efecte de la variant N1026S en la transcripció mitjançada pel complex β -catenina/Tcf-4

Els resultats obtinguts fins ara evidenciaven que la variant N1026S disminuïa la unió de la β -catenina amb el fragment APC 4x15, però es desconeixia el seu efecte en la proteïna APC sencera. Es van dur a terme assajos funcionals per investigar l'impacte d'aquesta variant en la transcripció mitjançada pel complex β -catenina/Tcf-4. Si la variant N1026S disminueix la capacitat d'unió d'APC amb β -catenina, llavors part de la β -catenina del citoplasma segurament no podrà ser fosforilada pel complex de destrucció –format per axina, conductina, GSK3 β i APC– i, per tant, no podrà ser degradada. Com a conseqüència, la β -catenina s'acumularia al citoplasma i es dirigiria cap al nucli, on s'uniria a Tcf-4, activant la transcripció de gens diana com *c-myc*. Per altra banda, al nucli, l'APC perdria capacitat d'unir i exportar la β -catenina cap al citoplasma, de manera que s'acumularia més β -catenina lliure al nucli, afavorint la transcripció de gens implicats en la carcinogènesi.

Es van utilitzar les cèl·lules SW480, que tenen la proteïna APC endògena truncada al codó 1338 i per tant, la transcripció mitjançada pel complex β -catenina/Tcf-4 constitutivament activada. Anteriorment ja s'havia descrit que l'expressió tant de la proteïna APC WT com de la regió central de la proteïna APC a les cèl·lules SW480, redueix substancialment els nivells de β -catenina i, per tant, disminueix l'activitat transcripcional mitjançada per β -catenina/Tcf-4 (Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997; Munemitsu et al., 1995). En canvi, l'expressió de la proteïna APC 1309 Δ no inhibeix la transcripció mitjançada per β -catenina/Tcf-4 en aquestes cèl·lules. La mutació APC 1309 Δ és l'alteració que s'identifica amb més freqüència en els individus de FAP amb poliposi severa; codifica per una proteïna APC truncada a l'extrem C-terminal, similar a la present a les cèl·lules SW480, que reté les repeticions de 15 AA d'unió a β -catenina, però li manquen les set repeticions de 20 AA que marquen la β -catenina per a la seva degradació.

Com era d'esperar, en les cèl·lules transfectades amb els plasmidis pCDNA i *APC* 1309 Δ es va observar un increment de 23 vegades i 9 vegades, respectivament, de la transcripció mitjançada per β -catenina/Tcf-4 respecte la observada en les cèl·lules transfectades amb *APC* WT (p-valors < 0,000001 en els dos casos) (Figura 31). L'expressió de la proteïna *APC* N1026S va incrementar la transcripció en 1,45 vegades quan es va comparar amb la proteïna *APC* WT (p-valor = 0,00003) (Figura 31).

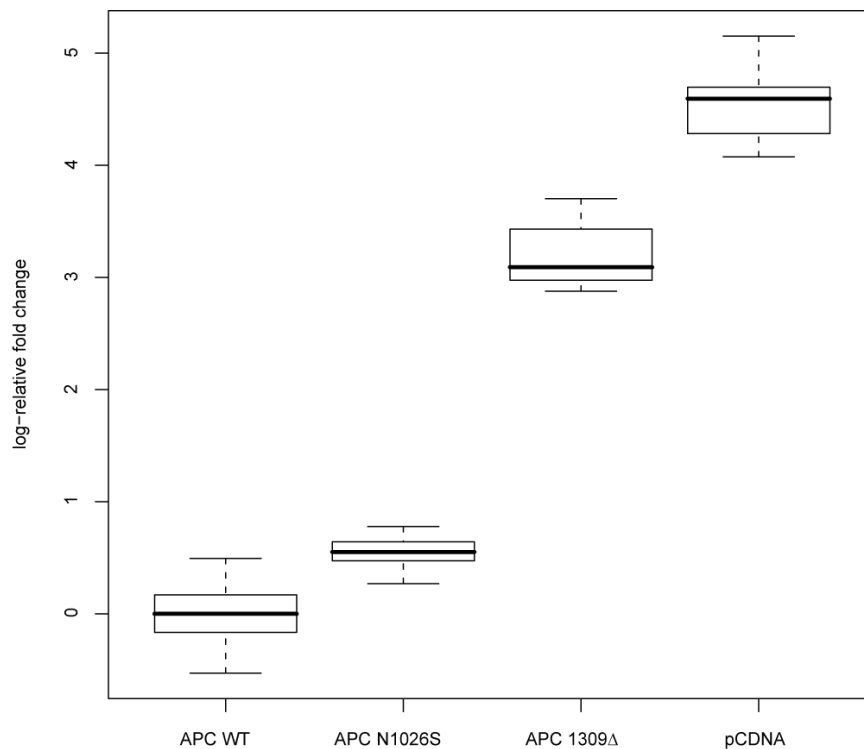


Figura 31. Efecte de l'expressió d'APC N1026S en la transcripció mitjançada per β -catenina/Tcf-4 a les cèl·lules SW480. Les cèl·lules es van cotransfectar amb 3 μ g del vector d'expressió corresponent, 0,5 μ g del plasmidi pTOPFLASH o pFOPFLASH i 50 ng del plasmidi pRL-TK. Es mostra un *box plot* representant el nivell de canvi relatiu en escala logarítmica (*log-relative fold change*) de la transcripció en les cèl·lules transfectades amb *APC* N1026S, *APC* 1309 Δ i pCDNA respecte l'*APC* WT. Els experiments es van realitzar en quatre dies independents per duplicat i triplicat i es van obtenir onze rèpliques.

Aquests resultats indiquen que la variant *APC* N1026S activa moderadament la transcripció mitjançada pel complex β -catenina/Tcf-4, que donaria lloc a un augment de la transcripció de gens implicats en la carcinogènesi. Els nivells d'expressió de les proteïnes *APC* WT, *APC* 1309 Δ i *APC* N1026S eren comparables en les diferents transfeccions (Figura 32), el què indicava que les diferències observades en la transcripció no poden ser atribuïdes a diferències en la dosi d'*APC*.

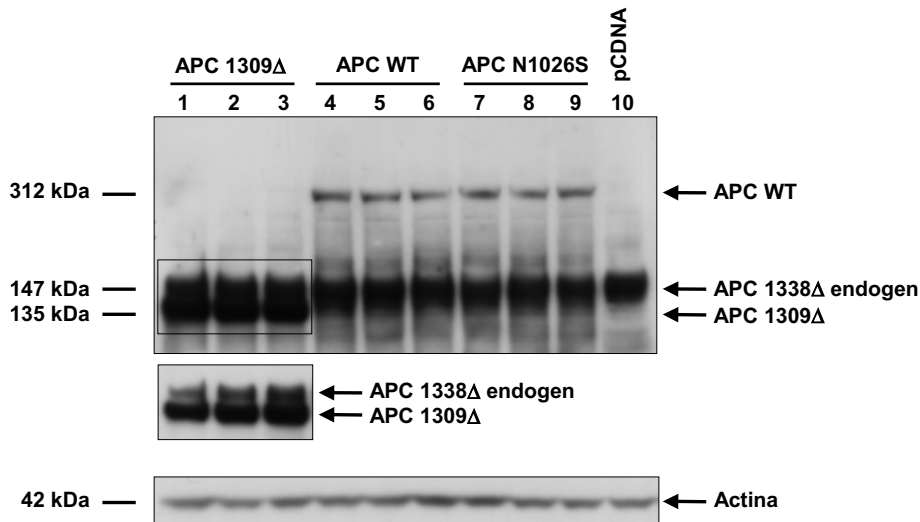


Figura 32. Expressió de les diferents formes de la proteïna APC a les cèl·lules SW480. L'expressió d'APC a les cèl·lules transfectades es va analitzar per WB amb un anticòs específic anti-APC. La banda de 147 kDa correspon a l'APC endogen de les cèl·lules SW480 (APC truncat al codó 1338). Els carrils 1-3 (imatge mostrada a sota amb menys intensitat) mostren l'expressió de la proteïna APC1309 Δ en un dels triplicats (~135 kDa) i els carrils 4-6 i 7-9 mostren els triplicats de l'expressió de les proteïnes APC WT i APC N1026S (312 kDa), respectivament. L'actina total va servir de control de càrrega.

3.2.5 Efecte de la variant N1026S en la transcripció del gen *c-myc*

Els resultats obtinguts fins al moment donen suport a la idea que la variant N1026S continua alterant la capacitat de la proteïna APC d'interaccionar amb la β -catenina quan es troba en el context de la proteïna APC sencera. Aquesta interacció parcial de la proteïna APC N1026S amb la β -catenina resultaria en una disminució de la capacitat de la proteïna APC N1026S tant de regular la degradació de la β -catenina al citoplasma com d'exportar la β -catenina del nucli cap al citoplasma. Atès que s'ha demostrat extensament que el gen *c-myc* és un gen diana de la via β -catenina/Tcf-4 involucrat en la proliferació i la desregulació del cicle cel·lular (He et al., 1998), es va avaluar per RT-PCR si l'activació de la transcripció del gen *c-myc* es correlacionava amb l'expressió d'APC N1026S a les cèl·lules SW480.

Es van observar uns nivells elevats de transcripció del gen *c-myc* a les cèl·lules transfectades amb pCDNA i APC 1309 Δ respecte les transfectades amb APC WT, amb un increment d'1,59 vegades i 1,42 vegades, respectivament (p-valors = 0,0003 i 0,001) (Figura 33). En concordança amb els resultats dels assajos amb luciferasa, l'expressió d'APC N1026S va incrementar la transcripció del gen *c-myc* 1,2 vegades quan es comparava amb APC WT, amb un p-valor proper a la significació estadística (p-valor = 0.057) (Figura 33). Aquests resultats ens indiquen que la variant APC

N1026S activa moderadament la transcripció d'un dels gens diana activats per la via β -catenina/Tcf-4 que millor s'ha caracteritzat fins ara: el gen *c-myc*.

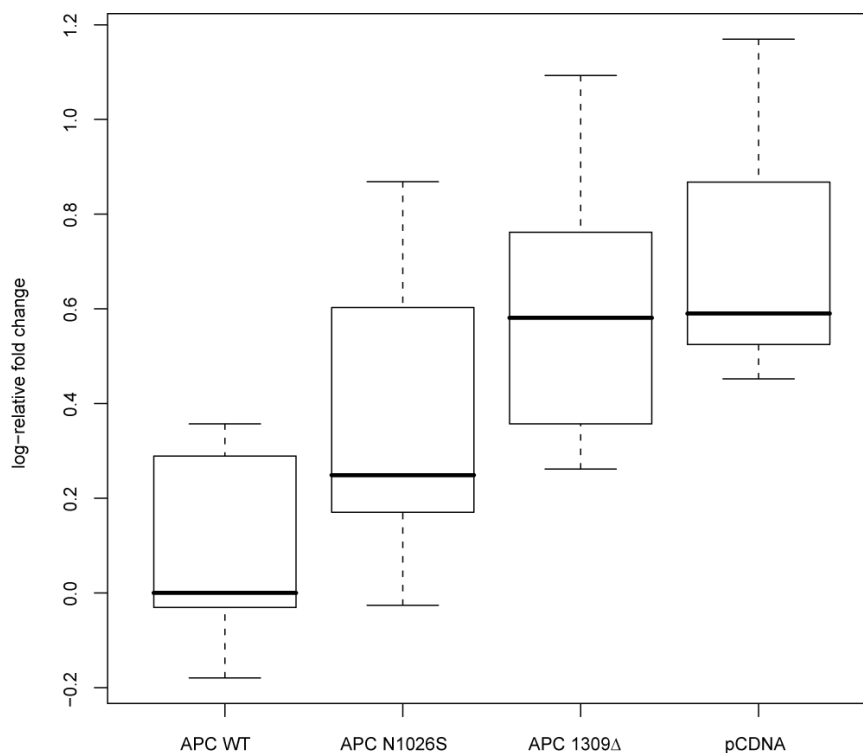


Figura 33. Efecte de l'expressió d'APC N1026S en la transcripció del gen *c-myc* en les cèl·lules SW480. Les cèl·lules es van cotransfectar amb 3 μ g del vector d'expressió corresponent, 0,5 μ g del plasmidi pFOPFLASH i 50 ng del plasmidi pRL-TK. Es mostra un *box plot* representant el nivell de canvi relatiu en escala logarítmica (*log-relative fold change*) de la transcripció de *c-myc* en les cèl·lules transfectades amb APC N1026S, APC 1309 Δ i pCDNA respecte l'APC WT. Els resultats mostren la mitjana de tres experiments independents realitzats en duplicat o triplicat (n=8).

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

A continuació es va voler explorar si aquesta moderada activació de la transcripció mitjançada per β -catenina/Tcf-4 observada en les cèl·lules transfectades amb APC N1026S estava associada amb canvis en els nivells totals de β -catenina cel·lular i/o en la seva distribució subcel·lular.

En línia amb observacions prèvies (Faux et al., 2004; Morin et al., 1996), no es van observar diferències en la quantitat total de β -catenina cel·lular després de l'expressió de les diferents construccions de l'APC (Figura 34).

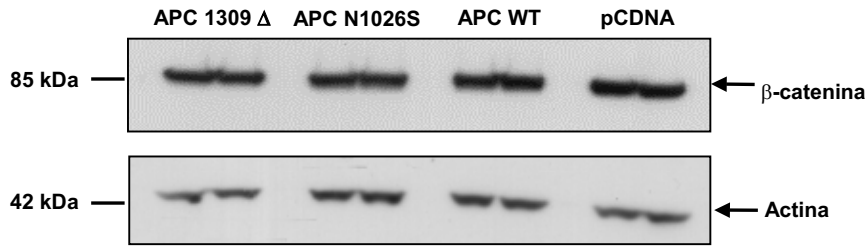


Figura 34. Anàlisi per WB dels nivells totals de β -catenina a les cèl·lules SW480 transfectades. Es va fer l'anàlisi mitjançant WB amb un anticòs monoclonal específic anti- β -catenina. L'actina total va servir de control de càrrega.

La tinció de β -catenina per immunocitoquímica, tant citoplasmàtica com nuclear, de les cèl·lules parentals, era molt intensa en la majoria de cèl·lules i això ens va impedir dur a terme comparacions significatives entre els diferents transfectants.

3.2.7 Estudi dels nivells de proteïna *c-myc* a les cèl·lules SW480 transfectades

Després d'observar que la variant N1026S activava moderadament la transcripció del gen *c-myc*, es va analitzar per WB l'expressió de la proteïna *c-myc* a les cèl·lules transfectades, amb l'objectiu d'avaluar si l'augment observat en la transcripció del gen *c-myc* també l'observàvem a nivell d'expressió proteica (Figura 35).

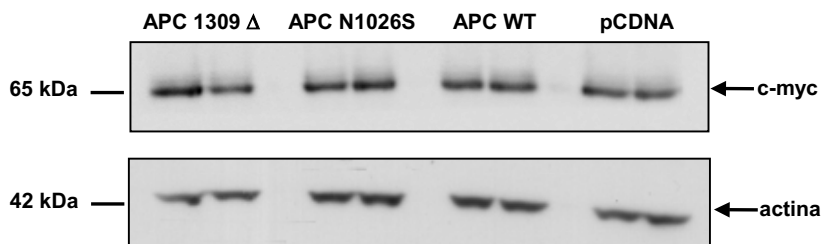


Figura 35. Anàlisi per WB dels nivells totals de *c-myc* a les cèl·lules SW480 transfectades. Es van analitzar per WB els nivells totals de *c-myc* amb un anticòs monoclonal anti-*c-myc* específic. L'actina total va servir de control de càrrega.

Com es mostra a la Figura 35, no s'observen diferències en l'expressió de la proteïna *c-myc* entre les cèl·lules transfectades amb les diferents construccions d'*APC*, potser degut a que no tenim suficient sensibilitat per observar les diferències a nivell proteic a les 24 h de la transfecció.

3.2.8 Detecció de β -catenina en teixits per immunohistoquímica

Amb l'objectiu d'avaluar els nivells cel·lulars i la distribució subcel·lular de la β -catenina a la mucosa normal del pacient portador de la variant N1026S, es van dur a terme tincions de β -catenina en mucoses normals (N), adenomes (AD) i/o carcinomes (C) de diferents pacients: un individu portador de la variant (N i AD), un individu no portador de la variant i portador d'una mutació clarament patogènica en el gen *APC* (N i AD), i un individu amb CCR esporàdic no portador de cap alteració germinal en el gen *APC* (N i C).

La β -catenina s'expressava tant a membrana com a citoplasma en les mucoses normals dels tres individus. No es van observar diferències significatives dels nivells de β -catenina a les cèl·lules de l'individu portador vs les dels individus no portadors de la variant. En els adenomes, la β -catenina es localitza en el citoplasma i en la membrana i no s'observa expressió nuclear. En el cas de l'individu portador de la variant hem observat una disminució considerable de l'expressió a membrana, a diferència del teixit normal. Aquesta disminució de β -catenina a la membrana no l'hem observat en l'adenoma de l'individu portador d'una mutació patogènica en el gen *APC*. En el carcinoma esporàdic, la β -catenina s'expressa tant a nucli com a citoplasma.

4. VARIANT *APC* L1129S

Hem identificat la variant *APC* L1129S (c.3386T>C) a la línia germinal d'una família de FAP portadora d'una mutació patogènica en el gen *APC* i d'una família d'AFAP portadora d'una mutació bial·lèlica en el gen *MYH*. La variant L1129S origina un canvi de leucina a serina i es localitza a l'exó 15 del gen *APC*, a la zona de repeticions de 15 AA d'unió a β -catenina, entre la primera i la segona repetició (Figura 36). Aquesta variant ja havia estat descrita anteriorment en dos estudis. En un dels estudis es va identificar la variant en 3/92 (3,3%) controls, 1/92 (1,1%) casos de CCR esporàdic i 1/91 (1,1%) casos de CCR hereditari (Zhou et al., 2004), i a l'altre es va identificar en dos pacients de FAP no relacionats (Scott et al., 2004).

1021	L DTPINYS L KYS D E Q LNSGRQSPSQNERWARPKHII EDEIKQSEQRQSRNQSTTYP
1077	VYTESTDDKHLKFQPHFGQQECVSPYRSRGANGSETNRVGSNHGINQNVSQS L CQE
1133	DDYE DD KPTNYSERYSEEEQH E EERPTNYSIKYNEEK R H V DQPIDYSLKYAT D I

Figura 36. Seqüència d'aminoàcids corresponent a la regió de les quatre repeticions de 15 AA de la proteïna *APC* d'unió a β -catenina. Aquesta regió, altament conservada, comprèn els AA 1021-1187. Les quatre repeticions de 15 AA es mostren subratllades en groc. El residu Leu del codó 1129, localitzat entre la primera i segona repetició de 15 AA, es mostra en negreta.

L'alineament múltiple en diferents espècies de la seqüència on es localitza el residu 1129 amb el programa ClustalW (www.ebi.ac.uk) ens indica que aquest residu es troba altament conservat en mamífers i en peixos, però que no s'ha conservat al llarg de l'evolució en amfibis o invertebrats (Figura 37).

<i>Homo sapiens</i>	1122	NQNVSQSLCQEDDYE
<i>Macaca mulatta</i>	1122	NQNVSQSLCQEDDYE
<i>Bos taurus</i>	1122	SQNVNQSLCQEDDYE
<i>Rattus norvegicus</i>	1122	NQNVNQSLCQEDDYE
<i>Mus musculus</i>	1122	NQNVNQSLCQEDDYE
<i>Monodelphis domestica</i>	1122	NQKVNQSLCHEDDYD
<i>Xenopus tropicalis</i>	1122	NSKASKPHCQVDDYD
<i>Takifugu rubripes</i>	1122	DDEEDGRLRRR-NDG
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	1122	DDEEDGRLRRRRNDG
<i>Drosophila melanogaster</i>	1122	DESGKANQAIVGTDA
		...

Figura 37. Alineament múltiple en diferents espècies de la regió compresa entre els AA 1122 i 1136 de la proteïna APC. El residu 1129 està ressaltat amb un requadre. El símbol "." indica que hi ha substitucions semi-conservades.

Amb l'objectiu d'avaluar la patogenicitat de la variant L1129S, es va seguir una estratègia semblant a la utilitzada amb la variant N1026S.

4.1 Estudis moleculars

4.1.1 Identificació de la variant L1129S a les famílies de poliposi

En primer lloc, la variant L1129S es va identificar a l'individu índex d'una família de FAP, diagnosticat de poliposi als 19 anys. Es va seqüenciar tota la regió codificant del gen *APC* en aquest individu i es va identificar una mutació patogènica (p.Ser1101X) molt propera a la variant L1129S, que originava una proteïna truncada. Es va observar que en els quatre membres afectes de poliposi estudiats, les dues alteracions cosegregaven amb la malaltia. No es van detectar alteracions en el gen *MYH* en l'individu índex.

També es va identificar la variant L1129S, juntament amb la variant G382D del gen *MYH* en homozigosi, a l'individu índex d'una altra família, en aquest cas d'AFAP, diagnosticat als 50 anys. No es va identificar cap altra alteració en el gen *APC*. A la

família no hi havia cap altre cas de poliposi. La variant L1129S es va identificar també en dos germans del cas índex heterozigots per la variant *MYH* G382D, que eren asimptomàtics tot i que, per l'edat, encara podien desenvolupar la poliposi atenuada. Un altre germà de l'individu índex, homozigot per la variant G382D del gen *MYH*, va ser diagnosticat de CCR als 51 anys, no tenia cap adenoma i no era portador de la variant L1129S. El fet que dels dos germans portadors de la variant G382D en homozigosi, només hagués desenvolupat adenomes el portador de la variant L1129S, ens feia pensar que la variant L1129S podria exercir un efecte modificador del fenotip de la malaltia a la família.

4.1.2 Estudi poblacional

La variant no es va identificar en cap dels individus controls estudiats (0/200) i sí en 2/232 casos de CCR esporàdic. Tampoc es va detectar en cap (0/181) dels altres casos de CCR hereditari analitzats (Figura 38, Taula 9).

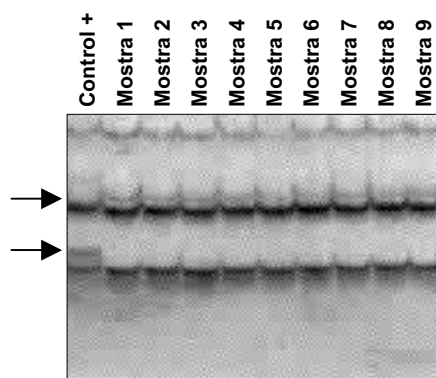


Figura 38. Detecció de la variant L1129S per SSCP. Electroforesi en un gel d'acrilamida al 8% no desnaturalitzant on s'analitza la presència de la variant L1129S en diferents mostres. A cada gel sempre s'hi carrega, com a control positiu, una mostra amb la variant L1129S, que mostra un patró electroforètic diferent al de les mostres negatives, assenyalat a la figura amb fletxes.

