



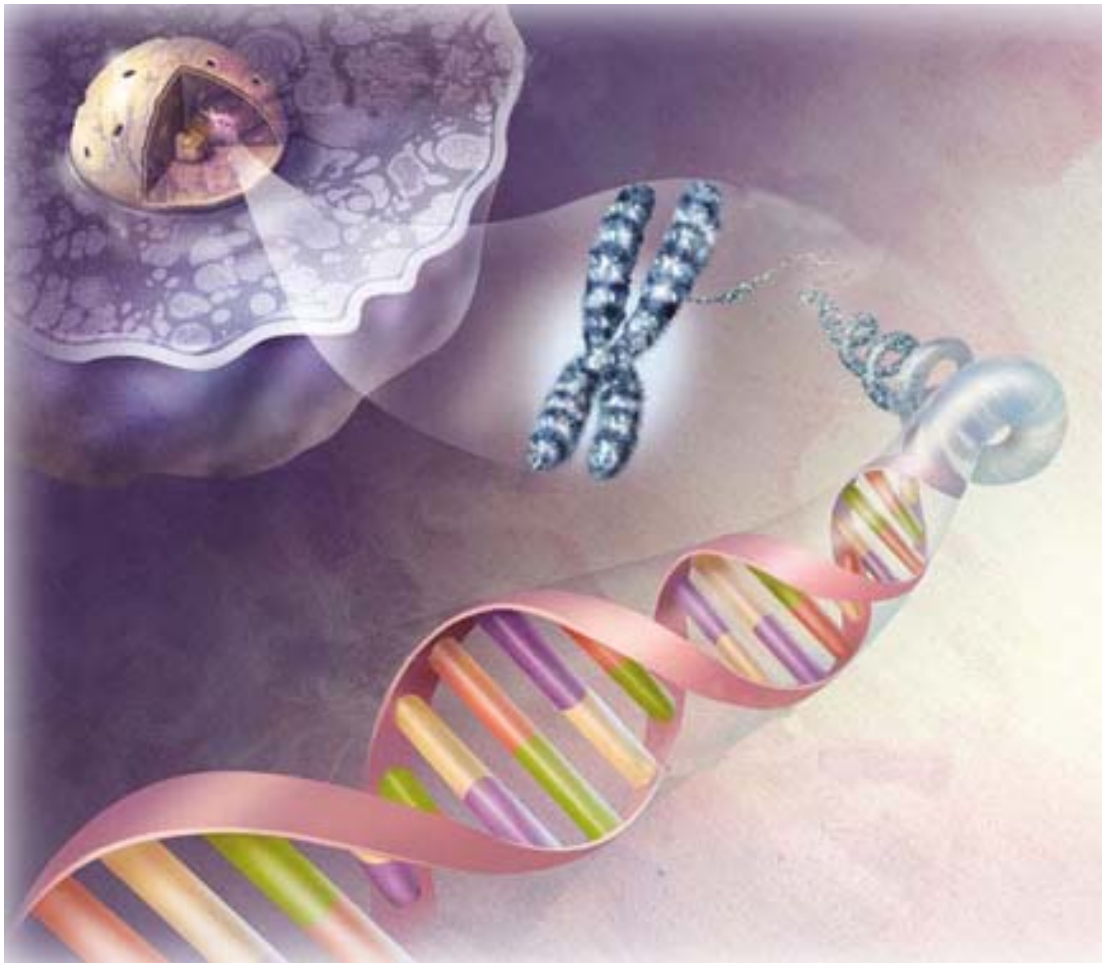
**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA**

**FACULTAT DE MEDICINA**

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA**

**I BIOLOGIA MOLECULAR**

## **LA INESTABILIDAD GENÓMICA EN CÁNCER**



Tesis presentada por **Hafid Alazzouzi**  
para la obtención del grado de Doctor en Biología

Estudio dirigido por:

**Dr. Simó Schwartz Navarro**  
**Director**

**Dr. Simon Schwartz Riera**  
**Tutor**

Tesis doctoral realizada en el Centro de Investigaciones en Bioquímica y Biología Molecular del Hospital Universitari Vall d'Hebron de Barcelona.

Barcelona, 2006

# **LA INESTABILIDAD GENÓMICA EN CÁNCER**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas  
por Hafid Alazzouzi

**Lugar:** Hospital Univesrtari de Vall d'Hebron. Barcelona

**Fecha:** 12 de Junio del 2006

**Hafid Alazzouzi**

Director de tesis

**Dr. Simó Schwartz Navarro**

Tutor de tesis

**Dr. Simon Schwartz Riera**

## **AGRADECIMIENTOS:**

**A mi Abuela Fátima  
A mis padres Zhor y Ahmed  
A mis hermanos  
A mis sobrinos  
A Beatriz  
A toda mi familia**

En la realización de los estudios que componen esta tesis doctoral han sido numerosas las personas que, de un modo u otro, han contribuido a que ésta pudiera llegar a buen fin. A todas ellas les estoy sinceramente agradecido. No obstante, quisiera mostrar de forma especial mi agradecimiento a ciertas personas que realmente me han ayudado a lo largo de este proceso y que han estado allí siempre que las he necesitado.

En primer lugar quisiera dar las gracias a mi director de tesis, el **Dr. Simó Schwartz**, por todo su esfuerzo, sus buenos consejos y su paciencia conmigo. La verdad es que han sido muchos años llenos de buenos recuerdos, muchos proyectos y también mucho trabajo. Gracias Simó por todo, espero continuar aprendiendo de ti.

Quisiera dar las gracias también al **Dr. Simon Schwartz Riera** por aceptarme en su grupo con los brazos abiertos (CIBBIM).

Así mismo, quisiera mostrar mi gratitud a **Laura Garcia** por inculcarme la necesidad de trabajar en un espacio ordenado, pero sobre todo por preocupaciones y consejos. Gracias, has sido muy buena amiga y compañera, no olvidare nunca tus recomendaciones.

También quisiera dar las gracias al **Dr. Diego Arango** y a su amable esposa **Beatriz** por brindarme su apoyo y amistad. Nunca olvidaré los maravillosos momentos vividos en los bosques de Helsinki buscando setas “Kiitos”.

Así mismo quisiera agradecer a la **Dra. M Fariol** sus interesantes y productivas conversaciones de pasillo.

Tampoco quisiera olvidarme de dar las gracias a mis compañeros. Para mí ha sido todo un privilegio trabajar con todos vosotros, día a día, durante estos años. Vuestra ayuda ha sido esencial para poder finalizar esta tesis: **Verónica**, gracias por revisar una y otra vez lo que iba escribiendo, ofreciéndome acertados comentarios, críticas y sugerencias. Y a tí **Enric**, gracias por tu colaboración continua en este proyecto y por tu gran paciencia conmigo y con los demás, seguro que ganarás el cielo. Tampoco tengo palabras suficientes para agradecer el apoyo incondicional de **Ángel y Julio**, y deseo a **Jordi** y a **José** mucha suerte en esta carrera que están empezando.

Gracias a **M<sup>a</sup> José** por tu gran ayuda y tus gestiones administrativas, y a **Isabel** por sus consejos y esas ricas tazas de té.

Gracias a los colegas de la planta 14: **Olga, Cristina, Tomas, Toni, Mariano, Jesús y Marta Valeri** por prestarme vuestra ayuda desinteresada cuando la necesite.

Gracias a los colegas del laboratorio de mitocondria: **Ramiro, Ricardo, Gisela, M<sup>o</sup> Carmen, David y Marc** que hacían mi trabajo diario más agradable.

Así mismo, gracias a **Luchy y Raquel** por su amabilidad al atender todas mis peticiones y solicitudes, que no han sido pocas. Gracias a **Olga, Maruja y Silvia** por su simpatía. Y por último, gracias a **Dr. J reventós, Dr. A Plaja, a Dr. E Espin, Dr. J. López, Dra. A Messaguer, Dr. T Andreu, a Dra. M Iglesias, Dra. Maite Quiles, Dra. M Antonia Arbós.**

De Manera general, quisiera mostrar mi agradecimiento a todos los miembros del Centro de Bioquímica i Biología Molecular (CIBBIM), que han estado presentes durante todo este tiempo. GRACIAS A TODO.

Por último, no podría de ninguna manera terminar estas páginas sin dar las gracias a todos los grandes amigos que me han apoyado:

- A la **familia Louah**, que ha sido como una segunda familia para mí en España.
- A **Nabil, Hamid, Nourddine, Youssef y Abdelrahman**, que aunque no he estado allí (Meknes), han sido amigos fieles y no me han olvidado.
- A **Rachida y Ahmed**, por tener unos hijos como **Adil y Leila**
- A **Alba, Esther, Anne Claude, Abdelmoula, Hicham, Mireia y Kubat**, por su gran amistad.
- A **Marta** y a **Nour**, por todo lo que hemos compartido y por su amistad incondicional. Felicidades a los dos por la nueva reina de casa, “SARA”.

A todas estas personas y a otras que no he nombrado, no por eso menos importantes, deseo expresar mi más sincero agradecimiento.

Quiero hacer mención, además, que este trabajo ha llevado cabo gracias a la aportación de una Beca FIS (FIS 01/1350) concedida por el Ministerio de Sanidad y Consumo.

# ÍNDICE GENERAL

## I. PRINCIPALES ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO

## II. INTRODUCCIÓN

1- Inestabilidad genómica	2
1.1. Inestabilidad cromosómica (CIN, Chromosomal <b>I</b> nstability)	2
1.2. Inestabilidad de microsatélites (MSI, <b>M</b> icrosatellite <b>I</b> nstability)	6
1.2.1- Los genes implicados en el sistema de reparación y los mecanismos	7
1.2.1.1- El sistema de reparación MMR en <i>Escherichia coli</i>	7
1.2.1.2- El sistema de reparación MMR en Eucariotas	8
1.2.1.3- Reconocimiento mediante los homólogos de MutS	9
1.2.1.4- Papel de homólogos de MutL en MMR	10
1.2.1.5- Detección de cadena errónea	11
1.2.1.6- Excisión y la resíntesis	11
2- Cáncer hereditario y las mutaciones en genes de reparación MMR	12
3- EL fenotipo mutador: (MMP: <i>Microsatellite Mutator Phenotype</i> )	17
4- El modelo de la haploinsuficiencia	19
5- Respuesta de los tumores MSI:	20
5.1- a la quimioterapia	20
5.2- a la radioterapia	22
<b>III. PROPÓSITO DE LA TESIS</b>	34
<b>IV. OBJETIVOS</b>	38
<b>V- ARTÍCULOS:</b>	40

**Artículo 1:** Simó Schwartz Jr, Hafid Alazzouzi and Manuel Perucho  
*Mutational dynamics in human tumors confirm the neutral intrinsic instability of the mitochondrial D-loop poly-cytidine repeat. Genes Chromosomes Cancer. May 17, 2006; 45(8), 770-780.* 41

**Artículo 2:** Menoyo A, Alazzouzi H, Espin E, Armengol M, Yamamoto H, Schwartz S  
*Jr. Somatic Mutations in the DNA Damage-Response Genes ATR and CHK1 in Sporadic Stomach Tumors with Microsatellite Instability. Cancer Research, November 1, 2001 61, 7727-7730.* 53

**VI- DISCUSIÓN** 58

<b>VII. CONCLUSIONES</b>	82
<b>VIII. ANEXOS</b>	85
<i>Anexo 1: Alazzouzi H, Domingo E, Gonzalez S, Blanco I, Armengol M, Espin E, Plaja A, Schwartz S, Capella G, Schwartz S Jr. <b>Low levels of microsatellite instability characterize MLH1 and MSH2 HNPCC carriers before tumor diagnosis.</b> <i>Human Molecular Genetics</i>, 2005; Vol. 14, No. 2 235–239.</i>	86
<i>Anexo 2: Alazzouzi H, Farriol M, Espin E, Armengol M, Pena M, Zeh K, Schwartz S, Schwartz S Jr. <b>Molecular patterns of nuclear and mitochondrial microsatellite alterations in breast tumors.</b> <i>Oncology Report</i>. 2003 Sep-Oct; 10(5):1561-7</i>	92
<b>IX. BIBLIOGRAFÍA</b>	100

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Sistema de reparación de errores replicativos y principales tipos de mutaciones asociadas.	16
Figura 2: Complejo de reconocimiento del sistema de reparación de errores replicativos.	16
Figura 3: Estrategia para el diagnóstico genético en pacientes con alto riesgo de cáncer colorrectal hereditario.	26
Figura 4: Los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial están codificados por el DNA mitocondrial y el DNA nuclear.	28
Figura 5: Mapa génica y de transcripción del DNA mitocondrial humano presentando diferentes enfermedades mitocondriales.	29
Figura 6: Inestabilidad de microsatélites en adenocarcinomas gástricos y su adenoma asociado. El tejido normal presenta una campana de Gauss en los cinco marcadores utilizados.	62
Figura 7: Modelo de generación de homoplasmia en el tejido tumoral. Los diferentes colores de mitocondria representan diferentes variantes del DNA mitocondrial.	74
Figura 8: Esquema representativa de acumulación de mutaciones en el DNAm <sub>t</sub> a lo largo del proceso tumoral del paciente 43.	74
Figura 9: Probabilidad de que un tumor contenga al menos una mutación homoplásmica en DNAm <sub>t</sub> según el modelo de Coller.	75
Figura 10: control del ciclo celular mediante la activación del <i>checkpoint</i> como respuesta a daño celular en el DNA por radiación ionizante (RI) o ultravioleta (UV).	81



## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: homólogos de Mut en levaduras y mamíferos	9
Tabla 2: Riesgos aproximados de cánceres colónicos y extracolónicos en el HNPCC	14
Tabla 3: Lista de genes mutados en secuencias repetitivas localizadas en una zona codificante en cáncer con MSI	18
Tabla 4: Criterios de Ámsterdam I	23
Tabla 5: Criterios de Bethesda para diagnosticar tumores colorrectales Con inestabilidad de microsatélites	24
Tabla 6: Criterios de Bethesda revisados para testar tumores colorrectales con inestabilidad de microsatélites	24
Tabla 7: Comparación de variantes encontradas en el D-loop del tejido normal y tumores MSS con diferentes grados de inestabilidad en secuencias repetitivas dinucleótidas.	71
Tabla 8: Resumen de alteraciones a nivel del DNA mitocondrial (D-loop) en casos de cáncer de estómago.	72
Tabla 9: Resumen de análisis mutacional de clones del tejido normal y tumoral del paciente 43 mediante la técnica de SSCP.	73

## RELACIÓN DE LAS PRINCIPALES ABREVIATURAS USADAS EN EL TEXTO

5-Fu.....	5-fluorouracil
ATP.....	Adenosine tri-phosphate
ATR-KD.....	<i>ATR-Kinase Dead</i>
BASC.....	<i>BRCA1-associated genome surveillance complex</i>
CCR.....	Cáncer Colorrectal
CIN.....	Chromosomal Instability
CpG.....	Cytosine Phosphate Guanine
DNA.....	Deoxyribonucleic acid
DNAmt.....	DNA mitocondrial
dNTPs.....	Deoxyribonucleotides triphosphates
DSB.....	Doble strand break
E.Coli.....	Escherichia coli
FISH.....	Fluorescence in situ hybridation
HNPCC.....	Hereditary Nonpolyposic Colorectal Cancer
ICG-HNPCC...	International Collaborative Group of HNPCC
IHQ.....	ImmunoHistoChemistry
Kb.....	Kilobase
LOH.....	<i>Loss Of Heterozygosity</i>
MMP.....	Microsatellite Mutator Phenotype
MMR.....	Mismatch repair
MSI.....	Microsatellite instability
MSI-H.....	Microsatellite instability high
MSI-L.....	Microsatellite instability-low
MSS.....	Microsatellite stable
NADH.....	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NHEJ.....	<i>non-homologous end-joining</i>
MGMT.....	O <sup>6</sup> -meGuanina- DNA metil transeferasa
Pb.....	Par de bases
PCR.....	Polymerase Chain Reaction
POLG.....	Polimerase gamma
PoliC.....	Polycitosine
RI.....	Radiación ionizante
ROS.....	Reactive oxygen species
rRNA.....	Ribosomal RNA
tRNA.....	Transfert RNA
UV.....	Ultravioleta

## **II. INTRODUCCIÓN**

## II. INTRODUCCIÓN

### 1. Inestabilidad genómica:

La combinación de los datos epidemiológicos y de biología molecular han demostrado que pueden requerirse múltiples cambios genéticos en tumorigénesis. Además consecuencia de estos cambios se podrían acumular más alteraciones genéticas afectan tanto a nivel cromosómico como genómico (nucleótidos), que conseguirían acelerar el proceso tumoral. Por este motivo, el mantenimiento de la estabilidad genómica tiene una vital importancia para la supervivencia celular que depende de una correcta regulación de los sistemas de respuesta celular al daño genómico y de la integridad de los sistemas de reparación del mismo. Varios síndromes conocidos están caracterizados por alteraciones genómicas, lo que permite utilizar estos síndromes para definir el efecto producido en la respuesta al daño del DNA y anomalías en la reparación del DNA o cromosomas en células tumorales.

En células tumorales existen dos tipos de inestabilidad generadas a partir de vías diferentes: la inestabilidad a nivel cromosómico (translocaciones, deleciones, duplicaciones, aneuploidías o inversiones) y la inestabilidad en DNA (mutaciones puntuales, o deleciones/ inserciones de secuencias microsatélite).

Esta forma de inestabilidad (translocación) podría generarse mediante el mismo mecanismo que causa la aneuploidía, por lo menos en algunos cánceres, pero su función en la tumorigénesis todavía no está clara (Lengauer et al., 1997). La mayoría de canceres colorrectales demuestran una inestabilidad microsatélite (MSI) o una inestabilidad cromosómica (CIN) lo que sugiere que la inestabilidad genómica tiene un papel importante en el desarrollo del cáncer colorrectal.

#### 1.1. Inestabilidad cromosómica (CIN, Chromosomal Instability).

La inestabilidad cromosómica (CIN) es el tipo más común de inestabilidad genómica observada en cáncer de gastrointestinal y ocurre en casi el 85% de estos tumores. Pero a pesar de la alta frecuencia de CIN en cáncer y la implicación de la aneuploidía en el

proceso tumoral, los conocimientos de este fenómeno todavía no están claramente definidos.

Las alteraciones cromosómicas se pueden clasificar en dos tipos:

- Alteraciones numéricas: que incluyen la ganancia o pérdida de cromosomas enteros (aneuploidía) o de set completos de cromosomas (poliploidía).
- Alteraciones estructurales: incluyen amplificaciones, deleciones, inversiones y translocaciones cromosómicas.

Se han encontrado múltiples evidencias que demuestran que los genomas de las células tumorales son más susceptibles a alteraciones cromosómicas como roturas, intercambio de cromátidas hermanas, y cambios en la ploidía que los genomas de células normales, lo que sugiere que estas alteraciones pueden ser las responsables del desarrollo de los tumores (Nowell et al., 1986).

En la mayoría de tumores sólidos, existen múltiples alteraciones cromosómicas que no son específicas de la enfermedad, lo que dificulta el descubrimiento de aquellas que son importantes (Johansson et al., 1996). Sin embargo, estudios citogenéticos en tumores gastrointestinales han demostrado que existen algunas alteraciones que son recurrentes como las reorganizaciones del cromosoma 17, que conducen a la pérdida de su brazo corto, y las pérdidas del cromosoma 18 en tumores colorrectales (Muleris et al., 1990), y en tumores gástricos (Uchino S et al., 1992) Aparte de algunas otras alteraciones recurrentes menos frecuentes, existen una gran variabilidad en cuanto a las alteraciones cromosómicas que presenten los tumores y se pueden encontrar tanto monosomías, trisomías y poliploidías como deleciones, duplicaciones y otros tipos de alteraciones estructurales.

Lengauer y colaboradores han demostrado que la aneuploidía se debe al aumento anormal de la inestabilidad cromosómica que persiste durante el proceso tumoral (Lengauer et al., 1997). Para demostrarlo emplearon la técnica de hibridización *in situ* con fluorescencia (FISH) en líneas celulares de cáncer colorrectal utilizando un panel de sondas centroméricas, lo cual reveló un aumento de 10-100 veces en las pérdidas o

ganancias de cromosomas en líneas celulares aneuploides comparado con líneas celulares diploides. Mediante las técnicas de fusión celular y la transferencia cromosómica, Lengauer concluyó que el estado de aneuploidía no causa la CIN, y sugirió que el origen de la CIN son las mutaciones que permiten la ganancia de funciones. Al principio se pensó que las mutaciones en TP53 estaban relacionadas con la inestabilidad genómica pero estudios de Eshleman y Lengauer han demostrado que no existe una correlación entre mutaciones en TP53 y el fenotipo de CIN (Eshleman et al., 1988; Lengauer et al., 1997).

Las causas de inestabilidad cromosómica podrían estar relacionadas con la presencia conjunta de daño en el DNA (errores de replicación, fallos en mitosis, carcinógenos, etc.) y alteraciones en los puntos de control del ciclo celular (*checkpoints*), que aseguran el orden de los procesos dentro del ciclo e integran la reparación del DNA con la progresión de las diferentes etapas (Hartwell & Kastan, 1994). Los *checkpoint* se componen de complejas vías de transducción de señales, de manera que mutaciones en cualquiera de sus componentes pueden conducir, en presencia de alguna alteración como daño en el DNA, a una progresión aberrante del ciclo y, consecuentemente, a inestabilidad genómica (Funk, 1999). Existen como mínimo tres checkpoints que detectan errores y paran el ciclo: los *checkpoints* de daño genómico en las transiciones G1-S y G2-M y el *checkpoint* de mitosis (Kaufmann, 1995).

El *checkpoint* de mitosis asegura que las cromátidas no se separen hasta que todos los cromosomas estén alineados adecuadamente en el huso mitótico, evitando la iniciación de un nuevo ciclo si la mitosis no se ha completado en el ciclo anterior, lo que conduciría a endorreduplicación (Hartwell & Kastan, 1994). Muchas proteínas que regulan este *checkpoint* han sido investigadas en organismos inferiores tales como la *Drosophila*, *Saccharomyces cerevisiae*, y *Xenopus*, y estos estudios han demostrado la implicación directa de estas proteínas que controlan la separación de cromátidas hermanas en la transición de metafase a anafase. Este mecanismo está conservado evolucionamente desde los organismos inferiores hasta animales superiores (Aamon, 1999; Cahill et al., 1998). Mutaciones en genes que participan en este *checkpoint* podrían ser los responsables de la inestabilidad cromosómica. Cahill y colaboradores

han demostrado el papel de los genes de *checkpoint* de mitosis en la inestabilidad cromosómica en cáncer humano, ya que encontraron mutaciones en dos genes BUB1 y BUBR1 que participan en el *checkpoint* mitótico en líneas celulares con cáncer de colon y de estómago que presentan CIN (Cahill et al., 1998; Grabsch H et al., 2003). También se han identificado mutaciones en otros genes de *checkpoint* de mitosis: MAD2 y MAD1, en cáncer de mama y leucemia respectivamente (Jin et al., 1998). Y se ha descrito que la pérdida de estos genes produce anomalías en la segregación cromosómica y predispone a la aparición de cáncer (Michel et al., 2001). Sin embargo, el papel de los defectos del *checkpoint* mitótico en el desarrollo de aneuploidía se ha visto cuestionado por estudios recientes que, al analizar diferentes tumores no encuentran mutaciones ni en el hBUB1 ni en otros genes de este *checkpoint*. Pero se debe tener en cuenta que son muchas las proteínas que intervienen en la segregación cromosómica y que la alteración de cualquiera de ellas podría contribuir a la generación de aneuploidía (Loeb & Loeb, 2000).

También se ha sugerido que anomalías en el número y la función de centrosomas podrían ser responsables de la aneuploidía (Doxsey, 2001). Los centrosomas juegan un papel central en la segregación de cromosomas durante la mitosis. La amplificación de centrosomas observados en casos de cáncer se piensa que aumenta la frecuencia de mitosis anormales y la incorrecta segregación de cromosomas (Pihan et al., 2001; Zhou et al., 1998a). Estudios en *Drosophila* y *Saccharomyces cerevisiae* indican que STK15 tiene un papel en la maduración de centrosomas y en la segregación de cromosomas. La sobreexpresión de este gen puede llevar a anomalías en la mitosis y por lo tanto a CIN (Doxsey, 1998; Francisco et al., 1994; Glover et al., 1995). Además estudios en tumores de próstata y mama han demostrado una asociación entre la aneuploidía y anomalías en número de centrosomas (Lingle et al., 2002; Pihan et al., 2001), pero se requiere llevar a cabo más investigación en este tema para entender mejor el papel de centrosomas en la CIN.

Por otro lado, existen como mínimo dos *checkpoints* de daño genómico: uno en la transición G1-S y otro en la transición G2-M. El primero evita que la célula replique DNA dañado, y el segundo impide la mitosis si los cromosomas no están intactos.

Varias evidencias experimentales sugieren que alteraciones en estos *checkpoints* pueden conducir a inestabilidad cromosómica y al desarrollo de tumores. Numerosas proteínas implicadas en el *checkpoint* del daño de DNA fueron identificadas en levaduras y algunas de ellas tienen un papel en cáncer humano como las alteraciones encontradas en los pacientes con ataxia telangiectasia (uno de los síndromes de rotura cromosómica que predispone a cáncer) que afectan al gen ATM (**A**taxia **T**elangiectasia **M**utated), el cual es necesario para la inducción óptima de p53 tras la exposición a radiaciones ionizantes (Hartwell & Kastan, 1994). Aparte de p53 y ATM, hay otros genes implicados en el *checkpoint* de daño genómico que se han asociado con la tumorigénesis, estos incluyen ATR (gen relacionado con ATM), BRCA1, BRCA2 y ciclina E (Spruck et al., 1999). La inestabilidad cromosómica que resulta de errores en este *checkpoint* se asocia con una recombinación mitótica aumentada y con segregación cromosómica aberrante. De manera que esta última no sólo se origina, como pudiera parecer, por errores de *checkpoint* mitótico, ya que los cromosomas que contienen DNA dañado son susceptibles de alteraciones estructurales debido a las roturas de cadena simple o doble, pero además estos cromosomas pueden segregarse inadecuadamente porque las cromátidas hermanas estén todavía conectadas por DNA o uniones DNA-proteína (Lengauer et al., 1998).

### **1.2. Inestabilidad de microsatélites (MSI, Microsatellite Instability).**

La inestabilidad de microsatélites está caracterizada por mutaciones, principalmente deleciones, en secuencias repetitivas cortas (microsatélites) del genoma. Los microsatélites son por su propia naturaleza y estructura secuencias inestables, y tienden a formar bucles que de no ser reparados pueden conllevar a la aparición de estas alteraciones (deleciones/inserciones en las mismas). La inestabilidad genómica es frecuente, y se ha observado en más de 80% de los casos de HNPCC y alrededor de 10-15% en casos de cáncer colorrectal esporádico y cáncer gástrico (Ionov et al., 1993; Thibodeau et al., 1998).

La inestabilidad de microsatélites es el resultado de defectos en el sistema de reparación de bases desapareadas (“Mismatch repair”, MMR) que corrige los errores que se



producen durante la replicación del DNA, tales como inserciones o deleciones de un nucleótido o más, o la substitución de una base por otra (Jiricny, 1998a; Marra & Schar, 1999). Si estas mutaciones no son detectadas por el sistema de reparación, se acumulan en las células hijas durante la mitosis. De manera general, la DNA polimerasa incorpora nucleótidos no-complementarios en el DNA con una frecuencia de un error por cada 100.000 nucleótidos (Klingler et al., 2002). A esta acumulación de mutaciones puntuales cabe añadir las alteraciones que afectan a secuencias repetitivas durante la replicación del DNA.

### **1.2.1- Los genes implicados en el sistema de reparación y los mecanismos**

La preservación de la integridad genómica requiere el funcionamiento apropiado de varios mecanismos tales como la replicación, la reparación y el proceso de la recombinación. El sistema de reparación de bases desapareadas (MMR) es uno de los mecanismos correctores de errores. Estudios anteriores en bacterias y levaduras han demostrado el funcionamiento de este sistema y de los heterodúplex formados durante la recombinación genética. La identificación de la función protectora del sistema MMR en cáncer humano ha ayudado a conocer mejor el mecanismo, y ha llevado al descubrimiento de nuevas funciones de MMR en células eucariotas.

#### **1.2.1.1- El sistema de reparación MMR en *Escherichia coli***

El aislamiento de material genético de *E.coli* con alta frecuencia de mutaciones espontáneas, ha permitido la identificación de 4 genes que juegan un papel central en MMR: *mutS*, *mutL*, *mutH*, y *mutU*. La caracterización de funciones de los genes *mut* en la corrección de errores durante replicación se ha facilitado mediante la purificación de proteínas, y la reconstitución de reacción del sistema de reparación de *E.coli in Vitro* (Modrich & Lahue, 1996).

MutS es un ATPasa (Haber & Walker, 1991) que actúa como un homodímero que rodea bases desapareadas o pequeños lazos de inserciones/deleciones que se escapan a la corrección de la polimerasa durante la replicación (Modrich & Lahue, 1996). Por su

parte, MutH es una endonucleasa que introduce una muesca (nick) en la nueva cadena como secuencias de GATC hemi-metiladas, que permite distinguir entre la cadena madre y la nueva cadena sintetizada, (Au et al., 1992; Hall & Matson, 1999). MutL tiene un papel importante en el reconocimiento de MMR. Primero, un homodímero de MutL forma un complejo con MutS (Galio et al., 1999; Grilley et al., 1989; Wu & Marinus, 1999) y esto activa la hidrólisis de ATP (Allen et al., 1997; Modrich & Lahue, 1996), probablemente como parte de la búsqueda de la cadena errónea. Segundo, MutL estimula la actividad endonucleasa de MutH de manera dependiente de ATP (Au et al., 1992; Ban & Yang, 1998b; Hall & Matson, 1999). Tercero, MutL requiere a MutU (HelicaseII/UvrD) para llegar al sitio donde MutH ha introducido la muesca (nick) (Dao & Modrich, 1998; Yamaguchi et al., 1998), facilitando el desenrollamiento del DNA y el traslado subsecuente de exonucleótidos a la nueva cadena.

Previamente, la actividad bioquímica de MutL no estaba muy clara pero estudios recientes sugieren que la unión y la hidrólisis de ATP con MutL son cruciales para MMR. El dominio N-terminal de MutL es similar a los dominios de unión a ATP y de hidrólisis de algunas proteínas tales como Hsp90, GyrB, entre otras (Ban et al., 1999; Ban & Yang, 1998a), demostrando que son dominios conservados. De hecho, estudios bioquímicos han demostrado que el MutL tendría también una actividad ATPasa, aunque baja (Ban et al., 1999; Ban & Yang, 1998a). Además mutaciones en sitios necesarios para la unión y la hidrólisis de ATP (Ban et al., 1999) inactivan el MMR *in vivo* (Aronshtam & Marinus, 1996).

Estudios detallados indican que la unión de ATP induce cambios conformacionales en MutL y estos cambios facilitarían las interacciones con otras proteínas involucradas en MMR, tales como MutS, probablemente coordinando el proceso de MMR (Ban et al., 1999).

#### **1.2.1.2- El sistema de reparación MMR en Eucariotas:**

Las proteínas implicadas en el proceso de MMR están muy conservadas evolutivamente, lo que pone de manifiesto la importancia de este tipo de reparación para

mantener la integridad del genoma en todos los organismos, desde bacterias a eucariotas superiores.

En levaduras y mamíferos, existen múltiples homólogos de MutS y MutL (Tabla 1) que reflejan la conservación del proceso de MMR, así como la especialización y la superposición del funcionamiento de los productos de genes de MMR.

<b>E. coli</b>	<b>S.cerevisiae</b>	<b>H.sapiens</b>
MutS	Msh2, Msh6, Msh3	Msh2, Msh6, Msh3
	Msh1	*
	Msh4, Msh5	Msh4, Msh5
MutL	Mlh1	Mlh1
	Pms1	Pms2
	Mlh2, Mlh3	Pms1, Mlh3
MutH	*	MED1
MutU (UvrD)	*	*

\* No esta identificado

**Tabla 1:** homólogos de Mut en levaduras y células eucariotas

### 1.2.1.3- Reconocimiento mediante los homólogos de MutS:

Se ha identificado seis genes homólogos de MutS en células eucariotas (Tabla 1). MSH2, MSH3 y MSH6 forman dos heterodímeros que reconocen DNA desapareado: MutS $\alpha$  (MSH2/MSH6) y MutS $\beta$  (MSH2/MSH3), (Acharya et al., 1996; Drummond et al., 1995; Habraken et al., 1996; Hughes & Jiricny, 1992; Marsischky et al., 1996). MutS $\alpha$  se une preferentemente a bases desapareadas y a zonas de inserción/delección de una base, mientras que MutS $\beta$  se une predominantemente a zonas de inserción/delección de 2-4 bases (Jiricny, 1998b). En células humanas, el complejo MutS $\alpha$  tiene una actividad predominante (Genschel et al., 1998; Marra et al., 1998). Figura 1

Al igual que MutS bacteriano, MSH2 y MSH6 de eucariotas tienen actividad intrínseca de unión e hidrólisis de ATP que son necesarios para el sistema MMR *in vitro* e *in vivo* (Alani et al., 1997; Iaccarino et al., 1998; Studamire et al., 1998). Estos genes son

---

imprescindibles para el reconocimiento de errores cometidos en la replicación del DNA (Alani et al., 1997; Drummond et al., 1995; Gradia et al., 1997; Iaccarino et al., 1998), probablemente la unión y la hidrólisis de ATP facilita las interacciones entre proteínas y/o el deslizamiento a lo largo del DNA (Blackwell et al., 1998a; Blackwell et al., 1998b; Gradia et al., 1999). Finalmente se han propuesto funciones asimétricas para MSH2 y MSH6, ya que las mutaciones que afectan el dominio de unión de ATP de MSH6 parecen más nocivas para la actividad de MutS $\alpha$  que las mismas mutaciones en MSH2 (Iaccarino et al., 1998; Studamire et al., 1998).