4.2 Estudis funcionals

La identificació de la variant L1129S a dues famílies de poliposi i a dos casos de CCR esporàdic, l'absència de la variant a la nostra població control estudiada, la localització de la variant dins la proteïna, la naturalesa de la substitució de l'AA i la conservació del codó al llarg de l'evolució en mamífers i peixos no eren encara observacions suficients per confirmar la seva patogènesi, raó per la qual es van realitzar assajos funcionals.

4.2.1 Interacció de β -catenina amb els fragments APC-4x15-WT i Ser1129

Amb l'objectiu d'avaluar si la variant L1129S alterava la unió de la β -catenina amb la proteïna APC 4x15, que conté les 4 repeticions de 15 AA que uneixen la β -catenina, es van dur a terme assajos d'interacció proteïna-proteïna per cromatografia d'afinitat i per BIAcore amb les proteïnes de fusió GST-APC-4x15-WT i Ser1129, que contenen les 4 repeticions de 15 AA d'unió a β -catenina (AA 1014-1197) (Figura 39).

1014	MDDNDGE	LDTPINYS	SLKYSDEQ	LN	SGRQSPSQNERWARPKHII	EDE
1060	IKQSEQRQSRNQSTTYPVYTESTDDKHLKFQPHFGQQECVSPYRSR					
1106	GANGSETNRVGSNHGINQNV	SQSL	CQEDDYE	DDKPTNYSERYSEEE		
1152	QHEE	EERPTNYSIKYNEEK	RHVDQ	PIDYSLKYATDI	PSSQKQSF	FSF

Figura 39. Seqüència d'aminoàcids corresponent al fragment APC 4x15. Aquest fragment comprèn les quatre repeticions de 15 AA de la proteïna APC d'unió a β -catenina. Les quatre repeticions de 15 AA es mostren subratllades en groc. El residu Leu del codó 1129, localitzat entre la primera i la segona repetició de 15 AA, es mostra en negreta.

4.2.1.1 Experiments de cromatografia d'afinitat

Es van unir covalentment 2,4 mg de les proteïnes de fusió GST-APC-4x15-WT, GST-APC-4x15-Ser1129 i GST sola a tres columnes d'afinitat, respectivament, i es va realitzar l'experiment en les mateixes condicions que les descrites a l'apartat 3.2.2.1. En el WB realitzat per detectar la β -catenina unida i no unida, no s'observen diferències en la interacció de la β -catenina amb la proteïna APC-4x15-Ser1129, si ho comparem amb la interacció de la β -catenina amb la proteïna APC-4x15-WT. No es va observar β -catenina en els eluïts de la columna amb GST, indicant que la unió de la β -catenina amb els fragments d'APC és específica (imatges no mostrades).

4.2.1.2 Experiments amb BIAcore

Es va decidir avaluar igualment aquestes interaccions amb la tècnica BIAcore, una tècnica més precisa basada en el principi de ressonància del plasmó de superfície. Tal i com s'observa a la Figura 40, tampoc es van observar diferències en la unió amb la β -catenina entre les proteïnes APC-4x15-WT i APC-4x15-Ser1129 amb el BIAcore. Aquests resultats indiquen que la variant L1129S no afecta la interacció del fragment APC 4x15 amb la β -catenina.

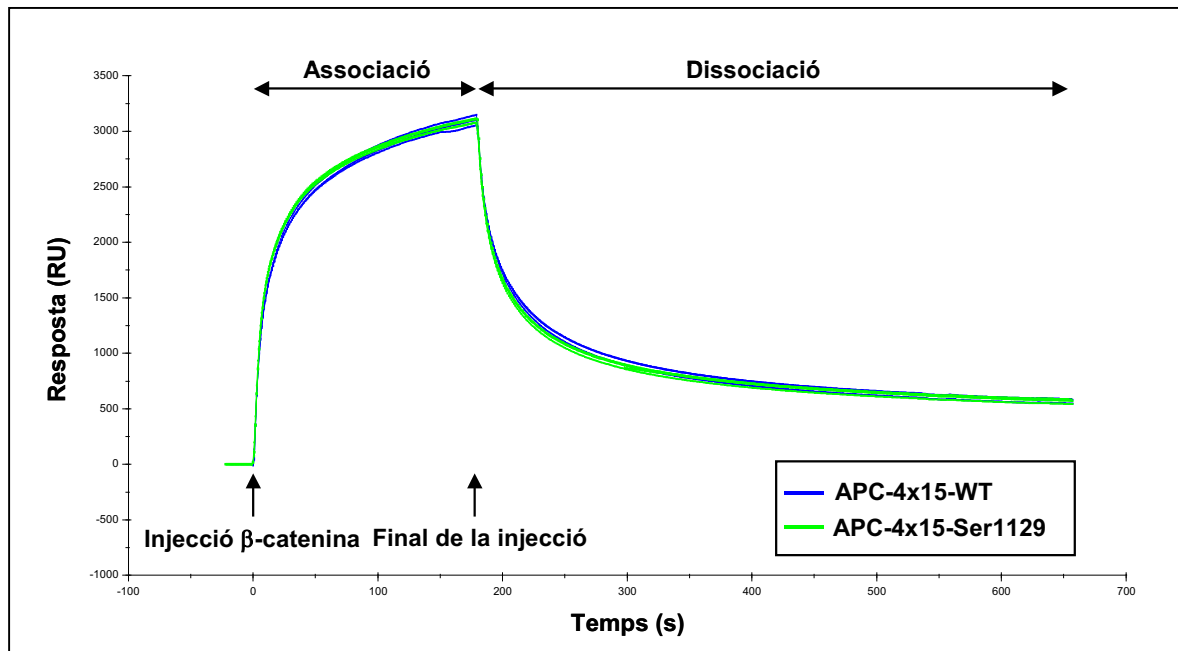


Figura 40. Sensograma mostrant les corbes d'associació i dissociació de la β -catenina amb les proteïnes de fusió APC-4x15-WT i APC-4x15-Ser1129. Es va injectar β -catenina a una concentració de 2 μ M sobre la superfície del xip on es trobaven immobilitzades les proteïnes APC-4x15-WT i APC-4x15-Ser1129. La resposta, en RUs, es va mesurar en funció del temps. Els experiments es van realitzar per triplicat.

4.2.2 Detecció de β -catenina en teixits per immunohistoquímica

Amb l'objectiu d'avaluar els nivells cel·lulars de la β -catenina i la seva distribució subcel·lular en la mucosa normal de pacients portadors de la variant L1129S, es van dur a terme tincions de β -catenina en mucoses normals (N), adenomes (AD) i/o carcinomes (C) de diferents pacients: dos individus de CCR esporàdic portadors de la variant (N+C), un individu no portador de la variant i portador d'una mutació clarament patogènica en el gen *APC* (N+AD), i un individu amb CCR esporàdic no portador de cap alteració germinal en el gen *APC* (N+C). De la mateixa manera que succeïa amb la variant N1026S, la β -catenina s'expressava tant a membrana com a citoplasma en les mucoses normals dels quatre individus i no es va observar un augment significatiu dels nivells de β -catenina a les cèl·lules de la mucosa normal dels individus portadors de la variant L1129S en comparació amb la mucosa normal dels individus no portadors. En els carcinomes esporàdics la β -catenina s'expressa tant a nucli com a citoplasma.

En el període d'execució de la present tesi no hem pogut analitzar l'efecte de la variant L1129S en la proteïna sencera, i per tant, no podem afirmar amb certesa que la variant no tingui cap efecte en la transcripció mitjançada per β -catenina/Tcf-4.

DISCUSSIÓ

L'anàlisi molecular de la regió codificant del gen *APC* que s'ha realitzat en membres afectes de 98 famílies de FAP i 40 d'AFAP, ha permès la identificació d'un total de deu variants *missense* del gen *APC*, la majoria de significat desconegut. Mentre que les mutacions del gen *APC* que originen una proteïna truncada estan inevitablement associades a una pèrdua de funcionalitat de la proteïna APC, degut a que s'eliminen dominis indispensables per la seva funció supressora tumoral, les variants del gen *APC*, que no causen una terminació prematura, són més difícils d'interpretar. L'objectiu del nostre estudi ha estat determinar si algunes de les variants identificades en el gen *APC* en les famílies de poliposi estaven associades a un canvi en la funcionalitat de la proteïna APC i per tant, si podrien incrementar el risc de desenvolupar CCR tant esporàdic com hereditari.

Es van identificar les variants G101E, K957N, L1129S i A2274V en famílies de FAP. Les variants N1026S, L1129S, I1307K, E1317Q i P2681L, susceptibles de tenir un efecte patogènic, es van identificar en famílies d'AFAP. Aquestes variants de significat biològic desconegut representen un 7% (4/62) de les mutacions identificades en les famílies de FAP i un 56% (5/9) de les identificades en famílies AFAP. També es van identificar les variants D1822V i G2502S, que eren polimorfismes presents a la població control. Aquests percentatges són força elevats si els comparem amb els que trobem a la literatura. Fins ara s'ha descrit que la majoria de mutacions germinals en el gen *APC* associades a la poliposi són mutacions *nonsense* (30%) o *frameshift* (68%) que originen una proteïna truncada (Galiatsatos i Foulkes, 2006), i que les variants *missense* representen una minoria de les mutacions identificades en els individus amb FAP i AFAP (Heinimann et al., 2001). L'escassetat en la identificació d'aquestes variants podria haver estat deguda al fet que fins ara s'ha utilitzat, majoritàriament, la tècnica del PTT per a la identificació de mutacions en el gen *APC*, doncs la majoria de mutacions en aquest gen originen una proteïna truncada. De fet, en l'únic estudi publicat fins ara adreçant aquest tema s'ha descrit que el 13% dels portadors de mutacions en *APC* no són identificats si s'analitzen pel mètode del PTT (Heinimann et al., 2001). Avui en dia, aquesta tècnica ja es va substituint per d'altres, com la seqüenciació directa del DNA, que permeten identificar amb una freqüència més elevada aquelles alteracions del gen *APC* que no donen lloc a una proteïna truncada.

Per avaluar la contribució de les variants del gen *APC* en el desenvolupament del CCR generalment es fan servir diversos criteris com la cosegregació de la variant amb la malaltia a la família, l'absència de la variant a la població control descartant que sigui un polimorfisme, la localització de la variant en els diferents dominis funcionals de la proteïna, la naturalesa de la substitució de l'aminoàcid i la conservació del codó al llarg de l'evolució. Però aquests criteris no són suficients per poder predir el

significat biològic de les variants, doncs no demostren amb certesa que la substitució de l'aminoàcid sigui una mutació patogènica, reforçant així la necessitat de realitzar assajos funcionals.

Les variants del gen *APC* que s'han descrit fins ara s'han identificat a la línia germinal de pacients amb fenotips diversos: pacients amb FAP clàssica i atenuada, pacients que desenvolupen CCR a una edat jove o pacients amb múltiples adenomes (Al-Tassan et al., 2002; Frayling et al., 1998; Laken et al., 1997; Lamlum et al., 2000; Miyoshi et al., 1992a; Miyoshi et al., 1992b; Nagase et al., 1992b; Powell et al., 1992; Resta et al., 2001; Rozek et al., 2006; Ruiz-Ponte et al., 2001; Scott et al., 2004; Slattery et al., 2001; Tranah et al., 2005; Wallis et al., 1999; Woodage et al., 1998; Zhou et al., 2004). Però la contribució d'aquestes variants al risc de desenvolupar CCR esporàdic o hereditari és encara motiu de controvèrsia, doncs és difícil poder demostrar l'efecte patogènic d'aquestes variants sense la realització d'assajos funcionals, per tant limitant la utilitat de la seva detecció en el consell genètic (Frayling et al., 1998; Woodage et al., 1998).

La combinació d'anàlisis genètiques, prediccions bioinformàtiques i assajos funcionals ha permès caracteritzar funcionalment variants *missense* en altres gens com *BRCA1* (gen implicat en el càncer de mama) o gens de reparació de bases desaparellades del DNA (MMR) i per tant, ha permès determinar la patogenicitat d'aquestes variants i demostrar amb certesa la seva associació amb el desenvolupament del càncer de mama/ovari familiar o de l'HNPCC. Per determinar el significat funcional de les variants del gen *BRCA1* s'utilitzen les estratègies habitualment emprades descrites anteriorment, juntament amb modelitzacions moleculars de proteïnes i, per a les variants localitzades als dominis BRCT de la regió C-terminal de la proteïna, també es realitzen assajos d'activació transcripcional en llevats i cèl·lules humanes (Lovelock et al., 2006; Phelan et al., 2005). També s'han caracteritzat funcionalment diverses variants dels gens MMR mitjançant assajos en llevats basats en la mesura de l'eficiència reparadora de les diferents proteïnes reparadores mutades, i assajos d'interacció proteïna-proteïna que permeten mesurar el grau d'interacció entre les proteïnes reparadores; aquests assajos s'utilitzen habitualment per caracteritzar funcionalment les variants *missense* dels gens MMR, doncs el mateix experiment serveix per avaluar diferents variants localitzades a qualsevol regió dels gens reparadors (Ollila et al., 2006; Raevaara et al., 2005; Shimodaira et al., 1998; Trojan et al., 2002).

En canvi, fins ara no s'ha realitzat cap anàlisi funcional de les variants del gen *APC*, no s'ha caracteritzat el possible efecte d'aquestes variants en l'expressió i funcionalitat de la proteïna APC, segurament degut a la dificultat de dissenyar i desenvolupar assajos específics segons la localització de la variant en els diferents dominis

funcionals de la proteïna APC. Per una banda, fins ara només s'han cristal·litzat petits dominis de la proteïna APC i encara no ha estat cristal·litzada tota la proteïna sencera, que permetria dur a terme prediccions estructurals bioinformàtiques per determinar els efectes de les variants en l'estructura sencera de la proteïna. Per altra banda, la proteïna APC és una proteïna molt gran i això dificulta en gran mesura la realització de determinats assajos funcionals.

En la major part dels casos descrits fins ara a la literatura, no ha estat possible determinar si el canvi d'aminoàcid dóna lloc a un increment heretat del risc de desenvolupar tumors colorectals o són simplement variants sense cap efecte patogènic que no alteren la funció de la proteïna APC. La dificultat d'avaluar amb fiabilitat el paper funcional d'aquestes variants del gen *APC* és un repte en el diagnòstic i l'assessorament genètic de les famílies de poliposi. Els assajos funcionals que avaluen activitats específiques de les proteïnes o fenotips biològics són, doncs, necessaris per determinar el risc real de desenvolupar adenomes colorectals o CCR associat a cadascuna de les variants.

En el nostre estudi hem analitzat la freqüència de les variants en un estudi prospectiu cas-control de base hospitalària i en una població de càncer hereditari, i hem realitzat anàlisis funcionals per conèixer l'impacte funcional d'algunes de les variants del gen *APC* en el desenvolupament del CCR. En el cas de la variant/polimorfisme més establerta (D1822V), hem avaluat la interacció entre la variant i diversos factors genètics, dietètics i ambientals en relació al risc de desenvolupar CCR.

La variant/polimorfisme **APC D1822V** és una de les variants del gen *APC* que hem caracteritzat amb més detall en el nostre estudi (Menendez et al., 2004). Aquesta variant, que origina un canvi d'aspartat a valina al codó 1822, es va identificar tant en famílies de FAP com en famílies d'AFAP. Inicialment es va suggerir que la variant en homozigosi podria ser la causa de la FAP en un pacient, i es va considerar patogènica en dos pacients amb CCR sense FAP (Wallis et al., 1999). Més tard es va descriure que la variant era un polimorfisme que tenia una freqüència al·lèlica del 10-23% en poblacions control europees i americanes (Ruiz-Ponte et al., 2001; Slattery et al., 2001). Aquesta és la variant del gen *APC* que es detecta amb més freqüència. Per tant, semblava intuïtiu pensar que aquesta variant podria incrementar el risc de desenvolupar CCR, ja fos esporàdic o hereditari. Només un estudi havia avaluat el paper d'aquesta variant en la patogènesi del CCR, mostrant que la variant no tenia cap efecte principal sobre el risc; però sí que hi havia un menor risc de desenvolupar càncer de còlon per aquells individus amb el genotip TT diagnosticats després dels 65 anys o que menjaven una dieta pobra en greixos (Slattery et al., 2001).

Amb l'objectiu d'analitzar la contribució d'aquesta variant, que és la més prevalent del gen *APC*, en el risc de desenvolupar CCR i adenomes a la nostra població així com en casos de CCR hereditari, es va fer ús d'un estudi cas-control dut a terme entre els anys 1996-1998, que tenia com a objectiu identificar la contribució relativa de la susceptibilitat genètica i de l'ambient al desenvolupament del CCR (Cox et al., 2004; Landi et al., 2003). Es va estudiar si l'associació de la variant D1822V amb el CCR era modificada per diversos factors genètics, dietètics i ambientals.

En el nostre estudi no es va observar cap efecte principal entre la variant D1822V i el risc de desenvolupar CCR, tal i com havia estat descrit prèviament en una població més gran que incloïa 1.945 individus control i 1.585 casos de càncer de còlon (Slattery et al., 2001). En aquell estudi, els individus amb el genotip TT mostraven un menor risc de càncer de còlon si eren diagnosticats després dels 65 anys o si menjaven una dieta pobra en greixos. Aquests resultats no es van reproduir en la nostra sèrie. Són diverses les causes que poden explicar aquesta discrepància. En primer lloc, trobem diferències en la població analitzada, doncs l'estudi realitzat per Slattery et al. es va basar exclusivament en casos de càncer de còlon, mentre que en el nostre estudi el grup de casos incloïa tant casos de càncer de còlon com de recte. En segon lloc, com que els individus analitzats provenen de diferents poblacions, podríem trobar variacions geogràfiques en els hàbits dietètics. Finalment, el fet que en el nostre estudi no detectem aquestes interaccions es podria atribuir a l'absència de poder estadístic degut a que nosaltres només observàvem 14 casos de CCR i 16 controls amb el genotip TT. El disseny cas-control i l'ús de controls hospitalaris és improbable que hi hagin influït ja que es coneix que les freqüències al·lèliques no estan significativament alterades en poblacions hospitalàries (Garte et al., 2001). A més, es van intentar minimitzar els biaixos potencials clàssicament associats a aquest tipus d'estudi (p.ex. biaix de memòria) amb un disseny acurat i l'ús de qüestionaris validats.

Després d'analitzar una extensa cohort de 244 casos de CCR hereditari, no ha estat possible mostrar cap tipus d'interacció entre la història familiar de CCR i la variant. Es va observar clarament que l'al·lel T no estava present amb més freqüència en les sèries de CCR hereditari que en els controls. Aquesta situació és paral·lela a la de la variant E1317Q, on només s'observa una modesta associació amb la història familiar de CCR (Lamlum et al., 2000). Amb les nostres observacions es pot concloure que l'al·lel T no dona lloc a cap efecte significatiu en l'agregació familiar de CCR.

D'una banda, a la nostra població, l'al·lel T incrementa molt més el risc de desenvolupar CCR en els individus amb una història personal d'adenomes simptomàtics que l'al·lel A. Això podria indicar que la variant atorga als adenomes un risc incrementat de malignitat. D'altra banda, es va observar també que la variant

D1822V no tenia cap efecte en la iniciació del procés de transformació de l'epiteli normal a adenoma. Mentre que el risc de malignització de l'adenoma, atribuïble a l'al·lel T, és modest, l'impacte en el total de casos de càncer podria ser significatiu degut a l'elevada freqüència de l'al·lel variant. No obstant, aquesta observació hauria de ser interpretada amb cautela i els resultats haurien de ser confirmats en sèries més llargues degut al baix nombre de casos inclosos en el nostre estudi.

El significat funcional de la variant encara no es coneix. La variant D1822V origina un canvi d'aspartat (aminoàcid hidrofílic, de cadena lateral amida) a valina (aminoàcid hidrofòbic, de cadena lateral alifàtica) al codó 1822, entre la quarta i la cinquena repetició de 20 AA en el domini de regulació de la β -catenina. Podria ser que aquesta substitució aminoacídica afectés d'alguna manera els nivells del complex de transcripció β -catenina/Tcf-4 que regula l'expressió d'una varietat de gens rellevants per la carcinogènesi com p.ex. *c-myc*, *ciclina D1*, *MMP-7* i *COX-2*, entre d'altres. El nostre primer intent d'identificar un impacte funcional de la variant, la cerca d'una possible pèrdua preferencial d'un dels dos al·lells en els teixits tumorals dels casos de CCR esporàdic heterozigots per la variant, no ha donat resultats positius. Tot i així, no podem descartar la possibilitat que hi hagin pèrdues d'altres regions del gen. Així doncs, es necessiten estudis addicionals per esbrinar de quina manera aquesta substitució podria afectar les funcions reguladores de l'APC i quins són els mecanismes moleculars involucrats en la seva funció. La manca d'associacions clares va fer que no donéssim prioritat a l'estudi del seu impacte funcional.

En resum, hem mostrat que la variant D1822V del gen *APC* no s'associa amb la història familiar de CCR i que podria incrementar el risc de transformació de l'adenoma. Només un estudi havia avaluat prèviament el paper d'aquesta variant en la patogènesi del CCR, amb resultats no concordants. Per tant, es necessiten més estudis en sèries més grans per confirmar aquestes observacions.

La variant que hem caracteritzat funcionalment i amb més detall ha estat la variant **APC N1026S**, de significat desconegut, identificada per primera vegada a la línia germinal d'una família d'AFAP. La variant cosegregava amb la malaltia i no es va identificar en cap dels controls ni dels casos de CCR esporàdic o hereditari estudiats. A més, la variant es troba localitzada en un residu altament conservat del gen *APC*: a la primera repetició de 15 AA en el domini d'unió a β -catenina, a la regió central de la proteïna APC. S'ha descrit que aquesta regió és suficient per la seva activitat supressora tumoral (Shih et al., 2000). Això suggeria que aquesta variant podria tenir un efecte patogènic en la gènesi del fenotip observat. Com que aquesta informació no era prou concloent com per poder ser utilitzada en el consell genètic a la família

portadora de la variant, es van desenvolupar diversos assajos funcionals per poder determinar el seu significat biològic.