#### **1.2.1.4- Papel de homólogos de MutL en MMR:**

Se ha identificado varios homólogos de MutL en levaduras y en células de mamíferos (Tabla 1). Los homólogos de MutL son MLH1, PMS2 (Pms1 en levaduras), y PMS1 (Mlh3 en levaduras), los cuales pueden interaccionar para formar dos heterodímeros, MutL $\alpha$  (MLH1/PMS2) (Guerrette et al., 1999; Li & Modrich, 1995; Prolla et al., 1994) y MutL $\beta$  (MLH1/PMS1).

Estudios recientes han comenzado a dar pistas sobre el papel de MutL $\alpha$  en MMR.

MutL $\alpha$  puede interaccionar con MSH2 (Prolla et al., 1994), MutS $\alpha$  (Habraken et al., 1998), MutS $\beta$  (Habraken et al., 1997) y con el antígeno nuclear de proliferación celular “*Proliferating Cell Nuclear Antigen*” (PCNA) (Gu et al., 1998; Umar et al., 1996), lo cual es consistente con el ensamblamiento de un complejo de orden superior durante MMR. Así, como en el MMR bacteriano, los complejos MutS/MutL de eucariotas pueden reclutar elementos adicionales en la zona de reparación, como MutL $\alpha$ , por analogías con las bacterias, acoplado el reconocimiento del apareamiento incorrecto y la discriminación de la cadena, la excisión y resíntesis. La función acopladora del heterodímero MutL $\alpha$  probablemente depende de la unión de ATP y/o de la actividad de hidrólisis por los sitios N-terminal conservados de MLH1 y PMS2 (Ban & Yang, 1998a). De hecho, se ha encontrado un porcentaje significativo de pacientes de HNPCC con mutaciones de sentido incorrecto en la región N-terminal de MLH1 (Peltomaki & Vasen, 1997), lo que se ha propuesto, podría interrumpir la unión del ATP o su hidrólisis (Ban et al., 1999).

### **1.2.1.5- Detección de cadena errónea:**

El mecanismo por lo cual se detectan las cadenas erróneas está desconocido incluso en bacterias (*E.coli*), aunque estudios en levadura y mamíferos han demostrado la implicación de PCNA en este proceso, ya que este puede interactuar con los homólogos de MutS y MutL de mamíferos y de levaduras (Gu et al., 1998; Johnson et al., 1996; Umar et al., 1996). Los análisis genéticos en levaduras indican que las mutaciones en PCNA pueden aumentar la frecuencia de cambios que alteran pauta de lectura (frameshifts) en secuencias repetitivas simples por la interrupción del MMR (Johnson et al., 1996; Umar et al., 1996).

Estudios de extractos de células humanas, han manifestado que PCNA se requiere prematuramente en el proceso de MMR tanto antes como durante el paso de la excisión (Gu et al., 1998; Johnson et al., 1996), así como en la resíntesis (Gu et al., 1998). En el caso de ausencia de PCNA, el MMR no puede distinguir entre la cadena neosintetizada y la cadena madre, y esto probablemente conduce a la formación de un bucle lo que conduce a la rotura del DNA de doble cadena. A partir de estos descubrimientos se ha propuesto un modelo que propone que PCNA actúa relacionando el complejo MMR con la DNA polimerasa durante la replicación (durante la bifurcación), posiblemente facilitando el reconocimiento y la reparación de la cadena neosintetizada (Umar et al., 1996). Por otro lado, se ha propuesto a MED1 como homólogo de MutH (Bellacosa et al., 1999). Teniendo en cuenta que MED1 se une fuertemente a DNA metilado, que su estructura está muy relacionada con endonucleasas de reparación por excisión de base (Bellacosa et al., 1999), y que la metilación cumple una función en la discriminación de cadenas en células de mamíferos (Jiricny, 1998b), MED1 ha sido considerado como un homólogo funcional de MutH. Además, se ha visto que su sobreexpresión causa MSI. (Figura 2)

### **1.2.1.6- Excisión y la resíntesis:**

Estudios genéticos en levaduras han identificado la implicación de tres exonucleasas en MMR: ExoI, y las exonucleasas proofreading de las DNA polimerasa  $\delta$  y  $\epsilon$ . ExoI es una

Exonucleasa 5'-3' identificada en *S. pombe*, que se activa para evitar las mutaciones (Szankasi & Smith, 1995). Además, estudios en *S.cervisiae* demostraron que ExoI interacciona con Msh2 y Mlh1 (Tishkoff et al., 1997), y que la interrupción de ExoI da una sensible ventaja a la aparición de fenotipo mutador (Tishkoff et al., 1997; Tran et al., 1999). Un homólogo de ExoI en humanos (EXO1/HEXI), que interacciona con MSH2 (Schmutte et al., 1998) también ha sido identificado (Tishkoff et al., 1998; Wilson et al., 1998). Se ha propuesto que exonucleasas proofreading de las DNA polimerasas  $\delta$  y  $\epsilon$  son funcionalmente redundantes con ExoI (Tran et al., 1999). La inactivación combinada de ExoI y la función exonucleasa de las dos polimerasas causa un aumento de mutaciones, similar al observado en la deficiencia de MMR (Tran et al., 1999). La resíntesis de la cadena cortada parece que esta seguida por una acción coordinada de la DNA polimerasa  $\delta$ , y posiblemente otras DNA polimerasas (Modrich, 1997; Thomas et al., 1991), PCNA, y la proteína de replication A (RPA) (Lin et al., 1998b). La DNA ligasa que completa la reacción de MMR no ha sido aún identificado.

## **2- Alteraciones en genes de reparación MMR en cáncer.**

La inestabilidad de microsatélites es una característica de los pacientes con cáncer colorrectal hereditario no polipósico (HNPCC) pero también puede afectar tumores esporádicos. Los principales tejidos caracterizados por la inestabilidad de microsatélites que podemos citar son: el tejido colorrectal, estómago, y endometrio.

El HNPCC es la causa hereditaria más común de CCR. Se conoce también como el síndrome de Lynch, en honor a su descubridor. Se trata de una enfermedad familiar de carácter dominante, no ligada al sexo que afecta tanto a los hombres como a las mujeres. El 50% de los afectados por el HNPCC tienen riesgo de padecer cáncer a los 45 años de edad (Vasen et al., 1991).

Existen dos tipos de HNPCC:

- Los síndromes de Lynch **de tipo I**, donde el riesgo de padecer cáncer está ligado únicamente al CCR.

- Los síndromes de Lynch **de tipo II** que desarrollan cáncer colorrectal (78%) (Thorson et al., 1999) pero también cánceres extracolónicos, en especial cáncer de endometrio, vías urinarias, estómago, vías biliares, intestino y ovario (Watson & Lynch, 1993) (Tabla 2)

El cáncer de **endometrio**, estimado como el segundo cáncer más frecuente (Vasen et al., 1994) afecta por lo menos un miembro en el 50% de las familias (Watson et al., 1994). Los portadores tienen un riesgo de desarrollar este cáncer 10 veces mayor que la población general y este aparecerá unos 15 años antes (media 48 años) que lo estimado para el resto de la población (55-75 años) (Lynch et al., 1978), encontrándose el 98% antes de los 65 años.

El cáncer de **estómago** lo sigue en frecuencia (Park et al., 2000), duplicándose su riesgo para los portadores de mutaciones en relación a la población general. Se estima una edad de presentación de 56 años y una supervivencia del 15% a los 5 años, pero que aumenta a 48% si la cirugía es radical (Aarnio et al., 1997).

En el caso del cáncer **vías biliares** el riesgo de desarrollar un cáncer esta en 18% de los pacientes con una historia familiar (Klein et al., 2001)

**Cáncer de ovario y HNPCC.** El riesgo de por vida que tiene una mujer para desarrollar cáncer de mama es casi el 13%, mientras que el riesgo de por vida de desarrollar cáncer de ovario es poco mayor al 1%. Aproximadamente del 5 al 10 % de los cánceres de mama y de ovario se deben a factores genéticos predisponentes conocidos. Esto significa que, de hecho, la mayoría de estos cánceres no son hereditarios.

**Cáncer de intestino y HNPCC:** el tumor de intestino delgado no es frecuente pero debe ser sospechado ante las manifestaciones clínicas que se desarrollan a edades tempranas, pero con un mejor pronóstico a 5 y 10 años que la población en general (Lin et al., 1998a).

Aunque el **cáncer de mama** no está considerado un tumor asociado al HNPCC, cuando existen ambas enfermedades, el cáncer de mama se diagnostica a edades más tempranas que en la población general. Por lo cual no se debe descartar su posible participación en la progresión del cáncer mamario.

Tejido afectado	Riesgo
Colon/recto	78%
Endometrio	43%
Estómago	19%
Vías biliares	18%
Vías urinarias	10%
Ovario	9%

**Tabla 2.** Riesgos aproximados de cánceres colónicos y extracolónicos en el HNPCC.

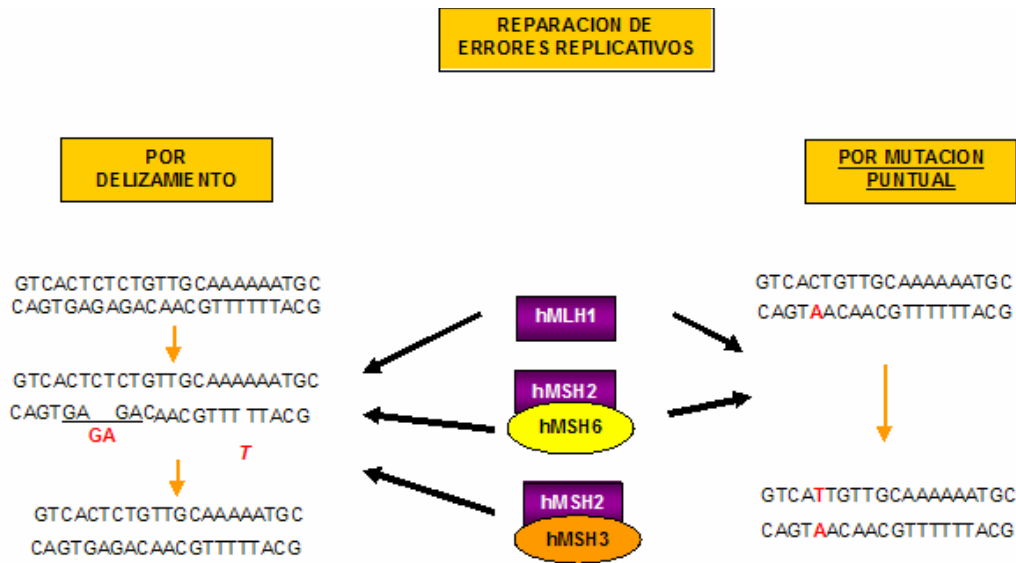
El HNPCC se ha asociado con mutaciones germinales en 5 genes del sistema MMR: MSH2, MSH6, MLH1, PMS1, y PMS2 (Akiyama et al., 1997; Lynch et al., 1997; Miyaki et al., 1997; Peltomaki & Vasen, 1997).

La mayoría de mutaciones encontradas en pacientes de HNPCC afectan los genes MLH1 y MSH2, mientras que mutaciones en PMS1, PMS2, y MSH6 son relativamente raras (Liu et al., 1996; Viel et al., 1998). Sin embargo, aún no se han identificado los genes de MMR responsables de más del 50% de pacientes de HNPCC, aunque se sospecha que mutaciones en otros genes relacionados con MMR pueden ser los responsables del desarrollo de tumores con MSI.

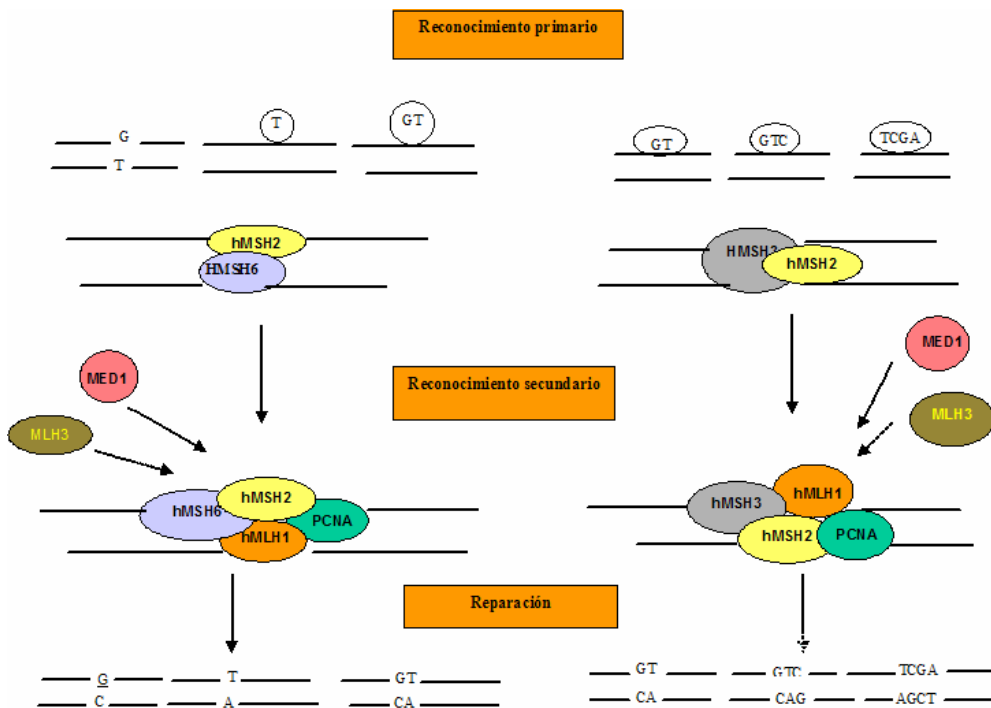
Los pacientes de HNPCC tienen en general una mutación germinal heterocigota en uno de los genes MMR y desarrollan cáncer después de 4 décadas de vida (Dunlop et al., 1997; Liu et al., 1996; Lynch et al., 1997). La MSI sólo aparece en los tumores y no en el tejido normal de los mismos pacientes (Kinzler & Vogelstein, 1996a), lo que indica que la pérdida o la inactivación del alelo normal es necesario para acelerar el proceso de tumorigénesis estableciéndose así un fenotipo mutador de carácter recesivo (Casares et al., 1995).



En algunos casos, se han identificado mutaciones en MSH6 (Akiyama et al., 1997; Miyaki et al., 1997) y pacientes con una mutación dominante de PMS2 o mutación homocigota de MLH1 que son mutaciones diferentes de las mutaciones típicas de HNPCC. Alternativamente, la carencia relativa de PMS2 y MSH6 en familias de HNPCC puede apuntar a funciones biológicas distintas, pero solapantes, de los genes del MMR (Prolla et al., 1998). De modo similar, las familias de HNPCC con una mutación en PMS2 pueden ser raras porque la pérdida de funciones de PMS2 podría ser compensada por otra proteína, por ejemplo por PMS1.



**Figura 1.** Sistema de reparación de errores replicativos y principales tipos de mutaciones asociadas.



**Figura 2.** Complejo de reconocimiento del sistema de reparación de errores replicativos. Adaptado de Lindahl T et al. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 7:158-169, (1997).

### **3-EL fenotipo mutador: (MMP: *Microsatellite Mutator Phenotype*)**

Los tumores de HNPCC se caracterizan por presentar diploidía o pseudopoliploidía. Además, aunque no presentan mutaciones en los genes tumorales comunes, acumulan numerosas mutaciones en microsatélites constituídos principalmente por polidesoxiadenosinas. La acumulación de estas mutaciones en el fenotipo mutador tiene consecuencias significativas para la estructura y función del genoma, ya que pueden alterar la organización de la cromatina e inducir cambios en la estructura del nucleosoma o modificar el patrón de expresión génica por mutaciones en los promotores de los genes.

La gran inestabilidad genómica en los microsatélites en estos tumores se explicó al comprobar la presencia de daño en los genes de reparación del DNA (microsatélite mutador phenotype; MMP). Las mutaciones identificadas se localizan en los genes hMSH2 y hMLH1, que plantearon el carácter recesivo del fenotipo Mutador.

La alteración en estos dos genes a su vez induce nuevas mutaciones (predominantemente en secuencias repetitivas) en genes que regulan la apoptosis, como la inactivación de los genes *BAX* (Rampino et al., 1997) o *Caspasa-5* (Schwartz et al., 1999), genes implicados en el control y regulación del crecimiento celular como TGFβRII (Myeroff et al., 1995), WISP-3 (Thorstensen et al., 2001) o IGFIIR (Ouyang et al., 1997), o incluso genes implicados en el propio sistema de reparación de errores (MMR) como hMSH3 o hMSH6 (Malkhosyan et al., 1996) (Tabla 3). La inactivación permanente de un mutador primario como hMLH1 presente desde el nacimiento, produce una inestabilidad que conduce a mutaciones secundarias en la vía Mutadora, como las presentes en los genes hMSH3 y hMSH6, lo cual aumenta la inestabilidad genómica y acelera por lo tanto la acumulación de mutaciones en tumores. Estudios previos han demostrado que una alteración epigenética mediante hipermetilación del promotor de MLH1 es el factor principal de tumores esporádicos con MSI (Cunningham et al., 1998; Kane et al., 1997; Veigl et al., 1998). La causa de la hipermetilación no ha sido definida, aunque se plantea la presencia de un mecanismo regulador de los patrones de metilación en todo el genoma, en el cual se produciría la mutación inicial.

Target gene	Gene function
ACTRII	Growth factor receptor
AIM2	Interferon inducible protein
APAF1	Pro-apoptotic factor
AXINA2	Wnt signalling
Bax	Pro-apoptotic factor
BCL10	Pro-apoptotic factor
BLM	Response to cellular DN
Caspasa-5	Pro-apoptotic factor
CDX2	Homeobox transcription factor
CHK1	Response to cellular damage
FAS	Pro-apoptotic factor
GRB14	Proteínas encuadradas del receptor del factor del growth
HG4-1	Cell cycle protein
IGFIIR	Growth factor Receptor
KIAA0977	Homologue of mouse cordon-bleu protein
MBD4	DNA glycosylase and methyl CpG binding protein
MLH3	DNA MMR
MSH3	DNA MMR
MSH6	DNA MMR
NADH-UOB	NADH ubiquinone oxireductase
OGT	O-linked GlcNAc transferase
PTEN	Cell cycle protein
RAD50	Response to cellular DNA damage
RHAMM	Cellular motility and HA binding
RIZ	Cell cycle and apoptotic protein
SEC63	ER membrane protein
SLC23AI	Nucleobase transporter
TCF4	Transcription factor (Wnt pathway)
TGFβRII	Inhibitor of celular growth
WISP3	Growth factor (Wnt pathway)

**Tabla 3.** Lista de genes mutados en secuencias repetitivas localizadas en una zona codificante en cáncer con MSI. (Adaptado de Duval y Hamelin, *Annales Génétique*, 45: 71-75, 2002).

La asociación entre defectos en los genes MMR y el cáncer humano ha forzado la hipótesis del fenotipo mutador que puede promover la tumorigénesis (Loeb, 1991). En células con deficiencia de MMR, la elevada frecuencia de mutaciones tiende a aumentar la probabilidad de mutaciones en genes reguladores del crecimiento, de modo que confiere ventajas selectivas. Además, en tumores colorrectales con MSI se ha identificado mutaciones que alteran la pauta de lectura (“frameshift”) en zonas de mononucleótidos de genes supresores tales como: APC, TGFβ-RII, IGF-IIR, BAX, BRCA1, BRCA2) y genes del sistema de reparación (MSH3, MSH6, BLM, Rad50, DNA pks). Los genes diana susceptibles para la inactivación mediante la pérdida de

MMR probablemente difieren según el tipo de tejido, así las mutaciones que alteran el marco de lectura generalmente no se han encontrado en los genes TGF-BRII, y BRCA1 en tumores de endometrio con MSI (Kim et al., 2001; Yamashita et al., 2000).

#### **4- El modelo de la haploinsuficiencia:**

En 1971 Knudson propuso un modelo de tumorigénesis en el cual se ponía de manifiesto que la progresión tumoral requiere la inactivación de los dos alelos de genes supresores de tumor. Este modelo (modelo del “doble hit”) fue desarrollado mediante análisis de la edad de aparición de la enfermedad comparando las formas hereditarias (retinoblastoma) con las formas esporádicas (Knudson, 2001; Knudson, 1971). Ya que en los cánceres hereditarios existen una alta probabilidad de desarrollar un cáncer más temprano que en los cánceres esporádicos. Esto se debe a que estos individuos llevan una mutación germinal en uno de los dos alelos de un gen supresor de tumor y para su inactivación sólo se necesitaría la inactivación del otro alelo, mientras que en los casos esporádicos requerirían mucho más tiempo porque necesitan mutaciones en los dos alelos del mismo gen supresor.

Existen varios mecanismos que pueden explicar la aparición de un fenotipo como consecuencia de una mutación en un sólo alelo de un gen. Primero, en el caso de una mutación dominante negativa que bloquea la función del producto del alelo restante. Existen numerosos ejemplos de este fenómeno por ejemplo los genes p53 y TGF $\beta$  (Hastie, 1994; Jenkins et al., 1984). Segundo, pérdida de heterocigosidad (LOH: *Loss Of Heterozygosity*) seguida por la pérdida del alelo salvaje y como resultado la pérdida del genotipo y la progresión rápida del tumor. Y por último, la haploinsuficiencia que puede dar lugar a la aparición lenta del proceso tumoral. De hecho, existe varios tipos de tumores gastrointestinales relacionados con la haploinsuficiencia de algunos genes como por ejemplo PTEN y SMAD4 (Di Cristofano A, 1998; Weinstein M, 2000).

Los tumores con genes haploinsuficientes son generalmente menos severos que los mismos tumores que llevan mutaciones homocigotas. Por ejemplo, los tumores con mutaciones en p53 y p27. Igualmente en algunos casos de haploinsuficiencia de genes

supresores de tumor, la haploinsuficiencia esta asociada con la aparición temprana de la enfermedad tales como formación de pólipos hamartomatosos que está asociada con la haploinsuficiencia de PTEN, SMAD4 y LKB1 (Di Cristofano A, 1998; Weinstein M, 2000; Miyoshi H, 2002). La formación de adenoma requiere no obstante la pérdida de ambos alelos.

Cook y colaboradores formularon un modelo matemático que estudió el efecto de la reducción de expresión de genes desde la diploidía hasta la haploidía, constatando que los niveles de expresión de los genes fluctúan (Cook et al., 1998). En los casos de haploidía, los niveles de expresión están alrededor del 50% del estado de diploidía, pero puede ocurrir que los niveles de expresión estén por debajo de ese porcentaje. En el caso de que la proteína esté implicada en la regulación del *checkpoint* del ciclo celular por ejemplo, esto probablemente alteraría la división celular.

La haploinsuficiencia parece que es general en los genes supresores de tumor, pero sus efectos cambian de un gen a otro y de sistema a otro (proliferación, *checkpoint*, estabilidad genómica). Los genes haploinsuficientes pueden actuar solos o colaborando con otros genes, en la progresión tumoral.

## **5- Respuesta de los tumores MSI:**

### **5.1- a la quimioterapia**

El sistema de MMR juega un papel importante en la respuesta celular cuando se produce un daño en el DNA. Su funcionamiento tiene una relación estrecha con el efecto de la quimioterapia en tumores inestables (MSI). Se ha demostrado que los agentes que metilan el DNA, como *streptazocina* y *temozolomida*, son menos eficaces en la destrucción de las células tumorales con inestabilidad microsatélite (MSI) que en tumores donde el sistema MMR funciona de manera normal (de Wind et al., 1995; Koi et al., 1994). Estos agentes actúan mediante la metilación de guanina en la posición O<sup>6</sup> (O<sup>6</sup>-metGua) y, a menudo, están reparados mediante la enzima O<sup>6</sup>-meGuanina- DNA metil transferasa (MGMT) (Dolan et al., 1990). Las células deficientes en esta enzima son altamente sensibles a los agentes metilantes del DNA. Esto, probablemente, es

debido al reconocimiento de la bases O<sup>6</sup>-meGuanina-timina mediante el complejo MSH2/MSH6 (Duckett et al., 1996) que conduce a la activación de la apoptosis. Algunos estudios sugieren que el DNA dañado, e identificado por el sistema MMR, y que no se puede reparar, obliga a la célula a entrar en parada en fase G2/M y, posteriormente, la conduce hacia la apoptosis mediante un mecanismo que depende de p53 (Karran & Bignami, 1994). Las células deficientes en MGMT y sistema MMR son entre 50 y 100 veces más resistentes a agentes metilantes que aquellas células con el sistema MMR normal (Humbert et al., 1999).

Los componentes de platinum, como la Cisplatina, conducen a la citotoxicidad mediante la reacción con las bases del DNA y formando un lazo entre la dobles cadenas del DNA. El complejo MSH2/MSH6 se une a los oligonucleotidos que llevan platinum (Duckett et al., 1996; Perera et al., 1992). La respuesta de las células competentes en MMR al daño del DNA causado por la cisplatina conlleva la aparición de una cascada de señales intracelulares implicando c-JUN-N-terminal kinase I (JNK1) y la kinasa c.abl. Esta respuesta no se ha observado en células deficientes en MMR (Hawn et al., 1995; Nehme et al., 1997).

Las células cancerígenas resistentes a cisplatino y carboplatina presentan un problema común en la clínica y generalmente llevan a recurrencia (Kavanagh et al., 1995). Análogos de cisplatina, tales y como tetraplatina, oxaliplatina y transplatina que forman un lazo en el DNA doble cadena y que no son reconocidos mediante el sistema MMR, pueden ser utilizados como alternativa para el tratamiento de los tumores MSI positivos (Fink et al., 1996). Como ya se ha dicho anteriormente, el 5-FU es el fármaco más utilizado en el tratamiento cáncer colorrectal pero, a pesar de ello, se ha visto que las líneas celulares también presentan resistencia cuando se tratan con este producto aunque el mecanismo causante se desconoce. La interrupción del ciclo celular no parece tener lugar como respuesta al tratamiento con 5-FU en células deficientes en el sistema de MMR (Carethers et al., 1999). Otros datos no apoyan esta teoría, y no han encontrado diferencias en la supervivencia entre los tumores positivos MSI y tumores estables MSS como respuesta al tratamiento con 5-FU (Halling et al., 1999). Estudios posteriores han analizado el efecto de la 5-FU sobre la supervivencia de pacientes con cáncer colorrectal tipo Dukes C tratados con este fármaco y han demostrado una clara

supervivencia de los pacientes con MSI positivos. El 90% de los pacientes con supervivencia libre de enfermedades a los 3 años se han observado en pacientes Dukes C con MSI positivos a cambio de 43% de los pacientes con MSI negativo (Hemminki et al., 2000).

### **5.2- a la radioterapia:**

La radiación ionizante provoca varios tipos de daños al DNA como ruptura de cadenas y daños a los nucleótidos (Hutchinson, 1985).

Estudios *in vitro* sugieren que existe una pequeña resistencia a la radiación ionizante en líneas celulares deficientes en MMR, (Fritzell et al., 1997) y el daño del DNA causado por la radiación se repara de manera más lenta en las células deficientes en MMR que en las células con el sistema de MMR normal (Mellon et al., 1996). Otros estudios no han podido encontrar una diferencia significativa entre las células con MSI positivos y células con MSI negativos en cáncer colorrectal como respuesta a la radiación (Qiu et al., 2000). El daño que más provoca la radiación ionizante al DNA es la ruptura de cadenas de DNA donde no está implicado el sistema de reparación de errores MMR.

### **6- Diagnostico del HNPCC:**

En 1991, gracias a una colaboración internacional se determinaron algunos criterios clínicos para identificar las familias de HNPCC: Los criterios de Amsterdam I (Vasen et al., 1991) (Tabla 4), más tarde estos criterios fueron criticados porque excluían las lesiones extracolónicas y las familias con una penetrancia baja. En la práctica, los antecedentes familiares suficientemente detallados que satisfacen los criterios no están a menudo disponibles. Por este motivo se revisaron los criterios de Amsterdam I y en 1999 establecieron los criterios de Amsterdam II (Park et al., 2002; Vasen et al., 1999). En esta versión fueron contempladas las lesiones extracolónicas y se cambió la indicación diagnóstica a: *por lo menos tres miembros de la familia deben estar afectados con cáncer asociado a HNPCC (cáncer colorrectal, cáncer de endometrio, intestino delgado, uréter, pelvis renal).*



Los otros tipos de cánceres no fueron añadidos a la lista a pesar de que otros órganos pudieran estar afectados.

**Tabla 4:** *Criterios de Amsterdam I*

Por lo menos tres miembros de la familia con CCR deben estar afectados y deben cumplirse los siguientes criterios:

- 1- Existe una relación de primer grado entre al menos 2 afectados
- 2- Al menos dos generaciones consecutivas están afectadas
- 3- Al menos un CC se ha diagnosticado antes de los 50 años.
- 4- La FAP está excluida en los pacientes con cáncer colorrectal CCR
- 5- La neoplasia se ha verificado por un examen anatómico- patológico.

En 1997 el instituto Nacional del cáncer de Estados Unidos recomendó utilizar un panel de cinco marcadores para determinar la inestabilidad de microsatélites (MSI) en tumores: BAT26, BAT25, D2S123, D5S346 y D17S250 (Boland et al., 1998). De esta manera, se determinó que siempre que los tumores muestren dos o más microsatélites alterados se clasifican como inestabilidad alta (MSI-H), cuando los tumores demuestran una alteración en un solo marcador de los cinco microsatélites se clasifican como inestabilidad baja (MSI-L). Mientras que cuando ninguno de los marcadores es positivo, la muestra se clasifica como estable (**MSS**). El instituto Nacional del cáncer estableció a su vez los *criterios de Bethesda* (Tabla 5) para ayudar en la selección de tumores mediante el análisis de los microsatélites (Boland et al., 1998; Rodríguez-Bigas et al., 1997). Los *criterios de Bethesda* fueron actualizados en 2004 pasando a denominarse “*criterios revisados de Bethesda*” para HNPCC (Tabla 6), incorporando nuevas recomendaciones para evaluar la inestabilidad de microsatélites (Umar et al., 2004).

**Tabla 5.** *Criterios de Bethesda para diagnosticar tumores colorrectales con inestabilidad de microsatélites.*

1. Sujetos con cáncer cuyas familias cumplan con los criterios de Ámsterdam.
2. Sujeto con 2 cánceres relacionados a HNPCC, incluidos cánceres extracolónicos.
3. Sujeto con CCR y un familiar de primer grado con CCR y/o un cáncer extracolónico relacionado con HNPCC y/o un adenoma colorrectal. Uno de los cánceres debe haber sido diagnosticado antes de los 45 años y el adenoma debe haber sido diagnosticado antes de los 40 años.
4. Sujeto con CCR o Cáncer de endometrio diagnosticado antes de los 45 años.
5. Sujeto con CCR derecho con patrón indiferenciado antes de los 45 años.
6. Sujeto con CRC de células en anillo antes de los 45 años.
7. Sujeto con adenomas diagnosticado antes de los 40 años.

**Tabla 6:** *Criterios de Bethesda revisados para testar tumores colorrectales con inestabilidad de microsatélites.*

Los tumores detectados en el individuo deben ser diagnosticados por MSI en las situaciones siguientes:

1. Cáncer colorrectal diagnosticado en pacientes antes de los 50 años.
2. Independientemente de la edad del individuo existe la presencia de synchronous, metachronous colorrectal u otros tumores asociados a HNPCC.
3. Cáncer colorrectal con MSI-H diagnosticado histológicamente antes de los 50 años.
4. Cáncer colorrectal diagnosticado en uno o varios familiares de primer grado afectados con HNPCC o tumores relacionados, y que fueron diagnosticados antes de los 50 años de edad.
5. Cáncer colorrectal diagnosticado en dos o más familiares de primer o de segundo grado e independientemente de la edad.

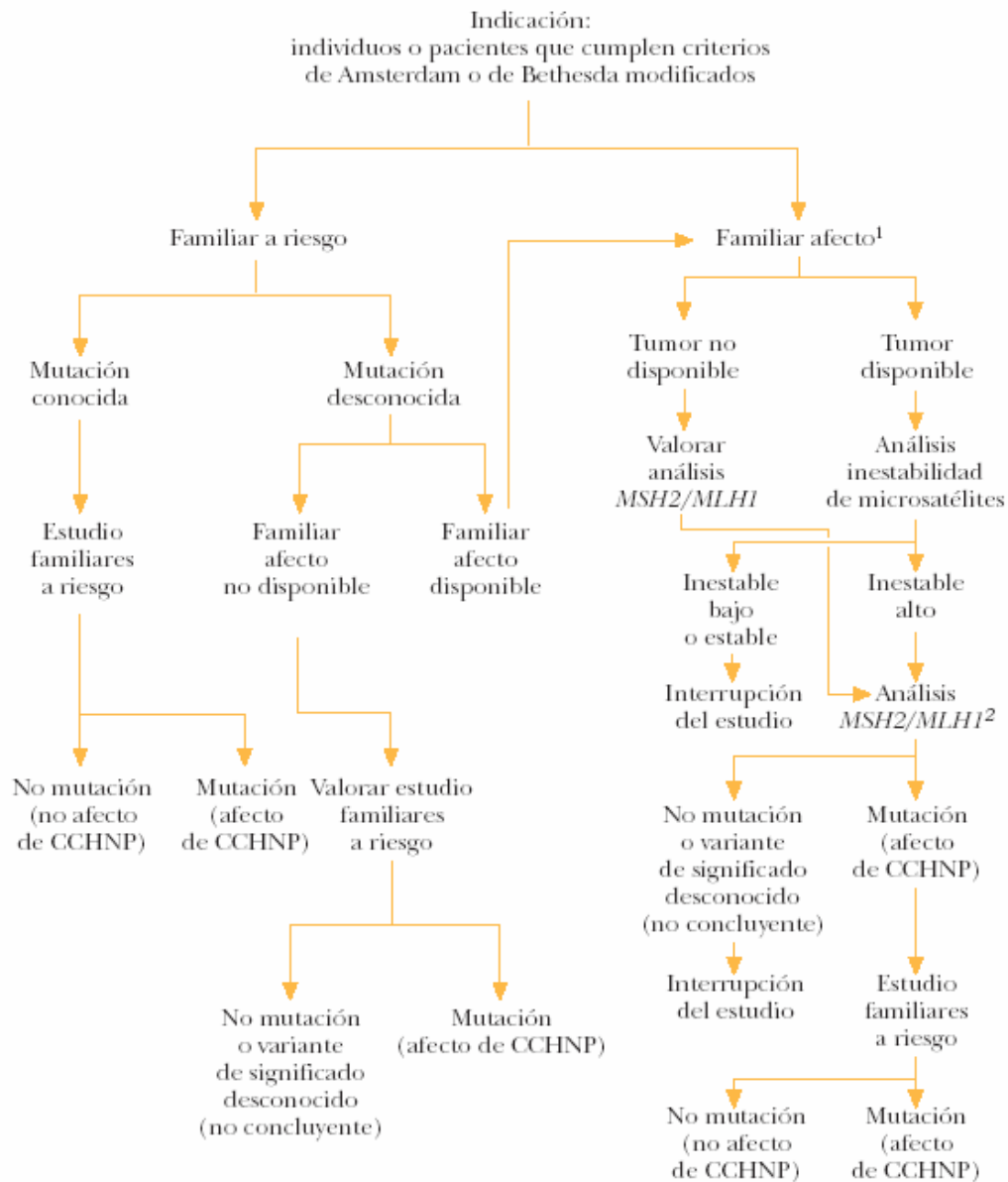
Se ha demostrado, no obstante, que los tumores con inestabilidad baja tienen las mismas características que los tumores estables (MSS). Algunos marcadores, como el Bat26, han demostrado ser muy específicos para MSI-H. Un 80% de los tumores de HNPCC presentan una inestabilidad alta (MSI-H), y en la práctica se utilizan los marcadores de MSI para su identificación.

Pero existen ciertas discrepancias con respecto al valor de la determinación del bajo nivel de inestabilidad de microsatélites (MSI-L). De hecho la inestabilidad baja (MSI-L) se ha observado en la mayoría de tumores de colorrectales (Laiho et al., 2002). Estos resultados demuestran también, que la sensibilidad de los marcadores de panel Bethesda no son suficientes para determinar los tumores MSI-L (Laiho et al., 2002).

#### **7- El diagnóstico del HNPCC mediante la técnica inmunohistoquímica:**

En 1994 empezó la comercialización de los anticuerpos monoclonales contra MHL1 y MSH2. La inmunohistoquímica (IHQ: **ImmunoHistoChemistry**) de proteínas MLH1 y MSH2 se propuso como medida paralela a estudios de microsatélite para el diagnóstico (Debniak et al., 2000; Dietmaier et al., 1997; Thibodeau et al., 1998). Así, algunos anticuerpos disponibles han sido utilizados con éxito en el reconocimiento de los productos de genes del sistema MMR. Prácticamente todos los tumores de MSI-H muestran una pérdida de expresión de proteínas de MMR utilizando los anticuerpos monoclonales de MLH1 y MSH2 (Dietmaier et al., 1997; Thibodeau et al., 1998), en este último resulta muy útil en el diagnóstico.

En la actualidad existe un organismo: International Collaborative Group of HNPCC (ICG-HNPCC), que coordina el desarrollo de métodos de diagnóstico de HNPCC. Este grupo recomienda la utilización de criterios de Amsterdam o Bethesda modificados para la identificación de los pacientes de HNPCC, y también está interesado en la utilización de métodos nuevos como IHQ con el objetivo de mejorar los instrumentos de diagnóstico de pacientes de HNPCC. (Figura 3)



1En individuos o familias que cumplen alguno de los tres primeros criterios de Bethesda puede efectuarse directamente el análisis de los genes *hMSH2* y *hMLH1* sin realizar el análisis de inestabilidad de microsatélites.

2 Previamente a la realización del análisis mutacional, puede efectuarse inmunohistoquímica para MSH2 y MLH1 en tejido tumoral con el fin de dirigir el orden del análisis de los genes *hMSH2* y *Hmlh*

1.CCHNPC=HNPCC: cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis.

Fuente: Adaptado de AGA Technical Review133.

**Figura 3:** Estrategia para el diagnóstico genético en pacientes con alto riesgo de cáncer colorrectal hereditario

**8- Deleciones en poliA en pacientes de HNPCC:**

Como se ha mencionado anteriormente, la mayoría de los tumores de HNPCC están ligados a inestabilidad microsatélites (Aaltonen et al., 1993). Las alteraciones de microsatélites se utilizan para clasificar la inestabilidad microsatélite (MSI). Se considera que incluso, algunos microsatélites pueden favorecer cambios morfológicos visibles en tumores (Parsons et al., 1995), aunque la acumulación de mutaciones en microsatélites en zonas no codificantes puede ocurrir sin cambios del fenotipo (Ionov et al., 1993; Zhou et al., 1997). Las secuencias repetitivas de PoliA son indicadores sensibles para detectar la inestabilidad de microsatélites. Las deleciones en el poliA no solo indican la pérdida del sistema de reparación de DNA, sino que también proporciona información sobre el tiempo de aparición de mutaciones en genes de MMR, lo que ha permitido establecer la utilización de mutaciones en microsatélites como reloj molecular (Blake et al., 2001; Shibata et al., 1994). La proporción de mutaciones en la mayoría de tumores es baja, generándose una mutación por cada 100.000 divisiones. Esto dificulta determinar la proporción de mutaciones, en tumores estables (MSS) a pesar de que las células se dividen diariamente.

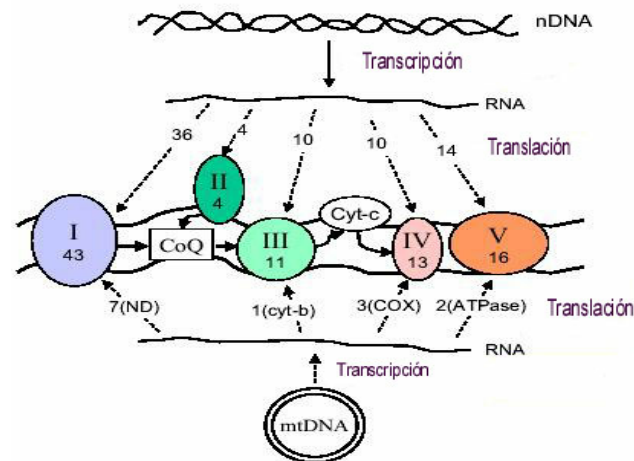
En los tumores MSI-H, la proporción de mutaciones puede ser 100 veces más elevada por los defectos en el sistema de reparación de errores. Los tumores de HNPCC son incapaces de reparar los errores que afectan al DNA y por lo tanto se aceleran la acumulación de mutaciones genéticas. La edad del tumor es el tiempo que transcurre entre la iniciación y la presentación clínica. La comparación de diferencias alélicas en tumores proporciona la información sobre la edad replicativa de un tumor. A mayor número de replicaciones celulares, mayor número de alteraciones mutacionales en microsatélites.

**9- La mitocondria como modelo de estudio de inestabilidad genómica en cáncer. Mutaciones en el DNA mitocondrial y deleciones en secuencias repetitivas mitocondriales en cáncer.**

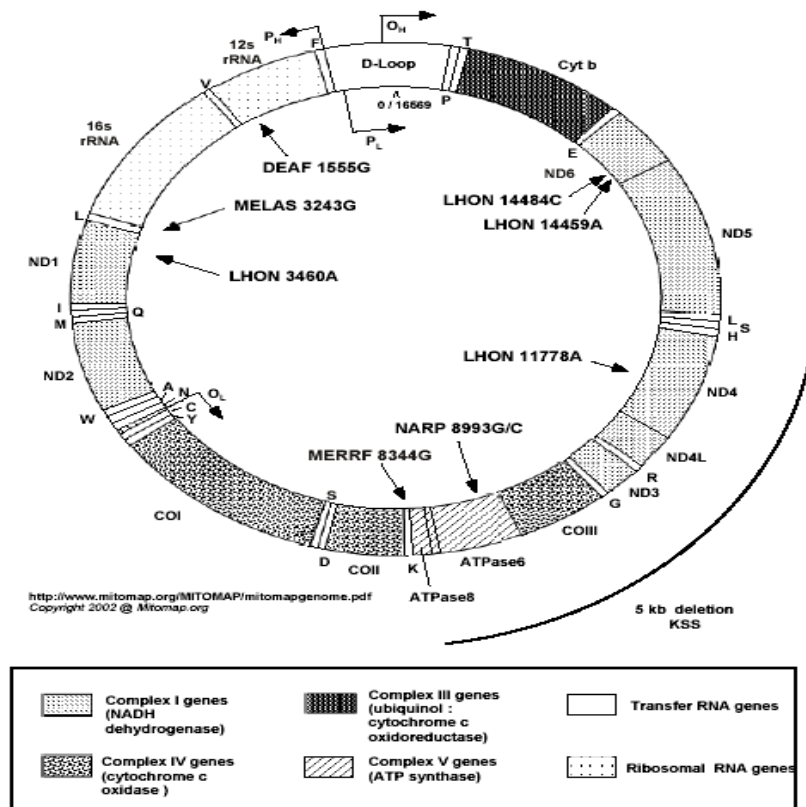
A principios de 1981 Sanger pudo secuenciar todo el genoma mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) humano (Sanger, 1981). Se trata de una hebra circular de doble cadena de 16'6Kb (exactamente de 16.529 pb), que codifica la síntesis de 2 rRNAs, 22 tRNAs y 13

subunidades proteicas de los complejos de la cadena respiratoria: 7 de estas proteínas pertenecen al complejo I, uno del complejo III, 3 subunidades del complejo IV y 2 son de la subunidad del complejo V (Wallace, 1992; Wallace, 1999). (Figura 4)

El DNAm tiene una zona de control transcripcional no codificante de 1.1Kb (D-loop), que contiene el origen de transcripción de las cadenas pesada, ligera y el origen de la replicación de la cadena pesada. El genoma mitocondrial esta caracterizado por la ausencia de intrones y todo el genoma es codificante y tiene su propio sistema de replicación y de transcripción. (Figura 5)



**Figura 4:** Los complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondrial estan codificados por el DNA mitocondrial y el DNA nuclear.



**Figura 5.** Mapa genético y de transcripción del DNA mitocondrial humano, presentando diferentes enfermedades mitocondriales

Las células humanas son muy ricas en mitocondria, cada célula tiene entre 300 y 500 mitocondrias y cada mitocondria tiene entre 2 y 4 moléculas de DNA (en total unas 1016 moléculas de DNA /célula). En general una célula somática tiene entre 1000 y 5000 copias de DNAm<sub>t</sub> como en el caso de oocitos maduros (Bogenhagen & Clayton, 1974).

Las moléculas de DNAm<sub>t</sub> están localizadas en la matriz mitocondrial, unidas a la membrana mitocondrial interna (Nass, 1969). La replicación de DNAm<sub>t</sub> depende de polimerasa gamma (POLG), que presenta una alta infidelidad comparada con la polimerasa alfa nuclear.

La mitocondria juega un papel en el metabolismo de ATP, en la generación de radicales libres (ROS), y la regulación de apoptosis. Mutaciones en DNAm<sub>t</sub> afectan la capacidad

énergica de las células, aumentan el stress oxidativo, causan daño al DNA y alteran la respuesta celular a agentes anticáncerígenos (Copeland et al., 2002; Penta et al., 2001). Se ha encontrado que un incremento moderado de ROS estimula la proliferación celular y la biogenesis mitocondrial (Lee et al., 2002). Este incremento de ROS y la estimulación de proliferación puede causar daño tanto al DNA nuclear, como al DNAm dando lugar al desarrollo de un tumor. La inestabilidad genética y la progresión de la enfermedad da lugar a que algunas mutaciones del DNAm puedan causar un incremento de la producción de ROS y por lo tanto más mutaciones en el genoma mitocondrial y más estrés oxidativo.

La combinación de factores endógenos y exógenos como la agresión de un medio rico en ROS, la alta infidelidad de la polimerasa gamma durante la replicación, la deficiencia de la maquinaria de reparación del DNA, y la ausencia de histonas que protegen el DNAm, todo ello pueden llevar a la acumulación de más alteraciones en el DNAm que en el DNA nuclear (Allen & Coombs, 1980; Backer & Weinstein, 1980; Kunkel & Loeb, 1981). Se ha estimado que la acumulación de alteraciones en el DNAm es aproximadamente entre 10 y 100 veces más alta que en el DNA nuclear (Brown et al., 1979; Marcelino & Thilly, 1999).

Las células malignas generalmente son más activas y sometidas al estrés oxidativo que las células normales (Hileman et al., 2001). Posiblemente algunas mutaciones podrían ser causadas por ROS endógeno en células cancerígenas. También se ha demostrado que la quimioterapia acumula mutaciones y daña el DNAm (Olivero et al., 1997; Talarico et al., 2001). Es posible que algunas mutaciones identificadas en células tumorales sean consecuencia del tratamiento con agentes quimioterápicos.

Estas mutaciones se han encontrado tanto en la zona codificante como en la zona no codificante (D-loop) del DNA mt en células malignas. En general podemos concluir que alteraciones del DNAm están presentes en muchos tipos de cáncer y que la mayoría de estas mutaciones se localizan en el D-loop, teniendo en cuenta que esta zona representa solo 1/16 parte del genoma mitocondrial, por el momento, se han identificado mutaciones del DNAm en cáncer colorrectal, estomago, hígado, páncreas y prostata entre otros.



La existencia de varias mitocondrias con diferentes copias de DNAm<sub>t</sub> en cada célula, presenta un verdadero desafío para investigar las mutaciones del DNAm<sub>t</sub> y sus consecuencias funcionales. Los análisis de mutaciones germinales homoplásmicas (mutación presente en todas las copias de DNAm<sub>t</sub> en células de un mismo individuo) son relativamente simples de estudiar, pero no así cuando coexiste DNAm<sub>t</sub> mutante y salvaje en células del mismo paciente, condición conocida como heteroplasmia.

Mutaciones homoplásmicas y heteroplásmicas se han observado en células malignas. El mecanismo por el cual aparece la homoplasmia a partir de la heteroplasmia es hoy en día un tema de discusión. Teniendo en cuenta que el DNAm<sub>t</sub> no tienen intrones, las mutaciones en zonas codificantes tienen un gran probabilidad de cambiar la composición aminoacídica de las proteínas sintetizadas. Muchas mutaciones de DNAm<sub>t</sub> tienen consecuencias fisiológicas y podrían dar unas ventajas o desventajas a la supervivencia y al crecimiento celular. Por ejemplo, es posible que una mutación en el DNAm<sub>t</sub> pueda causar un cambio funcional que afecte proteínas de la cadena de transporte de electrones de tal manera que aumente la eficiencia de transporte de electrones y por tanto aumente la generación de ROS.

La primera mutación no afecta todas las copias de DNAm<sub>t</sub>, por lo que al principio la mutación es heteroplásmica, el DNAm<sub>t</sub> mutado es minoritario. Así, las mutaciones somáticas emergen como mutaciones heteroplásmicas y se postula que pueden llegar a ser homoplásmicas con el tiempo, debido a que su expansión clonal confiere ventajas de replicación al DNA mt y la supervivencia celular.

La alta frecuencia de alteraciones de DNAm<sub>t</sub> en cáncer y su presencia en estadios precoces de la enfermedad probablemente podrían utilizarse como un marcador clínico para la detección precoz de cáncer (Modica-Napolitano & Singh, 2002). No obstante, contrariamente a esta hipótesis, en un estudio realizado por Coller y colaboradores utilizando un modelo por ordenador demostraron que para cualquier mutación del DNAm<sub>t</sub> en células tumorales es posible llegar a la homoplasmia, apareciendo en todas las células, totalmente al azar durante la replicación, sin que exista ningún tipo de ventaja selectiva previa (Coller et al., 2001). Sin duda, la clave para llegar a la homoplasmia de cualquier mutación mitocondrial debería pasar por otorgar a la mitocondria mutante una ventaja replicativa clara sobre las otras mitocondrias salvajes y

a su vez, una ventaja replicativa a esa mitocondria en particular sobre las demás y a esa célula tumoral sobre el resto. Algo poco probable, habida cuenta del gran número de moléculas de DNA mitocondrial existente en cada mitocondria, al elevado número de mitocondrias existente en cada célula y del elevado número de células tumorales.

Por todo ello, la cuestión de si las mutaciones mitocondriales en células tumorales son causa o consecuencia del propio proceso tumoral y por tanto, si tienen o no una funcionalidad selectiva clara en el proceso tumorigénico está aún por clarificar.

En tumores humanos se ha identificado un punto caliente mitocondrial (*hotspot*) en el DNAm (Sánchez-Céspedes et al., 2001). Esta variación afecta la zona localizada entre el nucleótido 303 y 316-318 (conocida como D310) del D-loop. Esta secuencia repetitiva es altamente polimorfa porque el número de citosinas pueden variar entre 6 y 10, además, a menudo demuestra un cierto grado de heteroplasmia (Hauswirth & Clayton, 1985). El D310 está localizado a 92 pb del origen de la replicación de la cadena ligera (*H-Strand*) del genoma mitocondrial (Lee & Clayton, 1998). La mayoría de alteraciones del D310 descritas en tumores primarios son deleciones / inserciones de 1 ó 2 pb, y casi todas son polimórficas y tienen una longitud entre 7C y 9C. Ha y sus colaboradores han estudiado las alteraciones en el D310 para 137 lesiones preneoplásicas de cabeza y cuello, su progresión de hiperplasia a carcinoma, y en diferentes lesiones sincrónicas y metacrónicas (Ha et al., 2002). Han encontrado alteraciones en 37% de lesiones de cabeza y cuello, con un aumento en incidencia de 22% en lesiones benignas y hasta 62% en carcinomas. Sus resultados demuestran claramente que estas alteraciones constituyen acontecimientos tempranos en lesiones de cabeza y cuello premalignas.

Hasta la fecha actual no se sabe hasta qué punto las alteraciones en esta zona D310 pueden afectar la replicación del DNAm. Realmente la mayoría de variaciones en D310 caen en el rango de mutaciones polimórficas lo que sugiere que no afectan la funcionalidad de la mitocondria. De hecho, variaciones en esta secuencia no parecen variar la actividad transcripcional y replicativa de la mitocondria (Augenlicht & Heerdt, 2001), con lo que la acumulación de mutaciones en esta zona podría deberse

simplemente a la ausencia de un sistema de reparación genómico adecuado y de un elevado número de replicaciones, como podría ser el caso de una célula tumoral.

Esta por ver además, si el patrón de mutaciones en esta secuencia concreta y su dinámica mutacional es paralela o equivalente a la que siguen los microsátélites nucleares en entornos deficientes en reparación MMR.

### III. Propósito de la tesis

### **III. Propósito de la tesis**

Durante los últimos años se han acumulado evidencias indicando de que la inestabilidad del genoma está estrechamente relacionada con el proceso de tumorigénesis. Descubrimientos recientes sobre el cáncer y los mecanismos de reparación del DNA establecen la importancia que tienen estos mecanismos a la hora de garantizar la estabilidad del genoma y señalan la existencia de una relación entre los defectos de reparación del DNA y el desarrollo tumoral. Por otro lado, la inestabilidad de los microsatélites resulta de gran utilidad para el diagnóstico de pacientes con tumores donde el sistema de reparación está alterado. De hecho, entre el 80 % de los pacientes de HNPCC son positivos al test de inestabilidad.

Varios estudios sugieren que la pérdida de MMR es un suceso temprano en el desarrollo tumoral en estos pacientes, que ocurre antes de la selección de mutaciones en genes supresores. Así mismo, otros estudios proponen que las células no neoplásicas en pacientes HNPCC pueden acumular mutaciones oncogénicas en el tejido antes de la pérdida bialélica de los genes del sistema MMR, lo que puede sugerir una haploinsuficiencia de estos genes. De ser así, la acumulación de mutaciones tendría lugar en el tejido normal de los pacientes HNPCC incluso antes de la aparición de la célula tumoral MMR<sup>-/-</sup> y de su expansión clonal. La detección de baja inestabilidad de BAT26 en estas células puede tener una implicación en la clínica para la identificación de pacientes portadores de mutaciones germinales, y especialmente en aquellos individuos o familias en los que no se detectan mutaciones germinales en los genes reparadores del sistema de reparación (MMR) conocidos hasta el momento.

Aunque la inestabilidad de microsatélite (MSI) ha sido relacionada con defectos en el sistema de reparación de errores (MMR), existen indicios de la implicación de otros factores como la fidelidad de las polimerasas durante la replicación del DNA y la inestabilidad inherente propia de las secuencias repetitivas. Para evaluar la implicación de este último factor en MSI, hemos estudiado el comportamiento de estas secuencias repetitivas en un modelo alternativo al nuclear (DNA mitocondrial; DNAm<sub>t</sub>) en diferentes tipos de tejidos: cáncer colorrectal, de estómago y de mama.

De hecho, estudios anteriores demuestran que la inestabilidad que caracteriza los microsatélites de un fenotipo mutador en los tumores, no está asociada con la inestabilidad mitocondrial en la secuencia repetitiva D310, lo que hace pensar que la inestabilidad encontrada en el DNAm podría ser causada por alteraciones intrínsecas de la propia secuencia, así como por la insuficiencia o ausencia de un adecuado sistema de reparación del DNAm.

Otra de las interrogantes a resolver es si las mutaciones dentro de la secuencia neutral (D-loop) en el DNA mitocondrial tienen la misma dinámica de alteraciones que los microsatélites intrónicos del genoma nuclear, ya que en caso de encontrar una concordancia entre el grado de inestabilidad nuclear y mitocondrial en sus secuencias repetitivas cabría la posibilidad de utilizar la secuencia D310 como un reloj molecular.

Así mismo, hemos tenido interés en estudiar el patrón y la dinámica mutacional que afecta a otras zonas del D-loop mitocondrial al margen de la secuencia D310, ya que diversos estudios recientes han demostrado la acumulación de mutaciones puntuales y su aparente selección y generación de homoplasmas en la célula tumoral, sugiriendo un posible papel en el desarrollo y aparición del cáncer.

De hecho, existe un gran interés por identificar nuevas mutaciones y genes alterados en los casos de cáncer y descubrir sus implicaciones en el desarrollo del tumor. Este interés se centra, básicamente, en entender aquellos mecanismos que hacen que estas alteraciones puedan influir tanto en el proceso tumoral como en la respuesta al tratamiento. Este tipo de estudios pretende llegar a clasificar los tumores en función de patrones moleculares y, teniendo en cuenta las diferencias encontradas, establecer el tratamiento específico más adecuado según el tipo de tumor. La presencia de MSI y de mutaciones en genes de reparación y de respuesta a daño genómico son factores que puedan tener un claro papel en la respuesta tumoral al tratamiento. Así, hemos analizado la posible existencia de mutaciones adicionales en vías de respuesta asociadas al checkpoint de control de daño genómico y en particular, en genes dianas del fenotipo mutador, en estómago, los genes ATR, CHK1 y algunos genes del complejo BASC de reparación. El fenotipo mutador afecta tanto a los cánceres germinales como a los esporádicos. En cuanto a los tejidos que presentan este fenotipo no hay diferencias entre los dos tipos de cánceres. El fenotipo mutador puede aparecer en diferentes tejidos

como en cáncer de colon, de endometrio, de estómago entre otros más. El mecanismo por el cual aparece el fenotipo mutador en estos tejidos es el mismo. En nuestro estudio hemos utilizado muestras de estómago por su disponibilidad en su momento.

## **IV. OBJETIVOS**



#### **IV. OBJETIVOS**

Nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Determinación de la distribución de moléculas de BAT26 en sangre periférica, de pacientes portadores de una mutación germinal en los genes hMLH1 y hMSH2, previamente al diagnóstico de un tumor.
2. Analizar la asociación entre la inestabilidad de microsatélites nuclear y mitocondrial.
3. Determinar si la acumulación de mutaciones en la secuencia repetitiva mitocondrial D310 puede utilizarse como reloj molecular en tumores colorrectales al igual que con las secuencias repetitivas de BAT26 y BAT25 en tumores con inestabilidad de microsatélites.
4. Determinar el patrón de mutaciones somáticas del DNA mitocondrial en tumores colorrectales y de estómago.
5. Identificar nuevos genes alterados en tumores con MSI relacionados con las vías de respuesta a daño genómico.

## **V- ARTÍCULOS**

**ARTÍCULO 1:**

*Simó Schwartz Jr, Hafid Alazzouzi and Manuel Perucho*

***Mutational dynamics in human tumors confirm the neutral intrinsic instability of the mitochondrial D-loop poly-cytidine repeat.***

*Genes Chromosomes & Cancer. 2006 May 17; 45(8): 770-780.*

# Mutational Dynamics in Human Tumors Confirm the Neutral Intrinsic Instability of the Mitochondrial D-Loop Poly-Cytidine Repeat

Simó Schwartz Jr.,<sup>1\*</sup> Hafid Alazzouzi,<sup>1</sup> and Manuel Perucho<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Molecular Oncology and Aging Group, Centre d'investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Centre Docent Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

<sup>2</sup>The Burnham Institute, North Torrey Pines Road, La Jolla, CA

Somatic mutations at a mitochondrial noncoding polycytidine (C)<sub>n</sub> repeat (polyC) have been associated with tumor progression. We analyzed whether these alterations are due to the inherent mutability of repeated sequences. Insertion and deletion mutations were found in colon (*n* = 114), stomach (*n* = 105), endometrium (*n* = 53), breast (*n* = 45), lung (*n* = 35), and prostate (*n* = 20) tumors. The mutation frequency in colon, gastric, and endometrial tumors was 23, 17, and 11%, respectively, which paralleled the relative extent of microsatellite instability in long mononucleotide repeats observed in tumors with mismatch repair deficiency (colon > stomach > endometrium, relative ratio 10:8:4). Colon tumors with mutations of more than one nucleotide were more advanced in tumor progression. Further, two tumors showing a T > C mutation that restored the homopolymeric repeat, harbored sequential deletion mutations of up to 4 and 6 nucleotides. These results illustrate that the increased mutability of repeated mitochondrial sequences is dependent on the repetitive structure of the DNA molecule and suggest that mutations in the (C)<sub>n</sub> repeat, whether homoplasmic or not, and by extrapolation, mitochondrial mutations in general, are not the result of selective pressure during tumorigenesis. We also suggest that the (C)<sub>n</sub> repeat may be used as an universal molecular clock to estimate the relative mitotic history of tumors. © 2006 Wiley-Liss, Inc.

## INTRODUCTION

Mitochondrial DNA (mtDNA) is a unique circular DNA molecule of 16,569 nucleotides that encodes 22 transfer RNAs, 2 ribosomal RNAs, and 13 proteins involved in the respiratory and oxidative phosphorylation pathways (Anderson et al., 1981; Wallace et al., 1998). Two different promoters control the replication and transcription activity of all these genes. Because of the lack of histones and the high rate of exposure to oxidative damaging agents, mtDNA is prone to accumulate genetic alterations when compared with nuclear DNA (Oberley and Buettner, 1979; Backer and Weinstein, 1980). Moreover, mtDNA polymerase- $\gamma$ , the enzyme responsible for mtDNA replication, is highly inefficient when compared with nuclear polymerases and replicates mtDNA with poor fidelity (Kunkel and Loeb, 1981). How mtDNA fidelity is maintained is not clear as all mitochondrial genes encode enzymes of the respiratory chain and none of them are known to be involved in DNA repair. Whether DNA repair enzymes from the nucleus are involved in mtDNA maintenance is not known.

Although mtDNA is maternally transmitted, due to a bottleneck process during gametogenesis and/or embryogenesis, only a few of the maternal mito-

chondria appear to be inherited (Thorburn and Dahl, 2001). Each mtDNA molecule of a cell undergoes hundreds or thousands of replication cycles during a lifetime. The higher the number of replication cycles, the higher the probability to accumulate mutations. Somatic mutations accumulate in mitochondria in association with the aging process (Michikawa et al., 1999).

Somatic alterations of mtDNA have been associated with different human diseases (Wallace, 1992), including cancer. Alterations in mtDNA were detected in oncocytomas (Welter et al., 1989) and deletions of 50 nucleotides were reported in gastric and renal cell carcinomas (Burgart et al., 1995; Horton et al., 1996). Homoplasmic mutations in coding and noncoding mtDNA sequences have been described in colorectal (Habano et al., 1998; Polyak et al., 1998) and other cancers (Fliss et al.,

Supported by: NIH; Grant numbers: CA63585 and CA38579; the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias; Grant number: FIS 02/0295.

\*Correspondence to: Dr. Simó Schwartz Jr., Centre d'investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM), Institut de Recerca Hospital Universitari Vall d'Hebron, passeig Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035, Spain. E-mail: sswartz@vhebron.net

Received 14 December 2005; Accepted 18 April 2006

DOI 10.1002/gcc.20340

Published online 17 May 2006 in

Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

2000; Habano et al., 2000; Schwartz and Perucho, 2000; Nishikawa et al., 2001; Sanchez-Cespedes et al., 2001; Nomoto et al., 2002). As cells contain hundreds of mitochondria, the finding of homoplasmic mutations in mtDNA in these tumors implies the replacement of all these hundreds of DNA molecules in most tumor cells by the mutated ones. The mtDNA mutations were thus interpreted to be the result of a positive intracellular selection process for the mutated mtDNA or the mitochondria carrying the mutated mtDNA, as well as a positive intercellular selective pressure for tumor cells carrying the mitochondria with the mutated mtDNA (Polyak et al., 1998; Fliss et al., 2000; Habano et al., 1998, 2000; Nishikawa et al., 2001; Sanchez-Cespedes et al., 2001; Nomoto et al., 2002). It was also suggested that these mutations played important roles in tumor development or progression.

Among these mutations, the most frequently occurring is in a polycytidine repeat (C)<sub>n</sub> within the D-loop region of the mtDNA (Habano et al., 1998). Since this region controls the transcription of the mtDNA heavy strand, it has been suggested that the length variations of this repeat could affect the level of transcription and mitochondrial function (Sanchez-Cespedes et al., 2001). However, the repeat is polymorphic, with lengths differing between 6 and 12, coexisting in the population, and heteroplasmic populations of mtDNA have been detected in normal tissues (Hauswirth et al., 1984; Hauswirth and Clayton, 1985). Hence, it appears unlikely that alterations in this repeat provide growing advantage in tumorigenesis. We previously suggested that these alterations are neutral and they are most likely detected in tumors by the clonal expansions accompanying tumorigenesis (Schwartz and Perucho, 2000). Also, homoplasmic mutations can be found in healthy cells from old individuals and computer models can explain the occurrence of these mutations as the result of random mutational drift without the need for selection (Coller et al., 2001).

Microsatellites, especially long mononucleotide repeats, are excellent markers for the mitotic history in tumors with mismatch repair (MMR) deficiency, and shortening of these repeats can be used as molecular clocks for these tumors (Shibata et al., 1994, 1996; Schwartz et al., 1999; Tsao et al., 2000). However, the applicability of these repeats as chronological tools is restricted to microsatellite instability (MSI) positive tumors. Tumors with MSI only represent the minority of a restricted subset of tumors (i.e., colon, gastric, endometrium). The

microsatellite mutation rates in tumors without MSI are too low to make these repeated sequences useful for this purpose.

We carried out this study to test the hypothesis that the increased mutability of mtDNA could be exploited to circumvent these limitations. We determined the spectrum of mutations at this hotspot in several common human cancers, and investigated whether this mtDNA repeat could be used as a molecular clock in tumors without MSI. During these studies, a T310C transition that generates a long (C)<sub>15</sub> repeat from the interrupted (C)<sub>8</sub>T(C)<sub>6</sub> frequently present in the germline was detected in two tumors. These stomach and breast tumors exhibited a higher frequency of mutations in the expanded repeat and the mutations involved a larger number of deleted nucleotides. These results are diagnostic of slippage by strand misalignment as mechanism for the origin of these mutations, with new variants of shorter length generated by sequential deletions. Therefore, mutations in the (C)<sub>n</sub> noncoding repeat are not selected during tumor progression, but occur more frequently in tumors because of their higher inherent mutability.

## MATERIALS AND METHODS

### Tumor Samples and Cell Lines

Tumors were obtained from the Southern Division of the Cooperative Human Tissue Network (University of Alabama at Birmingham), from the Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular Vall d'Hebron (CIBBIM) (Barcelona, Spain), and also from the National Cancer Center Research Institute (Tokyo, Japan) and from the Sapporo Medical University (Sapporo, Japan). None of the samples were from patients with non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) or with a positive familial history of cancer. Sample collection was carried out in accordance with previously established ethical protocols. Human cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection. Genomic and mitochondrial DNA were extracted according to standard procedures (Heerdt and Augenlicht, 1990) and diluted to 20 ng/ml prior to PCR amplification.