La proteïna APC juga un paper fonamental en la via de transducció de senyals Wnt, doncs uneix la β -catenina i regula la seva degradació (Munemitsu et al., 1995). D'una banda, en absència de la senyal extracel·lular de Wnt, la β -catenina lliure citoplasmàtica s'uneix al complex proteic de destrucció format per axina, conductina, GSK3 β i APC (Behrens et al., 1998). En aquest complex, la β -catenina és fosforilada per GSK3 β , i una vegada fosforilada, és degradada pel sistema ubiquitina-proteasoma (Aberle et al., 1997). D'aquesta manera la β -catenina no s'acumula al citoplasma i no es dirigeix a nucli, on juntament amb els factors Lef/Tcf activaria la transcripció de gens que promourien la carcinogènesi. D'altra banda, també s'ha descrit que APC accelera l'exportació nuclear de la β -catenina cap al citoplasma per la seva posterior degradació o incorporació a les unions adherents, disminuint així la concentració de β -catenina lliure al nucli i la seva activitat transcripcional (Rosin-Arbesfeld et al., 2003). Així, en primer lloc es va avaluar l'efecte de la variant N1026S en la interacció entre la proteïna APC i la β -catenina. Es van sintetitzar els pèptids WT (Asn1026) i mutat (Ser1026), que inclouen la primera repetició de 15 AA d'unió a β -catenina de l'APC i dels què disposàvem de l'estructura cristal·litzada. També es van sintetitzar les proteïnes de fusió APC-4x15-WT i APC-4x15-Ser1026, que contenen les quatre repeticions de 15 AA d'unió a β -catenina. En les dues situacions, la variant N1026S alterava de forma clara la unió d'APC amb la β -catenina. Mentre que en els experiments de cromatografia d'afinitat la variant N1026S impedia completament la unió de la β -catenina a la primera repetició de 15 AA de l'APC, en els assajos amb el BIAcore es va observar una disminució parcial de la unió de la β -catenina a la proteïna APC-4x15-Ser1026. Aquests resultats ens indiquen que la presència de les altres tres repeticions de 15 AA d'unió a β -catenina contribueixen en la interacció del fragment APC-4x15-Ser1026 amb la β -catenina, disminuïda parcialment per l'efecte de la variant. Els resultats observats amb els constructes APC 4x15 segurament reflecteixen millor la situació que podríem trobar en el context de la proteïna sencera.

Els resultats obtinguts dels assajos d'interacció amb la β -catenina estaven en concordança amb l'anàlisi estructural *in silico* del complex format pel pèptid APC Ser1026 en unió amb la β -catenina. Des d'un punt de vista estructural, el pèptid Ser1026 no pot establir contactes estables amb la β -catenina com els que s'estableixen amb el pèptid WT. El canvi d'Asn1026 a Ser impedeix la formació d'un pont d'hidrogen amb l'Asp390 de la β -catenina i elimina els contactes terciaris entre els residus Asn1026 i Ser1028 de l'APC, donant lloc a un increment de la flexibilitat

interna del pèptid que hauria de canviar de forma clara l'estructura tridimensional de la proteïna APC.

Les observacions obtingudes *in silico* i *in vitro* amb els pèptids o proteïnes de fusió mutades es van confirmar amb assajos de l'activitat transcripcional en cèl·lules SW480. Es van utilitzar aquestes cèl·lules perquè tenen la proteïna APC endògena truncada al codó 1338 i per tant, la transcripció mitjançada pel complex β -catenina/Tcf-4 constitutivament activada. A més, s'havia descrit anteriorment que l'activitat transcripcional mitjançada per β -catenina/Tcf-4 es podia revertir en aquestes cèl·lules induint l'expressió de la proteïna APC WT (Korinek et al., 1997; Morin et al., 1997; Munemitsu et al., 1995). En els nostres experiments, l'expressió de la proteïna APC N1026S es va associar amb una major activació transcripcional (increment d'1,45 vegades) i un augment dels nivells de transcripció del gen *c-myc* (increment d'1,2 vegades) quan es comparava amb la proteïna APC WT. Com era d'esperar, la magnitud d'aquests canvis era inferior als induïts per l'expressió de la proteïna APC 1309 Δ , una mutació truncant normalment associada a les poliposis més severes (Caspari et al., 1994). En conjunt, els nostres resultats suggereixen fermament que la proteïna APC N1026S sencera impedeix parcialment la unió amb β -catenina, activant així la transcripció de gens regulats pel complex β -catenina/Tcf-4, que promouran la carcinogènesi.

El mecanisme que hi ha al darrere de l'activació de la β -catenina que hem observat roman sense aclarir. S'ha descrit que la proteïna APC regula l'activitat de la β -catenina facilitant la seva degradació citoplasmàtica per una banda (Munemitsu et al., 1995) o promovent la seva translocació fora del nucli per l'altra (Rosin-Arbesfeld et al., 2003), dues vies de modulació diferents però no excloents. No es van detectar diferències en els nivells totals de β -catenina cel·lular després de l'expressió de les diferents formes d'APC, a diferència d'observacions prèvies (Munemitsu et al., 1995), on observaven que l'expressió de la proteïna APC WT causava una reducció dels nivells de β -catenina totals a les cèl·lules SW480. Però, per altra banda, hi ha altres treballs on tampoc han observat una disminució significativa dels nivells de β -catenina total després d'expressar establement APC WT a les cèl·lules SW480 o a les HT-29, les dues amb la proteïna APC endògena mutada (Faux et al., 2004; Morin et al., 1996). Enlloc d'això, observaven que l'expressió estable d'APC WT originava la translocació de la β -catenina del nucli i del citoplasma cap a la membrana plasmàtica (Faux et al., 2004). Malauradament, en el nostre estudi d'immunocitoquímica no es van detectar diferències en la distribució subcel·lular de la β -catenina entre els diferents transfectants. Però la consistència dels experiments d'interacció amb β -catenina juntament amb els resultats obtinguts dels assajos de l'activitat transcripcional i d'expressió de *c-myc* suggereixen que segurament la sensibilitat limitada de la tècnica

d'immunocitoquímica ens impedeix detectar els canvis moderats en la localització subcel·lular de la β -catenina. Així doncs, mentre la variant segurament també afecta la funció de la proteïna APC d'exportar la β -catenina nuclear, no hem estat capaços de demostrar-ho. Caldria realitzar el fraccionament subcel·lular de les cèl·lules transfectades per poder determinar les diferències en la diferent localització de la β -catenina entre nucli i citoplasma atribuïbles a l'expressió dels diferents transfectants. Tampoc no es van detectar diferències en l'expressió de la β -catenina en la immunohistoquímica realitzada a l'epiteli normal d'un individu portador de la variant N1026S, en comparació amb l'epiteli normal d'un individu no portador de cap alteració germinal en el gen *APC*. En tots els casos, la β -catenina s'expressava tant a membrana com a citoplasma. Segurament l'efecte moderat de la variant N1026S no es tradueix en un augment de la β -catenina quantificable per immunohistoquímica.

En resum, la interacció parcial que hem observat de la proteïna APC N1026S amb la β -catenina segurament resulta en una disminució de la capacitat de la proteïna APC N1026S tant de regular la degradació de la β -catenina al citoplasma com d'exportar-la del nucli i del citoplasma cap a la membrana plasmàtica. Això donaria lloc a un increment modest de la β -catenina nuclear, que, tal i com hem comprovat, activa moderadament la transcripció de gens involucrats en la carcinogènesi. L'activació moderada de la transcripció mitjançada pel complex β -catenina/Tcf-4 concorda amb el fenotip atenuat que s'observa a la família.

Atès que els nostres resultats indiquen que la variant *APC* N1026S té un efecte clarament patogènic en el fenotip d'AFAP, la variant hauria de ser analitzada en tots els individus de la família en situació de risc per a que se'ls pugui recomanar adherir-se a un programa de cribratge (Winawer et al., 2003).

Les estratègies utilitzades en aquest estudi per caracteritzar la patogènesi de la variant N1026S del gen *APC*, que permeten avaluar l'efecte de la variant tant en la interacció d'APC amb β -catenina com a nivell de l'activitat transcripcional, podrien aplicar-se per avaluar el significat funcional d'altres variants localitzades a les regions d'unió i/o regulació de la β -catenina, com les variants I1307K, E1317Q o D1822V, associades a tumors colorectals hereditaris o esporàdics (Frayling et al., 1998; Slattery et al., 2001; Woodage et al., 1998). Mentre que per les variants localitzades fora de la primera repetició de 15 AA els experiments de cromatografia d'afinitat s'haurien d'adaptar, totes les variants localitzades a la regió que comprèn el constructe APC 4x15 poden ser avaluades amb el nostre disseny experimental utilitzant el BIAcore. Els estudis de transfecció que hem dut a terme podrien ser de gran utilitat per aquelles variants del gen *APC* que podrien afectar el programa transcripcional de la β -catenina. Finalment, la caracterització funcional de les variants

localitzades en els dominis d'homodimerització o d'unió a microtúbuls necessitaran estratègies alternatives.

Com a exemple de l'aplicabilitat dels mètodes descrits en el nostre estudi, aquests podrien ser d'utilitat per a la caracterització de la variant S1028R, recentment identificada en una família d'AFAP referida a la Unitat de Consell Genètic de l'Institut Català d'Oncologia. De moment no disposem de cap més informació clínica d'aquesta família i per tant, no s'han pogut dur a terme estudis de cosegregació. La variant S1028R es localitza al codó 1028 del gen *APC*, altament conservat al llarg de l'evolució, i origina un canvi de serina a arginina en el domini d'unió a β -catenina, concretament a la primera repetició de 15 AA. Hem mostrat que la cadena lateral de l'Asn1026 de la proteïna APC forma un pont d'hidrogen amb la Ser1028, i sembla probable que el canvi d'aminoàcid al codó 1028 tingui un efecte funcional similar a l'observat amb la variant N1026S. S'hauria d'estudiar la presència de la variant a la resta d'individus de la família, a les diferents poblacions d'individus control i de CCR, i realitzar tant els assajos d'interacció amb β -catenina com els assajos de l'activitat transcripcional mitjançada per β -catenina/Tcf-4 per poder determinar el seu significat biològic i així poder oferir l'assessorament genètic a la família.

Una vegada finalitzada la caracterització molecular de la variant N1026S es va fer un intent per caracteritzar funcionalment la variant **APC L1129S**, que originava un canvi de leucina a serina a la regió d'unió a β -catenina i s'havia identificat a la línia germinal d'una família de FAP portadora d'una mutació patogènica en el gen *APC* i d'una família d'AFAP portadora d'una mutació bial·lèlica en el gen *MYH*. Aquesta variant ja havia estat descrita anteriorment en dos pacients de FAP no relacionats (Scott et al., 2004). En el nostre estudi, a la família de FAP la variant L1129S estava en desequilibri de lligament amb la mutació p.Ser1101X, clarament patogènica, i les dues alteracions cosegregaven amb la malaltia, de manera que no es podia avaluar si la variant L1129S exercia algun efecte en aquesta família. En canvi, a la família d'AFAP, la variant L1129S podria tenir un efecte modificador del fenotip, doncs dels dos germans portadors de la variant G382D del gen *MYH* en homozigosi, només el portador de la variant L1129S havia desenvolupat adenomes, mentre que l'altre germà no havia tingut cap adenoma i havia desenvolupat un CCR.

La presència de la variant L1129S també en dos casos de CCR esporàdic, l'absència de la variant en els 200 individus controls estudiats, i la seva localització entre la primera i segona repetició de 15 AA, a la zona d'unió a β -catenina, eren altres indicadors del possible efecte que la variant L1129S podria tenir en el desenvolupament de la poliposi. Tot i així, les evidències no eren consistents ja que

en estudis previs aquesta variant s'havia identificat en un 3,3% (3/92) d'individus control, un 1,1% (1/92) de casos de CCR esporàdic i un 1,1% (1/91) de casos de CCR hereditari (Zhou et al., 2004). Atès que aquestes observacions eren insuficients per confirmar la seva patogènesi, s'havien de realitzar assajos funcionals per avaluar la seva contribució a la poliposi i poder ser d'utilitat en l'assessorament genètic a la família.

Atès que la variant *APC* L1129S es troba localitzada a la regió d'interacció amb β -catenina i que ja teníem posats a punt els assajos funcionals per aquesta regió, es van avaluar les diferències que hi havia en la unió amb la β -catenina entre les proteïnes de fusió *APC*-4x15-WT i *APC*-4x15-Ser1129, que contenen les 4 repeticions de 15 AA d'unió a β -catenina. Els resultats del BIAcore, que detecten les diferències en les interaccions proteïna-proteïna amb una acurada precisió, mostraven que no hi havia diferències entre les proteïnes *APC*-4x15 WT i Ser1129 en la unió amb la β -catenina. Tampoc es van detectar diferències en l'expressió de la β -catenina en la tinció immunohistoquímica realitzada a l'epiteli normal dels dos casos de CCR esporàdic portadors de la variant L1129S, en comparació amb l'epiteli normal d'un individu no portador de cap alteració germinal en el gen *APC*. No hem pogut analitzar l'efecte funcional de la variant L1129S en la proteïna sencera, i per tant, no podem afirmar amb certesa que la variant no tingui cap efecte en la transcripció mitjançada per β -catenina/Tcf-4, però els resultats preliminars obtinguts indiquen que probablement no sigui una variant amb efecte patogènic.

En el nostre estudi es va identificar, en una família d'AFAP, la variant **I1307K**, una de les variants del gen *APC* que s'ha descrit amb més detall a la literatura (Frayling et al., 1998; Laken et al., 1997; Woodage et al., 1998). Aquesta variant, que origina un canvi d'isoleucina a lisina, és una variant *missense* amb penetrància incompleta, identificada en un 6% de controls Ashkenazi, que confereix un increment significatiu del risc de desenvolupar múltiples adenomes i tumors colorectals. Es troba localitzada al domini d'unió i regulació de la β -catenina, molt a prop d'una de les mutacions més freqüentment descrites, la mutació al codó 1309, associada amb un fenotip molt sever de la malaltia. Sembla, doncs, que aquesta variant podria ser la causant del fenotip de poliposi atenuada a la família on s'ha identificat, o bé exercir una funció modificadora del fenotip, però s'haurien de dur a terme assajos funcionals per avaluar amb certesa el seu impacte funcional.

En una altra família d'AFAP es va identificar la variant **E1317Q**, també freqüentment descrita, que origina un canvi de glutamat a glutamina al domini d'unió i regulació de la β -catenina. S'ha suggerit que aquesta alteració contribueix a una predisposició a

desenvolupar adenomes colorectals, i menys a carcinomes, tant en la població Ashkenazi com en la població no-jueva amb una penetrància baixa i variable (Frayling et al., 1998; Lamlum et al., 2000). Però recentment també s'ha descrit que aquesta variant no sembla estar associada a un increment del risc de desenvolupar CCR en una població del nord d'Israel (Rozek et al., 2006). Per tant, per conèixer si aquesta variant predispesa al desenvolupament d'adenomes a la família d'AFAP on s'ha identificat, s'hauria d'estudiar la variant amb més profunditat i realitzar diferents anàlisis que incloguin assajos funcionals.

La variant **APC G101E**, identificada per primera vegada a la línia germinal d'una família de FAP, no cosegregava amb la malaltia a la família estudiada. No es va identificar la variant en cap dels casos de CCR esporàdic i hereditari o controls analitzats. En aquesta família es va identificar també una mutació clarament patogènica que cosegregava amb la malaltia, de manera que sembla que la variant G101E no és la responsable de la FAP en aquesta família i que no tindria cap efecte modificador del fenotip de poliposi.

El potencial patogènic de la variant **APC A2274V**, identificada a la línia germinal d'una pacient amb FAP, essent l'única alteració identificada en el gen *APC*, no s'ha determinat. Sembla que la variant A2274V no sigui la responsable de la FAP en aquesta família, i tampoc tenim evidències que tingui una funció modificadora del fenotip de la malaltia. Per altra banda, la variant es va identificar a la nostra població en 1 dels 201 controls analitzats (0,5%). L'únic estudi molecular realitzat fins ara, dut a terme en 39 individus control de poblacions americanes i africanes, mostra que la variant A2274V es troba en heterozigosi amb una freqüència genotípica del 2,6% (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), tot i que aquest no és un resultat concloent degut al baix nombre d'individus estudiats. Així doncs, tot i que sembla que aquesta variant es podria considerar un polimorfisme sense cap impacte funcional, l'hem de considerar, de moment, com una variant de significat biològic desconegut. Caldria analitzar més individus control, analitzar també més membres de la família i dissenyar nous experiments, adaptats al domini de la proteïna APC en el què es troba –el domini bàsic d'unió a microtúbuls–, per poder avaluar la funcionalitat de la variant i poder conèixer el seu significat biològic.

La variant **APC G2502S** ja havia estat descrita anteriorment com un polimorfisme que no estava associat a un augment del risc de desenvolupar CCR o adenomes colorectals (Miyoshi et al., 1992b; Nagase et al., 1992b; Tranah et al., 2005; Zhou et

al., 2004). Segons les dades recollides de 298 individus de diferents poblacions (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>), aquesta variant es troba en heterozigosi amb una freqüència genotípica de mitjana del 3,4%. Al nostre laboratori es va identificar aquesta variant a la línia germinal d'una família d'AFAP i es va avaluar la freqüència d'aquest polimorfisme a la nostra població. Es va identificar la variant en un 1,38% d'individus control (2/145), en un 1,12% de famílies de FAP (1/89) i en un 2,76% d'individus amb CCR esporàdic (4/145). Així doncs, els resultats obtinguts confirmen que la variant es pot considerar un polimorfisme sense cap implicació clínica.

Finalment, no s'ha determinat el significat biològic de la variant **APC P2681L**, identificada per primera vegada a la línia germinal d'una família d'AFAP. Era la única alteració identificada en el gen *APC* en aquesta família i, en aquest cas, no es va identificar en cap dels controls ni dels casos de CCR esporàdic i hereditari analitzats. A la família hi havia un germà de l'individu índex amb poliposi de diagnòstic tardà, però no teníem mostra d'aquest individu, de manera que no es van poder realitzar estudis de cosegregació. Amb les dades de què disposem no podem concloure quin és el potencial patogènic d'aquesta variant; s'haurien de dur a terme assajos funcionals per avaluar si la variant modifica la unió d'APC amb la proteïna EB1, alterant la integritat del fus mitòtic i la correcta segregació dels cromosomes.

Així doncs, en la nostra experiència, mentre que les variants *missense* del gen *APC* són poc freqüents en el fenotip clàssic de la FAP, aquestes es troben amb elevada freqüència en els casos d'AFAP, doncs representen un 56% de les mutacions identificades en el gen *APC* en la nostra sèrie de pacients de poliposi atenuada.

En els estudis publicats fins ara on s'han analitzat les correlacions genotip-fenotip en la poliposi, s'ha descrit que la majoria dels pacients amb un fenotip de poliposi atenuada presenten mutacions germinals truncants en unes regions concretes del gen *APC*: a l'extrem 5', a la regió d'*splicing* alternatiu de l'exó 9 i a l'extrem 3' (Nieuwenhuis i Vasen, 2007; Soravia et al., 1998; Spirio et al., 1993). S'han formulat diferents hipòtesis per explicar aquesta correlació. Així, les mutacions a l'extrem 5' podrien donar lloc, d'una banda, a proteïnes truncades que formarien dímers inestables amb APC WT, permetent la formació de certs nivells de dímers d'APC WT funcionals (Dihlmann et al., 1999; Friedl et al., 1996); d'altra banda, algunes mutacions a l'extrem 5' podrien reiniciar la traducció en un codó d'iniciació alternatiu a la posició 184 donant lloc a proteïnes amb una petita deleció a l'extrem N-terminal (Heppner Goss et al., 2002). Les mutacions a l'exó 9 originen un *splicing* alternatiu que pot tenir

lloc en aquest exó, donant lloc a proteïnes capaces de formar dímers estables amb APC WT (Young et al., 1998). Finalment, les mutacions a l'extrem 3' només afectarien l'extrem C-terminal de la proteïna, permetent la formació de proteïnes estables amb capacitat de formar dímers parcialment funcionals amb APC WT (Friedl et al., 1996). Així doncs, les mutacions localitzades als extrems 5' i 3' i a l'exó 9 de l'APC mantindrien bona part de la funció supressora tumoral de l'APC, el què explicaria el fenotip atenuat que s'observa en aquests pacients.

Per contra, en el nostre estudi hem observat que les mutacions del gen *APC* associades a un fenotip atenuat de poliposi, la majoria de les quals són variants *missense*, es distribueixen al llarg de tot el gen, i no només als extrems 5', 3' i a l'exó 9, tal com ha estat descrit fins ara. Per tant, en el futur, en els pacients diagnosticats d'AFAP no s'hauria de limitar l'estudi molecular només als extrems 5' i 3' i a l'exó 9 del gen *APC*, sinó que s'hauria d'analitzar tota la seqüència codificant del gen.

Els resultats obtinguts en aquesta tesi mostren que les variants *missense* del gen *APC* estan associades majoritàriament a un fenotip de poliposi atenuada, doncs són mutacions que originen canvis d'un sol aminoàcid que podrien modificar només lleugerament l'estructura i la funcionalitat de la proteïna APC. N'és un exemple la variant N1026S, doncs l'activació moderada de la transcripció que hem observat associada a la variant correlaciona amb el fenotip atenuat que manifesta la família. Per tant, la naturalesa molecular de les mutacions en el gen *APC* ha de ser també considerada a l'hora d'establir futures correlacions genotip-fenotip en poliposi.

Les estratègies utilitzades en la present tesi podrien aplicar-se per la caracterització d'altres variants encara no classificades en termes de patogenicitat, que probablement s'identifiquen en famílies amb un fenotip de poliposi atenuat. En alguns casos, com en el cas de la variant D1822V, les variants *missense* podrien no ser la causa de la poliposi a la família, però podrien conferir un risc augmentat de desenvolupar CCR. Per aquest motiu també són de gran importància els estudis cas-control.

Cada vegada hi ha més evidències que suggereixen que les variants *missense* del gen *APC* podrien predisposar al desenvolupament de múltiples adenomes colorectals i augmentar el risc de desenvolupar CCR, possiblement amb una penetrància variable. Però la dificultat d'avaluar amb fiabilitat l'impacte funcional de les variants identificades en el gen *APC* limita la utilitat de la seva detecció en el consell genètic. Malauradament, moltes vegades els criteris utilitzats per determinar el significat biològic de les variants identificades no són suficients per poder concloure amb seguretat si una variant és patogènica o simplement és un polimorfisme sense cap rellevància clínica i per tant, aquestes variants s'han d'interpretar amb cautela fins que

es realitzin anàlisis complets, incloent assajos funcionals, que permeten avaluar amb certesa el seu impacte funcional.

En conjunt, aquests resultats indiquen que les variants *missense* del gen *APC* estan associades majoritàriament a un fenotip atenuat de poliposi, i reforcen la importància de la caracterització funcional de les variants del gen *APC* d'efecte biològic desconegut per al diagnòstic i l'assessorament genètic dels individus portadors i l'aplicació de les mesures de prevenció adequades.