### Analysis of mtDNA Microsatellite Variants

Briefly, we analyzed the polycytidine repeat (D310) within the Conserved Sequence Block-2 (CBS-2) (nucleotides 299 to 315) at the D-loop region of the mtDNA. The corresponding nucleotide sequence (nucleotides 261 to 462 according to

the CRS, GenBank mitochondrial sequence ID g1944628) was amplified by PCR with Taq DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA) for one cycle at 94°C for 4 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 57°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec, in the presence of 0.2 mCi of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP and the corresponding primers (5'-CCA CTT TCC ACA CAG ACA T-3' and 5'-GGA GGG GAA AAT AAT GTG TTA G-3'). PCR products were analyzed on a 6% denaturing polyacrylamide gel and subjected to autoradiography. We also analyzed the (A)<sub>8</sub> repeat within the mitochondrial coding region of the NADH dehydrogenase subunit 5 gene as control. PCR amplification of this fragment (nucleotides 12337 to 12460 according to GenBank mitochondrial sequence ID g1944628) was performed as mentioned earlier, but using specific primers (5'-ATA ACC ATG CAC ACT ACT AT-3' and 5'-ATG CGA CAA TGG ATT TTA CA-3'). Tumors with PCR bands that were not present in the normal tissue were initially considered as showing polyC-instability. These variants were mainly seen as insertions or deletions of one, two or three nucleotides, except in one case that showed deletions of up to six nucleotides. Tumors were also analyzed for genomic microsatellite instability by PCR using two mononucleotide repeats, (A)<sub>18</sub> of APΔ3 (Ionov et al., 1993) and (A)<sub>26</sub> of Bat26 (Liu et al., 1994), and the dinucleotide repeat D1S158 (Shibata et al., 1994). Analysis of a subset of these tumors, 39 colon, 35 stomach and 8 endometrium, all with MSI, has been reported previously (Schwartz and Perucho, 2000).

#### Cloning and Sequencing of mtDNA Variants

PCR products from tumors with mtDNA alterations and from their normal tissue counterparts were subcloned into plasmid pCRTM2.1. Cloned PCR products were also reamplified by PCR and analyzed on a 6% denaturing polyacrylamide gel and subjected to autoradiography as described. Plasmids from selected clones were sequenced by the dideoxy chain termination method, using the Sequenase DNA sequencing kit (Amersham Life Sci., OH) and also by direct sequencing, using ABI PRISMTM dye terminator cycle sequencing kit (PerkinElmer, NJ).

### RESULTS

#### Somatic Microsatellite Variation in mtDNA in Human Cancer

Sequence variants at the mitochondrial (C)<sub>n</sub> repeat were analyzed in tumors and tumor cell

lines from the colon, stomach, endometrium, prostate, lung, and breast. PCR products from every positive case were cloned and sequenced. Different length variants at the (C)<sub>n</sub> repeat ( $n = 6-9$ ) were detected among normal tissues. In 15% (11/75) of colon cancer cases more than one variant was present in the same normal sample, a condition called heteroplasmy.

Also, new mtDNA variants with insertions or deletions of 1, 2, or 3 nucleotides in the (C)<sub>n</sub> repeat were detected in 23% (17/75) of colorectal tumors without MSI and in 25% (10/39) MSI-High tumors (Fig. 1a). Analysis of individual clones showed heteroplasmic populations of mtDNA with different length variants in these tumors. None of these variants were detected by sequencing clones from the respective normal tissues (Table 1). MtDNA variants were detected in a colorectal adenoma (case 404) (Figs. 1a and 1b), and in a colon carcinoma (case 406), and two metastatic foci from the same tumor. The sequence profiles of the new variants in the metastatic foci were more similar than those of the primary tumor (Figs. 1c and 1d).

No correlation was found between mtDNA somatic variants and the presence of heteroplasmy in the normal tissue. No heteroplasmy was detected in any of the tumor cell lines, although different length variants ( $7 < (C)_n > 9$ ) were found among them. We also analyzed for instability in the same tumors a (A)<sub>8</sub> repeat within the coding sequence of the mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 5 gene. Insertion/deletion mutations in this repeat generate frameshift mutations and inactivate the gene. Only the wild type species of 8 adenines was detected in all tumors, suggesting the existence of negative selective pressure for these mutations.

Somatic variants in mtDNA were also observed in other tumors. In gastric cancer, mutations were detected in 12 of 70 tumors without MSI and in 7 of 35 tumors with MSI. Endometrium cancers also displayed mtDNA variants in 1 of 8 tumors with MSI and 5 of 45 without MSI. Somatic variability in mtDNA was also detected in other MSI negative tumors, including lung (3 of 35), breast (5 of 45), and prostate (1 of 20). Heteroplasmies were also observed in the normal tissue of all these cancer patients with frequencies of about 10%.

#### mtDNA Somatic Variability and Colon Cancer Clinical Features

For simplicity of description, the tumors with new (C)<sub>n</sub> variants (insertions or deletions of one, two, or three nucleotides) were classified as tumors

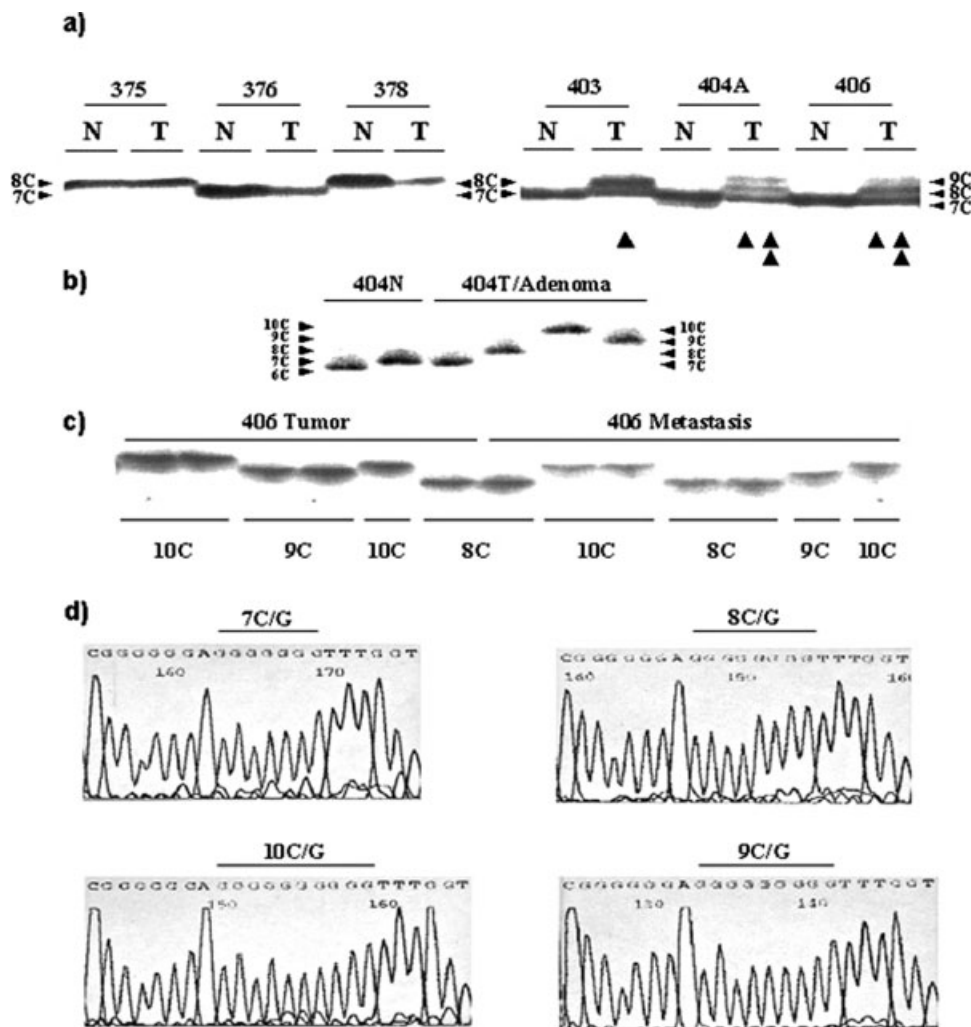


Figure 1. PolyC-instability detected in colorectal tumors. (a) Left panel, tumors without PolyC-instability; right panel, tumors with PolyC-instability. Tumor numbers are indicated on top; the length of the repeat is on the sides; N: normal tissue; T: tumor sample; one or two arrows pointing up indicate insertions of one or two cytosines respectively at the repeat. Case 404A is an adenoma case positive for PolyC-instability. New mitochondrial variants with 8C are shown in cases 403, 404A, and 406. Also, new variants with 9C are present in case 406 and in the adenoma. Mitochondrial polyC heteroplasmy of 6C and 7C variants is shown in the normal tissue of case 404A. (b) Analysis of single clones obtained from the adenoma case 404. Variants were cloned and ana-

lyzed by electrophoresis. The normal or tumoral origin of the clones is indicated on top; length variants are on the sides. Variants with 6C and 7C were detected in the heteroplasmic normal tissue; variants from 7 to 10 cytosines were detected in the tumor. (c) Clones from tumor 406 and from a lymph node metastatic foci were also analyzed. The tumoral or metastatic origin of the clones is on top; the lengths of each clone are on the bottom. Same variants from 8 to 10 cytosines were detected in the tumor and in the metastasis in similar heteroplasmic proportions. (d) Sequences of mitochondrial variants from tumor 406. The length of the C/G repeat is indicated on top of each sequence. The sequence of 7C was also found in the normal tissue.

with polyC-instability or  $(C)_n$ -Ins, while the tumors with no alterations in the  $(C)_n$  repeat were classified as tumors without  $(C)_n$ -Ins ( $(C)_n$ -Ins-0). No associations were found when  $(C)_n$ -Ins was contrasted to parameters such as race, gender, age, metastatic lymph nodes, left or right location, histology type, or stage of tumor progression (Table 2). However, an arbitrary division of tumors with only one nucleotide variation ( $(C)_n$ -Ins-1) versus tumors with two or more ( $(C)_n$ -Ins-2) revealed some intriguing asymmetries. Tumors with  $(C)_n$ -Ins-2 were at a more advanced stage of progression

(Dukes' D) and associated with young age ( $40 \pm 8$  years old) when compared with tumors with  $(C)_n$ -Ins-1 and with tumors without  $(C)_n$ -Ins (Table 2). These differences were significant ( $P < 0.001$ ). The only adenoma in the series (case 404) found with mtDNA alterations also exhibited  $(C)_n$ -Ins-2 (Table 1).

#### mtDNA Variants as Molecular Clocks in Tumorigenesis

We reported that the levels of instability observed in the noncoding long mononucleotide

TABLE I. mtDNA Clones from Colon Tumors<sup>a</sup>

Race	Gender	Age	Case	6C/T/6C	7C/T/6C	8C/T/6C	9C/T/6C	10C/T/6C	PolyC-inst.
B	F	75	336N			10			-
			336T			10			-
W	F	70	337N			10			-
			337T			10			-
W	M	75	339N		10				-
			339T		10				-
W	F	69	344N			9	1		-
			344T			2	1	7	+
W	M	42	348N		10				-
			348T		4		1	6	+
B	M	68	360N			10			-
			360T		7	3			+
B	M	68	362N		1	9			HT
			362T		9	1			HT
W	F	64	368N		1	9			HT
			368T			10			Clonal
W	M	54	371N			9			-
			371T			5	5		+
W	F	79	376N		10				-
			376T		10				-
W	F	64	379N		5	5			HT
			379T		5	5			HT
W	M	85	388N		10				-
			388T		10				-
B	F	86	389N			4	6		HT
			389T			4	6		HT
W	M	64	390N			8	2		HT
			390T			7	3		HT
W	M	38	391N		10				-
			391T		10				-
W	F	74	396N			6	4		HT
			396T			5	6		HT
W	F	55	398N			10			-
			398T			4	1	5	+
B	F	32	403N		10				-
			403T		3	6	1		+
W	M	84	404N	2	15				HT
			404T*		3	2	3	1	+
W	F	35	406N		10				-
			406T		8	7	6	3	+
B	M	73	412N		9				-
			412T		4	6			+
W	F	70	415N			10			-
			415T			1	9		+
n.a.	F	81	464N		4	6			HT
			464T		1	5			HT
n.a.	M	67	466N			10			-
			466T			3	7		+
n.a.	F	79	471N			10			-
			471T		4	6			+
n.a.	F	80	473N			10			-
			473T			2	8		+
n.a.	F	83	479N			10			-
			479T			4	6		+
B	F	46	482N			10			-
			482T		8	2			+
W	M	42	483N			10			-
			483T			20	3	4	+

(Continued)



TABLE I. mtDNA Clones from Colon Tumors<sup>a</sup> (Continued)

Race	Gender	Age	Case	6C/T/6C	7C/T/6C	8C/T/6C	9C/T/6C	10C/T/6C	PolyC-inst.
W	M	82	500N			10			-
			500T			3	7		+

<sup>a</sup>Cloned (C)<sub>n</sub> variants from colorectal tumors. W, white; B, black; M, male; F, female; N, normal; T, tumor; HT, heteroplasmy; n.a., not available; +, cases with polyC-instability; (\*), adenoma case with polyC-instability. The nucleotide sequence of the repeat is indicated on top. Numbers of analyzed clones are represented according to the cytosines of the repeat. Case 368N was found heteroplasmic with variants of 7C and 8C. Tumor case 368 has only the 8C variant and was considered as clonal in terms of polyC-instability. Ten clones from additional forty five colon tumors with their corresponding normal tissues were also analyzed. Cases 351, 354, 355, 359, 380, 383, 385, 386, 399, 401, 402, 408, 409, 414, 432, 463, 465, 467, 468, 470, 474, 477, 481, 484, 485, 497, 502, 503, 509, 510, 519, 520, and 522 have only a variant with 7C; cases 330, 349, 361, 373, 375, 378, 416, 472, 480, 494, and 496 have a variant with 8C; case 478 was heteroplasmic and have variants with 8C and 9C in similar proportions. No polyC-instability was detected in tumor cell lines with nuclear MSI from colon: SW48, LS174T, LS180T, DLD-1, HCT15, HCT116, LoVo, HuTu80. CaCo2, HT29, and LS411N; pancreas: Hs766T; endometrium: AN3CA, RL95-2, SKUT-1, SKUT-1B, HEC1-A, and HEC1-B; breast: Cal51 and prostate: DU145. Additional tumor cell lines without MSI from stomach: MKN1, KATOIII, MKN45, MKN74, JRST, and MKN28, endometrium: Hs825T and Hs248T, and colon: SW620, were also negative for polyC-instability.

repeat sequences Bat26 and APΔ3 varied in gastrointestinal and endometrial tumors of the mutator phenotype, with colon having the highest level of instability followed by stomach and endometrium (Schwartz et al., 1999). We interpreted these results as reflecting the tumor replication histories according to the use of microsatellite sequences as molecular clocks (Shibata et al., 1994, 1996; Schwartz et al., 1999; Tsao et al., 2000). To test the hypothesis that instability at the mtDNA (C)<sub>n</sub> repeat has similar mutational dynamics as nuclear microsatellite sequences in a defective DNA MMR environment, we compared the profiles of mtDNA mutations in colon, gastric, and endometrial cancers with the extent of nuclear MSI determined by the average number of deleted nucleotides in long noncoding mononucleotide repeats Bat26 and APΔ3 (Table 3). There was a good correlation ( $r = 0.99$ ) between the relative average degree of instability in the nucleus in the tumors with MSI, and in the mitochondria in all these tumors irrespective of their nuclear MSI status. Colon cancer had the highest relative degree of nuclear MSI and (C)<sub>n</sub>-Ins, followed by stomach and endometrium tumors.

#### (C)<sub>n</sub>-Instability Depends on the Length of the Repeat

During this analysis, we identified two tumors, stomach tumor J7 and breast tumor BC50, with deletions of several nucleotides in the (C)<sub>n</sub> repeat (Fig. 2a). Sequencing analysis of the shortened sequences revealed that the T, normally present in the wild type repeat sequence (CCCCCCCCT-CCCCC), was absent in these tumors (Fig. 2b). Therefore, these results suggest that deletions of the T or transitions from T to C at nucleotide 310 occurred in these tumors. In either case, these alterations changed the sequence of the inter-

rupted (C)<sub>8</sub>/T/(C)<sub>6</sub> repeat into a longer and more unstable repeat. Accordingly, new mtDNA variants appeared in these cases by sequential deletions of one repetitive unit (Fig. 2a). Analysis of clones revealed shorter lengths of the repeat from 12C to 9C in the stomach case and from 14C to 11C in BC50 (Figs. 2a and b). Neither the T-C transitions nor these new variants were detected in their respective normal tissues by cloning and sequencing. Also, no clones with 15C were detected in any case, manifesting the high level of instability of this particular sequence.

#### DISCUSSION

Widespread MSI characterizes a majority of tumors from patients with HNPCC and also a minority of sporadic tumors from the colon, stomach, and endometrium (Burks et al., 1994; Shibata et al., 1994; Eshleman and Markowitz, 1995; Yamamoto et al., 1997, 1998; Schwartz et al., 1999). The analysis of this type of instability has facilitated learning about the mutational dynamics of microsatellite sequences in the human genome. Because of the inherent instability of microsatellite sequences, slippage mutations within these sequences by strand misalignment occur during DNA replication (Perucho et al., 1994; Marra and Boland, 1995). Thus, longer sequences are more unstable because of their higher probability for misalignment errors and consequent slippage (Streisinger et al., 1966). These trends establish a spontaneous mutational dynamic process that configures, in concert with the DNA mismatch repair system, the length of microsatellites at an evolutionary determined time point and explains the allelic variability of these sequences within human populations (Ellegren, 2000; Xu et al., 2000; Kolodner et al., 2002). Therefore, in tumors where no DNA mismatch repair system is present, these somatic mutations will rap-

TABLE 2. Clinico-Pathological Features of Colorectal Tumors with PolyC-Instability

Case	406	348	398	403	483	344	371	412	415	466	473	479	500	360	471	482	>2	I	0
Age	35	42	55	32	42	69	54	73	70	67	80	83	82	68	69	46	40 ± 8*	71 ± 12	68 ± 13
Sex	F	M	F	F	M	F	M	M	F	M	F	F	M	M	F	F	2/3	5/7	33/23
Race	W	W	W	B	W	W	n.a	B	W	n.a	n.a	n.a	W	B	n.a	B	4/1	3/3	29/14
Differ	W	M	M	M	M	W	M	M	M	M	M	M	M	W	M	W	5/0	8/3	38/8
Locat	R	n.a	L	R	L	n.a	R	R	R	L	L	n.a	R	R	R	R	2/3	7/3	25/23
L. Nod	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	5/0**	4/8	27/24
Dukes	D	D	D	D	D	B	B	C	C	B	B	B	B	B	C	C	5/0**	1/1	14/36
Mut.	+3	+3	+2	+2	+2	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	-1	-1	-1			

M, male; F, female; W, white; B, black; L, N, presence of metastatic lymph nodes; M, moderately differentiated; W, well differentiated. R, right colon (cecum, ascending, and transversal); L, left colon (descending, sigmoid, and rectum); n.a., not available. Correlations were done with the available clinico-pathological features of all colorectal tumors analyzed. Adenoma case 404 not included.  
 \*Age average of 40 ± 8 for cases with two or more cytosine insertions. The average for colon tumors with lower levels of polyC-instability or without polyC-instability is 70 ± 10. High levels of mitochondrial instability associates with young ages. 47% (7/15) of colon tumors from patients under 55 years of age show polyC-instability, and 71% (5/7) of these cases have high levels of instability and Dukes D phenotype.  
 \*\*Cases with two or more cytosine insertions associate to Dukes D and positive lymph nodes with statistical significance (P < 0.001), although neither Dukes D nor positive lymph node associates with polyC-instability. No correlation was found when tumors with lower levels of polyC-instability were analyzed. None of these cases were positive for nuclear microsatellite instability.

idly accumulate in cancer cells according to the mutator phenotype model for tumorigenesis (Perucho et al., 1994). In this model, mutations in neutral microsatellite sequences will clonally perpetuate in tumor cells according to their spontaneous mutational rates and their particular mutational dynamics. The clonal perpetuation of hundreds of thousands of mutations occurring in noncoding repetitive sequences is only easily explained by assuming that these mutations occur before transformation (Shibata et al., 1996; Tsao et al., 2000). Implicit in this assumption is that these noncoding mutations are irrelevant and neutral, and accumulate in the normal cells precursor of the tumor. On the other hand, similar slippage mutations (frameshifts) within genomic coding regions might be under selective constraints during tumor progression, depending upon whether they confer cell growth or survival advantage (positive selection) or have deleterious effect in cell functions (negative selection).

We reported that the MSI that characterizes the microsatellite mutator phenotype in gastrointestinal tumors does not associate with instability at simple repeat sequences in mitochondria (Schwartz and Perucho, 2000). The mtDNA variants detected in this study were not associated with genomic instability at nuclear microsatellite sequences such as Bat26 and APΔ3, both of them had longer mononucleotide repeats than the ones analyzed in mitochondria. Therefore, the known genes of the nuclear DNA MMR system whose inactivation leads to gastrointestinal tumorigenesis of the microsatellite mutator phenotype pathway are not involved in the repair of mtDNA misalignments.

Even though PolyC-instability in colorectal and stomach tumors does not associate with nuclear MSI, a common slippage error mechanism seems to underlie both types of instability (Schwartz and Perucho, 2000; Poetsch et al., 2004; Guleng et al., 2005). We therefore suggest that PolyC-instability is caused by the intrinsic unstable nature of microsatellite sequences and an inefficient mitochondrial DNA mismatch repair system or the absence of the system. Although a specific mitochondrial DNA repair system has been suggested, its existence and its possible connection with nuclear DNA repair systems are still unknown.

The perseverance of similar heteroplasmic levels in two metastatic foci from tumor 406 with PolyC-instability suggests the existence of intracellular heteroplasmy in the primary tumor cells. Because of the clonality of tumor cells and to the

TABLE 3. Relative Ratios of PolyC-Instability and Nuclear MSI in Gastrointestinal and Endometrial Cancers

Tumor	Bat26 <sup>a</sup>	RR Bat26 <sup>b</sup>	PolyC-instability			
			Mutated Tumors (%)	Relative Ratio <sup>c</sup>	Mutational Events (%)	Relative Ratio
Colon						
MSI	11 ± 3	100	25 (10/39) <sup>d</sup>	100	33 (13/39)	100
MSS			23 (17/75)	92	35 (26/75)	106
Stomach						
MSI	9 ± 2	82	20 (7/35)	80	26 (9/35)	79
MSS			17 (12/70)	68	23 (16/70)	70
Endomet						
MSI	5 ± 1	45	12 (1/8)	48	12 (1/8)	36
MSS			11 (5/45)	44	13 (6/45)	39

Values in parentheses indicate no. of cases.

<sup>a</sup>Average Bat26 deletions in tumors (Schwartz et al., 1999).

<sup>b</sup>Relative Bat26 ratios, taking the average number of deletions of colon tumors as hundred.

<sup>c</sup>There is a statistical correlation of 0.99 between the relative Bat26 ratios of colon:stomach:endometrium and the corresponding relative ratios of tumors with positive polyC-instability.

<sup>d</sup>Additional MSI cases were added from our previous study (Schwartz and Perucho, 2000).

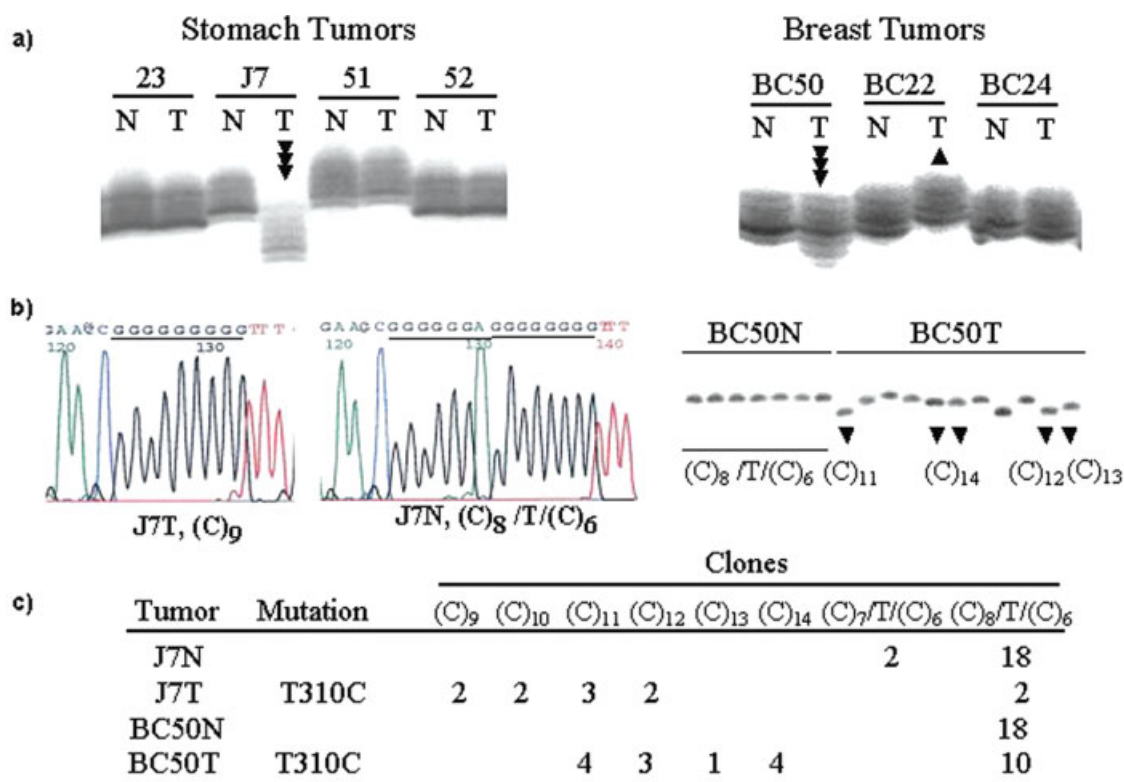


Figure 2. Mitochondrial T310C transition in human tumors. (a) Left panel, stomach tumors; right panel, breast tumors; case numbers are on top; N, normal tissue; T, tumor tissue; arrows pointing down indicate the presence of sequential deletions. PolyC-instability due to the T310C transition was detected in the stomach tumor J7 and in the breast tumor BC50. The arrow pointing up indicates an insertion of one cytosine and the presence of PolyC-instability in the breast case BC22. (b) mitochondrial variants from tumor cases J7 and BC50 were cloned and analyzed. Left, the T310C transition found in the stomach tumor J7 is shown in a representative sequence from a clone with 9 cytosines. A sequence from the normal tissue without the transition is next on the right. The polycytidine repeats are underlined and the nucleotide sequences are indicated at the bottom. Right, electrophoretic analysis of single clones obtained from the breast case BC50. The normal or tumoral origin of the clones is indicated on top. Variants from the normal tissue are on the left part of the picture, and the nucleotide

sequence is indicated at the bottom. Clones from tumoral origin are shown on the right. The arrows pointing down indicate new mitochondrial variants with the T310C transition; the nucleotide sequences of the new polycytidine repeats are at the bottom. New repeat variants from 11 to 14 cytosines in a row are indicated. (c) Table showing cloned variants from cases J7 and BC50. Cases are on the left; the T310C transition and the number of analyzed clones are indicated. The nucleotide sequence of the repeat is on top. As shown, normal variants with 7 and 8 cytosines without the transition mutation were detected in the normal tissue of the stomach case J7, indicating the presence of heteroplasmy. All clones from the normal breast tissue have an 8C/T/6C sequence. Only tumor cases show cloned variants with the transition mutation. The shortest variants with 9 and 10 cytosines were found only in the stomach tumor. Longer variants from 11 to 14 cytosines were also detected in these tumors. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com).]

fact that the majority of normal cells are homoplasmic in nature, the presence of heteroplasmy in tumor cases with PolyC-instability raises the question of how different mitochondrial variants are selected and perpetuated. Indeed, according to the mutator phenotype model for MSI applied to nuclear repetitive sequences, only mutations in the target genes of the mutator phenotype that give clonal advantage to the tumor cells should be perpetuated. However, and also according to the model, although the clonal advantage concept is valid for repetitive sequences within coding regions, it is not valid for neutral sequences such as noncoding microsatellites. Instead, mutations in these sequences get clonally perpetuated because of their high rates of instability. By analogy, we suggest that such is the case of the mitochondrial polycytidine repeat. Even though it is not clear yet whether length variations of this repeat could give growth advantage to the tumor cells, it has been reported that different lengths do not change mitochondrial replication or expression activity *in vitro* (Hauswirth and Clayton, 1985; Moraes et al., 1991). These results suggest the neutrality of this sequence. The absence of mutations in the (A)<sub>8</sub> tract within the subunit 5 of the mitochondrial NADH gene in these tumors also suggests that negative selective pressures modulate the mutational dynamics of this coding sequence and reinforces the concept of neutrality of the polycytidine repeat.

Therefore, mutations within this neutral sequence should be understood by analogy according to the mutational dynamics that rule neutral nuclear microsatellite sequences. The perpetuation of different length variants of the polycytidine repeat in tumor cells and the establishment of new heteroplasmic populations depend on: first, the above mentioned underlying mechanism of slippage errors supported by the absence of an effective specific mismatch repair system and second, high numbers of mitochondrial replication cycles that will allow the progressive accumulation of new mutant mitochondrial variants. In accordance with this, recombinant plasmids containing the polycytidine repeat have been shown to generate different length variants when repeatedly passaged in *E. coli* (Hauswirth and Clayton, 1985). It is known that although mitochondrial DNA replicates independent of the mitotic cell cycle, the high mitotic rates of tumor cells might indirectly induce higher mitochondrial replication activities. Therefore, we understand the association seen in colon tumors between PolyC-instability and dukes D and young

age as a consequence of the high replication activity of these poor-prognosis tumors. Indeed, high levels of PolyC-instability were also detected in a benign colorectal adenoma, most likely associated with a long mitotic history. There is no evidence at this point that PolyC-instability is involved in tumor progression or cellular growth advantage.

On the other hand, the two T310C transitions detected in two tumors provide new evidence of the inherent unstable nature of the polycytidine repeat. The absence of mutations in the normal tissues of these cases confirms these transitions as somatic mutations. The T310C mutation changes the sequence length of the repeat and generates a new (C)<sub>15</sub> repeat. According to the dynamics of mutability at neutral microsatellite sequences, new shorter variants are generated by sequential deletions of repetitive units. The shortest variants were detected by clonal analysis in the stomach case. Indeed, length variants from 11 to 14 cytosines were found in the breast cancer case while variants from 9 to 12 cytosines were detected in the stomach tumor. Again, these differences could be explained by a higher mitochondrial replication activity of the stomach tumor. According to this concept, we suggest a possible use of the polycytidine repeat as a molecular clock for mitochondrial replication activity. It is not clear however whether mitochondrial segregation might influence on the segregation of new polyC variants. Even though mitochondrial segregation most likely relies on randomness, some discussion is being raised regarding an alternative nonrandom segregation process. In any case, it is unlikely that mitochondrial segregation might significantly alter the levels of polyC-instability detected in the tumors because in fact, the instability of this sequence is an inherent condition of microsatellites. However this might not be so clear for specific point mutations in nonrepetitive sequences and will have to be addressed properly. Also, it has been found that sequence interruptions within microsatellite sequences confer differential allelic stability in mismatch repair deficient cells (Bacon et al., 2000). These findings are very relevant concerning the screening of genomic instability in HNPCC patients. In accordance with these findings, instability at the polycytidine repeat also varies according to its length and the presence of an interrupting thymidine within the sequence. Insertions are found when a thymidine is interrupting the sequence while deletions occur when no thymidine is present. These results clearly show

that the mutational dynamics of this repeat mimics the evolutionary dynamics of microsatellite DNA sequences.

Because of the neutrality of the (C)<sub>n</sub> repeat, the significant association with advanced stage of progression suggests that polyC-instability might be related to a highly mitogenic history and to progressive tumors, in particular tumors that had already metastasized at the time of diagnosis. Hence, the clonal distribution found in tumors J7 and BC50 also reinforces the hypothesis that higher levels of polyC-instability in mitochondria associate with higher replication rates of mitochondrial DNA. The absence of mutations in the NADH dehydrogenase gene (A)<sub>8</sub> coding repeat, in contrast with the relative high frequency of mutations in the (C)<sub>8</sub>/T/(C)<sub>6</sub> noncoding repeat, also reinforces the idea of the neutrality of the polycytidine repeat.

#### ACKNOWLEDGMENTS

H.A. was a recipient of the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias fellowship.

#### REFERENCES

- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJH, Staden R, Young IG. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457–465.
- Backer JM, Weinstein IB. 1980. Mitochondrial DNA is a major cellular target for a dihydrodiol-epoxide derivative of benzo[*a*]pyrene. *Science* 209:297–299.
- Bacon AL, Farrington SM, Dunlop MG. 2000. Sequence interruptions confer differential stability at microsatellite alleles in mismatch repair-deficient cells. *Hum Mol Genet* 9:2707–2713.
- Burgart LJ, Zheng J, Shu Q, Strickler JG, Shibata D. 1995. Somatic mitochondrial mutation in gastric cancer. *Am J Pathol* 147:1105–1111.
- Burks RT, Kessis TD, Cho KR, Hedrick L. 1994. Microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Oncogene* 9:1163–1166.
- Coller HA, Khrapko K, Bodyak ND, Nekhaeva E, Herrero-Jimenez P, Thilly WG. 2001. High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. *Nat Genet* 28:147–150.
- Ellegren H. 2000. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nat Genet* 24:400–402.
- Eshleman JR, Markowitz SD. 1995. Microsatellite instability in inherited and sporadic neoplasms. *Curr Opin Oncol* 7:83–89.
- Fliss MS, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, Jen J, Sidransky D. 2000. Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science* 287:2017–2019.
- Guleng G, Lovig T, Meling GI, Andersen SN, Rognum TO. 2005. Mitochondrial microsatellite instability in colorectal carcinomas—frequency and association with nuclear microsatellite instability. *Cancer Lett* 219:97–103.
- Habano W, Nakamura S, Sugai T. 1998. Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: Evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome. *Oncogene* 17:1931–1937.
- Habano W, Sugai T, Nakamura SI, Uesugi N, Yoshida T, Sasou S. 2000. Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 118:835–841.
- Hauswirth WW, Clayton DA. 1985. Length heterogeneity of a conserved displacement-loop sequence in human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 13:8093–8104.
- Hauswirth WW, Van de Walle MJ, Laipis PJ, Olivo PD. 1984. Heterogeneous mitochondrial DNA D-loop sequences in bovine tissue. *Cell* 37:1001–1007.
- Heerdt BG, Augenlicht LH. 1990. Changes in the number of mitochondrial genomes during human development. *Exp Cell Res* 186:54–59.
- Horton TM, Petros JA, Heddi A, Shoffner J, Kaufman AE, Graham SD, Jr., Gramlich T, Wallace DC. 1996. Novel mitochondrial DNA deletion found in a renal cell carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 15:95–101.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. 1993. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363:558–561.
- Kolodner RD, Putnam CD, Myung K. 2002. Maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 297:552–557.
- Kunkel TA, Loeb LA. 1981. Fidelity of mammalian DNA polymerases. *Science* 213:765–767.
- Liu B, Parsons RE, Hamilton SR, Petersen GM, Lynch HT, Watson P, Markowitz S, Willson JK, Green J, de la Chapelle A. 1994. hMSH2 mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. *Cancer Res* 54:4590–4594.
- Marra G, Boland CR. 1995. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: The syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 87:1114–1125.
- Michikawa Y, Mazzucchelli F, Bresolin N, Scarlato G, Attardi G. 1999. Aging-dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication. *Science* 286:774–779.
- Moraes CT, Andreatta F, Bonilla E, Shanske S, DiMauro S, Schon EA. 1991. Replication-competent human mitochondrial DNA lacking the heavy-strand promoter region. *Mol Cell Biol* 11:1631–1637.
- Nishikawa M, Nishiguchi S, Shiomi S, Tamori A, Koh N, Takeda T, Kubo S, Hirohashi K, Kinoshita H, Sato E, Masayasu I. 2001. Somatic mutation of mitochondrial DNA in cancerous and noncancerous liver tissue in individuals with hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 61:1843–1845.
- Nomoto S, Sanchez-Cespedes M, Sidransky D. 2002. Identification of mtDNA mutations in human cancer. *Methods Mol Biol* 197:107–117.
- Oberley LW, Buettner GR. 1979. Role of superoxide dismutase in cancer: A review. *Cancer Res* 39:1141–1149.
- Perucho M, Peinado MA, Ionov Y, Casares S, Malkhosyan S, Stanbridge E. 1994. Defects in replication fidelity of simple repeated sequences reveal a new mutator mechanism for oncogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59:339–348.
- Poetsch M, Petersmann A, Lignitz E, Kleist B. 2004. Relationship between mitochondrial DNA instability, mitochondrial DNA large deletions, and nuclear microsatellite instability in head and neck squamous cell carcinomas. *Diagn Mol Pathol* 13:26–32.
- Polyak K, Li Y, Zhu H, Lengauer C, Willson JK, Markowitz SD, Trush MA, Kinzler KW, Vogelstein B. 1998. Somatic mutations of the mitochondrial genome in human colorectal tumours. *Nat Genet* 20:291–293.
- Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Nomoto S, Cohen D, Xiao Y, Esteller M, Jeronimo C, Jordan RC, Nicol T, Koch WM, Schoenberg M, Mazzarelli P, Fazio VM, Sidransky D. 2001. Identification of a mononucleotide repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors. *Cancer Res* 61:7015–7019.
- Schwartz S, Jr., Perucho M. 2000. Somatic mutations in mitochondrial DNA do not associate with nuclear microsatellite instability in gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* 119:1806–1808.
- Schwartz S, Jr., Yamamoto H, Navarro M, Maestro M, Reventos J, Perucho M. 1999. Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res* 59:2995–3002.
- Shibata D, Navidi W, Salovaara R, Li ZH, Aaltonen LA. 1996. Somatic microsatellite mutations as molecular tumor clocks. *Nat Med* 2:676–681.
- Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosyan S, Perucho M. 1994. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet* 6:273–281.
- Streisinger G, Okada Y, Emrich J, Newton J, Tsugita A, Terzaghi E, Inouye M. 1966. Frameshift mutations and the genetic code. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 31:77–84.
- Thorburn DR, Dahl HH. 2001. Mitochondrial disorders: Genetics, counseling, prenatal diagnosis and reproductive options. *Am J Med Genet* 106:102–114.
- Tsao JL, Yatabe Y, Salovaara R, Jarvinen HJ, Mecklin JP, Aaltonen LA, Tavares S, Shibata D. 2000. Genetic reconstruction of individ-

- ual colorectal tumor histories. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1236–1241.
- Wallace DC. 1992. Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem* 61:1175–1212.
- Wallace DC, Brown MD, Melov S, Graham B, Lott M. 1998. Mitochondrial biology, degenerative diseases and aging. *Biofactors* 7:187–190.
- Welter C, Kovacs G, Seitz G, Blin N. 1989. Alteration of mitochondrial DNA in human oncocyomas. *Genes Chromosomes Cancer* 1:79–82.
- Xu X, Peng M, Fang Z. 2000. The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nat Genet* 24:396–399.
- Yamamoto H, Sawai H, Perucho M. 1997. Frameshift somatic mutations in gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res* 57:4420–4426.
- Yamamoto H, Sawai H, Weber TK, Rodriguez-Bigas MA, Perucho M. 1998. Somatic frameshift mutations in DNA mismatch repair and proapoptosis genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 58:997–1003.

ARTÍCULO 2

*Menoyo A, Alazzouzi H, Espin E, Armengol M, Yamamoto H, Schwartz S Jr.*

**Somatic Mutations in the DNA Damage-Response Genes *ATR* and *CHK1* in Sporadic Stomach Tumors with Microsatellite Instability**

*CANCER RESEARCH 61 November 1, 2001; 7727–7730.*

## Somatic Mutations in the DNA Damage-Response Genes *ATR* and *CHK1* in Sporadic Stomach Tumors with Microsatellite Instability<sup>1</sup>

Anna Menoyo,<sup>2</sup> Hafid Alazzouzi, Eloi Espín, Manel Armengol, Hiroyuki Yamamoto, and Simó Schwartz, Jr.<sup>3</sup>

Molecular Pathology Program, Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM), Barcelona 08035, Spain [A. M., H. A., S. S.]; Servei de Cirurgia General, Hospital General Universitari Vall d'Hebron, Barcelona 08035, Spain [E. E., M. A.]; and First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University, Sapporo 060-8543, Japan [H. Y.]

### Abstract

Maintenance of genomic stability depends on the appropriate cellular responses to DNA damage and the integrity of the DNA repair systems. We analyzed stomach tumors with microsatellite instability (MSI) for frameshift mutations in several potential targets of the mutator phenotype involved in DNA damage-response pathways, such as the ataxia telangiectasia mutated protein-related protein (ATR)-CHK1-Cdc25c pathway, and DNA repair. High frequency of mutations was found within *ATR* [5 (21%) of 23], *MED1* [10 (43%) of 23], *hMSH3* [13 (56%) of 23], and *hMSH6* [10 (43%) of 23] genes. Also, a low frequency of mutations within the *CHK1* gene was detected in 9% (2 of 23) of tumors. No mutations of *hMLH3*, *ATM*, *BRCA1*, or *NBS1* genes were detected. These results confirm *ATR*, *MED1*, and *CHK1* as targets of the mutator pathway in stomach tumorigenesis, and also suggest a potential role of *MED1* increasing, together with *hMSH3* and *hMSH6*, the genomic instability in the mutator pathway as a secondary mutator. Furthermore, these results suggest that the inhibition of the ATR-CHK1 DNA damage-response pathway might be involved in the tumorigenesis of gastric cancer with microsatellite instability.

### Introduction

Maintenance of the genome stability depends on the correct regulation of the cellular responses to DNA damage and the integrity of the DNA repair systems. Because of defects in DNA mismatch repair genes, sporadic stomach tumors of the mutator phenotype harbor hundreds of thousands of somatic mutations in repetitive sequences genomewide. According to the model (1), cells become tumorigenic when inactivating mutations occur in repetitive sequences within coding regions of cancer genes. The inactivation of these genes, known as targets of the mutator phenotype, give tumor cells growing advantage and positive selection, and become clonally perpetuated. *ATR*<sup>4</sup> is a member, together with the ATM and the DNA protein kinase (DNA-PK), of the phosphatidylinositol kinase family and activates after DNA damage (reviewed in Refs. 2 and 3). Also, *ATR* activates by phosphorylation the cell cycle checkpoint kinase *CHK1*, arresting cells into G<sub>2</sub>-M through the inactivation of the Cdc25c kinase also by phosphorylation (4). Furthermore, it has been recently shown that *ATR* phosphorylates p53 and *BRCA1* proteins after DNA damage (5, 6). Because *ATR* and *CHK1* genes have (A)<sub>10</sub> and (A)<sub>9</sub>

repeats in their respective coding sequences, both are potential targets of the mutator phenotype. Frameshift mutations in the *ATR* or *CHK1* genes might compromise the ATR-CHK1-Cdc25c DNA damage-response pathway, avoiding the G<sub>2</sub>-M cell cycle arrest of tumor cells. Also, inactivating mutations of the *ATR* or *CHK1* genes may inhibit the phosphorylation of p53 and *BRCA1* proteins after DNA damage, compromising the p53 apoptotic activity or the repair activity of *BRCA1* in these tumors. Indeed, *BRCA1* together with *ATM* form a large protein repair complex with several other proteins such as the Mre11-Rad50-NBS1 repair complex and the hMLH1, hMSH2, and hMSH6 DNA repair proteins (7). Recently, two new repair proteins have also been reported to interact with hMLH1: *MED1* and hMLH3 (8, 9). Because most of the genes encoding these repair proteins contain repetitive sequences within their coding regions, they are potential targets of the mutator phenotype and, therefore, secondary mutator candidates in the mutator pathway for gastrointestinal tumorigenesis.

We analyzed sporadic stomach tumors and cell lines with MSI for frameshift mutations within the *MED1*, *hMLH3*, *hMSH3*, *hMSH6*, *ATM*, *BRCA1*, *NBS1*, *ATR*, and *CHK1* genes. Frequent frameshift mutations in *ATR*, *CHK1*, *MED1*, *hMSH3*, and *hMSH6* were found. These results confirm *ATR*, *CHK1*, and *MED1* as target genes of the mutator phenotype in gastric cancer, which suggests the inhibition of the ATR-CHK1 DNA damage-response pathway in stomach tumorigenesis. A potential role of *MED1* as secondary mutator together with *hMSH3* and *hMSH6* in the mutator pathway is also suggested.

### Materials and Methods

**Tumor Samples and Cell Lines.** Tumors were obtained from the National Cancer Center Research Institute (Tokyo, Japan), from the Sapporo Medical University (Sapporo, Japan) and from the Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular Vall d'Hebron (CIBBIM; Barcelona, Spain). Sample collection was carried out in accordance with previously established ethical protocols. Collected tumors were immediately frozen in liquid nitrogen for further analysis. Human cancer cell lines were obtained from the American Type Culture Collection and also from the Japanese Cancer Research Resources Bank in Osaka, Japan. Genomic DNA was extracted with phenol-chloroform according to standard procedures.

**Analysis of Instability in Repetitive Sequences within Microsatellites and Target Genes.** Stomach tumors were analyzed for genomic MSI by PCR using two mononucleotide repeats, (A)<sub>18</sub> of APΔ3 and (A)<sub>26</sub> of BAT26, and the dinucleotide repeat DIS158, as described previously (10–12). Frameshift mutations in target genes were also analyzed. Briefly, PCR was carried out with Vent DNA polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA) in the presence of 0.2 mCi of [α-<sup>32</sup>P]dCTP as follows: one cycle at 94°C for 4 min., followed by 35 cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s., and 72°C for 30 s. PCR products were analyzed on a 6% denaturing polyacrylamide gel and subjected to autoradiography. The PCR primers for *ATM*, *BRCA1*, *NBS1*, *hMSH3*, and *hMSH6* have been described elsewhere (13, 14). The corresponding primers for *ATR* were 5'-GCC ACT TCT CAA CAT GAA TG-3' and 5'-GCA AGT TTT ACT GGA CTA GG-3'; for *CHK1*, 5'-AAT TGC CAT GGG ACC AAC C-3' and 5'-CTA GAG GAG CAG AAT CGA TT-3'; for *MED1*, 5'-TGC

Received 6/12/01; accepted 9/13/01.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> Supported by Grant FIS 01/1350 from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias. H. A. is supported by a fellowship from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias.

<sup>2</sup> Present address: Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale (INSERM), Hôpital Henri Mondor, 94010 Criteil, France.

<sup>3</sup> To whom requests for reprints should be addressed, at Molecular Pathology Program, CIBBIM, Passeig Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035, Spain. Phone: 34-93-489-4060; Fax: 34-93-489-4064; E-mail: schwartz@hg.vhebron.es.

<sup>4</sup> The abbreviations used are: ATM, ataxia telangiectasia mutated protein; ATR, ATM-related protein; MSI, microsatellite instability; MMP, microsatellite mutator phenotype.



ATT TCT GAT GCT GGA GC-3' and 5'-TGA TGC CAG AAG TTT TTT GTT C-3'; and for *hMLH3*, 5'-ATG CTA CTG AAG TGG GAT GCC A-3' and 5'-CAG TGG AAC ATA ATT TAA CTC G-3'. All primers amplified coding sequences that comprise the mononucleotide tracts of (A)<sub>7</sub> in *NBS1*; (T)<sub>7</sub> in *ATM*; (A)<sub>8</sub> in *BRCA1* and *hMSH3*; (C)<sub>8</sub> in *hMSH6*; (A)<sub>9</sub> in *hMLH3* and *CHK1*; and (A)<sub>10</sub> in *ATR* and *MED1* genes.

## Results

**Frequent Frameshift Mutations within the *ATR* and *CHK1* Genes of the DNA Damage-Response Pathway in Stomach Tumors of the Mutator Phenotype.** MSI was detected in 13% (23 of 175) sporadic stomach tumors from our collection. These cases were analyzed for frameshift mutations in repetitive sequences within the DNA damage-response genes *ATR* and *CHK1*, from the ATR-CHK1-Cdc25c-Cdc2 damage-response pathway (Fig. 1). Mutations within the (A)<sub>10</sub> repeat of *ATR* were found in 21% (5 of 23) of cases. All of the cases showed deletions of one adenine and were heterozygous (Table 1). Frameshift mutations were also detected in the endometrial tumor cell lines with MSI as follows: HEC-1A, HEC-1B, SK-UT-1, and SK-UT-1B. These frameshift mutations generate, from the codon 774 of *ATR*, two alternative reading frames with stop codons at the 776 codon for the insertions, and the 777 codon for the deletions. These truncated forms of *ATR* lack the last two-thirds of the protein, which include the functional ATR phosphatidylinositol 3-kinase signature at the COOH termini (reviewed in Ref. 3).

Also, an insertion and a deletion of one adenine in the *CHK1* gene were found in tumor cases V155 and V158, respectively. The low intensity of the mutant band of case V158 (Fig. 1) is attributable to the high amount of contaminating normal tissue present in the tumor sample, according to the bat26 microsatellite analysis (not shown). Therefore, a low frequency of slippage mutations within *CHK1* characterizes stomach tumors with MSI. No mutations of *ATR* or *CHK1* were found in stomach tumors and tumor cell lines without MSI (Fig. 1). Interestingly, when we confronted cases with mutations within these target genes, we found that most tumors with *ATR* mutations (4 of 5) also harbor concomitant mutations of the *hMSH6* gene. Indeed, 17% (4 of 23) of tumor cases show simultaneous mutations of *ATR* and *hMSH6*, whereas the expected ratio of concomitant *ATR-hMSH6*

mutations was only 9%. However, this association did not reach statistical significance because of the low number of cases. No similar associations were observed when the other target genes were confronted, and the yielded values were always in accordance with the expected ratios in all cases.

***MED1* as a Target Gene of the Mutator Phenotype in Gastric Tumors: High Incidence of Frameshift Mutations in Secondary Mutators.** Frameshift mutations at the DNA repair genes *ATM*, *BRCA1*, *NBS1*, *MED1*, *hMLH3*, *hMSH3* and *hMSH6*, were also analyzed (Fig. 1; Table 1). Mutations within the (A)<sub>10</sub> tract of *MED1* were found in 43% (10 of 23) of the tumors (Table 1). All these positive cases had deletions of one adenine and were heterozygous. No mutations were found within the repetitive tracts of *ATM*, *BRCA1*, *NBS1*, or *hMLH3* genes, although a deletion of one adenine within *hMLH3* was found in the MSI+ stomach tumor cell line SNU-1. Also, mutations in the (A)<sub>8</sub> and (C)<sub>8</sub> tracts from the *hMSH3* and *hMSH6* secondary mutators were found in 56% (13 of 23) and 43% (10 of 23), respectively, of tumors. Furthermore, all positive cases for *hMSH3* mutations had deletions of one adenine, whereas tumors with *hMSH6* mutations had preferentially insertions of one or two cytosines. Also, cases V156, J53, and J85 were homozygous for mutations in *hMSH6* and cases V22, J71, J85, J89, J94, and J99 showed concomitant mutations of both genes (Table 1). No mutations of *MED1*, *hMLH3*, *hMSH3*, or *hMSH6* were found in additional stomach tumors and tumor cell lines without MSI (Fig. 1). According to our results, a high incidence of frameshift mutations of the *MED1*, *hMSH3*, and *hMSH6* DNA repair genes characterizes stomach tumors with MSI. These results also suggest a potential role of *MED1*, together with *hMSH3* and *hMSH6*, as a secondary mutator of the mutator phenotype pathway for gastrointestinal tumorigenesis.

## Discussion

We have shown frequent frameshift mutations of the *ATR* and a low frequency of slippage mutations of the *CHK1* kinases in gastric tumors with MSI. *ATR* and *CHK1* proteins are checkpoint kinases of the cellular response pathway to DNA damage, which induce cellular arrest in G<sub>2</sub>-M after DNA damage through the inactivation of Cdc25c

Fig. 1. Frameshift mutations in stomach tumors and tumor cell lines of the mutator phenotype. On the left, genes. At the top, tumor cell lines and tumor samples. Arrowheads on the right, the wild-type PCR product and the size of the repetitive sequence; arrowheads pointing up or down, insertions and deletions, respectively, of one base. No mutations were detected in 50 additional stomach tumors without MSI. Additional tumor cell lines without MSI were also negative for mutations, including seven cell lines from the stomach (MKN1, MKN28, MKN45, MKN74, KATOIII, NUGC3, and AZ521), four from the colon (SW628, CaCo2, HT-29, and SW403), and three from endometrium (Hs34.T, Hs248.T, and Hs825.T).

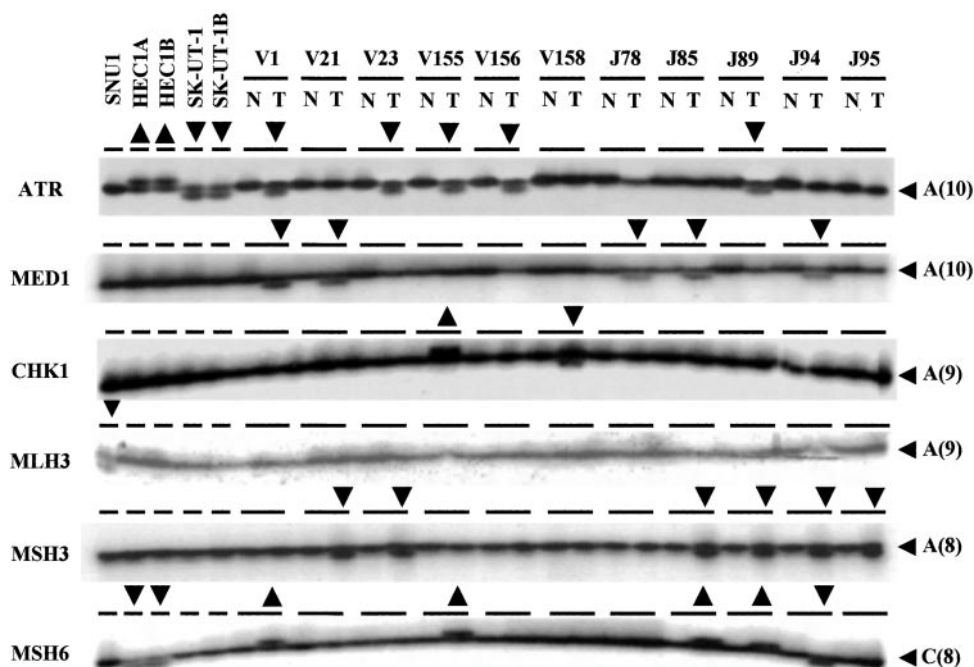


Table 1 Target genes in stomach tumors with MSI

Tumor cases	Analysis of microsatellites		Target Genes					
	Bat26	APΔ3	<i>hMSH3</i> (A) <sup>8<sup>a</sup></sup>	<i>hMSH6</i> (C) <sup>8<sup>a</sup></sup>	<i>CHK1</i> (A) <sup>9<sup>a</sup></sup>	<i>hMLH3</i> (A) <sup>9<sup>a</sup></sup>	<i>ATR</i> (A) <sup>10<sup>a</sup></sup>	<i>MED1</i> (A) <sup>10<sup>a</sup></sup>
Stomach tumors, percentage of positive cases <sup>b</sup>			56% (13/23)	43% (10/23)	9% (2/23)	0%	21% (5/23)	43% (10/23)
V1	+ <sup>c</sup>	+	–	+u	–	–	+d	+d
V6	+	+	–	–	–	–	–	–
V21	+	+	+d	–	–	–	–	+d
V22	+	+	+d	+u	–	–	–	–
V23	+	+	+d	–	–	–	+d	–
V152	+	+	+d	–	–	–	–	–
V153	+	+	–	–	–	–	–	+d
V154	+	+	+d	–	–	–	–	+d
V155	+	+	–	+u	+u	–	+d	–
V156	+	+	–	+u,uu	–	–	+d	–
V157	+	+	–	–	–	–	–	+d
V158	+	+	–	–	+d	–	–	–
J53	+	+	–	+u,uu	–	–	–	–
J60	+	+	+d	–	–	–	–	–
J62	+	+	–	–	–	–	–	+d
J71	+	+	+d	+u	–	–	–	+d
J78	+	+	–	–	–	–	–	+d
J85	+	+	+d	+u,d	–	–	–	+d
J89	+	+	+d	+u	–	–	+d	–
J94	+	+	+d	+d	–	–	–	+d
J95	+	+	+d	–	–	–	–	–
J99	+	+	+d	+d	–	–	–	–
J106	+	+	+d	–	–	–	–	–

<sup>a</sup> The size of the repeat.

<sup>b</sup> All tumors and tumor cell lines were negative for mutations within the DNA repair genes *ATM* (T)<sub>7</sub>, *NBS1* (A)<sub>7</sub>, and *BRCA1* (A)<sub>8</sub>.

<sup>c</sup> +, mutant; –, wild type; +u, 1-bp insertion; +u,uu, homozygous insertions of 1 and 2 bp; +d, 1-bp deletion.

and Cdc2 by phosphorylation (4). ATR plays a central role in the regulation of this response pathway, and its inactivation in gastric tumors clearly suggests that the inhibition of the ATR/CHK1 pathway in stomach cancer may lead to tumor cell progression.

Indeed, it has been shown that heterozygous mutations of *CHK1* enhance tumor formation in WNT-1 transgenic mice, which directly implies an involvement of the ATR/CHK1 pathway in tumor suppression (4). Also, homozygous inactivation of *ATR* in mice results in embryonic lethality (15), and overexpression of a kinase-inactive form of ATR in human fibroblasts reduces cell viability by 2–5 times (16, 17). These studies show a clear dominant-negative effect of the inactive-ATR form, capable of inducing cell death independently of the presence of wild p53. In accordance with this data, our results show heterozygous mutations of *ATR* and *CHK1* in the tumors and tumor cell lines analyzed, which suggests a possible dominant-negative effect of the ATR mutations in stomach cancer also. The presence of heterozygous mutations of *ATR* in the endometrial tumor cell lines HEC1A/B and SK-UT-1/B will allow functional studies of this protein and will provide the field with a cellular model for further research. These studies should clarify whether the mutant forms of ATR, originated by slippage mutations, also have a dominant-negative effect in these tumors.

Recently, ATR has been shown to phosphorylate the Ser15 of p53, promoting the transactivation of p53 and the phosphorylation of p21, which in turn inhibits the Cdk2 kinase and also arrests the cell cycle (Ref. 5; reviewed in Ref. 2). It should be noted also, that phosphorylation of p53 by CHK1 has been reported recently by Shieh *et al.* (18). However, although this pathway may also lead cells to apoptosis after DNA damage, it is not clear yet whether the inactivation of ATR and CHK1 in stomach tumors will prevent tumor cells from undergoing apoptosis. Nonetheless, we suggest that frameshift mutations in *ATR* and *CHK1* might lead to the inactivation of the p53-cell cycle arrest pathway in stomach tumors with MSI, thus contributing to the progression of tumor cells in gastric cancer of the mutator phenotype.

Furthermore, our results also agree with the haploinsufficiency model of the mutator phenotype, recently proposed by Perucho *et al.* (19). According to the model, monoallelic mutations in several target genes that belong to the same tumor-related pathway accumulate in cancer cells during tumor progression and inactivate the pathway. Hence, our results suggest that monoallelic mutations in *ATR* and *CHK1* genes may cause the inactivation of the ATR/CHK1 DNA damage-response pathway in gastrointestinal tumors of the mutator phenotype.

On the other hand, because the integrity of the cellular genome also depends on specific DNA repair protein complexes, we extended our analysis to other targets involved in DNA repair. It is known that ATR and ATM, another checkpoint kinase that is also involved in pathways similar to those of ATR, can activate BRCA1 by phosphorylation. BRCA1 together with ATM forms a large repair protein complex with the DNA repair Mre11-Rad50-NBS1 complex and hMLH1, hMSH2, and hMSH6 proteins. This complex, known as BASC (for BRCA1-associated genome surveillance complex), acts as a sensor of DNA damage and is involved in the repair of double-strand break lesions (7). Also, hMLH1, hMSH2, and hMSH6, together with hMSH3, MED1, and hMLH3 proteins are involved in the recognition complexes and repair of mismatch replication errors. Interestingly, most of these proteins have repetitive sequences within the coding region of their respective genes and are candidate targets of the mutator phenotype. Indeed, previous studies have already shown mutations in *hMLH1*, *hMSH2*, *MED1*, *Rad50*, *hMSH3*, and *hMSH6* in gastrointestinal tumors of the mutator phenotype (12–14, 20). Accordingly, our results show frequent mutations of *hMSH3*, *hMSH6*, and *MED1* genes in gastrointestinal tumors with MSI. Although it is not known yet whether mutations in *MED1* can increase the genomic instability that characterizes these tumors, our results suggest *MED1* as a potential secondary mutator of the mutator pathway, although further analyses are needed to confirm this possibility.

An adequate regulation and activity of specific cellular DNA dam-

age-response pathways and DNA repair systems are responsible for the maintenance of the genome stability and integrity in human cells. Alterations of these central molecular regulatory pathways may lead cells to become tumoral. We have shown that because of an exacerbated genomic instability, gastric tumors of the mutator phenotype harbor frameshift mutations in genes involved in main cell-cycle regulatory and DNA repair pathways. Accordingly, inactivating mutations in several repair genes such as *hMSH3*, *hMSH6*, and *MED1*, and also the inactivation of the ATR/CHK1 DNA damage-response pathway, might contribute to the tumor progression of the gastric cancer with MSI. Further analyses are required to show whether the inactivation of these DNA repair/damage-response genes might act also as cause-contributors of the mutator phenotype instability.

## References

1. Perucho, M. Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *J. Biol. Chem.*, *377*: 675–684, 1996.
2. Shiloh, Y. ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, *11*: 71–77, 2001.
3. Rotman, G., and Shiloh, Y. ATM: a mediator of multiple responses to genotoxic stress. *Oncogene*, *18*: 6135–6144, 1999.
4. Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X. S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L. A., and Elledge, S. J. Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G<sub>2</sub>/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev.*, *14*: 1448–1459, 2000.
5. Lakin, N. D., Hann, B. C., and Jackson, S. P. The ataxia-telangiectasia related protein ATR mediates DNA-dependent phosphorylation of p53. *Oncogene*, *18*: 3989–3995, 1999.
6. Chen, J. Ataxia telangiectasia-related protein is involved in the phosphorylation of BRCA1 following deoxyribonucleic acid damage. *Cancer Res.*, *60*: 5037–5039, 2000.
7. Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S. J., and Qin, J. BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev.*, *14*: 927–939, 2000.
8. Bellacosa, A., Cicchillitti, L., Schepis, F., Riccio, A., Yeung, A. T., Matsumoto, Y., Golemis, E. A., Genuardi, M., and Neri, G. MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *96*: 3969–3974, 1999.
9. Lipkin, S. M., Wang, V., Jacoby, R., Banerjee-Basu, S., Baxevanis, A. D., Lynch, H. T., Elliot, R. M., and Collins, F. S. *MLH3*: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nat. Genet.*, *24*: 27–35, 2000.
10. Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D., and Perucho, M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for clonal carcinogenesis. *Nature (Lond.)*, *363*: 558–561, 1993.
11. Shibata, D., Peinado, M. A., Ionov, Y., Malkhosyan, S., and Perucho, M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat. Genet.*, *6*: 273–281, 1994.
12. Schwartz, S., Jr., Yamamoto, H., Navarro, M., Maestro, M., Reventós, J., and Perucho, M. Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res.*, *59*: 2995–3002, 1999.
13. Yamamoto, H., Sawai, H., and Perucho, M. Frameshift somatic mutations in gastric cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res.*, *57*: 4420–4426, 1997.
14. Kim, N., Choi, Y. R., Baek, M. J., Kim, Y. H., Kang, H., Kim, N. K., Min, J. S., and Kim, H. Frameshift mutations at coding mononucleotide repeats of the *hRAD50* gene in gastrointestinal carcinomas with microsatellite instability. *Cancer Res.*, *61*: 36–38, 2001.
15. Brown, E. J., and Baltimore, D. ATR: disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev.*, *14*: 397–402, 2000.
16. Wright, J. A., Keegan, K. S., Herendeen, D. R., Bentley, N. J., Carr, A. M., Hoekstra, M. F., and Concannon, P. Protein kinase mutants of human ATR increase sensitivity to UV and ionizing radiation and abrogate cell cycle checkpoint control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *95*: 7445–7450, 1998.
17. Cliby, W. A., Roberts, C. J., Cimprich, K. A., Stringer, C. M., Lamb, J. R., Schreiber, S. L., and Friend, S. H. Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *EMBO J.*, *17*: 159–169, 1998.
18. Shieh, S.-Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y., and Prives, C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev.*, *14*: 289–300, 2000.
19. Yamamoto, H., Gil, J., Schwartz, S., Jr., and Perucho, M. Frameshift mutations in Fas, Apaf-1, and Bcl-10 in gastro-intestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cell Death Differ.*, *7*: 238–239, 2000.
20. Riccio, A., Aaltonen, L. A., Godwin, A. K., Loukola, A., Percesepe, A., Salovaara, R., Masciullo, V., Genuardi, M., Paravatou-Petsotas, M., Bassi, D. E., Ruggeri, B. A., Klein-Szanto, A. J. P., Testa, J. R., Neri, G., and Bellacosa, A. The DNA repair gene *MBD4(MED1)* is mutated in human carcinomas with microsatellite instability. *Nat. Genet.*, *23*: 266–268, 1999.

## **VI- DISCUSIÓN**

---

## **1- La inestabilidad genómica y la haploinsuficiencia de los genes hMLH1 y hMSH2: (Anexo 1)**

Un defecto en los genes del sistema de reparación (MMR) provoca la aparición de un fenotipo caracterizado por la inestabilidad genómica en los tumores. La inestabilidad de los microsatélites presenta una gran utilidad para el diagnóstico de pacientes con tumores donde el sistema de reparación está alterado. En los pacientes de HNPCC, un total de 85–90% de individuos con esta enfermedad son positivos al test de inestabilidad que aún siendo relativamente sensible es inespecífico, debido a que un porcentaje de 10-15 % de tumores inestables son de origen esporádico (Alonso et al., 2001). BAT26 una secuencia repetitiva mononucleotídica de 26 adeninas, localizada en el intrón 5 del gen hMSH2 (Zhou et al., 1998b) es uno de los cinco marcadores moleculares recomendados para detectar la inestabilidad genómica (Boland et al., 1998; Hoang et al., 1997). No obstante, numerosas evidencias indican que la única presencia de inestabilidad en BAT26 ya es suficiente para diagnosticar tumores con MSI-H, y su uso identifica alteraciones en el 97% de los casos (Loukola et al., 2001). El análisis de esta secuencia microsatélite en la mayoría de tejidos presenta, un patrón polimórfico de diferentes longitudes que sigue una distribución de tipo campana de Gauss. (Figura 6) Aunque el sistema de MMR es funcional las secuencias microsatélites son inherentemente inestables y pueden acumular mutaciones de una forma dependiente de replicación debido a que por simple probabilidad, un pequeño porcentaje de mutaciones se escapa a la reparación. Por este motivo la secuencia BAT26 presenta una distribución de tipo Gauss incluso en el tejido normal (Samowitz et al., 1999; Zhou et al., 1997). La presencia de inestabilidad genómica se traduce en una alteración de los patrones que definen el polimorfismo de BAT26, lo que comporta la aparición de fragmentos más cortos y un desplazamiento de la distribución de Gauss.