SUMARI

- Les variants *missense* de significat biològic desconegut representen un 56% de les mutacions identificades en les famílies d'AFAP (5/9), mentre que només representen un 7% de les identificades en famílies de FAP (4/62).
- La variant *APC* D1822V és un polimorfisme que s'associa a un risc incrementat de CCR en pacients amb història prèvia d'adenomes i no s'associa amb la història familiar de CCR.
- La variant *APC* N1026S, que està present de forma exclusiva en una família d'AFAP, afecta la unió d'APC amb β -catenina i activa moderadament la transcripció mitjançada pel complex β -catenina/Tcf-4.
- La variant *APC* L1129S, identificada en dues famílies de poliposi, no altera la interacció de la proteïna APC 4x15 amb la β -catenina.
- La variant *APC* G101E, identificada en una família de FAP, no s'associa a la malaltia ni sembla tenir cap funció modificadora del fenotip de poliposi.
- La variant *APC* G2502S és un polimorfisme que no sembla tenir rellevància clínica.
- L'efecte biològic de les variants *APC* A2274V i *APC* P2681L, identificades en dues famílies de poliposi, és encara desconegut.

CONCLUSIONS

1. La variant D1822V del gen *APC* pot incrementar el risc de la transformació maligna dels adenomes.
2. La variant N1026S del gen *APC* és patogènica i és la mutació responsable del desenvolupament de la Poliposi Adenomatosa Familiar Atenuada a la família on es va identificar.
3. La caracterització funcional de les variants del gen *APC* és de gran importància per conèixer la seva contribució en el desenvolupament de la poliposi i facilitar l'assessorament genètic.

BIBLIOGRAFIA

- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. and Kemler, R. (1997) beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *Embo J*, 16, 3797-3804.
- Al-Tassan, N., Chmiel, N.H., Maynard, J., Fleming, N., Livingston, A.L., Williams, G.T., Hodges, A.K., Davies, D.R., David, S.S., Sampson, J.R. and Cheadle, J.P. (2002) Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet*, 30, 227-232.
- Aretz, S., Stienen, D., Uhlhaas, S., Pagenstecher, C., Mangold, E., Caspari, R., Propping, P. and Friedl, W. (2005) Large submicroscopic genomic APC deletions are a common cause of typical familial adenomatous polyposis. *J Med Genet*, 42, 185-192.
- Aretz, S., Uhlhaas, S., Sun, Y., Pagenstecher, C., Mangold, E., Caspari, R., Moslein, G., Schulmann, K., Propping, P. and Friedl, W. (2004) Familial adenomatous polyposis: aberrant splicing due to missense or silent mutations in the APC gene. *Hum Mutat*, 24, 370-380.
- Astler, V.B. and Collier, F.A. (1954) The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg*, 139, 846-852.
- Baeg, G.H., Matsumine, A., Kuroda, T., Bhattacharjee, R.N., Miyashiro, I., Toyoshima, K. and Akiyama, T. (1995) The tumour suppressor gene product APC blocks cell cycle progression from G0/G1 to S phase. *Embo J*, 14, 5618-5625.
- Baker, S.J., Fearon, E.R., Nigro, J.M., Hamilton, S.R., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., vanTuinen, P., Ledbetter, D.H., Barker, D.F., Nakamura, Y., White, R. and Vogelstein, B. (1989) Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*, 244, 217-221.
- Behrens, J., Jerchow, B.A., Wurtele, M., Grimm, J., Asbrand, C., Wirtz, R., Kuhl, M., Wedlich, D. and Birchmeier, W. (1998) Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta- catenin, APC, and GSK3beta. *Science*, 280, 596-599.
- Behrens, J., von Kries, J.P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R. and Birchmeier, W. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, 382, 638-642.
- Berrueta, L., Kraeft, S.K., Tirnauer, J.S., Schuyler, S.C., Chen, L.B., Hill, D.E., Pellman, D. and 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, 10596-10601.
- Bienz, M. and Clevers, H. (2000) Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*, 103, 311-320.
- Bodmer, W.F., Bailey, C.J., Bodmer, J., Bussey, H.J., Ellis, A., Gorman, P., Lucibello, F.C., Murday, V.A., Rider, S.H., Scambler, P. and et al. (1987) Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*, 328, 614-616.

- Brocardo, M., Nathke, I.S. and Henderson, B.R. (2005) Redefining the subcellular location and transport of APC: new insights using a panel of antibodies. *EMBO Rep*, 6, 184-190.
- Burt, R.W. (2000) Colon cancer screening. *Gastroenterology*, 119, 837-853.
- Caspari, R., Friedl, W., Mandl, M., Moslein, G., Kadmon, M., Knapp, M., Jacobasch, K.H., Ecker, K.W., Kreissler-Haag, D., Timmermanns, G. and et al. (1994) Familial adenomatous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer. *Lancet*, 343, 629-632.
- Castells, A., Ino, Y., Louis, D.N., Ramesh, V., Gusella, J.F. and Rustgi, A.K. (1999) Mapping of a target region of allelic loss to a 0.5-cM interval on chromosome 22q13 in human colorectal cancer. *Gastroenterology*, 117, 831-837.
- Cox, D.G., Pontes, C., Guino, E., Navarro, M., Osorio, A., Canzian, F. and Moreno, V. (2004) Polymorphisms in prostaglandin synthase 2/cyclooxygenase 2 (PTGS2/COX2) and risk of colorectal cancer. *Br J Cancer*, 91, 339-343.
- Crawford, H.C., Fingleton, B.M., Rudolph-Owen, L.A., Goss, K.J., Rubinfeld, B., Polakis, P. and Matrisian, L.M. (1999) The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene*, 18, 2883-2891.
- de la Chapelle, A. (2004) Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*, 4, 769-780.
- Deka, J., Herter, P., Sprenger-Haussels, M., Koosch, S., Franz, D., Muller, K.M., Kuhnen, C., Hoffmann, I. and Muller, O. (1999) The APC protein binds to A/T rich DNA sequences. *Oncogene*, 18, 5654-5661.
- Desai, D.C., Neale, K.F., Talbot, I.C., Hodgson, S.V. and Phillips, R.K. (1995) Juvenile polyposis. *Br J Surg*, 82, 14-17.
- Dihlmann, S., Gebert, J., Siermann, A., Herfarth, C. and von Knebel Doeberitz, M. (1999) Dominant negative effect of the APC1309 mutation: a possible explanation for genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. *Cancer Res*, 59, 1857-1860.
- Dunlop, M.G. (2002) Guidance on gastrointestinal surveillance for hereditary non-polyposis colorectal cancer, familial adenomatous polyposis, juvenile polyposis, and Peutz-Jeghers syndrome. *Gut*, 51 Suppl 5, V21-27.
- Eklof Spink, K., Fridman, S.G. and 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, 6203-6212.
- EPIC Group of Spain. (1997a) Relative validity and reproducibility of a diet history questionnaire in Spain. I. Foods. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Epidemiol*, 26 Suppl 1, S91-99.

- EPIC Group of Spain. (1997b) Relative validity and reproducibility of a diet history questionnaire in Spain. II. Nutrients. European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *Int J Epidemiol*, 26 Suppl 1, S100-109.
- Erdmann, K.S., Kuhlmann, J., Lessmann, V., Herrmann, L., Eulenburg, V., Muller, O. and Heumann, R. (2000) The Adenomatous Polyposis Coli-protein (APC) interacts with the protein tyrosine phosphatase PTP-BL via an alternatively spliced PDZ domain. *Oncogene*, 19, 3894-3901.
- Faux, M.C., Ross, J.L., Meeker, C., Johns, T., Ji, H., Simpson, R.J., Layton, M.J. and Burgess, A.W. (2004) Restoration of full-length adenomatous polyposis coli (APC) protein in a colon cancer cell line enhances cell adhesion. *J Cell Sci*, 117, 427-439.
- Fearnhead, N.S., Britton, M.P. and Bodmer, W.F. (2001) The ABC of APC. *Hum Mol Genet*, 10, 721-733.
- Fearon, E.R. and Pierceall, W.E. (1995) The deleted in colorectal cancer (DCC) gene: a candidate tumour suppressor gene encoding a cell surface protein with similarity to neural cell adhesion molecules. *Cancer Surv*, 24, 3-17.
- Fearon, E.R. and Vogelstein, B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-767.
- Fleming, I.D., Phillips, J.L., Menck, H.R., Murphy, G.P. and 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, 2305-2310.
- Fodde, R. (2002) The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 38, 867-871.
- Fodde, R., Kuipers, J., Rosenberg, C., Smits, R., Kielman, M., Gaspar, C., van Es, J.H., Breukel, C., Wiegant, J., Giles, R.H. and Clevers, H. (2001) Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. *Nat Cell Biol*, 3, 433-438.
- Frayling, I.M., Beck, N.E., Ilyas, M., Dove-Edwin, I., Goodman, P., Pack, K., Bell, J.A., Williams, C.B., Hodgson, S.V., Thomas, H.J., Talbot, I.C., Bodmer, W.F. and 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, 10722-10727.
- Friedl, W., Meuschel, S., Caspari, R., Lamberti, C., Krieger, S., Sengteller, M. and Propping, P. (1996) Attenuated familial adenomatous polyposis due to a mutation in the 3' part of the APC gene. A clue for understanding the function of the APC protein. *Hum Genet*, 97, 579-584.
- Galiatsatos, P. and Foulkes, W.D. (2006) Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol*, 101, 385-398.
- Garte, S., Gaspari, L., Alexandrie, A.K., Ambrosone, C., Autrup, H., Autrup, J.L., Baranova, H., Bathum, L., Benhamou, S., Boffetta, P., Bouchardy, C., Breskvar,

- K., Brockmoller, J., Cascorbi, I., Clapper, M.L., Coutelle, C., Daly, A., Dell'Omo, M., Dolzan, V., Dresler, C.M., Fryer, A., Haugen, A., Hein, D.W., Hildesheim, A., Hirvonen, A., Hsieh, L.L., Ingelman-Sundberg, M., Kalina, I., Kang, D., Kihara, M., Kiyohara, C., Kremers, P., Lazarus, P., Le Marchand, L., Lechner, M.C., van Lieshout, E.M., London, S., Manni, J.J., Maugard, C.M., Morita, S., Nazar-Stewart, V., Noda, K., Oda, Y., Parl, F.F., Pastorelli, R., Persson, I., Peters, W.H., Rannug, A., Rebbeck, T., Risch, A., Roelandt, L., Romkes, M., Ryberg, D., Salagovic, J., Schoket, B., Seidegard, J., Shields, P.G., Sim, E., Sinnet, D., Strange, R.C., Stucker, I., Sugimura, H., To-Figueras, J., Vineis, P., Yu, M.C. and Taioli, E. (2001) Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 10, 1239-1248.
- Giardiello, F.M., Brensinger, J.D. and Petersen, G.M. (2001) AGA technical review on hereditary colorectal cancer and genetic testing. *Gastroenterology*, 121, 198-213.
- Grady, W.M. and Markowitz, S.D. (2002) Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 3, 101-128.
- Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M. and et al. (1991) Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 66, 589-600.
- He, T.C., Chan, T.A., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1999) PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*, 99, 335-345.
- He, T.C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L.T., Morin, P.J., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1998) Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, 281, 1509-1512.
- Heinimann, K., Thompson, A., Locher, A., Furlanetto, T., Bader, E., Wolf, A., Meier, R., Walter, K., Bauerfeind, P., Marra, G., Muller, H., Foernzler, D. and Dobbie, Z. (2001) Nontruncating APC germ-line mutations and mismatch repair deficiency play a minor role in APC mutation-negative polyposis. *Cancer Res*, 61, 7616-7622.
- Henderson, B.R. (2000) Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol*, 2, 653-660.
- Heppner Goss, K., Trzepacz, C., Tuohy, T.M. and Groden, J. (2002) Attenuated APC alleles produce functional protein from internal translation initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 8161-8166.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B. and Harris, C.C. (1991) p53 mutations in human cancers. *Science*, 253, 49-53.
- Ikeda, S., Kishida, S., Yamamoto, H., Murai, H., Koyama, S. and Kikuchi, A. (1998) Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *Embo J*, 17, 1371-1384.

- Ishidate, T., Matsumine, A., Toyoshima, K. and Akiyama, T. (2000) The APC-hDLG complex negatively regulates cell cycle progression from the G0/G1 to S phase. *Oncogene*, 19, 365-372.
- Jarvinen, H.J., Aarnio, M., Mustonen, H., Aktan-Collan, K., Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., De La Chapelle, A. and Mecklin, J.P. (2000) Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*, 118, 829-834.
- Joslyn, G., Richardson, D.S., White, R. and Alber, T. (1993) Dimer formation by an N-terminal coiled coil in the APC protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 11109-11113.
- Kawasaki, Y., Senda, T., Ishidate, T., Koyama, R., Morishita, T., Iwayama, Y., Higuchi, O. and Akiyama, T. (2000) Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. *Science*, 289, 1194-1197.
- Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87, 159-170.
- Kishida, S., Yamamoto, H., Ikeda, S., Kishida, M., Sakamoto, I., Koyama, S. and 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, 10823-10826.
- Knudsen, A.L., Bisgaard, M.L. and Bulow, S. (2003) Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP). A review of the literature. *Fam Cancer*, 2, 43-55.
- Knudson, A.G. (1993) Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 10914-10921.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., van Wichen, D., de Weger, R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Clevers, H. (1997) Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science*, 275, 1784-1787.
- Laken, S.J., Petersen, G.M., Gruber, S.B., Oddoux, C., Ostrer, H., Giardiello, F.M., Hamilton, S.R., Hampel, H., Markowitz, A., Klimstra, D., Jhanwar, S., Winawer, S., Offit, K., Luce, M.C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1997) Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet*, 17, 79-83.
- Lamlum, H., Al Tassan, N., Jaeger, E., Frayling, I., Sieber, O., Reza, F.B., Eckert, M., Rowan, A., Barclay, E., Atkin, W., Williams, C., Gilbert, J., Cheadle, J., Bell, J., Houlston, R., Bodmer, W., Sampson, J. and Tomlinson, I. (2000) Germline APC variants in patients with multiple colorectal adenomas, with evidence for the particular importance of E1317Q. *Hum Mol Genet*, 9, 2215-2221.
- Lamlum, H., Ilyas, M., Rowan, A., Clark, S., Johnson, V., Bell, J., Frayling, I., Efsthathiou, J., Pack, K., Payne, S., Roylance, R., Gorman, P., Sheer, D., Neale, K., Phillips, R., Talbot, I., Bodmer, W. and 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, 1071-1075.
- Landi, S., Moreno, V., Gioia-Patricola, L., Guino, E., Navarro, M., de Oca, J., Capella, G. and Canzian, F. (2003) Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NFkB1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. *Cancer Res*, 63, 3560-3566.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1998) Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396, 643-649.
- Leppert, M., Dobbs, M., Scambler, P., O'Connell, P., Nakamura, Y., Stauffer, D., Woodward, S., Burt, R., Hughes, J., Gardner, E. and et al. (1987) The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science*, 238, 1411-1413.
- Levin, B. (1992) Nutrition and colorectal cancer. *Cancer*, 70, 1723-1726.
- Lovelock, P.K., Healey, S., Au, W., Sum, E.Y., Tesoriero, A., Wong, E.M., Hinson, S., Brinkworth, R., Bekessy, A., Diez, O., Izatt, L., Solomon, E., Jenkins, M., Renard, H., Hopper, J., Waring, P., Tavtigian, S.V., Goldgar, D., Lindeman, G.J., Visvader, J.E., Couch, F.J., Henderson, B.R., Southey, M., Chenevix-Trench, G., Spurdle, A.B. and Brown, M.A. (2006) Genetic, functional, and histopathological evaluation of two C-terminal BRCA1 missense variants. *J Med Genet*, 43, 74-83.
- Lynch, H.T. and de la Chapelle, A. (2003) Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*, 348, 919-932.
- Malumbres, M. and Barbacid, M. (2003) RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*, 3, 459-465.
- Mann, B., Gelos, M., Siedow, A., Hanski, M.L., Gratchev, A., Ilyas, M., Bodmer, W.F., Moyer, M.P., Riecken, E.O., Buhr, H.J. and Hanski, C. (1999) Target genes of beta-catenin-T cell-factor/lymphoid-enhancer-factor signaling in human colorectal carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 1603-1608.
- Matsumine, A., Ogai, A., Senda, T., Okumura, N., Satoh, K., Baeg, G.H., Kawahara, T., Kobayashi, S., Okada, M., Toyoshima, K. and Akiyama, T. (1996) Binding of APC to the human homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. *Science*, 272, 1020-1023.
- Menendez, M., Gonzalez, S., Blanco, I., Guino, E., Peris, M., Peinado, M.A., Capella, G. and Moreno, V. (2004) Colorectal cancer risk and the APC D1822V variant. *Int J Cancer*, 112, 161-163.
- Miyoshi, Y., Ando, H., Nagase, H., Nishisho, I., Horii, A., Miki, Y., Mori, T., Utsunomiya, J., Baba, S., Petersen, G. and et al. (1992a) Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 4452-4456.

- Miyoshi, Y., Nagase, H., Ando, H., Horii, A., Ichii, S., Nakatsuru, S., Aoki, T., Miki, Y., Mori, T. and Nakamura, Y. (1992b) Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet*, 1, 229-233.
- Montera, M., Piaggio, F., Marchese, C., Gismondi, V., Stella, A., Resta, N., Varesco, L., Guanti, G. and Mareni, C. (2001) A silent mutation in exon 14 of the APC gene is associated with exon skipping in a FAP family. *J Med Genet*, 38, 863-867.
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1997) Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*, 275, 1787-1790.
- Morin, P.J., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1996) Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 7950-7954.
- Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K. and Olson, A.J. (1998) Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comp Chem*, 19, 1639-1662.
- Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B. and 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. and Polakis, P. (1994) The APC gene product associates with microtubules in vivo and promotes their assembly in vitro. *Cancer Res*, 54, 3676-3681.
- Nagase, H., Miyoshi, Y., Horii, A., Aoki, T., Ogawa, M., Utsunomiya, J., Baba, S., Sasazuki, T. and Nakamura, Y. (1992a) 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, 4055-4057.
- Nagase, H., Miyoshi, Y., Horii, A., Aoki, T., Petersen, G.M., Vogelstein, B., Maher, E., Ogawa, M., Maruyama, M., Utsunomiya, J. and et al. (1992b) Screening for germ-line mutations in familial adenomatous polyposis patients: 61 new patients and a summary of 150 unrelated patients. *Hum Mutat*, 1, 467-473.
- Nathke, I.S., Adams, C.L., Polakis, P., Sellin, J.H. and Nelson, W.J. (1996) The adenomatous polyposis coli tumor suppressor protein localizes to plasma membrane sites involved in active cell migration. *J Cell Biol*, 134, 165-179.
- Neufeld, K.L., Nix, D.A., Bogerd, H., Kang, Y., Beckerle, M.C., Cullen, B.R. and 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, 12085-12090.
- Nieuwenhuis, M.H. and 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, 153-161.

- Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S. and Hedge, P. (1991) Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 253, 665-669.
- Ollila, S., Sarantaus, L., Kariola, R., Chan, P., Hampel, H., Holinski-Feder, E., Macrae, F., Kohonen-Corish, M., Gerdes, A.M., Peltomaki, P., Mangold, E., de la Chapelle, A., Greenblatt, M. and Nystrom, M. (2006) Pathogenicity of MSH2 missense mutations is typically associated with impaired repair capability of the mutated protein. *Gastroenterology*, 131, 1408-1417.
- Oshima, M., Oshima, H., Kobayashi, M., Tsutsumi, M. and Taketo, M.M. (1995) Evidence against dominant negative mechanisms of intestinal polyp formation by Apc gene mutations. *Cancer Res*, 55, 2719-2722.
- Peifer, M., McCrea, P.D., Green, K.J., Wieschaus, E. and Gumbiner, B.M. (1992) The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the Drosophila segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol*, 118, 681-691.
- Peifer, M. and Polakis, P. (2000) Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis--a look outside the nucleus. *Science*, 287, 1606-1609.
- Peltomaki, P. (2003) Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol*, 21, 1174-1179.
- Phelan, C.M., Dapic, V., Tice, B., Favis, R., Kwan, E., Barany, F., Manoukian, S., Radice, P., van der Luijt, R.B., van Nesselrooij, B.P., Chenevix-Trench, G., kConFab, Caldes, T., de la Hoya, M., Lindquist, S., Tavtigian, S.V., Goldgar, D., Borg, A., Narod, S.A. and Monteiro, A.N. (2005) Classification of BRCA1 missense variants of unknown clinical significance. *J Med Genet*, 42, 138-146.
- Potten, C.S. and Loeffler, M. (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*, 110, 1001-1020.
- Potter, J.D. (1999) Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst*, 91, 916-932.
- Powell, S.M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T.M., Hamilton, S.R., Thibodeau, S.N., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1992) APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 359, 235-237.
- Raevaara, T.E., Korhonen, M.K., Lohi, H., Hampel, H., Lynch, E., Lonqvist, K.E., Holinski-Feder, E., Sutter, C., McKinnon, W., Duraisamy, S., Gerdes, A.M., Peltomaki, P., Kohonen-Ccorish, M., Mangold, E., Macrae, F., Greenblatt, M., de la Chapelle, A. and Nystrom, M. (2005) Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. *Gastroenterology*, 129, 537-549.
- Resta, N., Stella, A., Susca, F., Montera, M., Gentile, M., Cariola, F., Prete, F., Tenconi, R., Tibiletti, M.G., Logrieco, G., Mattina, T., Andriulli, G., Caruso, M.L., Fiorente, P., Russo, S., Caputi-Jambrenghi, O., Mareni, C. and Guanti, G.

- (2001) Nine novel APC mutations in Italian FAP patients. *Hum Mutat*, 17, 434-435.
- Reya, T. and Clevers, H. (2005) Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434, 843-850.
- Rodriguez-Bigas, M.A., Boland, C.R., Hamilton, S.R., Henson, D.E., Jass, J.R., Khan, P.M., Lynch, H., Perucho, M., Smyrk, T., Sobin, L. and Srivastava, S. (1997) A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*, 89, 1758-1762.
- Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., Destree, O. and Clevers, H. (1998) The Xenopus Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature*, 395, 608-612.
- Rosin-Arbesfeld, R., Cliffe, A., Brabletz, T. and Bienz, M. (2003) Nuclear export of the APC tumour suppressor controls beta-catenin function in transcription. *Embo J*, 22, 1101-1113.
- Rosin-Arbesfeld, R., Townsley, F. and Bienz, M. (2000) The APC tumour suppressor has a nuclear export function. *Nature*, 406, 1009-1012.
- Rowan, A.J., Lamlum, H., Ilyas, M., Wheeler, J., Straub, J., Papadopoulou, A., Bicknell, D., Bodmer, W.F. and Tomlinson, I.P. (2000) APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 3352-3357.
- Rozek, L.S., Rennert, G. and 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, 2325-2327.
- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Fiol, C., Munemitsu, S. and Polakis, P. (1996) Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science*, 272, 1023-1026.
- Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Munemitsu, S. and Polakis, P. (1997) Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res*, 57, 4624-4630.
- Rubinfeld, B., Souza, B., Albert, I., Muller, O., Chamberlain, S.H., Masiarz, F.R., Munemitsu, S. and Polakis, P. (1993) Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science*, 262, 1731-1734.
- Ruiz-Ponte, C., Vega, A., Conde, R., Barros, F. and Carracedo, A. (2001) The Asp1822Val variant of the APC gene is a common polymorphism without clinical implications. *J Med Genet*, 38, E33.