Las células no-neoplásicas en pacientes de HNPCC presentan un fenotipo normal debido a la persistencia del otro alelo salvaje del gen MMR mutado en estas familias. La inactivación o la pérdida de este alelo salvaje tiene como consecuencia la pérdida de funciones del sistema de reparación y la formación del tumor, este proceso tarda decenas de años desde la pérdida del segundo alelo hasta la aparición del tumor (Casares et al., 1995; Hemminki et al., 1994). Parece que la pérdida de MMR es un

---

suceso temprano en el desarrollo tumoral en los pacientes HNPCC, que ocurre antes de la selección de mutaciones en genes supresores (Aaltonen et al., 1994; Iino et al., 2000). La mayoría de métodos de análisis actuales, permiten solo la detección de los alelos predominantes, y aunque los niveles bajos de inestabilidad pueden generar alelos más cortos con una frecuencia baja, estos fragmentos cortos no pueden ser detectados debido a la sensibilidad técnica. En nuestro estudio hemos utilizado un método alternativo basado en técnicas de PCR-clonación con el objetivo de detectar niveles bajos de moléculas inestables en pacientes portadores de mutaciones germinales en los cuales la MSI podría detectarse antes del diagnóstico del tumor. Hemos estudiado dos familias HNPCC: familia A con una mutación germinal en hMLH1 y la familia B en hMSH2. Hemos analizado la sangre periférica de individuos de cada familia tanto portadores como no portadores de la mutación y fenotípicamente normales con el objetivo de determinar la distribución de las diferentes longitudes de la secuencia de BAT26.

El análisis de los clones de individuos de las dos familias definió un rango de longitudes de BAT26 entre 21 y 27 adeninas (los que consideramos como alelos estables) en los miembros no portadores de mutaciones, y un rango de longitudes entre 15 y 27 adeninas en los miembros portadores de mutaciones (la longitud igual o inferior a 20 adeninas identifica alelos inestables). Los dos grupos (portadores/no portadores) demuestran una distribución de tipo Gauss sin que existan diferencias respecto a la edad de los pacientes en ambos grupos. La frecuencia de alelos inestables detectados representa el 5,6% (102/1814) del total de clones analizados en los pacientes portadores de ambas familias. Nuestros resultados demuestran que un nivel bajo de inestabilidad genómica caracteriza los pacientes HNPCC portadores de la mutación antes del diagnóstico del tumor.

El modelo actual de inestabilidad de microsatélites en tumores defectivos en reparación de errores replicativos asume que el defecto de reparación y sus consecuencias (acumulación progresiva de mutaciones) se inicia tras la pérdida-inactivación de los dos alelos del gen reparador primario (Tsao et al., 2000). Mientras que la pérdida se produce de forma bialélica por hipermetilación en los casos colorrectales inestables esporádicos, en los tumores inestables de HNPCC se produce de forma progresiva: mutación germinal de un alelo y pérdida (LOH) alélica posterior del segundo alelo (Kuismanen et al., 2000). Según nuestros datos, el fenotipo mutador podría no ser realmente recesivo, como se ha postulado anteriormente (Casares et al., 1995), sino que ya se iniciaría tras

---

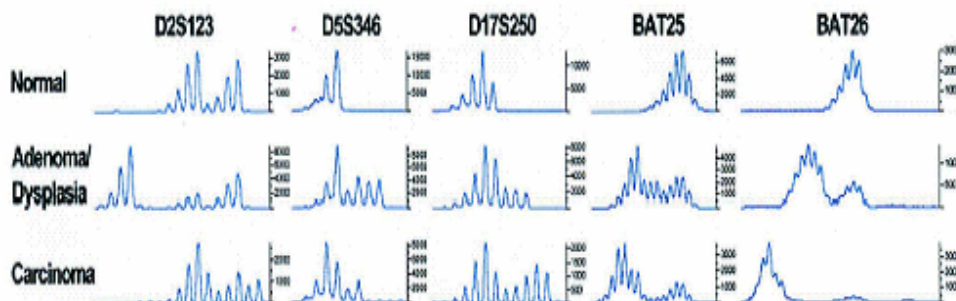
la inactivación monoalélica del gen, aunque la gran acumulación de mutaciones así como el efecto de inestabilidad importante sólo tendría lugar tras la pérdida bialélica. De ser así, la acumulación de mutaciones tendría lugar en el tejido normal incluso antes de la aparición de la célula MMR<sup>-/-</sup> y por tanto, de la célula tumoral MMR<sup>-/-</sup> y de su expansión clonal. Este modelo se basaría en la haploinsuficiencia del gen reparador y reflejaría la presencia de células circulantes con un fenotipo normal MSI (-/+). De hecho, estudios anteriores realizados por Calabrese y sus colaboradores sugieren que las células no-neoplásicas de colon en pacientes HNPCC pueden acumular mutaciones oncogénicas en el tejido antes de la pérdida completa de MMR, lo que se puede explicar por una reducción de efectividad del sistema MMR (Calabrese et al., 2004). Estos resultados están en concordancia con otros estudios realizados en diferentes modelos animales como la *Drosophila* y ratones transgénicos. Se ha demostrado que mutaciones germinales heterocigotas favorecen el aumento de niveles de inestabilidad, y se ha obtenido resultados similares en levaduras con defecto en MLH1 y MSH2 (Baida et al., 2003; Lopez et al., 2002). Las mutaciones observadas podrían ser acumuladas desde el nacimiento en los tejidos de los pacientes HNPCC portadores de la mutación germinal, aunque el grado de inestabilidad no está en correlación con la edad de los pacientes que llevan la mutación, lo que podría deberse a la propia haploinsuficiencia.

No obstante, la presencia de baja inestabilidad en los pacientes HNPCC portadores de la mutación y con un fenotipo normal, puede tener otras explicaciones alternativas. Así, otra posibilidad es el efecto de que la mutación en los genes MLH1 y MSH2 que existe en las células normales con un genotipo MSI(-/+) sea dominante negativa. Sin embargo esta posibilidad es poco probable por dos motivos: primero, porque la mayoría de tumores HNPCC pierden el otro alelo salvaje de MMR mediante la pérdida de heterocigocidad (LOH), lo que sugiere que la mayoría de mutaciones en los genes MMR en pacientes HNPCC no ejercen funciones dominantes negativas. Segundo, porque las mutaciones germinales homocigotas de genes de MMR son letales o provocan la muerte a muy corta edad (Vilkki et al., 2001).

Por otro lado, la presencia de alelos muy cortos de entre 15-17 adeninas podría sugerir la presencia de células circulantes que han perdido completamente los dos alelos del gen reparador (MMR<sup>-/-</sup>), lo que explicaría la presencia de células que acumulan más alteraciones. Estas células podrían tener un fenotipo normal o maligno. De hecho, a

cuatro de los cinco individuos analizados se les ha diagnosticado una neoplasia antes o después de la extracción de sangre.

Explicaciones al margen, nuestros resultados pueden tener una implicación clínica, ya que la detección de baja inestabilidad puede ser utilizada para la caracterización de pacientes portadores de mutaciones germinales, lo que podría ser de gran utilidad en aquellos casos o familias en los que no se detectan mutaciones germinales en los genes reparadores del sistema de reparación (MMR) conocidos hasta el momento. Además, la detección de alelos mutantes de BAT26 puede servir como una herramienta más para el análisis de la presunta patogenicidad de las mutaciones de cambio de sentido en los genes MMR en los pacientes HNPCC portadores. De hecho, un 29% de las mutaciones identificadas en hMLH1 y un 16 % en hMSH2 son de cambio de sentido, lo que en determinados casos puede dificultar la interpretación de resultados en el diagnóstico de HNPCC (en especial en ausencia de otros familiares afectados), ante la posibilidad de que no sean necesariamente patogénicas. En este sentido, un 12% de las mutaciones por cambio de sentido identificadas en hMLH1 y un 20% en el caso de hMSH2 son polimorfismos y no son consideradas como causales del síndrome de HNPCC (Lynch & de la Chapelle, 2003). El análisis de proteínas del sistema de reparación mediante técnicas inmunohistoquímicas nos permite detectar los niveles de expresión de proteínas del sistema de reparación, de manera que puede dar una idea del estado de los genes del sistema de reparación e indirectamente de la patogenicidad de las mutaciones (Lindor et al., 2002; Thibodeau et al., 1998). En este sentido, el uso de la técnica de PCR-clonación puede ser un nuevo instrumento para constatar la patogenicidad de algunas mutaciones frente a otras.



**Figura 6:** Inestabilidad de microsatélites en adenocarcinomas gástricos y su adenoma. El tejido normal presenta una campana de Gauss en los cinco marcadores utilizados.



---

## **2- La inestabilidad en el genoma mitocondrial:** (Artículo 1, Anexo 2)

Aunque la inestabilidad de microsatélites (MSI) esta relacionada con defectos en el sistema de reparación de errores (MMR), existen indicios de la implicación de otros factores como la inestabilidad inherente propia de las secuencias repetitivas y la fidelidad de las polimerasas de replicación. Se ha postulado que la falta de fidelidad de la polimerasa podría ser el primer mecanismo para la inducción espontánea de mutaciones (Viguera et al., 2001). En un estudio realizado por Nazumi A y sus colaboradores se ha identificado un nuevo mecanismo para la inducción de mutaciones en microsatélites en líneas celulares (fibroblastos) con un sistema de reparación normal transfectadas con el gen de la polimerasa  $\beta$  (Yamada & Farber, 2002). La sobreexpresión de la polimerasa  $\beta$  induce mutaciones en la secuencias microsatélites de manera independiente de la composición de mononucleótidos, quizá causando la perturbación de la replicación del DNA. En este estudio sugieren que las mutaciones observadas en tumores de baja inestabilidad (MSI-L) podrían deberse a la sobreexpresión de polimerasa  $\beta$  en presencia de una actividad normal del sistema de reparación de errores. Se piensa que la polimerasa  $\beta$  está involucrada en el proceso de excisión de bases, de manera que protege las células del daño inducido por agentes citotóxicos (Sobol et al., 1996; Sobol et al., 2000). En condiciones normales la expresión de polimerasa  $\beta$  es baja durante el ciclo celular (Zmudzka et al., 1988), también la fidelidad de replicación de este enzima es muy baja comparado con otras polimerasas. Las células eucariotas contienen por lo menos otras cuatro polimerasas: polimerasas de replicación de DNA  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , y  $\epsilon$  requeridas para la replicación del DNA en el núcleo. Es de particular importancia que la DNA polimerasa  $\gamma$  es la única DNA polimerasa encargada de la replicación y reparación del DNA mitocondrial (DNAMt).

Se ha demostrado que la polimerasa  $\gamma$  presenta una alta tasa de infidelidad comparada con las polimerasas nucleares (Kunkel & Loeb, 1981), y se han encontrado varias mutaciones tanto puntuales como inestabilidad de microsatélites en el DNA mitocondrial en diferentes tipos de cáncer humano (Fliss et al., 2000; Maximo et al., 2002). En particular, se ha observado inestabilidad mitocondrial (mtMSI) dentro de la secuencia mononucleotídica D310 (7C/T/6C) en cáncer de mama (29%), cáncer de

---

cabeza y cuello de (37%) (Sánchez-Céspedes et al., 2001), en cáncer de ovario (20%) (Liu et al., 2001) y también en cáncer de endometrio (32%) (Liu et al., 2003).

En estudios anteriores se ha demostrado que la inestabilidad de microsatélites que caracteriza los microsatélites de un fenotipo mutador en tumores gastrointestinales no está asociada con la inestabilidad mitocondrial en la secuencia repetitiva D310 (Schwartz & Perucho, 2000). Las variaciones detectadas en el DNAm<sub>t</sub> en nuestro estudio no están asociadas con la inestabilidad de los microsatélites nucleares como BAT26 y APA3 (estas dos secuencias son más largas que la secuencia mitocondrial analizada). Por lo tanto, los genes del sistema MMR conocidos, cuya inactivación provoca la inestabilidad de microsatélites en tumores gastrointestinales no están involucrados en la reparación de errores en el DNA mitocondrial.

Así, ya que la inestabilidad mitocondrial en tumores colorrectales y de estómago no está asociada con la inestabilidad nuclear (Guleng et al., 2005; Schwartz & Perucho, 2000), sugerimos que la inestabilidad de microsatélites en el DNAm<sub>t</sub> está causada por la inestabilidad intrínseca de la secuencia microsatélite, así como por la insuficiencia o ausencia de un sistema de reparación del DNAm<sub>t</sub> adecuado. En este sentido, un estudio reciente realizado por B Szczesny y sus colaboradores sugiere la presencia de un sistema de reparación específico del DNAm<sub>t</sub>, aunque no se conoce la existencia de una posible conexión con el sistema de reparación del DNA nuclear (Szczesny et al., 2003). Estudios realizados en cáncer de mama proponen la existencia de sistemas diferentes responsables del mantenimiento de estabilidad genómica en mitocondria y en el núcleo en células tumorales (Richard et al., 2000).

Por otro lado, la perseverancia de niveles similares de heteroplasma en dos focos metastásicos a partir del tumor 406 con mtMSI, sugiere la existencia de heteroplasma intracelular en los tumores primarios. Debido a la clonación de células tumorales, la presencia de heteroplasma en los tumores con inestabilidad en DNAm<sub>t</sub>, plantea la pregunta de como se seleccionan y persisten las diferentes variantes del DNAm<sub>t</sub>. De acuerdo con el modelo del fenotipo mutador para inestabilidad de microsatélites, sólo las mutaciones en genes diana del fenotipo mutador que dan ventajas clonales a las células tumorales pueden persistir. Pero aunque este modelo también es válido para las secuencias repetitivas dentro de regiones codificantes, no lo es para secuencias neutrales

---

tales como los microsatélites en regiones no codificantes. Las mutaciones en estas secuencias se vuelven clonales porque presentan una muy elevada frecuencia. Esto se puede aplicar en nuestro caso sobre la secuencia repetitiva D310. Nuestros datos confirman los resultados de otros estudios anteriores que demuestran que la alta frecuencia de mutaciones en el DNAm<sub>t</sub> está localizada en la zona del D-loop, especialmente en la zona D310 que presenta un *hotspot* para la inestabilidad en cáncer gastrointestinal. Aunque todavía no está claro si variaciones en esta secuencia repetitiva puede dar ventajas al crecimiento en células tumorales, en estudios anteriores se ha demostrado que diferentes longitudes en el D310 no cambian la replicación mitocondrial o la actividad de expresión *in vitro* a pesar de que esta región forma parte de una zona que presenta el origen de la replicación del DNA mitocondrial (Hauswirth & Clayton, 1985; Poetsch et al., 2004). Por otro lado, la presencia de polimorfismos en la secuencia D310 (un rango de 7C y 9C) en células normales parece también sugerir la improbabilidad de que las alteraciones encontradas en el D-loop (D310) conduzcan a una deficiencia funcional en la mitocondria

En este sentido, nuestros resultados sugieren la neutralidad de esta secuencia en términos de selección tumoral. La ausencia de mutaciones en la secuencia codificante repetitiva (A)<sub>8</sub> dentro de la subunidad 5 del gen NADH mitocondrial en estos tumores, sugiere también la selección negativa en esta secuencia y refuerza el concepto de la neutralidad del D310.

Las mutaciones dentro de la secuencia neutral (D-loop) en el DNA mitocondrial, tienen la misma dinámica de alteraciones que los microsatélites intrónicos del genoma nuclear. La existencia de variantes de diferentes longitudes en la secuencia repetitiva PoliC en células tumorales y el establecimiento de una nueva población de heteroplasmia podrían resultar de la ausencia de un sistema de reparación efectivo que corrija los errores y de la acumulación progresiva de nuevas variantes en la mitocondria por el alto número de ciclos de replicación. De hecho, ya en el año 85 un estudio demostró que un plásmido recombinante que contiene la secuencia repetitiva de PoliC genera variantes de diferentes longitudes cuando se transfecta en *E. coli* (Hauswirth & Clayton, 1985). Se sabe que el DNAm<sub>t</sub> se replica de manera independiente del ciclo celular, pero la alta frecuencia de mitosis en células tumorales induce indirectamente una alta actividad

---

replicativa en las mitocondrias, lo que podría explicar la asociación observada entre la inestabilidad del DNAm en tumores de colon invasivos (Dukes D) con una edad temprana de aparición. No obstante, también se han detectado niveles altos de inestabilidad mitocondrial en adenomas benignos colorrectales, probablemente asociada a una larga historia de mitosis. Por ello, es muy cuestionable que la inestabilidad mitocondrial esté directamente implicada en la progresión tumoral o que pueda conferir ventaja selectiva al crecimiento celular.

Las distintas frecuencias de mutaciones en el D310 observadas entre diferentes tejidos tumorales pueden ser consecuencias de las diferencias existentes en el número de replications propias de cada tejido, a mayor tasa de replicación más mutaciones puedan acumularse en el DNA mitocondrial. Es posible que la deficiencia de funciones de un sistema de reparación de errores replicativos mitocondrial pueda variar de un tumor a otro, o que la exposición a factores pro-mutagénicos difiera entre ellos.

Mambo y sus colaboradores demostraron que la región D310 es altamente susceptible a la inducción de mutaciones mediante la exposición a agentes oxidantes como Pert-butyl hidroperóxido (Mambo et al., 2003). Estos resultados pueden también explicar el elevado porcentaje de mutaciones somáticas encontradas en distintos tumores.

Por otro lado, la detección de la transición de T a C en la posición 310 en tres tumores colon (496), estómago (J7) y mama (BC50) nos proporciona nuevas evidencias sobre la naturaleza inherente de la secuencia repetitiva D310. La ausencia de mutaciones en el tejido normal en estos tres casos confirma que estas alteraciones son mutaciones somáticas. La transición T310C cambia la longitud de la secuencia repetitiva y da lugar a una nueva secuencia repetitiva de 15 citosinas (15C). De acuerdo con la dinámica de mutaciones esporádicas en secuencias microsatélite, se generan nuevas variantes más cortas mediante la deleción secuencial de nucleótidos en esta secuencia repetitiva. Las variantes más cortas se han detectado mediante los análisis de clones en casos de estómago y mama. La longitud varía entre 11C y 14C (citosinas) en casos de cáncer de mama, mientras que variantes entre 9C y 12C (citosinas) se han detectado en tumores de estómago. Estas diferencias se podrían explicar por una alta actividad de replicación mitocondrial en tumores de estómago. Por tanto, estos datos demuestran que la inestabilidad en el poliC al igual que ocurriría en cualquier otro microsatélite

---

mitocondrial o nuclear varía en función de su longitud y de la transición de timidina a citosina en la posición 310. De hecho, se ha demostrado que interrupciones de secuencia dentro de los microsatélites conceden una estabilidad alélica diferencial en células deficientes en el sistema de reparación de errores (MMR) (Moraes et al., 1991). De acuerdo con esto, la inserción de bases en D310 se ha encontrado cuando la secuencia esta interrumpida por una timidina y las deleciones cuando no hay dicha transición. Estos resultados, podrían sugerir una posible utilización de la secuencia repetitiva PoliC como reloj molecular de la actividad replicativa de la mitocondria en estos tumores. De ser así, los tumores con mayor actividad replicativa deberían tener también una mayor incidencia de mutaciones en microsatélites, tanto nucleares como mitocondriales.

De Hecho, estudios anteriores han sugerido la utilización de las secuencias repetitivas de BAT26 y de AP $\Delta$ 3 para determinar la historia replicativa del tumor (Schwartz et al., 1999; Shibata et al., 1994). En el presente estudio hemos encontrado una buena concordancia entre el grado de inestabilidad nuclear (100% en colon; 82% en estómago; 45% en endometrio) e inestabilidad mitocondrial (100% en colon; 80% en estómago; 48% en endometrio) tanto en tumores de colon, endometrio y estómago, siendo mayor la inestabilidad en los tumores de colon, seguido por los de estómago y endometrio.

Los estudios del anexo 2 confirman estos resultados e indican que la frecuencia de mutaciones esporádicas en los microsatélites en cáncer de mama es inferior que en otros tumores con una actividad replicativa más alta como el cáncer colorrectal. Esto sugiere que es necesario un número mínimo de ciclos replicativos para que las células con defecto en el sistema de reparación del MMR puedan alcanzar un fenotipo caracterizado por MSI. Probablemente así se explicaría para el tumor del caso 14, que presenta una pérdida alélica de los genes hMLH1 y hMSH2 sin demostrar MSI.

Los tumores de mama no están caracterizados por MSI, por lo tanto no están asociados con defectos del sistema de reparación de errores MMR. De hecho, el análisis de 40 microsatélites dinucleótidos y dos mononucleótidos (BAT26 y AP $\Delta$ 3) no se ha detectado MSI.

En nuestros resultados, la inestabilidad de microsatélite en la secuencia repetitiva del DNAm<sub>t</sub> (D310) se ha detectado en el 10,8% (4/37) de los casos analizados de cáncer de mama. El número alto de replicaciones del DNAm<sub>t</sub> en las células tumorales y la ausencia de un sistema de reparación efectivo, comparado con el DNA nuclear, pueden

---

explicar la progresiva acumulación de mutaciones somáticas y la inestabilidad genómica de mitocondria encontradas en tumores de mama. De hecho, de forma similar al cáncer colorrectal, 3 de los 4 casos con inestabilidad mitocondrial se encuentran en tumores de grado III, lo que sugiere que los tumores con un alto grado (III) probablemente tienen más actividad replicativa que los tumores de bajo grado (I, II).

Existe una asociación significativa de la secuencia repetitiva D310, con estadios avanzados de progresión que sugiere que la inestabilidad mitocondrial en D310 está relacionada con una alta capacidad mitogénica y con la progresión tumoral, en particular, en tumores en los que se ha diagnosticado una metástasis a distancia en órganos dístales. La ausencia de mutaciones en el gen de NADH deshidrogenasa en la zona codificante (A)<sup>8</sup>, y la alta frecuencia de mutaciones en D310 en zona no codificante, refuerza de nuevo la idea de neutralidad del poliC.

Con el objetivo de comprobar si secuencias neutras nucleares (secuencias repetitivas de dinucleótidos) y las mutaciones puntuales mitocondriales al margen de D310 siguen de forma paralela la misma dinámica mutacional se analizó el grado de inestabilidad de 24 dinucleótidos nucleares en 50 tumores de CCR. Se seleccionaron dos tumores (pacientes 414 y 429) que no presentan ninguna alteración en los 24 microsatélites analizados, así como un tumor (paciente 496) tiene 6 de los 24 microsatélites alterados (Tabla 7), lo que podría sugerir que la progresión de este último tumor lleve más tiempo que los dos anteriores, y por lo tanto que pueda haber tenido más replications en su DNA, tanto nuclear como mitocondrial. Nuestros resultados no obstante sugieren que la dinámica mutacional que caracteriza a las mutaciones puntuales en el DNAm no sigue una evolución paralela a la acumulación de mutaciones en secuencias repetitivas nucleares y por tanto no parecen tener correlación directa con la actividad replicativa de la célula tumoral como los microsatélites. Tampoco existe una correlación entre mutaciones puntuales e inestabilidad en D310 en los tumores. (Tabla 8).

Nuestros datos también demuestran la selección de algunas variantes que aparecen en el tejido tumoral a partir del tejido normal (clonalidad). Estas variantes observadas en los tumores estarían presentes en las células normales y se acumularían en los tumores debido a un proceso aleatorio de selección seguido por una expansión clonal durante el proceso tumoral. Las variantes que desaparecen en células tumorales probablemente se

---

pierden como consecuencia de reparticiones desiguales de mitocondrias hijas durante la división celular. Las variantes menos representadas en células normales podrían volverse dominantes en tejido tumoral debido a una expansión clonal de la célula tumoral, probablemente favorecida por mutaciones nucleares en oncogenes o de genes supresores tumorales que acelera la división celular conduciendo la acumulación rápida de estas variantes. (Figura 7)

Los análisis del D-loop en 33 tumores de estómago estables y sus correspondientes normales como control, demuestran que el 48,5% (16/33) de los tumores de estómago presentan una o más mutaciones somáticas, incluyendo tanto mutaciones puntuales como inestabilidad de microsatélites en D310. Se consideraron mutaciones aquellas alteraciones encontradas en los tumores pero no en el tejido normal correspondiente.

Un total de 30,3% de mutaciones puntuales (10/33) se han detectado en el D-loop de los tumores de estómago, mientras que se ha identificado 18,2% de tumores (6/33) que presentan inestabilidad en la secuencia D310. Un 6% (2/33) de tumores presentan mutaciones puntuales e inestabilidad en D310 (Tabla 8). El patrón mutacional sugiere que estas mutaciones se producen al azar por lo que no existe una zona caliente específica (*“hotspot”*). Es posible que las mutaciones puntuales puedan generarse por daño oxidativo en la mitocondria, mientras que la inestabilidad en D310 simplemente se produciría por errores durante la replicación del DNA mitocondrial debido a la baja fidelidad de la polimerasa  $\gamma$  y/o la propia estructura inherentemente inestable del microsatélite. Por otro lado, el análisis de clones de un fragmento del D-loop (paciente 43) y la posterior comparación entre el tejido normal y tumoral de estos clones nos demuestra la aparición de nuevas variantes no detectadas previamente mediante la secuenciación directa. (Tabla 9). Así encontramos en el tejido normal dos tipos de variantes: el primer grupo y más mayoritario (44/46 clones) lleva el genotipo A (C150T, G185A y A189G) mientras que el otro grupo y menos representado (solo 2/46 clones) lleva a demás de los polimorfismos señalados un nuevo polimorfismo, el C33T, (genotipo B). Por otro lado, en el tejido tumoral encontramos 5 tipos de variantes: los mas numerosos son los clones del tipo A (42/46 clones), encontrados en el tejido normal, que se podría explicar por la contaminación del tejido tumoral por células del tejido tumoral. Pero también hallamos un clon de la variante B, otras nuevas variantes derivadas de la variante B: tipo C (C26A, C33T, C112T, C150T, G185A y A189G) y

---

otras derivadas de la variante A: tipo D (C150T, G185A, A189G y A193G) y E (C150T, G185A, A189G y G225A). (Tabla 9)

Estos resultados sugieren que las alteraciones puntuales encontradas en el tejido tumoral procederían desde el tejido normal con un genotipo A o B y acumularían más alteraciones a lo largo del proceso tumoral dando lugar a nuevos genotipos C, D y E, lo que permite diseñar un árbol de acumulación progresiva de mutaciones a lo largo del proceso tumoral (expansión pseudoclonal) (Figura 8). Esta acumulación progresiva en secuencias no codificantes sugieren de nuevo una ausencia de selección tumoral y ventajas replicativas de las mismas.

Por otra parte, mutaciones somáticas se han identificado en zonas codificantes del DNAmT en varios tipos de cánceres. Aunque no hay evidencias claras de que estas mutaciones puedan contribuir en el desarrollo del tumor. Varios trabajos demuestran que las mutaciones del DNAmT detectadas en tumores no están asociadas con defectos en mitocondria. Aunque un estudio realizado por Takano y sus colaboradores en carcinoma de tiroides ha demostrado un aumento de expresión de varios genes mitocondriales (ND1, ND2, ND3, ND4 y ATP6) (Takano et al., 2000), y sugieren que tal sobreexpresión podría ser consecuencia de mutaciones en el DNAmT. De cualquier modo es necesario llevar a cabo más estudios para confirmar esta hipótesis y determinar si existe una asociación entre las mutaciones del DNAmT y la tumorigénesis.

En el caso de que estas mutaciones se seleccionen acaban apareciendo en los tumores. De hecho, un estudio realizado por Coller y sus colaboradores ha demostrado mediante un modelo informático que la selección de mutaciones somáticas mitocondriales acumuladas en los tumores podría deberse al azar (Coller et al., 2001). (Figura 9)

Según el modelo de Coller, los bajos niveles de heteroplasmia encontrados en DNAmT en células progenitoras pueden volver a homoplasmia sin ningún tipo de selección después de docenas o centenas de divisiones celulares. Así, las mutaciones homoplásmicas en el DNAmT encontradas en diferentes de tipos de cánceres, podrían no tener ningún efecto sobre la función de la mitocondria.



	414 ( 0/24)		429 (0/24)		496(6/24)	
	Normal	Tumor	Normal	Tumor	Normal	Tumor
Fragmento 1	3	<b>6</b>	3	3	7	7
Fragmento 2	2	1	5	3	2	2
Fragmento 3	4	2	7	4	8	4
Fragmento 4	4	2	3	<b>4</b>	4	1
Fragmento 5	5	2	5	3	7	3
Fragmento 6	3	2	3	3	5	3

**Tabla 7:** Comparación de variantes encontradas en el D-loop del tejido normal y tumores MSS con diferentes grados de inestabilidad en secuencias repetitivas dinucleotídicas. Las alteraciones no clonales (ausentes en tejido normal) se marcan en un recuadro.

Los fragmentos de 1 a 7 son secuencias entre 120 y 250 pb del fragmento hipervariable II del D-Loop analizados mediante la técnica de SSCP, después de su clonación en el vector PCR4 y su transformación en E.coli. Por cada fragmento se analizaron 60 clones.  
0/24, 6/24: El número de dinucleótidos que presentan inestabilidad en la secuencia repetitiva analizada.

Nº paciente	Tejido	Mutación	mtDNA	Heteroplasmia D310
3	N	-		8C
	T	-	+	8C, 9C, 10C
9	N	C150		-
	T	C150T		-
13	N	C150, A183		7C
	T	C150T, A183G	+	7C, 8C
14	N	T176		-
	T	T176G		-
19	N	T152		-
	T	T152C		-
26	N	G143		-
	T	G143A		-
28	N	-		7C, 8C
	T	-		7C, 8C
32	N	-		8C, 9C
	T	-		8C, 9C
34	N	A193, A200G		-
	T	A193, A193G, A200		-
36	N	G316		-
	T	G316A		-
37	N	G366		7C
	T	G366T	+	7C, 8C
38	N	-		7C, 8C
	T	-	+	7C
39	N	-		7C
	T	-	+	7C, 8C, 9C
42	N	-		8C
	T	-	+	7C, 8C
43	N	G316		-
	T	G316A		-
45	N	T195		-
	T	T195, T195C		-
49	N	-		8C, 9C
	T	-		8C, 9C

**Tabla 8:** Resumen de alteraciones a nivel del DNA mitocondrial (D-loop) en casos de cáncer de estómago.

Se ha analizado 33 muestras. En la tabla solo está señalado las muestras que presentan mutaciones puntuales en el D-loop, inestabilidad mitocondrial o heteroplasmia en la secuencia D310. + Inestabilidad microsatélite

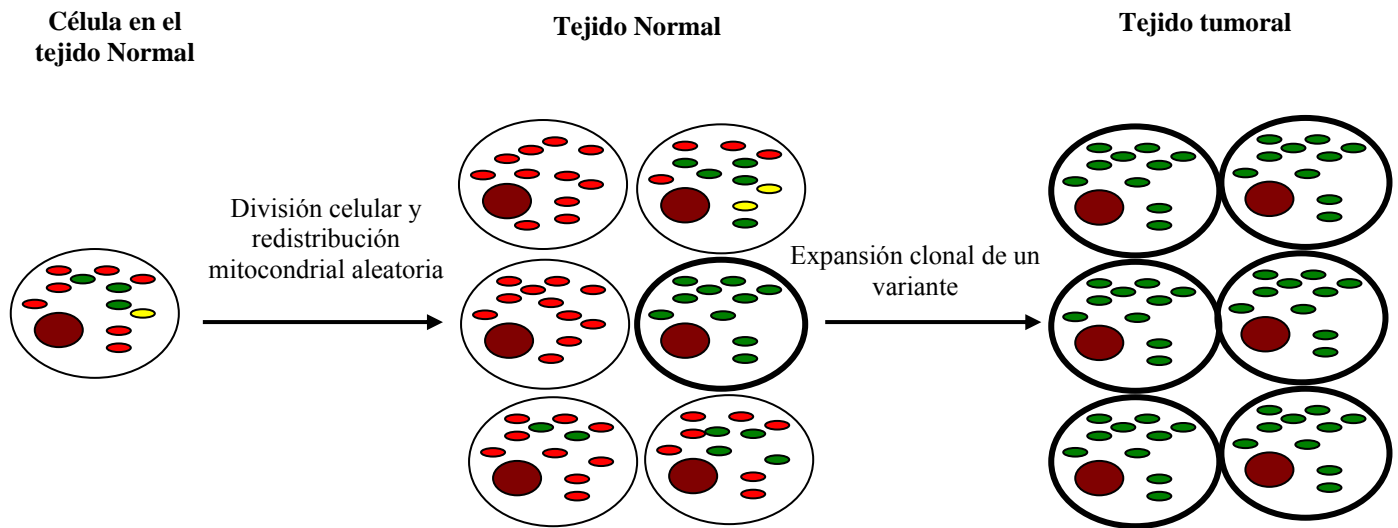
**Tejido tumoral**

	C26A M	C33T M	C112T M	C150T P	G185A P	A189G P	A193G P	G225A P
Genotipo A n=42				X	X	X		
Genotipo B n=1		X		X	X	X		
Genotipo C n=1	X	X	X	X	X	X		
Genotipo D n=1				X	X	X	X	
Genotipo E n=1				X	X	X		X

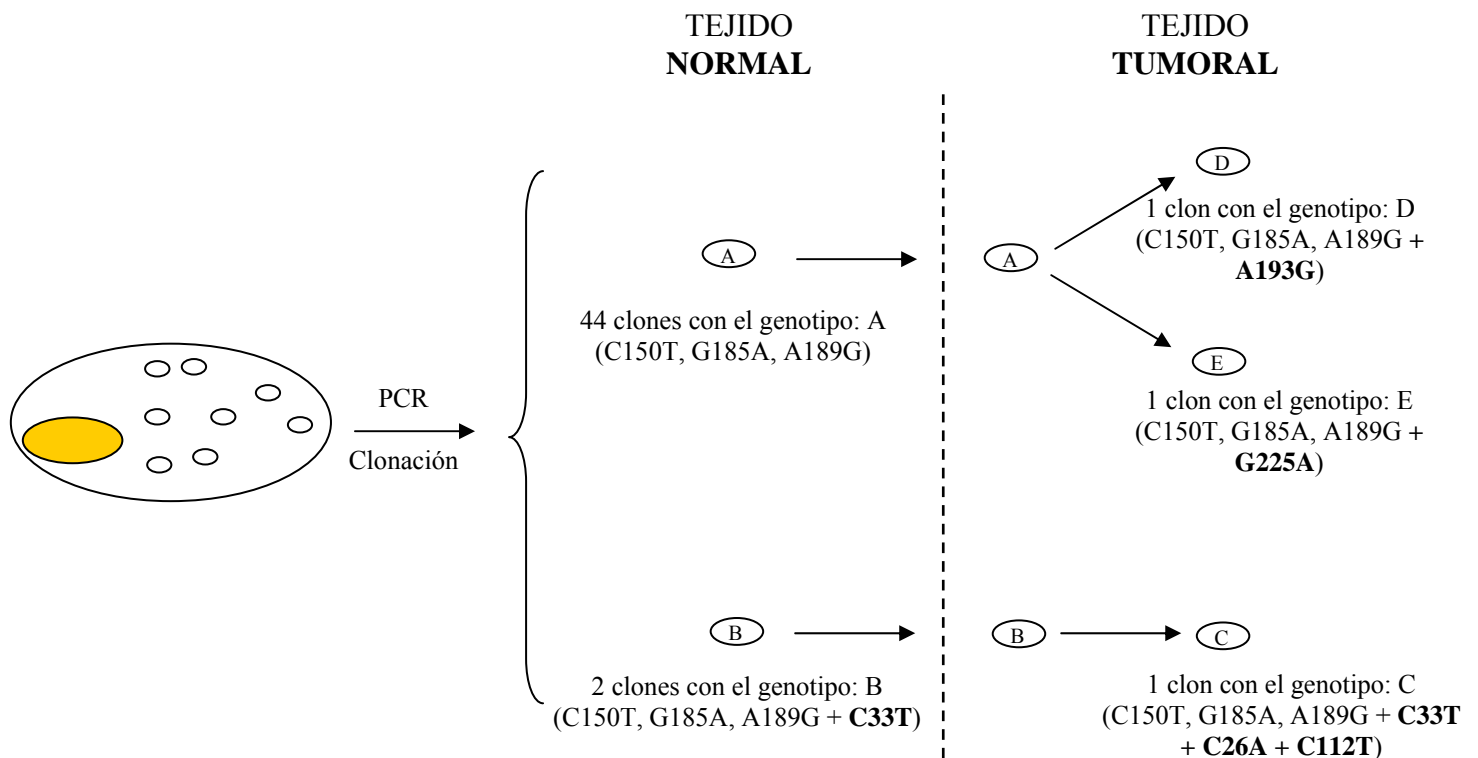
**Tejido normal**

	C26A M	C33T M	C112T M	C150T P	G185A P	A189G P	A193G P	G225A P
Genotipo A n=42				X	X	X		
Genotipo B n= 2		X		X	X	X		

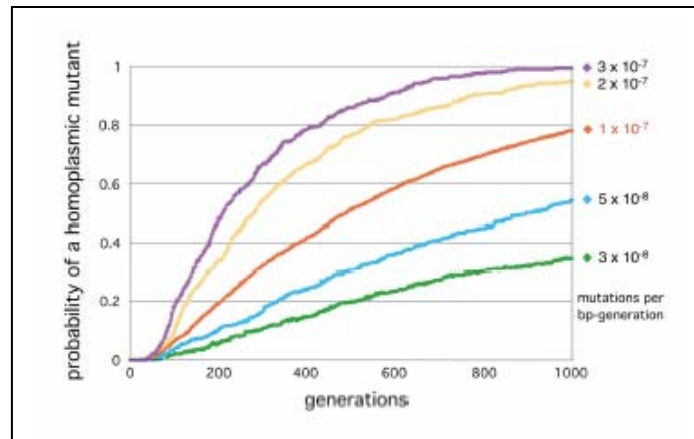
**Tabla 9:** Resumen de análisis mutacional de clones del tejido normal y tumoral del paciente 43 mediante la técnica de SSCP.  
n es el número de clones detectados que presenten el mismo genotipo.



**Figura 7:** Modelo de generación de homoplasma en el tejido tumoral. Los diferentes colores de mitocondria representan diferentes variantes del DNA mitocondrial. Adoptado a Sanchez- Cespedes M. Cancer Res. 2001. 61(19):7015-9.



**Figura 8:** Esquema representativa de acumulación de mutaciones en el DNAm<sub>t</sub> a lo largo del proceso tumoral del paciente 43



**Figura 9:** Probabilidad de que un tumor contenga al menos una mutación homoplásmica en DNAm<sub>t</sub> según el modelo de Collier (*Collier HA et al. Nature Genetics. 2001. 28(2):147-50*)

### **3 Inestabilidad genómica y control de la integridad del DNA en cáncer MSI: (Artículo 2)**

Durante los últimos años, se ha puesto de manifiesto la gran importancia que tienen los estudios relacionados con la inestabilidad genómica por su implicación en el proceso tumoral y de ahí a la necesidad de comprender los mecanismos de reparación del DNA que garantizan la estabilidad del genoma.

El fenotipo mutador afecta diferentes tejidos (colon, endometrio o estómago) tanto en tumores germinales como en tumores esporádicos. La única diferencia existente es el origen de la inactivación de los genes de reparación de errores del MMR.

Como se ha comentado en la introducción, el mantenimiento de la integridad del genoma celular necesita el funcionamiento adecuado de varios mecanismos como el sistema de reparación de errores de bases desapareadas (MMR) y el sistema de respuesta celular al daño en el DNA. Las alteraciones en los genes involucrados en uno o ambos sistemas pueden originar la iniciación del proceso tumoral.

Por otro lado, existen mecanismos de vigilancia que actúan como puntos de control (*checkpoint*) proporcionando a las células el tiempo necesario para reparar el DNA dañado antes de iniciar un nuevo ciclo celular, y en el caso de detectar un daño extensivo en las células, activan la apoptosis. Un defecto en la respuesta del *checkpoint*

---

ante la detección de daños no reparados en el DNA puede provocar inestabilidad genómica y la transformación de células normales a tumorales.

En los tumores con inestabilidad de microsatélite (MSI) donde el sistema de reparación (MMR) es defectuoso se produce la aparición de un fenotipo molecular caracterizado por la acumulación de múltiples mutaciones en todo el genoma, especialmente en secuencias repetitivas simples (Aaltonen et al., 1993; Ionov et al., 1993). Estos microsatélites están distribuidos en todo el genoma y la mayoría de ellos se encuentran en zonas no codificantes, aunque también pueden encontrarse en regiones codificantes. La inserción o delección de un nucleótido o dos en microsatélites codificantes produce un cambio en la pauta de lectura que conlleva la síntesis de una proteína anómala, frecuentemente truncada y por tanto no funcional. Varios estudios han demostrado la existencia de una serie de genes alterados en cáncer gastrointestinal con MSI que contenían microsatélites en su región codificante como por ejemplo el gen TGFBR2 que se encuentran frecuentemente mutado en los pacientes con alta inestabilidad (MSI-H). Estos genes diana pueden tener una posible implicación en tumorigenesis debido a su función supresora de tumores o reparadora. Entre estos genes diana se encuentran los genes ATR y CHK1 que llevan una secuencia repetitiva de 10 y 9 adeninas respectivamente en sus regiones codificantes. En nuestro estudio hemos demostrado frecuentes mutaciones que alteran la pauta de lectura (*frameshift*) en el gen ATR, y una baja frecuencia de alteraciones en CHK1. Las proteínas ATR y CHK1 son unas quinasas que se activan en el *checkpoint* de respuesta celular al daño en el DNA. Estudios realizados en células deficientes en ATM, ATR, y Chk1 demuestran que la vía ATM/ATR-Chk1 es responsable de la activación del *checkpoint* G2 como respuesta al daño genotóxico (Brown & Baltimore, 2003). Ambos genes, ATR y ATM activan Chk1 por fosforilación en Ser-317 y Ser-345. El Chk1 activado fosforila cdc25c en Ser-216 formando un dominio de unión para la proteína 14-3-3, esta interacción evita la defosforilación de cdc25c, lo que permite la activación del complejo quinasa ciclinaB-Cdc2, que impide que las células con el DNA dañado entren en mitosis. ATR y ATM contribuyen el retraso de la entrada de las células en la fase M, y ATR es especialmente responsable de la parada del ciclo celular en fase G2 (Liu et al., 2000). (Figura 10). La proteína ATR constituye la principal señal de transducción cuando las células acumulan daño genómico debido a la radiación por luz ultravioleta (UV) o por agentes que

---

interfieren en la replicación del DNA por ejemplo por hidroxiaurea, que inhibe la síntesis de dNTPs bloqueando las horquillas de replicación. Así mismo, ATR también se activa en el *checkpoint* inducido por roturas de doble hélice *doble strand break* (DSB) que es el principal tipo de lesiones genómicas secundarias a radiaciones ionizantes (Abraham, 2001; Shiloh, 2003). Por otro lado, Se ha demostrado que ATR también puede fosforilar p53 en las serinas 15 y 37 (Abraham, 2001; Khanna et al., 2001; Shiloh, 2003) lo que promueve la transactivación de p53 y la fosforilación de p21, que inhibe la quinasa Cdk2 y detiene el ciclo celular en G1-S. Asimismo CHK1 también fosforila p53 (Shieh et al., 2000). A pesar de que la activación de esta vía puede llevar las células a apoptosis después de un daño en el DNA, no está claro si la inactivación de ATR y CHK1 en tumores de estómago podría estar involucrada en la inhibición de apoptosis en las células tumorales. Es posible que mutaciones de ATR y CHK1 en tumores de estómago con MSI puedan dificultar la parada del ciclo celular que depende de p53, lo que podría favorecer la progresión de células tumorales en cáncer de estómago con un fenotipo mutador. Aunque está por demostrar que las mutaciones monoalélicas de los genes ATR y CHK1 inactiven la respuesta de control de daño en el DNA dependiente de la vía de ATR/CHK1 en tumores gastrointestinales, de acuerdo al modelo de haploinsuficiencia propuesto por Perucho y sus colaboradores: el cual sugiere que mutaciones monoalélicas en varios genes diana que pertenecen a la misma vía relacionada con el tumor se acumulan durante la progresión tumoral e inactivan esa vía, permite plantear esa hipótesis (Yamamoto et al., 2000). Es posible no obstante, que el efecto de la haploinsuficiencia sólo se produzca en situaciones de estrés genómico importante cuando la activación de la vía no alcanza el nivel requerido. De hecho, un estudio reciente realizado por Y Fang y colaboradores han demostrado que las líneas celulares transfectadas con el gen ATR<sup>+/-</sup> son haploinsuficientes cuando se someten al estrés por exposición a UV (Fang et al., 2004). Por otro lado, no está claro aún si las mutaciones encontradas en ATR/Chk1 podrían tener un efecto dominante negativo. De hecho, la transactivación de ATR requiere su dimerización (Unsal-Kacmaz et al., 2004), por lo que es plausible que la presencia de mutantes truncados puedan ejercer un efecto dominante negativo en la activación del checkpoint. En este sentido, las mutaciones encontradas de ATR/Chk1 en cáncer de estómago generan una proteína carente de los 2/3 terminales y por tanto del dominio de fosforilación y transactivación.

---

Se ha descrito una forma inactiva de ATR llamada ATR-KD (*ATR-Kinase Dead*) que presenta una mutación puntual dirigida (Aspártico 2494 Glutámico, D2494E) en el dominio quinasa que provoca su inactivación. La sobreexpresión de ATR-KD en fibroblastos humano ha demostrado tener un efecto dominante negativo e inhibe la activación del *checkpoint* y reduce la viabilidad celular entre 2 y 5 veces (Cliby et al., 1998; Wright et al., 1998). Según estos resultados hay un efecto dominante negativo de la forma inactiva ATR-KD, capaz de inducir la muerte celular independientemente de la presencia de p53 salvaje. Por otro lado, la pérdida parcial de funciones de ATR no parece tener un efecto intrínseco en la fase de progresión G2-M en células HCT116, pero interfiere en el mantenimiento del *checkpoint* y causa un defecto parcial en la fosforilación de CHK1 (Fang et al., 2004).

Como se ha explicado antes, la integridad del genoma celular depende en gran parte de los sistemas de reparación del DNA. Por este motivo, hemos ampliado nuestro estudio a otros genes diana candidatos, involucrados en la reparación del DNA.

Se sabe que el gen ATM (otra quinasa que activa el *checkpoint*, y que esta implicado en la misma vía que ATR) se activa rápidamente después de la exposición celular a la radiación ionizante que causa roturas de doble hélice (DSB). De hecho, la activación de ATM provoca la fosforilación de Chk2 y la fosforilación de Ser15 de p53, inducción de p21 e inhibición de cdk2 que conduce a la parada del ciclo celular en la fase G1/S. Esta vía constituye de hecho la vía principal y más importante de respuesta a daño por RI (DSB). ATM puede asimismo activar a BRCA1 mediante su fosforilación, que forma entonces un complejo de proteínas de reparación conjuntamente con Mre11-Rad50-NBS1. Este gran complejo, conocido como BASC (*BRCA1-associated genome surveillance complex*), es el principal responsable de la reparación de roturas de doble hélice por recombinación homóloga (Wang et al., 2000).

Al parecer el complejo BASC podría también asociarse a otras proteínas de reparación y de control de *checkpoint* como son las proteínas de reparación de MMR MLH1/MSH2/MSH3 y MSH6, otras proteínas Rad como Rad50 y Rad51 y las proteínas del *checkpoint* ATR y ATM (Cortez et al., 1999; Wang et al., 2001; Yarden et al., 2002). Muchas de estas proteínas tienen mutaciones en tumores gastrointestinales con MSI como Rad50, MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 y ATR y con mucha menor incidencia



---

ATM, Mre11 y Brca1 (Kim et al., 2001). Esta por demostrar no obstante hasta que punto estas mutaciones, como las de ATR, pueden alterar la respuesta y capacidad reparativa del complejo. Por otro lado, el complejo BASC no es el único complejo involucrado en la reparación de DSB. Existe otra vía de reparación por unión de fragmentos no homólogos (NHEJ), “*non-homologous end-joining*” formado por diversas proteínas como DNA PKcs, Ku 70 y Ku 80, proteínas que interaccionan con Xrcc4 entre otras. Es interesante destacar el hecho de que también DNA pKcs tiene elevada incidencia de mutaciones en CRC (Li et al., 2004). Así, el elevado número de mutaciones encontradas en proteínas que forman parte o participan en los procesos de reparación de DSB en tumores gastrointestinales con MSI podrían sugerir la existencia de un sistema defectivo de respuesta a DSB. Hasta que punto este defecto podría producir una mayor sensibilidad de tumores y líneas celulares con MSI a RI esta aun por definir. Por otro lado, los genes hMLH1, hMSH2 y hMSH6 junto con las proteínas hMSH3, MED1 y hMLH3 están involucrados en el reconocimiento y reparación de los errores producidos durante la replicación normal del DNA. Se ha demostrado que la mayoría de estos genes llevan secuencias repetitivas en su zona codificante y por lo tanto presentan una diana para un fenotipo mutador. De hecho, estudios previos han señalado mutaciones en estos genes (Bellacosa et al., 1999; Ohmiya et al., 2001; Togo et al., 2001). Nuestros resultados también demuestran mutaciones frecuentes en los genes hMSH3 (56%), hMSH6 (43%) y MED1 (43%) en tumores gastrointestinales con MSI. Aunque todavía no está claro si mutaciones en MED1 pueden aumentar la inestabilidad genómica que caracteriza estos tumores, nuestros resultados sugieren que MED1 podría ser un potencial mutador secundario de la vía mutadora. Algunos estudios sugieren esta posibilidad (Bellacosa et al., 1999). Por otra parte, datos recientes sugieren que se necesita un sistema de reparación de errores (MMR) funcional para que se produzca una activación adecuada del *checkpoint* (Hickman & Samson, 1999; Hirose et al., 2003; Kaina et al., 1997). De hecho, se ha demostrado una interacción directa entre ATM y hMHL1 en un estudio reciente realizado por Y. Wang y sus colaboradores se describen la interacción entre ATR y la proteína hMSH2 (Wang & Qin, 2003). En esta misma línea, se han observado defectos de fosforilación de Chk2 en ratas transgénicas defectuosas en MSH2 sometidas a radiaciones ionizantes (Takai et al., 2002). Esto

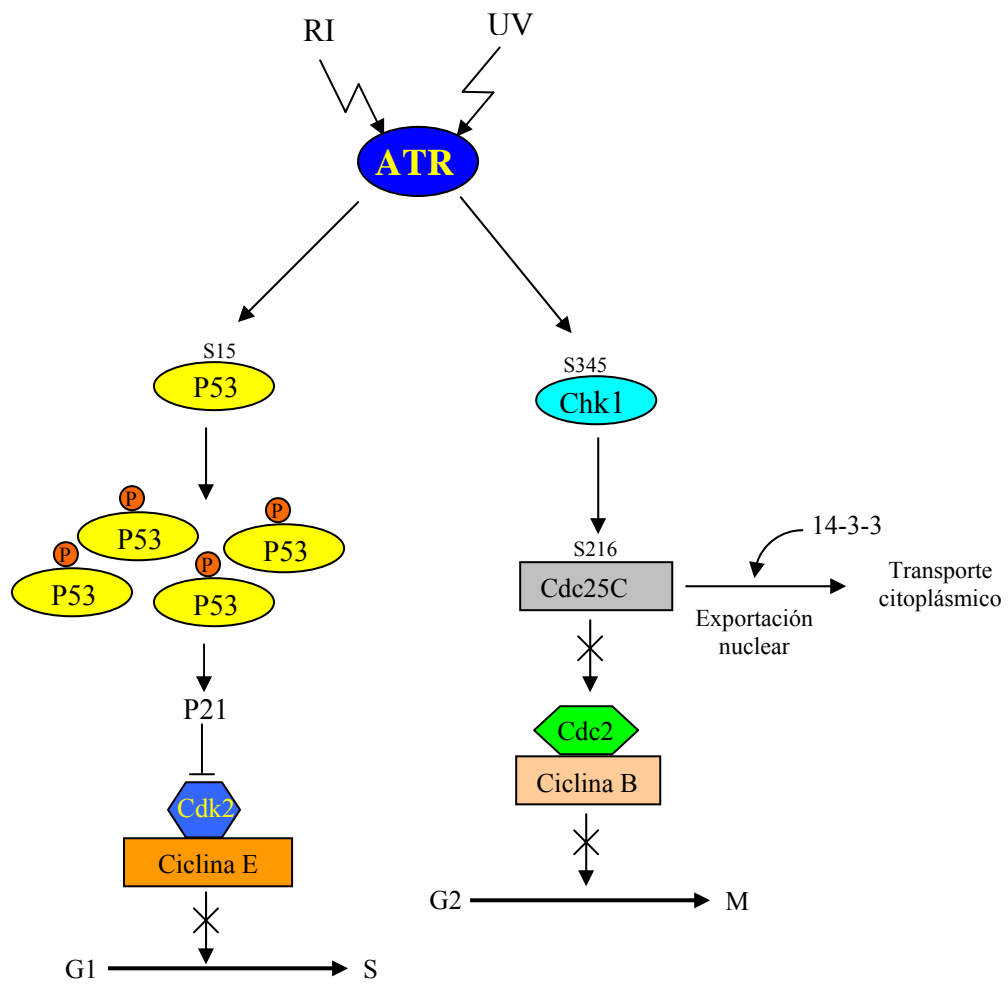
---

sugiere que las mutaciones inactivantes de los genes MMR podrían no sólo inducir MSI sino también alterar la respuesta de control de integridad genómica.

En este sentido, al igual que el *checkpoint* el estado del sistema MMR en las células también podría afectar la respuesta celular a varios agentes genotóxicos. No obstante, se han realizado diferentes estudios para determinar la respuesta de tumores inestables ante la radiación ionizante pero los resultados de estas investigaciones son contradictorios. Algunos grupos han demostrado que los tumores con defectos en el sistema de reparación MMR son más resistentes a la radiación ionizante que los tumores con el sistema de reparación normal (DeWeese et al., 1998; Fritzell et al., 1997). Por el contrario, A. Franchitto y sus colaboradores han demostrado que las células deficientes en MMR son más sensibles a la radiación ionizante que las células competentes (Franchitto et al., 2003). Por otro lado, otros grupos han encontrado resultados que demuestran que no existen diferencias significativas entre la respuesta a la radiación ionizante entre los tumores deficientes y tumores competentes en MMR (Aquilina et al., 1999; Yan et al., 2001). No obstante, Otros estudios sugieren que el defecto de MMR parece no tener efecto sobre las células tratadas, pero el complejo Mre11-Nbs1-Rad50 está afectado en células deficientes en MSH2 (Franchitto et al., 2003). Situaciones similares se han observado al interpretar la sensibilidad de tumores competentes y deficientes en sistema de reparación de errores MMR utilizando otros agentes como la radiación ultravioleta (UV) (Sonneveld et al., 2001), lo que supondría la posible existencia de otros factores y vías implicadas en la respuesta celular al tratamiento.

Una regulación y una actividad adecuada de respuesta celular al daño en el DNA y del sistema de reparación de errores son necesarias para el mantenimiento de estabilidad genómica y la integridad en las células humanas. Alteraciones en estas vías moleculares reguladoras pueden llevar a la formación de células tumorales. Hemos demostrado que en tumores caracterizados por inestabilidad genómica, existen mutaciones en genes involucrados en la regulación del ciclo celular y en vías de reparación del DNA.

Alteraciones en varios tipos de genes del sistema de reparación como hMSH3, hMSH6 y MED1, y también la inactivación de genes responsables de la respuesta celular al daño en DNA como ATR/CHK1, probablemente contribuyen y aceleran la progresión tumoral en cáncer con MSI.



**Figura 10:** control del ciclo celular mediante la activación del *checkpoint* como respuesta a daño celular en el DNA por radiación ionizante (RI) o ultravioleta (UV).

## VII. CONCLUSIONES

## VII. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta tesis doctoral se puede extraer las siguientes conclusiones:

- 1.- ATR presenta un alto porcentaje de mutaciones que alteran su pauta de lectura, en tumores con inestabilidad genómica por defecto de reparación de bases desapareadas.
- 2.- La técnica PCR-clonación permite detectar en la sangre periférica de pacientes portadores de mutaciones germinales en hMLH1 y hMSH2 niveles bajos de moléculas inestables de BAT26, que pueden detectarse antes del diagnóstico del tumor. Estos resultados pueden tener una implicación clínica, ya que la detección de baja inestabilidad puede ser utilizada para la caracterización de pacientes portadores de mutaciones germinales, lo que podría ser de gran utilidad en aquellas familias en los que no se detectan mutaciones germinales en los genes reparadores del sistema de reparación (MMR) conocidos hasta el momento.
- 3.- La detección de alelos mutantes de BAT26 puede servir como una herramienta más para el análisis de la presunta patogenicidad de las mutaciones de cambio de sentido en los genes MMR en los pacientes HNPCC portadores. En este sentido, el uso de la técnica de PCR-clonación puede ser un nuevo instrumento para constatar la patogenicidad de algunas mutaciones frente a otras.
- 4.- No existe asociación entre el estado funcional del sistema MMR y la inestabilidad del D310. Los genes del sistema MMR conocidos, cuya inactivación provoca la inestabilidad de microsatélites en tumores gastrointestinales no estarían involucrados en la reparación de errores en el DNA mitocondrial.

- 5.- La existencia de variantes de diferentes longitudes en la secuencia repetitiva PoliC en células tumorales podría resultar de la ausencia de un sistema de reparación efectivo que corrija los errores y de la acumulación progresiva de nuevas variantes en la mitocondria por el alto número de ciclos de replicación.
  
- 6.- Las mutaciones dentro de la secuencia neutral (D-loop) en el DNA mitocondrial, tienen la misma dinámica de alteraciones que los microsatélites intrónicos del genoma nuclear.
  
- 7.- Los tumores con mayor actividad replicativa presentan también una mayor incidencia de mutaciones en microsatélites, tanto nucleares como mitocondriales. Nuestros resultados, podrían sugerir una posible utilización de la secuencia repetitiva PoliC como reloj molecular de la actividad replicativa de la mitocondria en estos tumores.
  
- 8.- Los resultados demuestran que el tejido normal presenta más variaciones que el tejido tumoral, lo que sugiere la selección de algunas variantes que aparecen en el tejido tumoral a partir del tejido normal. Estas variantes observadas en los tumores estarían presentes en las células normales y se acumularían en los tumores debido a un proceso aleatorio de selección seguido por una expansión clonal durante el proceso tumoral.

## **VIII. ANEXOS**

ANEXO 1:

*Alazzouzi H, Domingo E, Gonzalez S, Blanco I, Armengol M, Espin E, Plaja A,  
Schwartz S, Capella G, Schwartz S Jr.*

Low levels of microsatellite instability characterize MLH1 and MSH2  
HNPCC carriers before tumor diagnosis

*Human Molecular Genetics, 2005, Vol. 14, No. 2 235–239*



# Low levels of microsatellite instability characterize *MLH1* and *MSH2* HNPCC carriers before tumor diagnosis

Hafid Alazzouzi<sup>1</sup>, Enric Domingo<sup>1</sup>, Sara González<sup>2</sup>, Ignacio Blanco<sup>3</sup>, Manel Armengol<sup>1</sup>, Eloi Espín<sup>1</sup>, Alberto Plaja<sup>1</sup>, Simó Schwartz<sup>1</sup>, Gabriel Capella<sup>2</sup> and Simó Schwartz, Jr<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Molecular Oncology and Aging Research, Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035, Spain, <sup>2</sup>Translational Research Unit and <sup>3</sup>Genetic Counseling Unit, Institut Català d'Oncologia, Gran Via s/n Km 2.7, 08907 L'Hospitalet, Spain

Received July 28, 2004; Revised September 22, 2004; Accepted November 9, 2004

**Microsatellite instability (MSI) characterizes tumors arising in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. HNPCC is a hereditary autosomal dominant disease caused by germline mutations in genes from the DNA (MMR) mismatch repair system. In these tumors, the loss of MMR compromises the genome integrity, allowing the progressive accumulation of mutations and the establishment of a mutator phenotype in a recessive manner. It is not clear, however, whether MSI can be detected in HNPCC carriers before tumor diagnosis. The aim of this study was to evaluate the presence of genetic instability in MMR gene carriers in peripheral blood lymphocytes of carriers and non-carriers members of two HNPCC families harboring a germline *MLH1* and *MSH2* mutation, respectively. An extensive analysis of the allelic distribution of single molecules of the polyA tract bat26 was performed using a highly sensitive PCR-cloning approach. In non-carriers, the allelic distribution of single bat26 molecules followed a gaussian distribution with no bat26 alleles shorter than (A)<sub>21</sub>. All mutation carriers showed unstable alleles [(A)<sub>20</sub> or shorter] with an overall frequency of 5.6% (102/1814). We therefore suggest that low levels of genomic instability characterize MMR mutation carriers. These observations suggest that somatic mutations accumulate well before tumor diagnosis. Even though it is not clear whether this is due to the presence of a small percentage of cells with lost MMR or due to MMR haploinsufficiency, detection of these short unstable alleles might help in the identification of asymptomatic carriers belonging to families with no detectable MMR gene mutations.**

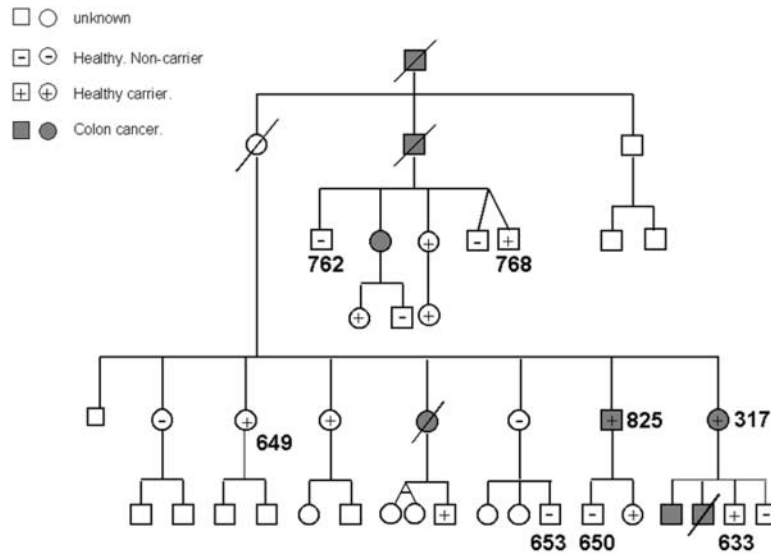
## INTRODUCTION

Tumors from the hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome are characterized by a widespread genomic instability phenotype, caused by a defective mismatch repair (MMR) system (1,2). Up to 50% of HNPCC patients carry germline heterozygous mutations in one of the DNA repair genes *MLH1*, *MSH2* and *MSH6* (2–4). In these families, non-neoplastic cells from HNPCC carriers are phenotypically normal and retain a wild-type allele of the MMR gene. The inactivation or loss of the wild-type allele results in the loss of the MMR function and causes, in HNPCC tumors, a mutator phenotype in a recessive manner (5,6). The defective MMR system allows the accumulation

in a stepwise model of thousands of mutations in microsatellites and other repetitive sequences, generating microsatellite instability (MSI) and initiating the tumorigenic process that leads to MSI colorectal cancer (7–9). Loss of MMR is an early event in HNPCC cancer development that occurs before gatekeeper mutations are selected (10–12).

In concordance with the recessive nature of MMR deficiency, microsatellite alterations are typically absent in non-neoplastic cells from HNPCC patients, suggesting the proficiency of the MMR system in these cells (13,14). Also, extensive somatic microsatellite mutations have been found in normal tissues from rare individuals with congenital bi-allelic or dominant-negative mutations in MMR genes (15–17). However, the acknowledged recessive nature of

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +34 934894060; Fax: +34 934894040; Email: sswartz@vhebron.net



**Figure 1.** Family A is represented. This family shows a positive family history for colorectal cancer and is also positive for Amsterdam criteria (30). Accordingly, it was diagnosed as an HNPCC family and few carriers with a germline mutation in the *MLH1* gene were identified. Carrier and non-carrier members are indicated, as well as members with colorectal cancer. The members selected for the bat26 analysis are numbered accordingly. Cases 317, 649 and 825 were healthy at the time of blood extraction.

MMR deficiency has been challenged by the scarce evidences showing that normal non-neoplastic cells from HNPCC individuals may be also MMR-deficient (18,19).

One of the microsatellites used for detecting genomic instability is bat26, a quasi-monomorphic mononucleotide repeat of 26 adenines (20,21). Because of the inherent instability of microsatellite sequences, the analysis of a microsatellite sequence in bulk tissues often results in a polymorphic pattern of different lengths in a gaussian-like distribution. With the majority of the current analytical methods, only the most predominant alleles are detectable. Even though low levels of instability can generate shorter alleles at a low frequency, these might be under the sensitivity thresholds for detection. This dilution factor can be overcome by using alternative methods that allow the analysis of single microsatellite molecules. The aim of this study has been to investigate the presence of genetic instability in peripheral blood cells obtained from carrier and non-carrier members of two well-characterized HNPCC families harboring *MLH1* and *MSH2* germline mutations, respectively, in the absence of detectable neoplasia. Length distribution pattern of single molecules of bat26 has revealed the appearance of unstable alleles before tumor diagnosis in MMR mutation carriers. These observations suggest that the detection of these short unstable alleles might help in the identification of asymptomatic carriers belonging to families with no detectable MMR gene mutations and may be of help in further assessing the pathogenicity of missense MMR mutations.

## RESULTS AND DISCUSSION

Tumors from the HNPCC syndrome show high levels of MSI and a defective MMR cellular environment (1,2). In these tumors, the loss or inactivation of the remaining wild-type allele of the MMR gene is believed to cause the inactivation

of the MMR system starting a tumorigenic mutator phenotype (8,10). Accordingly, current models suggest a recessive nature for the genomic instability present in HNPCC tumorigenesis associated with the lack of microsatellite alterations in normal tissues from HNPCC patients (6,13,14). We have used an alternative PCR-cloning approach to further investigate, at the level of single microsatellite molecules, whether microsatellite instability can occur before tumor diagnosis and thus be helpful in identifying HNPCC carriers.

Because of the mutational dynamics of repetitive sequences, genomic microsatellites show a polymorphic length distribution that depends on their inherent instability and the status of the MMR system. Even when the MMR system is functional, a small percentage of mutations escape from repair and become clonally perpetuated, allowing microsatellites to exhibit different lengths in a gaussian-like distribution even in normal tissues (22,23). Our aim was to characterize the distribution patterns of bat26 single molecules in peripheral blood lymphocytes (PBLs) from non-carrier and carrier members of two HNPCC families with known germline mutations in *MLH1* (Family A, with a G>A missense mutation in codon 67 of exon 2) (Fig. 1) and in *MSH2* (Family B, with a G insertion in nucleotide 735 of exon 4). A total of 901 single molecules from four non-carrier members (three members of Family A and 266 molecules from one member of Family B) were analyzed. As expected, distributions showed a gaussian-like pattern of bat26 with lengths ranging from 21 to 27 adenines that we considered as stable alleles (Table 1). Interestingly, the most common length of bat26 was 25 adenines instead of 26 in all cases. No differences were detected with respect to age. These patterns were considered as normal for comparison purposes.