- Schreibman, I.R., Baker, M., Amos, C. and McGarrity, T.J. (2005) The hamartomatous polyposis syndromes: a clinical and molecular review. *Am J Gastroenterol*, 100, 476-490.
- Scott, R.J., Crooks, R., Rose, L., Attia, J., Thakkinstian, A., Thomas, L., Spigelman, A.D. and Meldrum, C.J. (2004) Germline Missense Changes in the APC Gene and Their Relationship to Disease. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 2, 81-91.
- Seeling, J.M., Miller, J.R., Gil, R., Moon, R.T., White, R. and Virshup, D.M. (1999) Regulation of beta-catenin signaling by the B56 subunit of protein phosphatase 2A. *Science*, 283, 2089-2091.
- Shih, I.M., Yu, J., He, T.C., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (2000) The beta-catenin binding domain of adenomatous polyposis coli is sufficient for tumor suppression. *Cancer Res*, 60, 1671-1676.
- Shimodaira, H., Filosi, N., Shibata, H., Suzuki, T., Radice, P., Kanamaru, R., Friend, S.H., Kolodner, R.D. and Ishioka, C. (1998) Functional analysis of human MLH1 mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Genet*, 19, 384-389.
- Sieber, O.M., Lamlum, H., Crabtree, M.D., Rowan, A.J., Barclay, E., Lipton, L., Hodgson, S., Thomas, H.J., Neale, K., Phillips, R.K., Farrington, S.M., Dunlop, M.G., Mueller, H.J., Bisgaard, M.L., Bulow, S., Fidalgo, P., Albuquerque, C., Scarano, M.I., Bodmer, W., Tomlinson, I.P. and Heinimann, 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, 2954-2958.
- Sieber, O.M., Lipton, L., Crabtree, M., Heinimann, K., Fidalgo, P., Phillips, R.K., Bisgaard, M.L., Orntoft, T.F., Aaltonen, L.A., Hodgson, S.V., Thomas, H.J. and Tomlinson, I.P. (2003) Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med*, 348, 791-799.
- Sieber, O.M., Segditsas, S., Knudsen, A.L., Zhang, J., Luz, J., Rowan, A.J., Spain, S.L., Thirlwell, C., Howarth, K.M., Jaeger, E.E., Robinson, J., Volikos, E., Silver, A., Kelly, G., Aretz, S., Frayling, I., Hutter, P., Dunlop, M., Guenther, T., Neale, K., Phillips, R., Heinimann, K. and 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, 1440-1448.
- Slattery, M.L., Samowitz, W., Ballard, L., Schaffer, D., Leppert, M. and 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, 1000-1004.
- Soravia, C., Berk, T., Madlensky, L., Mitri, A., Cheng, H., Gallinger, S., Cohen, Z. and Bapat, B. (1998) Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. *Am J Hum Genet*, 62, 1290-1301.
- Spirio, L., Olschwang, S., Groden, J., Robertson, M., Samowitz, W., Joslyn, G., Gelbert, L., Thliveris, A., Carlson, M., Otterud, B. and et al. (1993) Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell*, 75, 951-957.

- Strate, L.L. and Syngal, S. (2005) Hereditary colorectal cancer syndromes. *Cancer Causes Control*, 16, 201-213.
- Su, L.K., Burrell, M., Hill, D.E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1995) APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res*, 55, 2972-2977.
- Su, L.K., Johnson, K.A., Smith, K.J., Hill, D.E., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1993a) Association between wild type and mutant APC gene products. *Cancer Res*, 53, 2728-2731.
- Su, L.K., Vogelstein, B. and Kinzler, K.W. (1993b) Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*, 262, 1734-1737.
- Takaku, K., Oshima, M., Miyoshi, H., Matsui, M., Seldin, M.F. and Taketo, M.M. (1998) Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both *Dpc4* (*Smad4*) and *Apc* genes. *Cell*, 92, 645-656.
- Tetsu, O. and McCormick, F. (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, 398, 422-426.
- Tranah, G.J., Giovannucci, E., Ma, J., Fuchs, C. and Hunter, D.J. (2005) APC Asp1822Val and Gly2502Ser polymorphisms and risk of colorectal cancer and adenoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 14, 863-870.
- Trojan, J., Zeuzem, S., Randolph, A., Hemmerle, C., Brieger, A., Raedle, J., Plotz, G., Jiricny, J. and Marra, G. (2002) Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. *Gastroenterology*, 122, 211-219.
- Umar, A., Boland, C.R., Terdiman, J.P., Syngal, S., de la Chapelle, A., Ruschoff, J., Fishel, R., Lindor, N.M., Burgart, L.J., Hamelin, R., Hamilton, S.R., Hiatt, R.A., Jass, J., Lindblom, A., Lynch, H.T., Peltomaki, P., Ramsey, S.D., Rodriguez-Bigas, M.A., Vasen, H.F., Hawk, E.T., Barrett, J.C., Freedman, A.N. and Srivastava, S. (2004) Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*, 96, 261-268.
- van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Battle, E., Coudreuse, D., Haramis, A.P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R. and Clevers, H. (2002) The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, 111, 241-250.
- Van Der Spoel, D., Lindahl, E., Hess, B., Groenhof, G., Mark, A.E. and Berendsen, H.J. (2005) GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem*, 26, 1701-1718.
- Vasen, H.F. (2000) Clinical diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes. *J Clin Oncol*, 18, 81S-92S.

- Vasen, H.F., Mecklin, J.P., Khan, P.M. and Lynch, H.T. (1991) The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum*, 34, 424-425.
- Vasen, H.F., Watson, P., Mecklin, J.P. and 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, 1453-1456.
- Venesio, T., Molatore, S., Cattaneo, F., Arrigoni, A., Risio, M. and Ranzani, G.N. (2004) High frequency of MYH gene mutations in a subset of patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*, 126, 1681-1685.
- Wallis, Y.L., Morton, D.G., McKeown, C.M. and 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, 14-20.
- Winawer, S., Fletcher, R., Rex, D., Bond, J., Burt, R., Ferrucci, J., Ganiats, T., Levin, T., Woolf, S., Johnson, D., Kirk, L., Litin, S. and Simmang, C. (2003) Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology*, 124, 544-560.
- Winawer, S.J., Fletcher, R.H., Miller, L., Godlee, F., Stolar, M.H., Mulrow, C.D., Woolf, S.H., Glick, S.N., Ganiats, T.G., Bond, J.H., Rosen, L., Zapka, J.G., Olsen, S.J., Giardiello, F.M., Sisk, J.E., Van Antwerp, R., Brown-Davis, C., Marciniak, D.A. and Mayer, R.J. (1997) Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology*, 112, 594-642.
- Woodage, T., King, S.M., Wacholder, S., Hartge, P., Struewing, J.P., McAdams, M., Laken, S.J., Tucker, M.A. and Brody, L.C. (1998) The APC11307K allele and cancer risk in a community-based study of Ashkenazi Jews. *Nat Genet*, 20, 62-65.
- Young, J., Simms, L.A., Tarish, J., Buttenshaw, R., Knight, N., Anderson, G.J., Bell, A. and Leggett, B. (1998) A family with attenuated familial adenomatous polyposis due to a mutation in the alternatively spliced region of APC exon 9. *Hum Mutat*, 11, 450-455.
- Zhang, F., White, R.L. and 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, 12577-12582.
- Zhou, X.L., Eriksson, U., Werelius, B., Kressner, U., Sun, X.F. and Lindblom, A. (2004) Definition of candidate low risk APC alleles in a Swedish population. *Int J Cancer*, 110, 550-557.

ANNEXOS

ANNEX I

Taula 5. Condicions d'amplificació per PCR de diferents fragments dels gens *APC* i *CTNNB1*.

Regió amplificada	Mida del fragment	Seqüències dels encebadors (5' - 3')	Mescla dels reactius (concentració final)	Condicions d'amplificació
Variante APC G101E (exó 3)	293 pb	Forward: AAGCAATTGTTGTATAAAAACTT Reverse: ACAATAAACTGGAGTACACAAGG	1x <i>Taq Buffer</i> , 2,5 mM MgCl ₂ , 200 µM dNTPs, 0,2 µM oligonucleòtids, 1,25 U <i>Taq Polimerase</i> i 150 ng de DNA. Vol. final 50 µl.	96 °C 5 min, 35 cicles de 96 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s i 72 °C 5 min.
Variante APC L1129S (exó 15)	311 pb	Forward: GGAGCCAATGGTTCAGAAACA Reverse: TCGGTTTTACTGCTTTGTCCAGA	1x <i>Taq Buffer</i> , 2,5 mM MgCl ₂ , 200 µM dNTPs, 0,2 µM oligonucleòtids, 1,25 U <i>Taq Polimerase</i> i 150 ng de DNA. Vol. final 50 µl.	96 °C 5 min, 35 cicles de 96 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s i 72 °C 5 min.
Polimorfisme APC c.4479A>G (exó 15)	513 pb	Forward: AGTAAATGCTGCAGTTCAGAGG Reverse: TACACCCGTGGCATATCATC	1x <i>Taq Buffer</i> , 2,5 mM MgCl ₂ , 200 µM dNTPs, 1 µM oligonucleòtids, 1,25 U <i>Taq Polimerase</i> i 100 ng de DNA. Vol. final 50 µl.	96 °C 5 min, 35 cicles de 96 °C 1 min, 65 °C 1 min, 72 °C 1 min i 72 °C 5 min.
Polimorfisme APC c.5880A>G (exó 15)	416 pb	Forward: GTCATCCAAAGACATACCA Reverse: TGCGGAGCTTATACATTCT	1x <i>Taq Buffer</i> , 2,5 mM MgCl ₂ , 200 µM dNTPs, 1 µM oligonucleòtids, 1,25 U <i>Taq Polimerase</i> i 100 ng de DNA. Vol. final 50 µl.	96 °C 5 min, 35 cicles de 96 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1 min i 72 °C 5 min.
Polimorfisme APC D1822V (exó 15)	379 pb	Forward: ACCCAACAAAAATCAGTTAGATG Reverse: TTTTGCCTTTCTTAATTCAGCC	1x <i>Taq Buffer</i> , 2,5 mM MgCl ₂ , 200 µM dNTPs, 0,2 µM oligonucleòtids, 1,25 U <i>Taq Polimerase</i> i 100 ng de DNA. Vol. final 50 µl.	96 °C 5 min, 35 cicles de 96 °C 30 s, 50 °C 30 s, 72 °C 30 s i 72 °C 5 min.
CTNNB1 (exó 3)	337 pb	Forward: TGCTTTTCTTGGCTGTCTTTC Reverse: CTGACTTTCAGTAAGGCAATGA	1x <i>Taq Buffer</i> , 2,5 mM MgCl ₂ , 200 µM dNTPs, 0,2 µM oligonucleòtids, 1,25 U <i>Taq Polimerase</i> i 150 ng de DNA. Vol. final 50 µl.	96 °C 5 min, 35 cicles de 96 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s i 72 °C 5 min.
APC 4x15 (exó 15)	570 pb	Forward: GCAGAATTCATGGATGATAATGATGGA Reverse: CTGACTCGAGGAATGAAAATGACTGTTTCTGT	1x <i>Taq Buffer</i> , 2,5 mM MgCl ₂ , 200 µM dNTPs, 0,2 µM oligonucleòtids, 1,5 U <i>Taq Polimerase</i> i 6 µl de DNA plasmídic. Vol. final 100 µl.	96 °C 5 min, 35 cicles de 96 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 2 min i 72 °C 5 min.

Taula 6. Seqüències dels encebadors i de les sondes d'hibridació utilitzats per a l'amplificació i la discriminació al·lèlica de les variants dels gens *APC* i *MYH* amb el Light Cycler.

VARIANT	Exó	Mida fragment	Seqüències dels encebadors (5' - 3')	Seqüències de les sondes (5' - 3')
APC N1026S	15	382 pb	Forward: CTGCCATACACATTCAAACAC Reverse: TGTTTGGGTCTTGCCCATCTT	Sensor: TCTGAATATTTAAGACTATAA <u>C</u> TTATTGG Anchor: TATCTAGTTCTCCATCATTATCATCCATATG
APC D1822V	15	379 pb	Forward: ACCCAACAAAAATCAGTTAGATG Reverse: TTTTGCCTTTCTTAATTCAGCC	Sensor: TCCAAGG <u>A</u> CTTCAATGATAAGC Anchor: CCCAATAATGAAGATAGAGTCAGAGGAAG
APC A2274V	15	263 pb	Forward: CTCTCGAGGCAGGACAATGAT Reverse: GTCTTGAAGGGTCTGAATCTCTA	Sensor: ATTTACAGATGGCTTG <u>A</u> CTCCTC Anchor: AGGAGAAGTGGTGGCTGTTTGACCT
APC G2502S	15	258 pb	Forward: CACTAGGTCCCAGGCACAAAC Reverse: CGAGGAAGGGATGATGAATGTT	Sensor: CGTCTGTTCAGGCT <u>A</u> GTGGATG Anchor: CGAAACTCCCACCTAATCTCAGTCCC
APC P2681L	15	366 pb	Forward: ATGTTTGGGTGAGAATTGAGGACT Reverse: CTTGAGCTGCTAGAACTGAATGG	Sensor: TACTCCCC <u>C</u> GGTGATTGACAGT Anchor: TCCTAGATCTGGAAGATCTCCCACAGGT
MYH Y165C	7-8	412 pb	Forward: AGGGTAGGGGAAATAGGAACGATA Reverse: GCACAGAGGGGCCAAAGAGT	Sensor: CGG CCA CGA GAA TAG <u>C</u> AG C Anchor: AGG CCA GCC CAG AGT TGA T
MYH G382D	13	307 pb	Forward: TGG GCG TGG AGG GCA GTG Reverse: AAG GGT CAA GGG GTT CAA ATA GG	Sensor: GCC AGC AGA <u>C</u> CT GAG AGG Anchor: CGG ACG GGA ACT CCC ACA GTC

Taula 7. Condicions d'amplificació i discriminació al·lèlica de les variants dels gens *APC* i *MYH* amb el Light Cycler.

VARIANT	Mescla dels reactius (concentració final)	Condicions d'amplificació i discriminació al·lèlica
APC N1026S	2,5 mM MgCl ₂ , 0,1 μM encebadors, 0,1 μM sondes, 0,5x <i>LightCycler FastStart DNA Master HybProbe</i> i 10 ng de DNA. Vol. final 10 μl.	<u>Desnaturalització</u> : 95 °C 10 min; <u>Amplificació</u> : 43 cicles de 95 °C 3 s, 54 °C 10 s, 72 °C 13 s; <u>Corba de fusió</u> : 95 °C 8 s, 38 °C 20 s i de 38 °C a 70 °C a 0,1 °C/s; <u>Refredament</u> : 40 °C 20 s
APC D1822V	2 mM MgCl ₂ , 0,2 μM encebadors, 0,2 μM sondes, 1x <i>LightCycler FastStart DNA Master HybProbe</i> i 40 ng de DNA. Vol. final 10 μl.	<u>Desnaturalització</u> : 95 °C 10 min; <u>Amplificació</u> : 47 cicles de 95 °C 2 s, 57 °C 8 s, 72 °C 16 s; <u>Corba de fusió</u> : 95 °C 2 s, 40 °C 20 s i de 40 °C a 80 °C a 0,1 °C/s; <u>Refredament</u> : 40 °C 20 s
APC A2274V	3 mM MgCl ₂ , 0,3 μM encebadors, 0,2 μM sondes, 1x <i>LightCycler FastStart DNA Master HybProbe</i> i 20 ng de DNA. Vol. final 10 μl.	<u>Desnaturalització</u> : 95 °C 10 min; <u>Amplificació</u> : 45 cicles de 95 °C 3 s, 60 °C 8 s, 72 °C 12 s; <u>Corba de fusió</u> : 95 °C 2 s, 52 °C 20 s i de 52 °C a 80 °C a 0,1 °C/s; <u>Refredament</u> : 40 °C 20 s
APC G2502S	2 mM MgCl ₂ , 0,1 μM encebadors, 0,2 μM sondes, 1x <i>LightCycler FastStart DNA Master HybProbe</i> i 20 ng de DNA. Vol. final 10 μl.	<u>Desnaturalització</u> : 95 °C 10 min; <u>Amplificació</u> : 43 cicles de 95 °C 3 s, 60 °C 8 s, 72 °C 12 s; <u>Corba de fusió</u> : 54 °C 25 s i de 54 °C a 75 °C a 0,1 °C/s; <u>Refredament</u> : 40 °C 20 s
APC P2681L	3 mM MgCl ₂ , 0,1 μM encebadors, 0,16 μM sondes, 1x <i>LightCycler FastStart DNA Master HybProbe</i> i 20 ng de DNA. Vol. final 20 μl.	<u>Desnaturalització</u> : 95 °C 10 min; <u>Amplificació</u> : 45 cicles de 95 °C 3 s, 60 °C 8 s, 72 °C 12 s; <u>Corba de fusió</u> : 95 °C 2 s, 52 °C 20 s i de 52 °C a 80 °C a 0,2 °C/s; <u>Refredament</u> : 40 °C 20 s
MYH Y165C	3,5 mM MgCl ₂ , 0,5 μM encebadors, 0,12 μM sondes, 1x <i>LightCycler FastStart DNA Master HybProbe</i> i 20 ng de DNA. Vol. final 10 μl.	<u>Desnaturalització</u> : 95 °C 10 min; <u>Amplificació</u> : 35 cicles de 95 °C 5 s, 60 °C 8 s, 72 °C 12 s; <u>Corba de fusió</u> : 95 °C 5 s, 40 °C 15 s i de 40 °C a 75 °C a 0,2 °C/s; <u>Refredament</u> : 40 °C 20 s
MYH G382D	3,5 mM MgCl ₂ , 0,5 μM encebadors, 0,12 μM sondes, 1x <i>LightCycler FastStart DNA Master HybProbe</i> i 20 ng de DNA. Vol. final 10 μl.	<u>Desnaturalització</u> : 95 °C 10 min; <u>Amplificació</u> : 35 cicles de 95 °C 5 s, 60 °C 8 s, 72 °C 12 s; <u>Corba de fusió</u> : 95 °C 5 s, 40 °C 15 s i de 40 °C a 75 °C a 0,2 °C/s; <u>Refredament</u> : 40 °C 20 s

Taula 8. Condicions de digestió del DNA amb enzims de restricció.

Nom del fragment de DNA digerit	Tipus de DNA digerit	Enzim de restricció	Mescla dels reactius (concentració final)	Condicions de digestió
Polimorfisme APC c.4479A>G	Producte d'amplificació	BsaJI (New England Biolabs)	1x <i>Buffer 2</i> , 3 U BsaJI, 0,1mg/ml BSA i 5 µl de DNA. Vol. final 15 µl.	60 °C tota la nit
Polimorfisme APC c.5880A>G	Producte d'amplificació	MspI (New England Biolabs)	1x <i>Buffer 2</i> , 5 U MspI i 5 µl de DNA. Vol. final 15 µl.	37 °C tota la nit
Polimorfisme APC D1822V	Producte d'amplificació	MbolI (New England Biolabs)	1x <i>Buffer 2</i> , 2,5 U MbolI i 5 µl de DNA. Vol. final 15 µl.	37 °C tota la nit
APC 4x15	Producte d'amplificació	Digestió doble EcoRI (Roche) i XhoI (Roche)	1x <i>Buffer H</i> , 20 U EcoRI, 20 U XhoI i 40 µl de DNA. Vol. final 100 µl.	2 h a 37 °C
pGEX-4T1	Plasmidi	Digestió doble EcoRI (Roche) i XhoI (Roche)	1x <i>Buffer H</i> , 20 U EcoRI, 20 U XhoI i 1 µg de DNA. Vol. final 100 µl.	2 h a 37 °C
pGEX-APC-4x15	Producte de lligació o producte de mutagènesi dirigida	Digestió doble EcoRI (Roche) i XhoI (Roche)	1x <i>Buffer H</i> , 3 U EcoRI, 3 U XhoI i 5 µl de DNA. Vol. final 10 µl.	2 h a 37 °C
pCMV-APC	Producte de mutagènesi dirigida	BamHI (New England Biolabs)	1x <i>Buffer 2</i> , 10 U BamHI i 3 µl de DNA. Vol. final 15 µl.	2 h a 37 °C

ANNEX II

LETTER TO THE EDITOR

Colorectal Cancer Risk and the APC D1822V Variant

Mireia MENÉNDEZ^{1,2}, Sara GONZÁLEZ¹, Ignacio BLANCO¹, Elisabet GUINÓ¹, Mercé PERIS¹, Miquel A. PEINADO², Gabriel CAPELLÀ^{1*} and Victor MORENO¹ for the Bellvitge Colorectal Cancer Study Group³

¹Institut Català d'Oncologia, Translational Research Laboratory, Cancer Epidemiology Department, Cancer Prevention and Control Department, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

²Institut de Recerca Oncològica, Molecular Oncology Center, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain

³The members of the Bellvitge Colorectal Cancer Study Group are Victor Moreno, Matilde Navarro, Joan Marti-Rague, Javier de Oca, Alfonso Osorio, Carlos del Rio, Sebastiano Biondo, Maria Cambray, Felip Vilardell, Belen Lloveras, Valeri Novell, Elisabet Guinó, Laura Pareja, Caridad Pontes, Miguel A. Peinado and Gabriel Capellà

Dear Sir,

Adenomatous Polyposis Coli (APC) tumor suppressor gene, identified in 1991,¹ plays a key role in early stages of human colorectal tumorigenesis. High-penetrance germline mutations in the APC gene, usually generating a stop codon, are responsible for the autosomal dominant inherited disease Familial Adenomatous Polyposis (FAP). Multiple germline missense mutations in the APC gene have been reported,^{2–6} although their contribution to colorectal cancer (CRC) risk is controversial. I1307K, E1317Q and D1822V are the most prevalent APC variants reported so far. D1822V, which results in an aspartate to valine change at codon 1822 due to an A-to-T transversion, is the most common APC variant described. The possibility that this variant may increase CRC risk has been addressed in only one study,⁶ which showed no main effect and a reduced risk of colon cancer for those individuals with the homozygous variant diagnosed after age 65 or eating a low-fat diet.

Here we report the results of a hospital-based case-control study (346 sporadic CRC cases and 297 controls) designed to assess whether D1822V predisposes to CRC and interacts with other risk factors including family history. A detailed description of the population and study methods has been extensively described elsewhere.⁷ All subjects were informed and gave written consent to participate in the study and to allow their biological samples to be genetically analyzed, according to the Helsinki declaration. The Local Ethical Committee cleared the study protocol. Genotyping of the D1822V variant was performed by means of fluorescent hybridization probe melting curves using the Light Cycler instrument. Statistical analysis was carried out using logistic regression models from which odds ratios (OR) and 95% confidence intervals (CI) were calculated. To increase statistical power, risk was assessed combining the heterozygous and variant homozygous against the reference category of homozygosity for the more frequent allele assuming a dominant model. All analyses were adjusted for age and sex.

In our case-control study, family history of CRC (at least 1 first-degree relative harboring a colorectal tumor but not other cancers), increased CRC risk (OR = 3.23; 95% CI 1.77–5.88; p -value = 0.001). We also observed a high risk of CRC associated to a personal history of symptomatic adenomas, assessed by a previous performance of an endoscopic procedure evidencing any type of adenomas (OR = 4.31; 95% CI

1.44–12.9; p -value = 0.004). As expected, long-term nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) consumption was a protective factor (OR = 0.39; 95% CI 0.23–0.68; p -value = 0.001). No significant modification of risk was observed for macronutrients other than alcohol, which was associated with a dose-response increased risk.

The frequency of the T allele at codon 1822 was 19.5% in our control population and 19.7% in CRC cases (Table I) being genotypes in Hardy-Weinberg equilibrium. There were no statistically significant differences in CRC risk associated with D1822V genotype (OR for AT/TT = 1.06; 95% CI 0.76–1.48; p -value = 0.72). When cases were stratified by tumor site, this result was similar both in cases of colon (OR for AT/TT = 0.91; 95% CI 0.62–1.33; p -value = 0.62) and rectum (OR for AT/TT = 1.35; 95% CI 0.88–2.07; p -value = 0.17). No interaction was observed with sex or age (data not shown). Regarding dietary habits, no interaction of the variant was observed with dietary fat (Table II) or other nutrients analyzed (data not shown). These results are different from those previously reported by Slattery *et al.*,⁶ who described in a large study that the TT genotype was associated with a reduced colon cancer risk among individuals diagnosed after age 65 or eating a low-fat diet. Several factors may account for this discrepancy: i) differences in the population analyzed (Slattery's study was performed on colon cancer cases exclusively); ii) geographical variations in dietary habits and iii) lack of statistical power to detect these interactions in our study since we only observed 14 CRC cases and 16 controls with the TT genotype. We tried to minimize the potential recall bias associ-

Grant sponsor: Marató TV3; Grant number: 48/95; Grant sponsor: Ministerio de Sanidad y Consumo; Grant numbers: 96/0797, 00/0021 and 01/1264; Grant sponsor: Ministerio de Ciencia y Tecnología; Grant number: SAF00/81.

*Correspondence to: Institut Català d'Oncologia, Laboratori de Recerca Translacional, Av. Gran Via s/n, Km 2.7, 08907 L'Hospitalet de Llobregat, Spain. Fax: +34-93-2607466. E-mail: gcapella@ico.scs.es

Received 27 February 2004; Accepted after revision 8 March 2004

DOI 10.1002/ijc.20361
Published online 2 June 2004 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

ated with the use of hospital controls by a careful design and the use of validated questionnaires. Also, it is already known that allele frequencies are not significantly altered in hospital populations.⁸

While in our study family history increased CRC risk, no interaction with the variant was observed (Table II). We decided to further explore this issue by analyzing a large cohort of 244 unrelated familial CRC cases (Table III). Prevalence of the variant did not vary among affected individuals of classical ($n = 90$) or attenuated ($n = 26$) FAP when compared to controls or sporadic CRC cases. Moreover, in 2 FAP families analyzed, the variant did not cosegregate with the disease. Prevalence of the variant was not modified in Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) affected individuals ($n = 35$). However, we observed a nonsignificant lower T allele frequency in HNPCC-like⁹ ($n = 93$) cases compared to controls. The heterogeneous nature of this latter group of patients precluded identification of a specific subgroup harboring a lower T allele frequency. From our observations, it can be concluded that the T allele is not related to CRC familial aggregation.

Personal history of adenomas was a strong risk factor in our case-control study: AA individuals with a personal history of symptomatic adenomas had 2-fold risk of CRC, being this risk further increased in T allele carriers (Table II). While the risk of malignant transformation of adenomas associated with the T allele might be modest, the impact on the overall cancer burden could be significant due to the relatively high prevalence of the variant allele. These observations must be interpreted with caution due to the low number of cases included.

The functional significance of the variant remains unknown. D1822V results in an *aspartate* (a hydrophilic, amide side chain amino acid) to *valine* (a hydrophobic, aliphatic side chain amino acid) change at codon 1822, between fourth and fifth 20-amino-acid repeat within the β -catenin downregulation domain. In order to expand our knowledge about the potential pathogenesis of this variant, loss of heterozygosity (LOH) at codon 1822 was studied in paired tumor and normal tissues of 92 germline heterozygous (AT) CRC cases. Results obtained in the Light Cycler instrument were confirmed with a *MspI* RFLP/PCR assay. LOH was observed in 25 (27%) of the 92 tumours. The A allele was lost in 13 cases and the T allele in 12, indicating that no preferential loss of the normal allele was present. Further investigation is certainly needed to ascertain how this substitution may affect *APC* regulatory functions and which are the molecular mechanisms involved in its putative function.

In summary, we have shown that the D1822V variant of the *APC* gene does not associate with family history of CRC but may increase the risk of adenoma transformation. Only one study had previously evaluated the role of this variant in the

TABLE I—RISK OF SPORADIC COLORECTAL CANCER FOR *APC* 1822 GENOTYPES

<i>APC</i> 1822 genotypes	Cases N (%)	Controls N (%)	OR (95% CI) ¹
AA	224 (65)	197 (66)	1.0
AT	108 (31)	84 (28)	1.13 (0.80–1.60)
TT	14 (4)	16 (5)	0.71 (0.34–1.51)

¹Odds ratios adjusted for age and sex; p -value for association = 0.48.

TABLE II—INTERACTIONS BETWEEN SOME RISK FACTORS AND *APC* 1822 GENOTYPES FOR THE RISK OF COLORECTAL CANCER

	Cases/controls	AA OR (95% CI) ¹	Cases/controls	AT/TT OR (95% CI) ¹	p -value for interaction
Family history of cancer					
No cancer	103/106	1.0	58/52	1.14 (0.71–1.82)	0.83
Colorectal cancer	32/10	3.58 (1.65–7.74)	21/7	3.1 (1.25–7.7)	
Other cancers	89/81	1.22 (0.81–1.84)	43/41	1.16 (0.7–1.95)	
Personal history of symptomatic adenomas					
No	216/193	1.0	112/100	0.99 (0.71–1.39)	0.02
Yes	8/4	1.91 (0.56–6.52)	10/0	Inf (1.96–Inf) ²	
Fats (density) ³					
Lowest tertile	77/55	1.0	46/33	0.86 (0.48–1.54)	0.87
Middle tertile	75/69	0.78 (0.48–1.28)	34/31	0.82 (0.44–1.5)	
Highest tertile	69/68	0.77 (0.47–1.27)	38/35	0.79 (0.44–1.44)	

¹Odds ratios adjusted for age and sex.—²Lower confidence interval estimated with exact logistic regression.—³Density is calculated dividing daily intake of fats in grams per daily caloric intake. Cut points correspond to 26% and 32% of total calories provided by fats.

TABLE III—*APC* 1822 GENOTYPES AND ALLELE FREQUENCIES IN CONTROLS AND FAMILIAL CANCER CASES

<i>APC</i> 1822 genotypes	Controls N (%)	FAP ¹ N (%)	AFAP ² N (%)	HNPCC ³ N (%)	HNPCC-like ⁴ N (%)
AA	197 (66)	58 (64)	17 (65)	20 (57)	68 (73)
AT	84 (28)	27 (30)	7 (27)	13 (37)	24 (26)
TT	16 (5)	5 (6)	2 (8)	2 (6)	1 (1)
T allele frequency %	19.5	20.5	21.2	24.3	13.9
(95% CI)	(15.2–24.5)	(13.2–31.0)	(9.0–43.6)	(12.5–43.3)	(7.7–22.7)
N	297	90	26	35	93

¹More than 100 colorectal adenomas.—²Attenuated FAP: Less than 100 colorectal adenomas.—³Defined by Amsterdam criteria type I or II.—⁴Criteria described in Winawer *et al.*

pathogenesis of CRC, so further studies in larger series are needed to confirm these observations that may shed some light in colorectal tumorigenesis.

Yours sincerely,

Mireia MENÉNDEZ, Sara GONZÁLEZ, Ignacio BLANCO,
Elisabet GUINÓ, Mercè PERIS, Miquel A PEINADO,
Gabriel CAPELLÁ and Victor MORENO,
for the Bellvitge Colorectal Cancer Study Group

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Olga Campos, Raquel Cuesta and Gloria Julià of the Program of Molecular Diagnosis of Hereditary Colorectal Cancer for excellent technical support. Francisco Rico was of great help with D1822V genotyping with the Light Cycler instrument. M.M. is a recipient of a FPI MCYT fellowship. The research team belongs to the Network of Cooperative Research on Cancer (C03/10) and Epidemiology and Public Health (C03/09), funded by the Instituto Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo of Spain.

REFERENCES

1. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J, Spirio L, Robertson M, Sargeant L, Krapcho K, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;66:589–600.
2. Frayling IM, Beck NE, Ilyas M, Dove-Edwin I, Goodman P, Pack K, Bell JA, Williams CB, Hodgson SV, Thomas HJ, Talbot IC, Bodmer WF, et al. 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* 1998;95:10722–7.
3. Woodage T, King SM, Wacholder S, Hartge P, Struwing JP, McAdams M, Laken SJ, Tucker MA, Brody LC. The *APC*I1307K allele and cancer risk in a community-based study of Ashkenazi Jews. *Nat Genet* 1998;20:62–5.
4. Lamlum H, Al Tassan N, Jaeger E, Frayling I, Sieber O, Reza FB, Eckert M, Rowan A, Barclay E, Atkin W, Williams C, Gilbert J, et al. Germline *APC* variants in patients with multiple colorectal adenomas, with evidence for the particular importance of E1317Q. *Hum Mol Genet* 2000;9:2215–21.
5. Heinimann K, Thompson A, Locher A, Furlanetto T, Bader E, Wolf A, Meier R, Walter K, Bauerfeind P, Marra G, Muller H, Foerzner D, et al. Nontruncating *APC* germ-line mutations and mismatch repair deficiency play a minor role in *APC* mutation-negative polyposis. *Cancer Res* 2001;61:7616–22.
6. Slattery ML, Samowitz W, Ballard L, Schaffer D, Leppert M, Potter JD. A molecular variant of the *APC* gene at codon 1822: its association with diet, lifestyle, and risk of colon cancer. *Cancer Res* 2001;61:1000–4.
7. Landi S, Moreno V, Gioia-Patricola L, Guino E, Navarro M, de Oca J, Czpella G, Canzian F. Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, *NFKB1*, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. *Cancer Res* 2003;63:3560–6.
8. Garte S, Gaspari L, Alexandrie AK, Ambrosone C, Autrup H, Autrup JL, Baranova H, Bathum L, Banhamou S, Boffetta P, Bouchardy C, Breskvar K, et al. Metabolic gene polymorphism frequencies in control populations. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:1239–48.
9. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, Ganiats T, Levin T, Woolf S, Johnson D, Kirk L, Litin S, et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003;124:544–60.

ANNEX III

Article sotmès a publicació a *Gastroenterology* (pendent d'una segona revisió)

Editorial Manager(tm) for Gastroenterology
Manuscript Draft

Manuscript Number: GASTRO-D-07-00070

Title: FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE NOVEL APC N1026S VARIANT ASSOCIATED WITH ATTENUATED FAMILIAL ADENOMATOUS POLYPOSIS

Article Type: Clinical - Alimentary Tract

Section/Category: Human Research - Human Material

Corresponding Author: Dr Gabriel Capella, M.D. Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Institut Català d'Oncologia-IDIBELL

First Author: Mireia Menéndez, BS

Order of Authors: Mireia Menéndez, BS; Sara González, BS; Antònia Obrador-Hevia, BS; Maria Jesús Pujol, PhD; Joan Valls, BS; Núria Canela, PhD; Ignacio Blanco, M.D., PhD ; Antonio Pineda-Lucena, PhD; Víctor Moreno, M.D., PhD; Oriol Bachs, PhD; Gabriel Capella , M.D., PhD

FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF THE NOVEL *APC* N1026S VARIANT ASSOCIATED WITH ATTENUATED FAMILIAL ADENOMATOUS POLYPOSIS

Short title: *APC* N1026S in AFAP

Mireia Menéndez (1), Sara González (1), Antònia Obrador-Hevia (1), Maria Jesús Pujol (2), Joan Valls (1), Núria Canela (2), Ignacio Blanco (1), Antonio Pineda-Lucena (3), Víctor Moreno (1), Oriol Bachs (2), Gabriel Capellá (1)

(1) Laboratori de Recerca Translacional. Departament de Prevenció i Control del Càncer. Servei d'Epidemiologia i Registre del Càncer. IDIBELL - Institut Català d'Oncologia, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain.

(2) Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Facultat de Medicina, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi Sunyer (IDIBAPS), Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

(3) Laboratorio de Biología Estructural, Departamento de Química Médica, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain.

Grant support: AGL2004-07579-04 from MEC and BM05-254-0 from Fundació La Caixa, PI: GC; Spanish Networks RCEP (C03/09) and RTICCC (C03/10) from Instituto de Salud Carlos III; SAF 2003-08339, PI: OB; BFU2005-09141/BFI from MEC, PI: AP; ACOMP06/174 from Generalitat Valenciana, PI: AP. M.M. is a recipient of FPI MCYT and IDIBELL fellowships.

Correspondence: Gabriel Capellá, Laboratori de Recerca Translacional, Institut Català d'Oncologia, Barcelona, Spain. Tel. 932607465; Fax. 932607466; E-mail: gcapella@iconcologia.net

ABSTRACT

Background & Aims. We identified for first time the novel *APC* N1026S variant of unknown malignant potential in the *Adenomatous Polyposis Coli (APC)* gene in a Spanish Attenuated Familial Adenomatous Polyposis (AFAP) family. The variant was located in the first of the four highly conserved 15-amino acid (AA) repeats within the β -catenin union domain. Our aim was to determine its functional relevance in order to establish its pathogenicity.

Methods. N1026S variant was analyzed in 25 members of the AFAP family studied, in 236 sporadic colorectal cancer (CRC) cases, 203 matched controls and 205 unrelated familial CRC cases. To assess its effects on β -catenin binding and β -catenin/Tcf-4-mediated transcription we performed affinity chromatography experiments, BIAcore assays, luciferase reporter assays and assessment of *c-myc* mRNA levels, a well-known target of the β -catenin/Tcf-4 pathway.

Results. N1026S variant co-segregated with the disease in the AFAP family studied. None of the sporadic or familial cases as well as the controls analyzed was positive for the variant. N1026S variant completely precluded β -catenin binding to the first 15-AA repeat and diminished it when all

the four 15-AA repeats were present (p-value=0.05). Expression of *APC* N1026S resulted in a 1.45-fold increase in β -catenin/Tcf-4-mediated transcription (p-value=0.00003) and a 1.2-fold increase in *c-myc* mRNA levels (p-value=0.057) when compared to *APC* WT.

Conclusions. These findings strongly support a pathogenic role of the *APC* N1026S variant in the AFAP phenotype, reinforcing the importance of functional characterization of *APC* variants for genetic counseling.

INTRODUCTION

Classical Familial Adenomatous Polyposis (FAP) is an autosomal dominant inherited disease caused by germline mutations in the *Adenomatous Polyposis Coli (APC)* tumor suppressor gene. FAP patients typically develop hundreds to thousands of adenomatous polyps in the colon and rectum by the third decade of life. If left untreated, one or more adenomas progress to carcinoma by 45 years of age.¹ Truncating germline mutations in the *APC* gene are responsible for the majority of FAP cases,² while in a minority of cases missense mutations are detected.³ Attenuated FAP (AFAP) patients generally present with a lower number (<100) of colorectal adenomas by their fourth decade and have

a later age of onset of colorectal cancer (CRC). AFAP is mainly associated with germline mutations in the 5' and 3' ends of the *APC* gene.⁴ Very recently, several studies have demonstrated that, in some cases, mainly showing an autosomal recessive pattern of inheritance, AFAP is associated with biallelic germline mutations in the base-excision repair gene *MYH*.⁵

The APC protein plays an integral role in the Wnt signaling pathway, as it binds and down-regulates β -catenin.⁶ The central region of the APC protein contains four 15-amino acid (AA) repeats that bind β -catenin,⁷ being the fourth 15-AA residue motif, located just C-terminal to the third repeat, recently described.⁸ This region also contains seven 20-AA repeats that trigger β -catenin down-regulation through the formation of a protein complex together with axin, conductin, and the glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β).⁹ It has also been suggested that APC acts as a nuclear exporter of β -catenin,¹⁰ inducing its cytoplasmic degradation. Loss of functional APC, usually due to truncating mutations that remove the β -catenin regulatory domain, leads to nuclear accumulation of β -catenin,⁶ which binds to members of the Lef/Tcf family of transcription factors, such as Tcf-4,¹¹ activating transcription of target genes as *c-myc*,¹² involved in early transformation of the colonic epithelium.

In both classical and attenuated FAP, germline missense variants leading to single AA changes in the *APC* gene, such as I1307K, E1317Q or D1822V, have been reported although their contribution to FAP is controversial,^{3, 13-17} thus limiting their potential use in genetic counseling.^{13, 17} Co-segregation of the variant with the disease, absence of the variant in control population, location of the variant within the protein, the nature of the AA substitution and evolutionary conservation of the involved codon are used to estimate their contribution to tumorigenesis. Unfortunately, these criteria are frequently insufficient to predict the significance of missense variants, reinforcing the need of functional assays.

We identified the novel *APC* N1026S germline missense variant of unknown malignant potential in one Spanish AFAP family. We aimed to functionally characterize this variant because it results in an *asparagine to serine* change in a highly conserved residue in the central third of the APC protein, a region that mediates β -catenin union and has been shown to be sufficient for its tumor suppressor activity.¹⁸ Also, the crystal structure of the first 15-AA repeat of the APC domain bound to the armadillo region of β -catenin⁸ revealed that the

side chain of APC Asn1026 forms a hydrogen bond with β -catenin Asp390 and APC Ser1028. We hypothesized that *APC* N1026S variant could affect the binding of APC with β -catenin therefore having a dominant negative effect on APC function. The aim of this study was to determine the biological and functional significance of the *APC* N1026S variant by investigating the effect of this mutation on the interaction between APC and β -catenin and its impact on β -catenin/Tcf-4-mediated transcription.

MATERIALS AND METHODS

Subjects

APC N1026S variant was found in a single Spanish AFAP family after sequencing the complete coding sequence of the *APC* gene. After identifying the variant in the index case, it was analyzed in 25 blood relatives of the AFAP family available for study (Figure 1). In addition, 236 sporadic CRC cases and 203 age and sex frequency matched controls were genotyped for the variant. Sporadic CRC cases were patients with a new diagnosis of CRC attending the Bellvitge Hospital in L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona, Spain, between January 1996 and December 1998. Controls were randomly selected among patients admitted to the hospital during the same period.¹⁹ A total of 205 familial colorectal patients were also included: 98 classical FAP, 40 AFAP, 13 hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) patients defined by Amsterdam Criteria I or II and 54 HNPCC-like patients (defined by one of this criteria: lack of only one Amsterdam criteria; diagnosis of CRC before age 45 years; or having two or more HNPCC-related tumors).²⁰ All subjects were informed and gave written consent to participate in the study and to allow their biological samples to be genetically analyzed, according to the Helsinki declaration. The Local Ethical Committee cleared the study protocol.

Molecular analysis

Peripheral blood for DNA extraction was obtained from all individuals. N1026S variant was assessed by means of fluorescent hybridization probe melting curves using the LightCycler[®] 2.0 System (Roche Molecular Biochemicals). A 382 bp fragment was amplified using the Light Cycler-FastStart DNA Master Hybridization Probes kit following manufacturer's instructions. Forward primer was 5'-CTGCCATACACATTCAAACAC - 3' and reverse primer was 5'-

TGTTTGGGTCTTGCCCATCTT - 3'. Allelic discrimination was performed by melting curves using two labeled probes: a sensor fluorescein and an anchor LC-Red640. To discard the presence of other mutations in the index case of the AFAP family carrying the variant, we sequenced the whole coding region of *APC* and the most frequently mutated exon of β -catenin (exon3). We also analyzed by means of LightCycler® 2.0 the presence of the two most prevalent variants in the *MYH* gene: Y165C and G382D.

Plasmids

Expression plasmids pCMV-APC, containing full-length *APC*, and pCMV-APC1309 Δ , which encodes a C-terminal truncated APC mutant, were kindly provided by B. Vogelstein and K. Kinzler (Johns Hopkins University, Baltimore, MD). pCDNA 3.1 vector (Invitrogen) was used as a control. Reporter plasmids pTOPFLASH and pFOPFLASH, which contain, respectively, three copies of the optimal or mutant β -catenin/Tcf-binding motif upstream a firefly luciferase gene, were a generous gift of E. Sancho (Institut de Recerca Biomèdica de Barcelona). pRL-TK vector (Promega), which contains a herpes simplex virus thymidine kinase promoter driving a *Renilla* luciferase gene, was used as an internal control for transfection efficiency. pGEX-6P3- β -catenin expression vector was kindly provided by M. Duñach (Universitat Autònoma de Barcelona).

A DNA fragment corresponding to all the four β -catenin-binding 15-AA repeats of APC (APC 4x15, amino acids 1014-1197) was amplified by PCR from the entire *APC* cDNA of plasmid pCMV-APC using primers (upstream 5'-GCAGAATTCATGGATGATAATGATGGA-3'; downstream 5'-CTGACTCGAGGAATGAAAATGACTGTTTCTG T-3') containing *EcoRI* and *XhoI* sites at their 5'-ends, respectively. The 0.57-kilobase amplification fragment was digested with *EcoRI* and *XhoI* and cloned in the same sites of pGEX-4T1 plasmid. The absence of mutations in this fragment was verified by DNA sequencing.

Site-directed mutagenesis

The Ser1026 mutation was introduced into pCMV-APC and pGEX-APC-4x15 using the QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) following the manufacturer's instructions (primer sequences are available upon request). After amplification, the nicked plasmid was transformed and sequenced to confirm the mutation.

Expression and purification of recombinant proteins

WT and mutant APC 4x15 constructs, β -catenin and GST were expressed in *E. Coli* as GST fusion proteins and purified by affinity chromatography on glutathione-Sepharose beads (Amersham Pharmacia Biotech). GST domain was removed from GST- β -catenin fusion protein by digestion with PreScission protease according to the manufacturer (Amersham Pharmacia Biotech).

Affinity chromatography experiments

Two chromatography columns were generated by coupling three mg of WT (Asn1026 LDTPINYSLKYSDEQ) and mutant N1026S (Ser1026 LDTPISYSLKYSDEQ) peptides comprising the first β -catenin-binding 15-AA repeat of APC (amino acids 1021-1035) to 3.5 ml of BrCN-activated Sepharose 4B (Amersham Pharmacia Biotech). Then, 20 μ g of purified GST- β -catenin or GST as a control were incubated with immobilized peptides in the binding buffer 50mM KCl, 50mM HEPES, pH 7.6, 1mM MgCl₂, and 1mM EDTA in a final volume of 1ml for 30 min at 4°C. Beads were then extensively washed with binding buffer containing 300mM KCl. After washing, the unbound fraction was collected whereas bound proteins were eluted, first with buffer A (1M KCl pH 7.6) and then with buffer B (0.1M acetate and 0.5M NaCl pH 4). Samples were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western Blotting (WB) with specific monoclonal antibodies against β -catenin (Transduction Laboratories, Lexington, KY) or GST (Upstate Biotechnology, Inc.). Immunoblots were developed by chemiluminescence detection system (ECL, Pierce).

Binding analysis by real-time Biomolecular Interaction Analysis (BIAcore)

BIAcore 1000 (Biacore AB), a surface plasmon resonance (SPR) biosensor, was used to covalently immobilize approximately 0.07 pmoles/mm² (2800 resonance units -RUs-) of WT (APC 4x15Asn) or mutant (APC 4x15Ser) GST fusion proteins on a CM5 sensor chip at a flow rate of 10 μ l/min using the amine coupling method as described by the manufacturer. Two μ M of purified β -catenin without GST in HBS-EP buffer (0.15M NaCl, 0.01M HEPES pH7.4, 3mM EDTA and 0.005% surfactant P20) were injected over the sensor surface at a flow rate of 30 μ l/min. The sensor chip surface was regenerated with 0.05% SDS between experiments. The association, dissociation and regeneration phases were followed in real-time. For

each binding curve, the response obtained using control surfaces (no protein coupled) was subtracted. Sensograms were analyzed using BIAevaluation Software (v 4.1; Biacore AB).

Structural analysis of the interaction between the mutant N1026S peptide and β -catenin

A detailed structural analysis of the APC/ β -catenin complex was carried out based on the X-ray crystal structure⁸ deposited at the Protein Data Bank (ID code 1JPP) for a 15-AA β -catenin-binding repeat from APC bound to the armadillo repeat region of β -catenin. Using that PDB file as an input, the program PyMOL (<http://www.pymol.org>) was used for recreating absent atoms in the PDB file (side-chains of residues Lys1030 and Asp1033) and for generating a mutant peptide containing a Ser residue at position 1026. Positional restrained energy minimization for both peptides was carried out using the program GROMACS²¹ before the docking procedure. This step was carried out to ensure the docking process was initiated with energy-minimized structures, particularly for the mutant peptide whose structure was generated *de novo* using PyMOL. To analyze the structural consequences of this mutation in the interaction between the APC peptides with β -catenin, AutoDock²² was used for generating a set of poses for both complexes. The docking protocol incorporated, during the definition of active torsion angles, the polar contact restraints obtained from the energy-minimization process.

Reporter assays and analysis of protein expression

SW480 cells were transiently transfected with 0.5 μ g of the TCF reporter construct (pTOPFLASH or pFOPFLASH), 50 ng of phRL-TK as an internal control for transfection efficiency and 3 μ g of the expression plasmid pCMV-APC (APC WT, APC1309 Δ or APC N1026S) or the empty vector pCDNA 3.1 as a control using the LipofectAMINE PLUS method (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. Firefly and *Renilla* luciferase activities were determined with a luminometer using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) 24 h after transfection. To examine the expression level of APC and β -catenin proteins, WBs with specific monoclonal antibodies against APC (OP44; Oncogene Research Products, San Diego) and β -catenin (Transduction Laboratories, Lexington, KY) were performed. Immunoblots were developed by chemiluminescence detection system (ECL, Pierce).

As a loading control, actin was analyzed in all samples. β -catenin immunocytochemistry was performed in transfected cells grown on coverslips. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde/PBS for 20 min, incubated with 3% hydrogen peroxide in water for 10 min and permeabilized using 0.1% Triton X-100/PBS for 15 min. After blocking with goat serum for 1 h, cells were incubated with primary (1:200, mouse anti- β -catenin) and secondary (Envision anti-mouse, Dako) antibodies for 2 h and 30 min, respectively. 3,3'-Diaminobenzidine (DAB, Dako) was used as the chromogen.

Quantitative real-time RT-PCR

Total RNA was isolated from each transfection using Trizol® Reagent (Invitrogen™ life technologies) and expression levels of *c-myc* were analyzed 24 hours after transfection. 500 ng of total RNA was reverse transcribed using pdN6 primers and the MMLV Reverse transcriptase (Invitrogen™ life technologies). Subsequent real-time RT-PCR for *c-myc* amplification was performed in the LightCycler® 2.0 System (Roche) with the SYBR Green detection methodology, using specific primers: forward (exon 1), 5'-GCTGCTTAGACGCTGGATTTT-3' and reverse (exon 2), 5'-CTGCTGCTGCTGCTGGTAGAAG-3'. β -2-microglobulin was used as an internal control for normalization.

Statistical analysis

To evaluate the differences between APC WT and APC N1026S with respect to β -catenin/Tcf-4-mediated luciferase activity and *c-myc* expression data, we fitted a linear regression model adjusted by the effect of day. Data was conveniently log-scaled (base 2) to improve normality. Box plots were used to visualize and interpret the observed effects with respect to the basal category represented by APC WT. Significance was assessed by using the estimated parameters and their standard error from the model. To analyse the differences in β -catenin binding between WT and N1026S as assessed by BIAcore, we focused on R_{Umax} values. Since three curves were obtained for each condition, a Mann-Whitney test, which is a conservative and non-parametric test, was performed to assess significance. A significance level of 0.05 was set for the p-values assessment.

RESULTS

N1026S variant co-segregated with the disease in an AFAP family

We identified the novel *APC* N1026S germline missense variant in one out of 40 Spanish AFAP families analyzed. All AFAP affected relatives showed between 10 and 100 polyps covering the entire colon and age at diagnosis oscillated between 36 and 65 years. Other clinical features of the family are summarized in Figure 1. No other mutation was detected in the whole coding region of *APC* nor in exon 3 of *β-catenin* in the index member carrying the variant. The presence of *MYH* Y165C and G382D variants was also ruled out. N1026S variant co-segregated with the disease in the 9 affected members of the AFAP family studied and it was absent in 9 non-affected members, 3 of which were older than 52 years (Figure 1). In the last generation, 3 members did not carry the variant and 4 members were carriers having been called for colonoscopy. None of the remaining CRC cases [236 sporadic and 205 familial] or controls (0/203) analyzed harbored the mutation.

N1026S variant completely prevents β-catenin binding to the first 15-AA repeat

To evaluate *APC* N1026S effects on β-catenin binding, we performed affinity chromatography experiments using WT (Asn1026) and mutant (Ser1026) *APC* peptides (Figure 2). Unbound and bound GST-β-catenin or GST were quantified by WB. In the Asn1026 column incubated with GST-β-catenin, we observed GST-β-catenin in serial eluates (95-kDa band) after extensive washing (Figure 3A). However, in the Ser1026 column, all GST-β-catenin was collected in washes indicating that N1026S variant completely precludes β-catenin binding in this experimental setting. (Figure 3A). When columns were incubated with GST, we did not observe the 28-kDa band corresponding to GST in eluates, as all GST protein was collected in washes in both columns, indicating that binding of GST-β-catenin to columns was specific (Supplementary figure 1).

N1026S variant diminishes β-catenin binding to APC 4x15

Next, we performed SPR measurements with BIAcore to analyze differences in β-catenin binding to WT (*APC* 4x15Asn) or mutant (*APC* 4x15Ser) GST fusion proteins containing all the four β-catenin-binding 15-AA repeats (Figure 2), in order to see if the variant still prevents β-catenin binding

when the other three 15-AA repeats are present. A difference of approximately 1490 RUs (Δ RU_{max}) was observed in β-catenin binding between WT and mutant proteins, being higher for WT when compared to the N1026S one (p-value=0.05) (Figure 3B).

Mutant N1026S peptide is unable to establish stable contacts with β-catenin

Once energy-minimized structures were obtained for both the WT and the mutant peptides, PyMOL was used for analyzing the number of polar contacts (ie, hydrogen bonds). For the WT peptide, the RMSD (Root Mean Square Deviation) between the coordinates available from the PDB and the GROMACS minimized was only of 0.083 Å. The initial analysis indicated that the WT peptide has four polar contacts, whereas the N1026S mutant has only two polar contacts. From a structural point of view, the change of Asn1026 for Ser abolishes tertiary contacts between Asn1026 and Ser1028, giving rise to an increase in the internal flexibility of the peptide. At this stage, a docking strategy, using AutoDock, was pursued to evaluate the structural consequences of the mutation in the interaction with β-catenin as compared with the WT (Figure 4A). Figures 4B and 4C show an overlap of the clusters obtained during the docking process for the WT and the mutant peptide, respectively. An in-depth analysis of the different poses generated for the mutant peptide showed that the number of contacts with β-catenin was clearly lower than in the case of the WT peptide, and that the mutation of Asn1026 to Ser precludes the formation of a hydrogen bond with Asp390 in β-catenin. Finally, it was observed that, on average, the number of internal polar contacts at the output of AutoDock was of 3.43 for the WT peptide, and of 1.40 for the mutant peptide. Taken together, these data indicate that, from a structural point of view, the N1026S peptide is unable to establish stable contacts with β-catenin, as it happens with the WT peptide, mainly due to the flexibility of the peptide as a consequence of the lack of internal restraints.

N1026S variant moderately activates β-catenin/Tcf-4-mediated transcription

To determine the effects of *APC* N1026S expression on β-catenin/Tcf-4-mediated transcription we performed a luciferase reporter assay. SW480 cells were chosen for these studies because they have endogenous mutant *APC* (truncated at AA 1338) and constitutively active β-catenin/Tcf-4-mediated transcription. Moreover, it has already been

previously reported that introduction of full-length APC or the central region of APC into SW480 cells substantially reduces β -catenin levels and down-regulates β -catenin/Tcf-4-mediated transcriptional activity, while expression of APC1309 Δ is deficient in inhibiting transcription.^{6, 23} As expected, cells transfected with pCDNA3.1 and APC1309 Δ induced an 23-fold and 9-fold increase, respectively, in β -catenin/Tcf-4-mediated transcription respect to those transfected with APC WT (p-values < 0.000001 in both cases) (Figure 5A). Expression of APC N1026S induced an observed 1.45-fold increase in β -catenin/Tcf-4-mediated transcription when compared to APC WT (p-value=0.00003) (Figure 5A) in the presence of comparable amounts of APC protein (Figure 5C).

As *c-myc* has been broadly shown to be a target of the β -catenin/Tcf-4 pathway involved in deregulation of cell growth and proliferation,¹² we evaluated by RT-PCR whether *c-myc* up-regulation correlated to the expression of APC N1026S in SW480 cells. High levels of *c-myc* expression were observed in cells transfected with pCDNA3.1 and APC1309 Δ with respect to those transfected with APC WT, with an observed 1.59-fold change and 1.42-fold change respectively (p-values= 0.0003 and 0.001) (Figure 5B). In concordance with luciferase results, expression of APC N1026S resulted in a 1.2-fold increase in *c-myc* expression when compared to APC WT, close to statistical significance (p-value=0.057) (Figure 5B). These results indicate that APC N1026S variant moderately activates transcription of one of the most described up-regulated targets of β -catenin/Tcf-4 pathway: *c-myc* gene.

Next we wanted to explore whether this moderate up-regulation was associated with changes in the total amount of cellular β -catenin and/or in its subcellular distribution. We were not able to observe differences in the overall amount of cellular β -catenin among the distinct transfectants (data not shown). Also, immunocytochemistry of β -catenin in parental SW480 cells revealed an intense cytoplasmatic and nuclear staining in the overwhelming majority of cells that precluded meaningful comparisons with the remaining transfectants (data not shown).

DISCUSSION

Although missense mutations represent a minority of FAP mutations,³ the difficulty in reliably assessing the functional role of missense APC

variants is a challenge in the diagnosis and counselling of FAP and AFAP families. Functional assays should be helpful in this setting. Several missense variants in other genes, such as BRCA1 (breast cancer genes) or MMR (mismatch repair genes), have been functionally characterised to determine their pathogenicity within familial breast/ovarian cancer or HNPCC.²⁴⁻²⁶ However, no functional assays of APC missense variants has been carried out up to now, presumably due to the difficulty in designing and developing specific assays depending on the position of the variant along the different functional domains of the APC protein.

We identified the novel APC N1026S germline missense variant of unknown malignant potential in a Spanish AFAP family. The variant co-segregated with the disease and was not present in any of the familial and sporadic CRC and controls studied. Moreover, its location in a highly conserved residue of the APC gene within the critical area of the first 15-AA repeat within the β -catenin union domain, suggested that it could play a pathogenic role in the genesis of the observed phenotype. Since this information was not conclusive enough to be used in genetic counseling, we developed several assays to determine its functional significance.

We first investigated the effect of the variant on the physical interaction between APC and β -catenin. A small mutant peptide encompassing the first β -catenin-binding 15-AA repeat of APC, for which the crystal structure was available, was synthesized and a construct containing the four 15-AA repeats was used. In both settings, binding to β -catenin was altered. While in affinity chromatography experiments N1026S completely precluded β -catenin binding to the first 15-AA repeat, we observed a partial decrease in APC 4x15 binding to β -catenin, as assessed by BIAcore. Results observed with APC 4x15 constructs are likely to better reflect the whole protein situation.

β -catenin binding results were in concordance with structural analysis of the N1026S APC peptide/ β -catenin complex. The Ser1026 peptide is predicted to be unable to establish stable contacts with β -catenin. The change of Asn1026 for Ser precludes the formation of a hydrogen bond with β -catenin Asp390 and abolishes tertiary contacts between Asn1026 and Ser1028, giving rise to an increase in the internal flexibility of the peptide.

In silico and *in vitro* observations using mutant peptides or fusion proteins were further confirmed in *in vitro* experiments using the whole APC protein. We used SW480 cells, which show a

constitutively active β -catenin/Tcf-4-mediated transcription that can be reverted by inducing APC expression.^{6, 23} APC N1026S transfection was associated with a higher transcriptional activation (1.45-fold increase) and *c-myc* expression levels (1.2-fold increase) when compared to APC WT. The magnitude of these changes is lower than that induced by APC1309 Δ , a truncating mutation usually associated with a severe FAP phenotype. Altogether, our results strongly suggest that the whole APC N1026S protein partially precludes β -catenin binding and activates its downstream effectors.

The mechanism behind the β -catenin activation observed remains unclear. APC has been described to regulate β -catenin activity by either facilitating its cytoplasmic degradation or promoting its translocation out of the nucleus, two distinct but not exclusive ways of modulation. In line with previous observations by Morin *et al*,²⁷ we did not detect differences in the total amount of cellular β -catenin after expression of the different transfectants. Also, we did not detect differences in the subcellular distribution of β -catenin among transfectants. The consistency of binding analyses together with luciferase and *c-myc* expression results suggest that the limited sensitivity of our immunocytochemistry technique may preclude detecting modest changes in subcellular localization of β -catenin. Thus, while APC N1026S variant might affect APC nuclear exporter activity, we have not been able to prove it. The moderate activation of the β -catenin/Tcf-4-mediated transcription is consistent with the attenuated phenotype observed within the family.²⁸ Previous studies have described a correlation of the attenuated phenotype with the location of *APC* mutations²⁹ but not with its molecular nature. In our experience, while *APC* missense mutations are rare in classical FAP phenotype, they may be overrepresented in AFAP cases (González S, Blanco I and Capellá G, unpublished observations). Thus, the approach used in this study may be carried out to characterize those alterations present in AFAP families.

The strategy utilized here to further characterize the significance and pathogenesis of the N1026S *APC* gene variant may be also useful for other variants that are located within the β -catenin binding and/or down-regulation region, such as I1307K, E1317Q or D1822V, associated to familial and sporadic colorectal tumors.^{13, 15-17} While for mutations outside the first 15-AA repeat chromatography affinity experiments will have to be adapted, all mutations located within the APC 4x15 construct

can be evaluated with our BIAcore design. *In vitro* transfection studies could be useful for mutations predicted to affect the β -catenin transcription program. Finally, functional characterization of mutations in the oligomerization or microtubule-binding domain will need alternative strategies.

In conclusion, our findings strongly support a pathogenic role of the *APC* N1026S variant in the AFAP phenotype. Therefore, the variant should be tested in all at risk relatives so that they can be advised to adhere to a lifelong screening program,²⁰ reinforcing the importance of functional characterization of *APC* variants for genetic counseling.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank members of the Program of Molecular Diagnosis of Hereditary CRC for excellent technical support, A. Villanueva and M. Pineda for their helpful comments and suggestions on the manuscript and members of the Laboratori de Recerca Translacional for advice and help. We also thank A. Domínguez, P. Franken and R. Fodde for technical advice and M. Duñach, E. Sancho, B. Vogelstein and K. Kinzler for reagents.

BIBLIOGRAPHY

1. Jeter JM, Kohlmann W, Gruber SB. Genetics of colorectal cancer. *Oncology* (Williston Park) 2006;20:269-76; discussion 285-6, 288-9.
2. Lipton L, Tomlinson I. The genetics of FAP and FAP-like syndromes. *Fam Cancer* 2006;5:221-6.
3. Heinimann K, Thompson A, Locher A, Furlanetto T, Bader E, Wolf A, Meier R, Walter K, Bauerfeind P, Marra G, Muller H, Foerzler D, Dobbie Z. Nontruncating APC germ-line mutations and mismatch repair deficiency play a minor role in APC mutation-negative polyposis. *Cancer Res* 2001;61:7616-22.
4. Spirio L, Olschwang S, Groden J, Robertson M, Samowitz W, Joslyn G, Gelbert L, Thliveris A, Carlson M, Otterud B, *et al*. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 1993;75:951-7.
5. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, Hodges AK, Davies DR, David SS, Sampson JR, Cheadle JP. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 2002;30:227-32.
6. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in

- colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;275:1787-90.
7. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 1993;262:1734-7.
 8. Eklof Spink K, Fridman SG, Weis WI. Molecular mechanisms of beta-catenin recognition by adenomatous polyposis coli revealed by the structure of an APC-beta-catenin complex. *Embo J* 2001;20:6203-12.
 9. Behrens J, Jerchow BA, Wurtele M, Grimm J, Asbrand C, Wirtz R, Kuhl M, Wedlich D, Birchmeier W. Functional interaction of an axin homolog, conductin, with beta-catenin, APC, and GSK3beta. *Science* 1998;280:596-9.
 10. Rosin-Arbesfeld R, Cliffe A, Brabletz T, Bienz M. Nuclear export of the APC tumour suppressor controls beta-catenin function in transcription. *Embo J* 2003;22:1101-13.
 11. Behrens J, von Kries JP, Kuhl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 1996;382:638-42.
 12. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 1998;281:1509-12.
 13. Frayling IM, Beck NE, Ilyas M, Dove-Edwin I, Goodman P, Pack K, Bell JA, Williams CB, Hodgson SV, Thomas HJ, Talbot IC, Bodmer WF, Tomlinson IP. 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* 1998;95:10722-7.
 14. Wallis YL, Morton DG, McKeown CM, Macdonald F. 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* 1999;36:14-20.
 15. Slattery ML, Samowitz W, Ballard L, Schaffer D, Leppert M, Potter JD. A molecular variant of the APC gene at codon 1822: its association with diet, lifestyle, and risk of colon cancer. *Cancer Res* 2001;61:1000-4.
 16. Menendez M, Gonzalez S, Blanco I, Guino E, Peris M, Peinado MA, Capella G, Moreno V. Colorectal cancer risk and the APC D1822V variant. *Int J Cancer* 2004;112:161-3.
 17. Woodage T, King SM, Wacholder S, Hartge P, Struewing JP, McAdams M, Laken SJ, Tucker MA, Brody LC. The APC11307K allele and cancer risk in a community-based study of Ashkenazi Jews. *Nat Genet* 1998;20:62-5.
 18. Shih IM, Yu J, He TC, Vogelstein B, Kinzler KW. The beta-catenin binding domain of adenomatous polyposis coli is sufficient for tumor suppression. *Cancer Res* 2000;60:1671-6.
 19. Landi S, Moreno V, Gioia-Patricola L, Guino E, Navarro M, de Oca J, Capella G, Canzian F. Association of common polymorphisms in inflammatory genes interleukin (IL)6, IL8, tumor necrosis factor alpha, NFKB1, and peroxisome proliferator-activated receptor gamma with colorectal cancer. *Cancer Res* 2003;63:3560-6.
 20. Winawer S, Fletcher R, Rex D, Bond J, Burt R, Ferrucci J, Ganiats T, Levin T, Woolf S, Johnson D, Kirk L, Litin S, Simmang C. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology* 2003;124:544-60.
 21. Van Der Spoel D, Lindahl E, Hess B, Groenhof G, Mark AE, Berendsen HJ. GROMACS: fast, flexible, and free. *J Comput Chem* 2005;26:1701-18.
 22. Morris GM, Goodsell DS, Halliday RS, Huey R, Hart WE, Belew RK, Olson AJ. Automated docking using a Lamarckian genetic algorithm and an empirical binding free energy function. *J Comp Chem* 1998;19:1639-1662.
 23. Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3046-50.
 24. Phelan CM, Dapic V, Tice B, Favis R, Kwan E, Barany F, Manoukian S, Radice P, van der Luijt RB, van Nesselrooij BP, Chenevix-Trench G, kConFab, Caldes T, de la Hoya M, Lindquist S, Tavtigian SV, Goldgar D, Borg A, Narod SA, Monteiro AN. Classification of BRCA1 missense variants of unknown clinical significance. *J Med Genet* 2005;42:138-46.
 25. Trojan J, Zeuzem S, Randolph A, Hemmerle C, Brieger A, Raedle J, Plotz G, Jiricny J, Marra G. Functional analysis of hMLH1 variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. *Gastroenterology* 2002;122:211-9.
 26. Ollila S, Sarantaus L, Kariola R, Chan P, Hampel H, Holinski-Feder E, Macrae F, Kohonen-Corish M, Gerdes AM, Peltomaki P, Mangold E, de la Chapelle A, Greenblatt M, Nystrom M. Pathogenicity of MSH2 missense mutations is typically associated with impaired repair capability of the mutated protein. *Gastroenterology* 2006;131:1408-17.
 27. Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7950-4.
 28. Sieber OM, Segditsas S, Knudsen AL, Zhang J, Luz J, Rowan AJ, Spain SL, Thirlwell C, Howarth KM, Jaeger EE, Robinson J, Volikos E, Silver A, Kelly G, Aretz S, Frayling I, Hutter P, Dunlop M, Guenther T, Neale K, Phillips R, Heinimann K, Tomlinson IP. Disease severity and genetic pathways in attenuated familial

- adenomatous polyposis vary greatly but depend on the site of the germline mutation. *Gut* 2006;55:1440-1448.
29. Nieuwenhuis MH, Vasen HF. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): A review of the literature. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006.

LEGEND TO THE FIGURES

Figure 1. Pedigree of the Spanish AFAP family where the *APC* N1026S missense variant was identified. The arrow indicates the index case. Ages, cancer type, age at diagnosis and mutation status are shown.

Figure 2. Schematic overview of the β -catenin-binding 15-AA repeats domain of the APC protein. A schematic representation and AA sequence of the peptide comprising first 15-AA repeat used in the binding assay and the cloned fragment (APC 4x15) used in the BIAcore assay are shown. APC 4x15 fragment includes the four β -catenin-binding 15-AA repeats (highlighted in boxes). N1026S variant is shown in bold.

Figure 3. (A) Binding of β -catenin to WT and mutant peptides. Peptides were incubated with the indicated amounts of GST- β -catenin. Bound (B) and not bound (NB) GST- β -catenin was affinity-purified and analyzed by WB with anti- β -catenin monoclonal antibody. In the Asn1026 column we observe, after extensive washing, the 95-kDa band in eluates corresponding to β -catenin. However, in the Ser1026 column all β -catenin is collected with washes and no visible band can be seen in eluates, indicating that β -catenin binds to the WT but not to the mutant peptide. All experiments were performed in triplicate. FT, flow through; W1, first wash; W2, second wash; Wn, last wash; EA, eluate buffer A; EB, eluate buffer B.

(B) Sensogram showing the association and dissociation profiles of 2 μ M β -catenin injected over sensor surfaces immobilized with WT (APC 4x15Asn) or mutant (APC 4x15Ser) fusion proteins. The response in RUs was recorded as a function of time. Experiments were performed in triplicate.

Figure 4. (A) Detail of the interaction between the most populated cluster generated by AutoDock for the WT peptide (green) and the X-ray calculated structure (yellow) of the same peptide with β -catenin (surface representation). The RMSD was of

0.42 Å between both structures revealing that redocking was successful and that the parameters used for the docking were reasonable. **(B)** Overlap of the seven multi-clusters obtained for the docking of the WT peptide with β -catenin. The cartoon shows the high degree of overlapping between the generated poses indicating the convergence of the model obtained for the WT in its interaction with β -catenin. The close proximity of Asn1026 and Ser1028, also illustrated in the figure, explains why the side chains of these two residues form a hydrogen bond. **(C)** Overlap of the fifty clusters for 50 generated poses obtained for the docking of the N1026S peptide with β -catenin. In this case, the program is unable to obtain a consensus structure for the mutant peptide in its interaction with β -catenin, probably due to the conformational flexibility induced by the mutation.

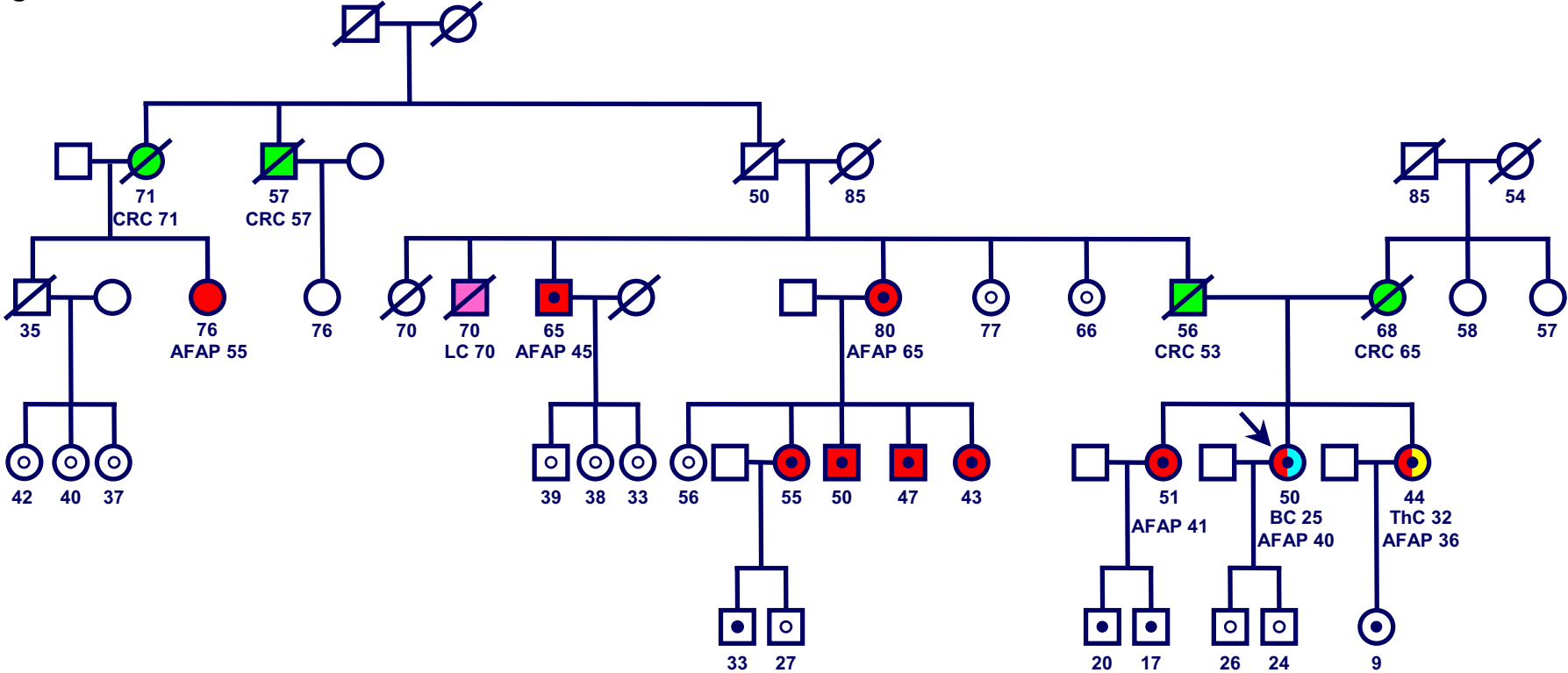
Figure 5. Effects of APC N1026S expression on β -catenin/Tcf-4-mediated transcription in SW480 cells. **(A)** Box plot representing the log-relative fold change of β -catenin/Tcf-4-mediated transcription with respect to APC WT is shown. Cells were transiently co-transfected with 0.5 μ g of pTOPFLASH or pFOPFLASH, 50 ng of pRL-TK as an internal control and 3 μ g of the expression plasmids pCMV-APC (APC WT, APC1309 Δ or APC N1026S) or the empty vector pCDNA 3.1 as a control. TOPFLASH and FOPFLASH activities were normalized using the *Renilla* pRL-TK activity. β -catenin/Tcf-4-mediated reporter activity was corrected for nonspecific transcription by the TOP/FOP ratio. Experiments were performed in duplicate or triplicate and 11 replicas were obtained. **(B)** Box plot representing the log-relative fold change of *c-myc* expression with respect to APC WT is shown. Results show the average of three independent experiments performed in duplicate or triplicate (n=8). **(C)** APC expression in transfected cells was analyzed by WB. The 147 kDa band corresponds to endogenous APC of SW480 cells (APC truncated at codon 1338). Lanes 1-3 (image enlarged below) show triplicates of APC1309 Δ expression (~135 kDa) and lanes 4-6 and 7-9 show triplicates of APC WT and APC N1026S expression (312 kDa). Total actin was used as a control for protein loading.

Supplementary figure 1. Binding of GST to WT and mutant peptides. Peptides were incubated with the indicated amounts of GST. Bound (B) and not bound (NB) GST was affinity-purified and analyzed by WB with anti-GST monoclonal antibody. In both

columns all GST is collected with washes. The lack of GST in eluates indicates that binding of GST- β -catenin to columns was specific. All experiments

were performed in triplicate. FT, flow through; W1, first wash; W2, second wash; Wn, last wash; EA, eluate buffer A; EB, eluate buffer B.

Figure 1



		Unaffected
		Attenuated Familial Adenomatous Polyposis, AFAP
		Colorectal Cancer, CRC
		Lung Cancer, LC
		Breast Cancer, BC
		Thyroid Cancer, ThC
		Non Carrier
		Carrier

Figure 2

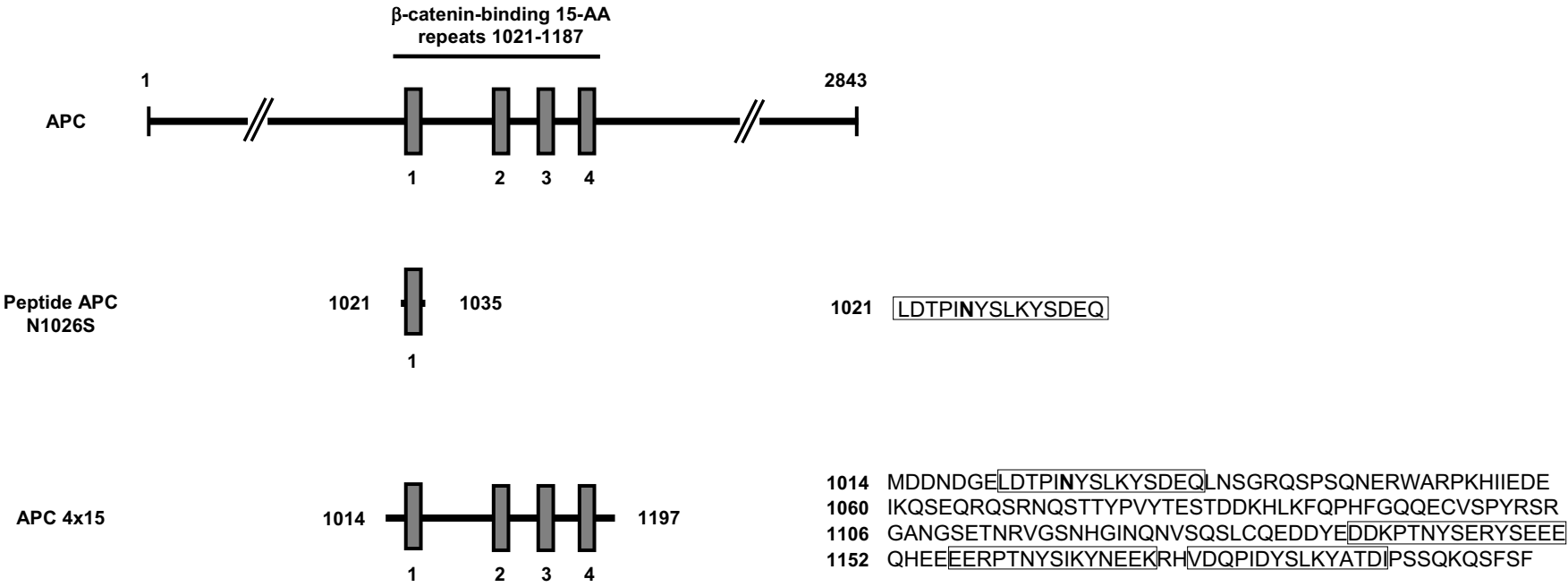
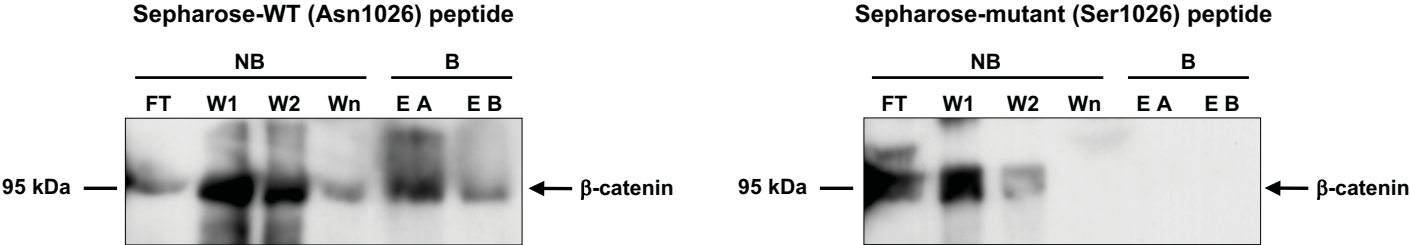


Figure 3

A



B

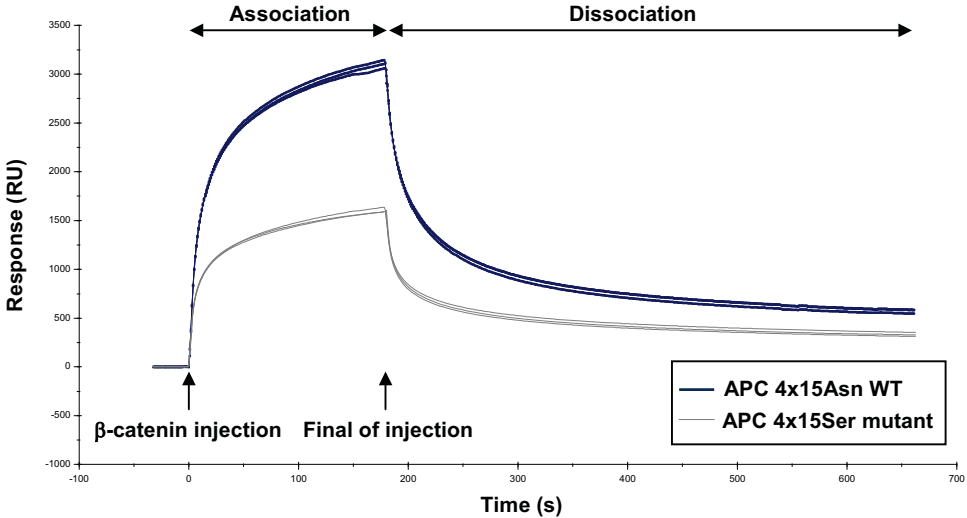
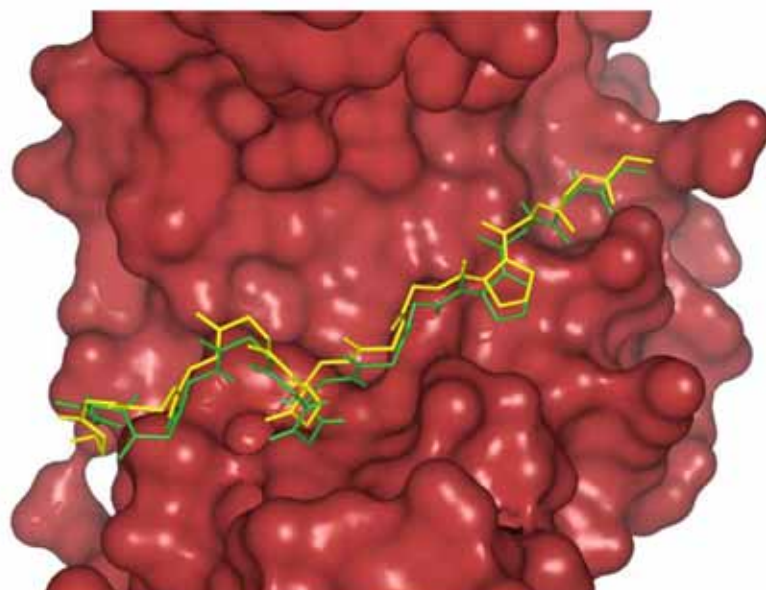
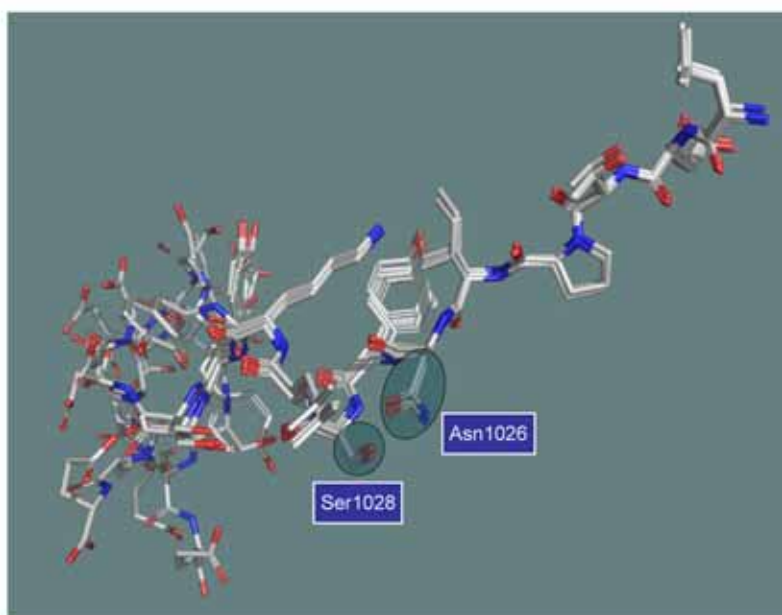


Figure 4

A



B



C

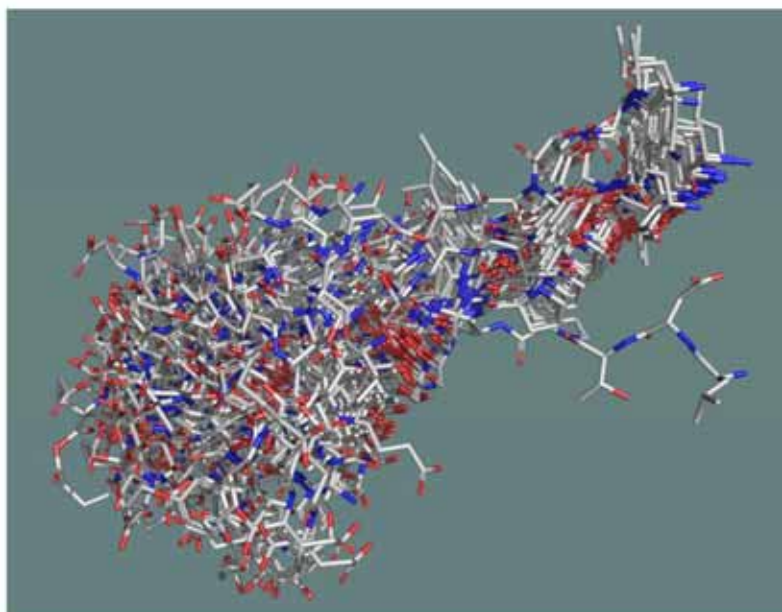
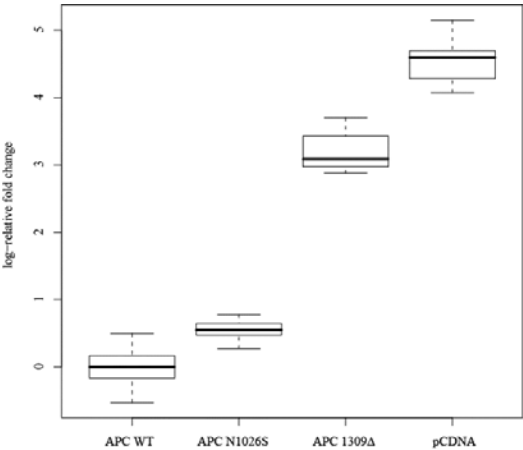
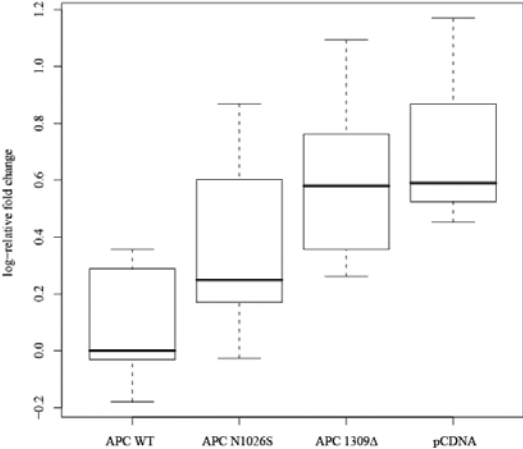


Figure 5

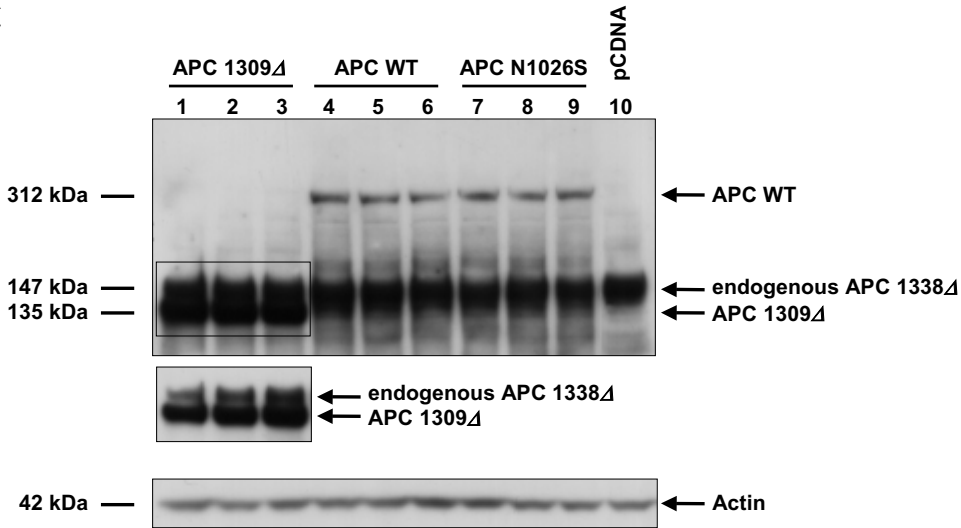
A



B



C



Supplementary figure 1