Next, we studied the allelic distribution of bat26 alleles present in PBLs of five phenotypically normal (at the time

**Table 1.** Bat26 allelic profiles in PBLs from carriers and non-carriers from HNPCC families

	Family A (G199A, <i>MLH1</i> )				Family B (735G, <i>MSH2</i> )					
	Carriers		Non-carriers		Carrier		Non-carrier			
Family member	633 +	317 +	768 +	649 +	825 +	762 -	650 -	653 -	376 +	378 -
Age <sup>a</sup>	31	61	42	45	61	52	35	26	45	27
Sex	Male	Female	Male	Female	Male	Male	Male	Male	Female	Female
Total clones analyzed	342	296	367	226	239	323	339	239	344	266
Length of follow-up	4y	8y	4y	4y	4y	4y	4y	4y	5y	5y
Current status	Adenoma 2y CRC 5y		Renal Ca 1y							
Stable allele frequency (A) <sup>b</sup>										
27A	2(2) <sup>c</sup>	5(2)	4(2)	3(2)	2(2)	10(3)	3(1)	7(3)	5(2)	9(4)
26A	47(3)	70(4)	65(2)	34(2)	32(3)	56(2)	67(3)	62(4)	52(2)	40(3)
25A	88(10)	71(7)	89(5)	95(4)	39(3)	92(6)	90(5)	64(2)	91(3)	76(5)
24A	75(5)	71(8)	85(6)	42(6)	55(4)	65(3)	81(5)	50(4)	72(5)	61(4)
23A	58(6)	61(5)	58(7)	24(4)	45(5)	47(4)	43(2)	28(2)	56(4)	45(3)
22A	35(6)	38(4)	30(5)	13(6)	33(4)	33(4)	38(3)	23(3)	25(5)	22(4)
21A	15(10)	29(12)	21(12)	7(5)	19(10)	20(9)	17(9)	5(4)	15(8)	13(6)
Unstable allele frequency										
20A	<u>13(6)</u>	<u>10(6)</u>	<u>8(5)</u>	<u>3(3)</u>	<u>9(5)</u>	0	0	0	<u>9(3)</u>	0
19A	<u>5(3)</u>	<u>2(2)</u>	<u>5(5)</u>	<u>3(3)</u>	<u>2(2)</u>	0	0	0	<u>13(4)</u>	0
18A	<u>2(2)</u>	<u>8(4)</u>	<u>1(1)</u>	<u>2(2)</u>	<u>2(2)</u>	0	0	0	0	0
17A	0	<u>1(1)</u>	0	0	<u>1(1)</u>	0	0	0	0	0
16A	<u>1(1)</u>	0	<u>1(1)</u>	0	0	0	0	1(1)	0	0
15A	<u>1(1)</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
14A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total <sup>d</sup>	22/342	21/296	15/367	8/226	14/239					22/344
Percentage	6.43	7.09	4.08	3.53	5.85					6.39

Altered bands are underlined.

<sup>a</sup>Age at blood extraction.

<sup>b</sup>Length of the bat26 repeat.

<sup>c</sup>Number of clones found (sequenced clones).

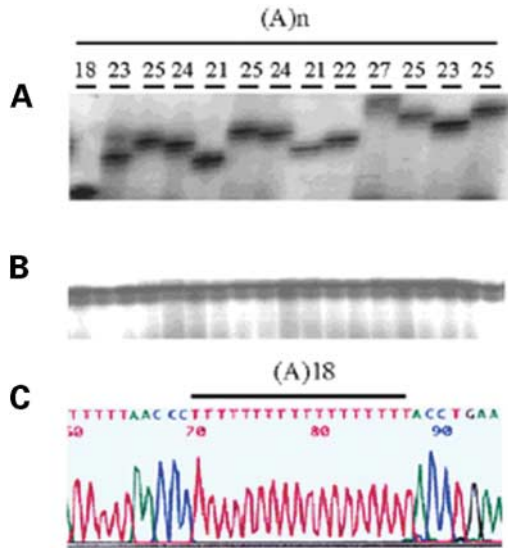
<sup>d</sup>Total fraction of detected unstable clones.

of blood extraction) HNPCC carriers from Family A and one carrier from Family B (Table 1 and Fig. 2 A and C). All carriers showed a gaussian-like pattern with specific altered microsatellite molecules (20 adenines tracts or shorter) (number of 20A–14A alleles was 0 of 1167 in controls versus 81 of 1566 in carriers,  $P < 0.001$ ). The overall frequency of altered bat26 sequences (unstable alleles) in carriers was 5.6% (102/1814) (range: 3.53–7.09) of the total number of cloned molecules (Table 1). Again, no differences were detected with respect to regarding age. Further experiments with a single bat26 clone demonstrated that altered lengths were not owing to artifacts from our PCR-cloning approach (Fig. 2b). These results suggest that subjacent low-level genomic instability characterizes HNPCC carriers and that this instability may occur well before tumor diagnosis.

The molecular basis of the observed low-level genetic instability detected in phenotypically normal HNPCC carriers may have distinct explanations. One possibility is that they reflect the presence of circulating phenotypically normal MSI(–/+) cells. Several theoretical explanations can be envisioned for this phenotype. On the one hand, a reduced dose (haploinsufficiency) of effective MMR molecules could explain it. This would be in agreement with previous observations suggesting that, in non-neoplastic HNPCC colon cells, oncogenic mutations might accumulate in tissues before a complete loss of MMR occurs (19). This suggestion

is in line with previous results with distinct animal models. Heterozygous mutants of *MSH2* in *Drosophila* germ cells also show MSI in the germline (24,25). Furthermore, colon tissues from heterozygous *MSH2* transgenic mice are characterized by increased levels of genomic frameshift deletions (26) and similar data have been obtained from defective *MSH2* and *MLH1* yeast strains (27,28). In this case, the somatic mutations observed would accumulate from birth in tissues of HNPCC carriers. While a role for insufficiency is provocative, it certainly does not account for all our findings. In fact, age of carrier does not correlate with the degree of instability, as would be expected under haploinsufficiency. Another possibility is that dominant-negative effect of both *MLH1* and *MSH2* mutations exists in normal MSI(+/-) cells. However, this possibility is unlikely. First, because a majority of HNPCC tumors show a second hit affecting the wild-type MMR allele, mainly by loss of heterozygosity, suggesting that most HNPCC MMR mutations do not exert dominant-negative functions. Second, because reported individuals showing homozygous germline mutations in MMR genes died at very young age (17).

Another relevant possibility is that the shorter alleles we detect depict the presence of circulating MSI(+/-) cells that have completely lost MMR. The presence of very short alleles (15A–17A) in several of the carriers analyzed, highly suggests the presence of cell populations that have accumulated a high number of alterations. These cells could be



**Figure 2.** Bat26 mutations in HNPCC carriers. (A) An illustrative figure of bat26 clones obtained from the HNPCC-carrier 768 is shown. The respective sizes of the adenine repeats are depicted on top. (B) A representative autoradiography showing the absence of mutational events caused by the PCR-cloning approach when using a single clone of 20 adenines as control. (C) The sequence data from one of the (A)<sub>18</sub> clones found in the HNPCC-carrier 768 are shown.

either phenotypically normal or already malignant. The fact that four of the five carriers had been diagnosed of neoplasia either before or after blood extractions makes this possibility a feasible one.

These results may have some clinical implications. Detection of low-level MSI may be used in the characterization of members at risk of HNPCC families in families with MSI(+) tumors with no detectable germline mutations in the known MMR genes. Also, the detection of rare mutant bat26 alleles might be an additional tool for evaluating the pathogenic capabilities of missense MMR mutations in HNPCC carriers, although it does not alone prove pathogenicity. The missense mutation from G to A at codon 67 (GGG to AGGG; G67R) of Family A is worthy of note. This mutation has been considered as pathogenic based on three facts: (a) this glycine residue is highly conserved, (b) the mutation has not been found in control individuals and the mutation (c) cosegregates with the disease. The experimental evidence we report here should be used as further evidence supporting its pathogenicity.

## MATERIALS AND METHODS

### Sample collection and DNA extractions

Genomic DNA samples from PBLs were obtained from previously characterized members of two HNPCC families with known germline MMR mutations attended at the Cancer Genetic Unit at the Institut Català d'Oncologia, (Barcelona, Spain). Five HNPCC carriers and three non-carriers of Family A (Fig. 1) harboring a G199A missense mutation in codon 67 of exon 2 of *MLH1* and two members—one carrier and one non-carrier—of Family B, with a frameshift

mutation in *MSH2* produced by a G insertion at nucleotide 735 of exon 4, were included. The G199A mutation has been previously described and is considered as a pathogenic mutation (see the International Society of Gastrointestinal Hereditary Tumours Mutation database, <http://www.insight-group.org>).

All included patients had undergone endoscopic procedures 1–2 years before blood extraction. At the time of blood extraction, all colonoscopies were negative. Of all included patients, one carrier (825+) had been diagnosed of a colorectal carcinoma 1 year before. He had no evidence of disease at the time of blood analysis. Another carrier (376+) had been diagnosed of an ovarian cancer 2 years before blood extraction and of a colorectal cancer 1 year before. Follow-up period oscillated between 4 and 8 years. During follow-up, and in the absence of disease, colonoscopic procedures have been performed every 2 years before 40 years of age and yearly afterwards. Current follow-up status is depicted in Table 1. Case 317 was diagnosed of adenoma 2 years after blood extraction and a carcinoma was diagnosed 3 years later.

DNA was extracted as described. Briefly, blood samples were treated with erythrocyte lysis buffer (2 M Tris, p. 7.5; 1 M MgCl<sub>2</sub>), during 30 min on ice and supernatants recovered by centrifugation. Leukocyte lysis buffer (5 M NaCl; 0.25 M EDTA, pH. 8.0; 2 M Tris, p. 7.5) and proteinase K were added to each tube and samples incubated during 5 h at 50 and at 37°C overnight. DNA was extracted with chloroform and isopropanol using standard procedures. Sample collection was carried out in accordance with previously established ethical protocols.

### Analysis of bat26 allelic profiles

The microsatellite bat26 was amplified by PCR as previously described (20), and PCR products cloned into PCR4-Topo vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Transformed *Escherichia coli* were grown with ampicillin at 37°C and colonies picked after 12 h. Clones were reamplified by radioactive PCR in the presence of 0.2 mCi of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP as follows: one cycle at 94°C for 4 min., followed by 35 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 30 s. PCR products were analyzed on a 6% denaturing polyacrylamide gel and subjected to autoradiography (29). A previously characterized clone of bat26 of 17 adenines was used as control. The size of every clone was determined by band counting, using the size of the control as reference. In order to ensure that the assigned sizes were as expected, a representative percentage of randomly selected clones were also sequenced on an ABI Prism 377 automatic sequencer (Perkin-Elmer, Foster City, CA, USA) using the ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin-Elmer). All sequences confirmed the expected sizes. Proportions of alleles were compared by means of Yates' corrected Pearson chi-square test. Furthermore, we used a bat26 clone of 20 adenines to address whether the PCR-cloning technique of our approach could yield artificial shorter alleles of bat26 that will invalidate the analysis. This clone was therefore reamplified, cloned again into PCR4-Topo vector and grown in bacteria. Fifty colonies were

randomly selected and analyzed accordingly. We did not detect any allelic variant other than the original.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by grants FIS 01/1350, 01/1264 from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias. H.A. and E.D. are supported by fellowships from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias.

## REFERENCES

- Aaltonen, L.A., Peltomäki, P., Leach, F.S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Powell, S.M., Jen, J., Hamilton, S.R. *et al.* (1993) Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, **260**, 812–816.
- Marra, G. and Boland, C.R. (1995) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J. Natl Cancer I*, **87**, 1114–1125.
- Miyaki, M., Konishi, M., Tanaka, K., Kikuchi-Yanoshita, R., Muraoka, M., Yasuno, M., Igari, T., Koike, M., Chiba, M. and Mori, T. (1997) Germline mutation of *MSH6* as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat. Genet.*, **17**, 271–272.
- Lynch, H.T. and de la Chapelle, A. (1999) Genetic susceptibility to nonpolyposis colorectal cancer. *J. Med. Genet.*, **36**, 801–818.
- Hemminki, A., Peltomäki, P., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Salovaara, R., Nystrom-Lahti, M., de la Chapelle, A. and Aaltonen, L.A. (1994) Loss of the wild type *MLH1* gene is a feature of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat. Genet.*, **8**, 405–410.
- Casares, S., Ionov, Y., Ge, H., Stanbridge, E. and Perucho, M. (1995) The microsatellite mutator phenotype of colon cancer cells is often recessive. *Oncogene*, **11**, 2303–2310.
- Perucho, M., Peinado, M.A., Ionov, Y., Casares, S., Malkhosyan, S. and Stanbridge, E. (1994) Defects in replication fidelity of simple repeated sequences reveal a new mutator mechanism for oncogenesis. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **59**, 339–348.
- Perucho, M. (1996) Cancer of the microsatellite mutator phenotype. *J. Biol. Chem.*, **377**, 675–684.
- Shibata, D., Navidi, W., Salovaara, R., Li, Z. and Aaltonen, L.A. (1996) Somatic microsatellite mutations as molecular tumor clocks. *Nat. Med.*, **2**, 676–681.
- Aaltonen, L.A., Peltomäki, P., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Jass, J.R., Green, J.S., Lynch, H.T., Watson, P., Tallqvist, G., Juhola, M., *et al.* (1994) Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res.*, **54**, 1645–1648.
- Iino, H., Simms, L., Young, J., Arnold, J., Winship, I.M., Webb, S.I., Furlong, K.L., Leggett, B. and Jass, J.R. (2000) DNA microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut*, **47**, 37–42.
- Kim, K.M., Salovaara, R., Mecklin, J.P., Jarvinen, H.J., Aaltonen, L.A. and Shibata, D. (2002) PolyA deletions in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: mutations before a gatekeeper. *Am. J. Pathol.*, **160**, 1503–1506.
- Parsons, R., Li, G.M., Longley, M.J., Fang, W.H., Papadopoulos, N., Jen, J., de la Chapelle, A., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. and Modrich, P. (1993) Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell*, **75**, 1227–1236.
- Modrich, P. (1994) Mismatch repair, genetic stability, and cancer. *Science*, **266**, 1959–1960.
- Ricciardone, M.D., Ozcelik, T., Cevher, B., Ozdag, H., Tuncer, M., Gurgey, A., Uzunalimoglu, O., Cetinkaya, H., Tanyeli, A., Erken, E., *et al.* (1999) Human *MLH1* deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis typ. 1. *Cancer Res.*, **59**, 290–293.
- Wang, Q., Lasset, C., Desseigne, F., Frappaz, D., Bergeron, C., Navarro, C., Ruano, E. and Puisieux, A. (1999) Neurofibromatosis and early onset of cancers in *hMLH1*-deficient children. *Cancer Res.*, **59**, 294–297.
- Vilkkii, S., Tsao, J.L., Loukola, A., Pöyhönen, M., Vierimaa, O., Herva, R., Aaltonen, L.A. and Shibata, D. (2001) Extensive somatic microsatellite mutations in normal human tissue. *Cancer Res.*, **61**, 4541–4544.
- Parsons, R., Li, G.M., Longley, M., Modrich, P., Liu, B., Berk, T., Hamilton, S.R., Kinzler, K.W. and Vogelstein, B. (1995) Mismatch repair deficiency in phenotypically normal human cells. *Science*, **268**, 738–740.
- Calabrese, P., Tsao, J.L., Yatabe, Y., Salovaara, R., Mecklin, J.P., Jarvinen, H.J., Aaltonen, L.A., Tavare, S. and Shibata, D. (2004) Colorectal pretumor progression before and after loss of DNA mismatch repair. *Am. J. Pathol.*, **164**, 1447–1453.
- Hoang, J.M., Cottu, P.H., Thuille, B., Salmon, R.J., Thomas, G. and Hamelin, R. (1997) BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res.*, **57**, 300–303.
- Boland, C.R., Thibodeau, S.N., Hamilton, S.R., Sidransky, D., Eshleman, J.R., Burt, R.W., Meltzer, S.J., Rodriguez-Bigas, M.A., Fodde, R., Ranzani, G.N., *et al.* (1998) A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.*, **58**, 5248–5257.
- Zhou, X.-P., Hoang, J.-M., Cottu, P., Thomas, G. and Hamelin, R. (1997) Allelic profiles of mononucleotide repeat microsatellites in control individuals and in colorectal tumors with and without replication errors. *Oncogene*, **15**, 1713–1718.
- Samowitz, W.S., Slattery, M.L., Potter, J.D. and Leppert, M.F. (1999) BAT-26 and BAT-40 instability in colorectal adenomas and carcinomas and germline polymorphisms. *Am. J. Pathol.*, **154**, 1637–1641.
- López, A., Xamena, N., Marcos, R. and Velázquez, A. (2002) Germ cells microsatellite instability. The effect of different mutagens in a mismatch repair mutant of *Drosophila* (sp11). *Mutat. Res.*, **514**, 87–94.
- Baida, A., López, A., Marcos, R. and Velázquez, A. (2003) Germline mutations at microsatellite loci in homozygous and heterozygous mutants for mismatch repair and PCNA genes in *Drosophila*. *DNA Repair*, **2**, 827–833.
- Zhang, S., Lloyd, R., Bowden, G., Glickman, B.W. and de Boer, J.G. (2002) Msh2 deficiency increases the mutation frequency in all parts of the mouse colon. *Environ. Mol. Mutagen.*, **40**, 243–250.
- Drotschmann, K., Clarck, A.B., Tran, H.T., Resnick, M.A., Gordenin, D.A. and Kunkel, T.A. (1999) Mutator phenotypes of yeast strains heterozygous for mutations in the *Msh2* gene. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 2970–2975.
- Drotschmann, K., Shcherbakova, P.V. and Kunkel, T.A. (2000) Mutator phenotype due to loss of heterozygosity in diploid yeast strains with mutations in *MSH2* and *MLH1*. *Toxicol. Lett.*, **112–113**, 239–244.
- Menoyo, A., Alazzouzi, H., Espin, E., Armengol, M., Yamamoto, H. and Schwartz, S., Jr. (2001) Somatic mutations in the DNA damage-response genes *ATR* and *CHK1* in sporadic stomach tumors with microsatellite instability. *Cancer Res.*, **61**, 7727–7730.
- Vasen, H.F., Mecklin, J.P., Khan, P.M., Lynch, H.T. (1991) The international collaborative group on hereditary nonpolyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis. Colon Rectum*, **34**, 424–425.

ANEXO 2

*Alazzouzi H, Farriol M, Espin E, Armengol M, Pena M, Zeh K, Schwartz S, Schwartz S  
Jr.*

**Molecular patterns of nuclear and mitochondrial microsatellite  
alterations in breast tumors.**

*Oncology Report. 2003 Sep-Oct; 10(5):1561-7*

# Molecular patterns of nuclear and mitochondrial microsatellite alterations in breast tumors

HAFID ALAZZOUZI, MIREYA FARRIOL, ELOI ESPÍN, MANEL ARMENGOL,  
MANEL PENA, KARIN ZEH, SIMÓ SCHWARTZ and SIMÓ SCHWARTZ Jr

Molecular Pathology Program, Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular  
(CIBBIM), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

Received November 11, 2002; Accepted February 14, 2003

**Abstract.** The widespread distribution of microsatellite sequences within the human genome has allowed researchers to identify alternative patterns of microsatellite alterations in cancer cells. Among them, aneuploid patterns of nuclear microsatellites, pseudo-diploid microsatellite instability patterns, and also patterns of microsatellite instability within the mitochondrial genome. In this context, while aneuploid patterns of multiple genomic gains and losses had already been described in breast tumors, data on nuclear microsatellite instability still remain controversial and limited data on mitochondrial instability are available. In order to clarify this, we undertook an extensive analysis of nuclear and mitochondrial microsatellite alterations in breast ductal adenocarcinomas, stratified by grades. No instability was detected in any of the 40 dinucleotide microsatellites analysed nor in bat26 and APA3 mononucleotide repeats, clearly concluding that microsatellite instability is not a feature of ductal breast tumorigenesis. Instead, microsatellites defined a clear pattern of aneuploid genomic gains and losses among which, losses of *BRCA1* at D17S855 and gains of *plakoglobin* at D17S846 significantly associated to grade III tumors and poor prognosis. On the other hand, mitochondrial instability at the transcription control region was also detected in 10.8% of cases. None of the new mitochondrial variants was found in the normal tissue counterparts, confirming that these new variants arise as sporadic somatic mutations in the tumor cells. Also, no association was found between heteroplasmy in the normal tissue and mitochondrial instability in the tumors. We therefore suggest that these new

variants arise in tumors as a consequence of the progressive accumulation of slippage somatic mutations and the intrinsic instability of these microsatellite sequences. Finally, our results also confirm that mitochondrial instability does not associate with nuclear MSI.

## Introduction

Microsatellite sequences have been widely used to analyse genomic alterations in human cancers. The widespread distribution of these polymorphic repetitive sequences within the genome has allowed researchers to get a general overview of how microsatellite alterations characterise each particular cancer. Accordingly, different types of microsatellite alteration patterns have been clearly identified. Among them, microsatellite gains and losses define cancer-type aneuploid patterns of genetic alterations that give clonal advantage and positive selection to the tumor cells. Loss of microsatellite alleles, also known as loss of heterozygosity (LOH), has provided a powerful tool for defining genomic regions that might contain tumor suppressor genes, whereas microsatellite allelic gains accounting for genomic amplifications has helped to determine oncogenic candidate genes.

On the other hand, a different pattern of microsatellite alterations, known as microsatellite instability (MSI), has been found in tumors with defects in the DNA mismatch repair system (1-3). Due to the inherent instability of microsatellite sequences, within slippage mutations occur during DNA replication according to their spontaneous mutational rates (4). Also, according to the mutational dynamics of microsatellite sequences, long sequences have mainly sequential deletions of repetitive units while short repeats accumulate mostly insertions and longer lengths (5). In fact, longer sequences are more unstable because of their higher probabilities for slippage and misalignment errors. These trends establish a spontaneous mutational dynamic process that configure, together with the DNA mismatch repair system (MMR), the final lengths of microsatellites and explains the allelic variability of these sequences within human populations (6,7).

Therefore, in tumors with defects in the DNA mismatch repair system, these somatic mutations will rapidly accumulate in cancer cells according to the mutator phenotype model for tumorigenesis (8). In this model, mutations in neutral microsatellite sequences will clonally perpetuate in tumor cells

---

*Correspondence to:* Dr Simó Schwartz Jr, Molecular Pathology Program, CIBBIM, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain  
E-mail: schwartz@hg.vhebron.es

*Abbreviations:* LOH, loss of heterozygosity; MSI, microsatellite instability; MMR, mismatch repair

*Key words:* breast cancer, loss of heterozygosity, microsatellite instability

according to their spontaneous mutational rates and their particular mutational dynamics. The clonal perpetuation of mutations at repetitive sequences within genomic coding regions will also depend on the tumor cell growing advantage and the tumorigenic selectivity of these specific target-gene frameshifts. In these tumors, MSI define a specific pattern of pseudo-diploid genomic alterations, and constitutes an alternative tumorigenic pathway because the cancer genes involved are different than those involved in the aneuploid patterns.

Recently, microsatellite instability has also been described in a polycytidine repeat within the D-loop region of the mitochondrial DNA (mtDNA) in gastrointestinal carcinomas and associated to tumor progression (9,10). Even though this region controls the transcription of the mtDNA heavy strand, it is still unclear whether longer repeats could give tumor cells growing advantage and clonal selection in tumorigenesis. Mitochondrial instability at this neutral polycytidine repeat might result from an accumulative process of slippage errors due to the higher rate of replication cycles of the tumor cells, together with a low-efficient mitochondrial DNA repair system. Moreover, no association has been observed between nuclear MSI and mtDNA instability in tumors of the mutator phenotype, suggesting that both are independent mechanisms (11). Further analysis of this new type of instability in human tumors are required in order to clarify its role in tumorigenesis.

Accordingly, different types of nuclear and mitochondrial genomic instability define alternative patterns of microsatellite alterations in cancer cells. Because the biological mechanisms that generate these alterations and the consequentially affected cancer genes are different for every pattern, it is necessary to define the specific tumorigenic pattern that characterises each tumor type. In this context, while aneuploid patterns of multiple genomic gains and losses have already been described in breast tumors, the presence of nuclear microsatellite instability still remains controversial and data on mtDNA instability are scarce. Here we report an extensive analysis of nuclear and mitochondrial microsatellite alterations in breast tumors. No nuclear microsatellite instability was detected in any case nor significant losses of genes involved in MMR such as *hMLH1* or *hMSH2*. On the contrary, nuclear microsatellites defined an aneuploid pattern of alterations among which, losses of *BRCA1* and gains at the *plakoglobin* locus significantly associated to high grade tumors. Finally, mitochondrial instability within the polycytidine repeat at the D-loop region was also found in a small percentage of cases. We suggest that these new variants arise in tumors as a consequence of the progressive accumulation of slippage somatic mutations and the intrinsic instability of these microsatellite sequences.

## Materials and methods

**Tumor samples.** Breast tumors were obtained from our collection at the Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular Vall d'Hebron (CIBBIM), Barcelona, Spain. Sample collection was carried out in accordance with previously established ethical protocols. Collected tumors were immediately frozen in liquid nitrogen for further

analysis. Nuclear and mitochondrial DNA were extracted with phenol-chloroform according to standard procedures (12).

**Analysis of nuclear and mtDNA microsatellite instability.** Tumors were analyzed for nuclear microsatellite instability by PCR as previously described (2,13) by using two mononucleotide repeats, (A)<sub>18</sub> of APΔ3 (2) and (A)<sub>26</sub> of Bat26 (14), and also 40 additional dinucleotide repeats, including those suggested in the US National Cancer Institute Guidelines for the assessment of microsatellite instability (15). Microsatellite instability was also analysed at the polycytidine repeat (nucleotides 299-315) within the D-loop region of the mtDNA by PCR, for one cycle at 94°C for 4 min, followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 57°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec, in the presence of 0.2 μCi of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP and specific primers (5'-CCA CTT TCC ACA CAG ACA T-3' and 5'-GGA GGG GAA AAT AAT GTG TTA G-3'). PCR products were analyzed on a 6% denaturing polyacrylamide gel and subjected to autoradiography.

**Cloning and sequencing of mtDNA variants.** PCR products from tumors with mtDNA instability and from their normal tissue counterparts were subcloned into plasmid pCRTM2.1, reamplified by PCR and analyzed on a 6% denaturing polyacrylamide gel and subjected to autoradiography. Plasmids from 20 selected clones from each normal and tumor case were sequenced using the ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Warrington, UK).

## Results and Discussion

Two different types of microsatellite alterations characterise the two major phenotypic patterns of human cancers. On the one side, allelic losses and gains of nuclear genomic regions, defining tumorigenic aneuploid patterns in which losses of tumor suppressor genes and/or gains of oncogenes give tumor cells clonal advantage. On the other side, tumors with defects in the DNA mismatch repair system that accumulate hundreds of thousands of somatic mutations in simple repeat sequences, configuring a pseudo-diploid pattern of a genomewide microsatellite instability (2). Although multiple frameshift mutations are generated when repeats within coding regions become unstable, only those genes involved in tumorigenesis will be clonally perpetuated because of their higher advantage and positive selection in tumor cell clonal expansion (8,16).

Accordingly, alternative patterns of microsatellite alterations can be defined for each specific tumor-type. Because these patterns are caused by different underlying mechanisms, the cancer genes involved in tumorigenesis are also different for each pattern and distinct tumor phenotypes are configured. Although aneuploid patterns have already been described in breast tumors (17,18), contradictory observations of nuclear microsatellite instability have been reported (19,20). Here we report an extensive analysis of dinucleotide and mononucleotide microsatellites in 37 ductal mammary adenocarcinomas. For comparative purposes tumors were classified into two groups according to their tumor



Table I. Summarized patterns of microsatellite alterations in breast tumors.

T	Age	G	Locat	N	<i>Brcal</i> <sup>a</sup>	<i>Plako</i> <sup>b</sup>	<i>E-cadherin</i> <sup>c</sup>	<i>β-catenin</i> <sup>d</sup>	<i>hMLH1</i> <sup>e</sup>	<i>hMSH2</i> <sup>f</sup>	mtDNA	MSI <sup>g</sup>
27	70	I	R	+	-	-	LOH	-	-	NI	-	-
50	80	I	R	-	-	-	LOH	-	NI	-	-	-
48	79	II	L	+	NI	Gain	-	-	-	-	NI	NI
46	55	II	R	+	-	-	-	LOH	-	-	NI	-
5	65	II	R	-	-	-	-	LOH	-	-	-	-
25	40	II	R	+	-	-	-	-	-	-	-	-
34	65	II	R	na	-	NI	LOH	-	-	-	NI	-
8	55	II	L	+	-	NI	-	NI	-	-	NI	NI
42	63	II	R	na	NI	-	LOH	NI	-	NI	NI	-
29	49	II	R	na	-	-	LOH	LOH	-	-	NI	NI
11	60	II	R	-	-	-	LOH	-	-	-	NI	-
41	32	II	L	-	NI	-	-	NI	-	-	NI	-
65	59	II	R	-	-	Gain	-	NI	NI	-	LOH	NI
16	78	II	R	+	-	NI	-	-	LOH	NI	-	-
36	48	II	R	+	-	-	-	NI	-	NI	-	-
26	49	II	L	+	-	-	LOH	LOH	LOH	-	LOH	-
2	55	III	R	na	LOH	NI	NI	LOH	-	-	-	NI
55	57	III	R	+	LOH	Gain	-	LOH	-	LOH	LOH	-
49	63	III	L	+	-	-	-	NI	-	NI	-	-
44	79	III	L	+	-	-	-	-	-	-	-	LOH
15	62	III	R	+	-	Gain	-	-	-	-	NI	-
12	86	III	R	+	LOH	-	LOH	-	-	NI	-	NI
31	32	III	R	+	LOH	-	-	NI	NI	NI	-	-
22	71	III	R	-	-	Gain	LOH	NI	-	-	-	-
7	61	III	L	+	-	Gain	LOH	-	NI	-	-	-
14	45	III	L	+	LOH	NI	LOH	NI	LOH	LOH	LOH	LOH
6	72	III	R	+	-	Gain	NI	LOH	NI	NI	NI	-
3	55	III	L/R	+	NI	-	-	-	NI	NI	-	-
17	63	III	L	+	LOH	NI	NI	LOH	-	-	-	-
53	43	III	L	-	NI	Gain	LOH	LOH	-	NI	-	NI
38	74	III	L	+	-	-	-	-	NI	-	NI	-
37	49	III	L	+	-	-	NI	NI	-	-	-	-
59	57	III	L/R	+	-	Gain	-	NI	-	NI	-	-
60	55	III	L	-	-	Gain	-	LOH	-	NI	NI	-
43	67	III	L	+	-	Gain	-	-	NI	-	-	NI
47	77	III	R	-	NI	Gain	-	-	NI	-	NI	-
4	48	III	L	na	NI	-	LOH	LOH	LOH	LOH	-	-

Tumors and clinical data are on the left. Tumor grades I and II are on the upper part of the table and separated from grade III that are showed in the lower part. Genes are named on top. T, tumor cases; G, tumor grade; Locat, location; N, lymph nodes; mtDNA, mitochondrial instability; MSI, microsatellite instability; R, right; L, left; LOH, loss of heterozygosity; NI, non-informative; na, not available; +, positive nodes; -, negative case; +del, deletion of one cytosine; +u,uu, insertions of one and two cytosines. a, locus D17S855; b, locus D17S846; c, locus 16S2624 and D16S752; d, locus D3S2456 and D3S1768; e, locus D3S1029, D3S1283, D3S1611 and D3S1619; f, locus D5S624 and D5S2107; g, summarised results from the analysis of 40 dinucleotide microsatellites and from Bat26 and APΔ3 mononucleotide repeats.

grade. Therefore, grade III tumors were compared with grades I and II. No microsatellite instability was detected in any of the 40 dinucleotide microsatellites analysed, nor in bat26 or APΔ3 mononucleotide repeats, clearly concluding

that microsatellite instability is not a characteristic feature of breast cancer, and also that breast tumorigenesis do not associate with defects of the DNA mismatch repair system (Table I).

As it has been suggested, due to the intrinsic instability of microsatellite sequences, spontaneous somatic mutations might accumulate at microsatellites according to their particular sequence and to the number of cell replication cycles (4,13,21). The higher the number of replication cycles, the higher the probabilities for slippage and misalignment errors to accumulate. In fact, the detection of these mutations in tumors does not represent positive selection but the inherent mutational dynamics of these neutral sequences, together with their random selection during tumor cell clonal expansions. These characteristics also allow researchers the use of microsatellite sequences as molecular clocks of tumor progression (4,21). Furthermore, microsatellite instability levels of bat26 and APΔ3 had been associated to cell replication activity in different tumor sets (13,22). In this context, our results indicate that the expected frequency of sporadic mutations in microsatellites in breast cancer is, according to the 2,960 alleles analyzed, at least lower than 0.03%. This frequency is lower than the reported for other tumor types with higher replication activities such as colorectal cancer (23,21). Moreover, because there is a minimum number of replication cycles required by a cell with DNA mismatch repair defects for achieving a microsatellite instability phenotype, it might be feasible for a tumor such as case 14 to show allelic losses of *hMLH1* and *hMSH2* genes without showing MSI (Table I).

Recently, microsatellite instability has been reported in a polycytidine repeat within the mitochondrial transcription control region in human tumors (9,24,25). Even though the region controls the transcription of the mitochondrial heavy strand, it is not clear whether different lengths at the polycytidine repeat will confer replication advantage to the mitochondrial molecule or have a role in tumorigenesis. According to *in vitro* experiments, variations in length of this repeat do not seem to affect the level of transcription, and different variants and heteroplasmic populations of mitochondrias have been detected in normal tissues as well (26). In our collection, instability was detected in 10.8% of tumor cases (4 of 37) (Table I and Fig. 1). Analysis of 20 clones from the normal and tumor tissues of the positive cases showed no evidence of insertion or deletion mutations in the normal tissue, confirming that these new variants arise as sporadic somatic mutations in the tumor cells. Nonetheless, heteroplasmy of this repeat was detected also in four normal cases, yielding a total percentage of 10.8%. However, no associations were detected between the presence of heteroplasmy in the normal tissue and mitochondrial instability in the tumor. Indeed, only case 22 was heteroplasmic and showed concomitant insertion mutations of one and two cytosines in the tumor counterpart.

Moreover, because microsatellite sequences are inherently unstable, different new mitochondrial variants of the (C)<sub>n</sub> repeat may also generate depending on the number of replication cycles of the tumor cells, according to the mutational dynamics of these sequences as molecular clocks. Due to the lack of histones and the high rate of exposure to oxidative damaging agents, mtDNA is prone to accumulate genetic alterations when compared to nuclear DNA (26,27). Also, mtDNA polymerase-γ, the enzyme responsible for mtDNA replication, is highly inefficient when compared

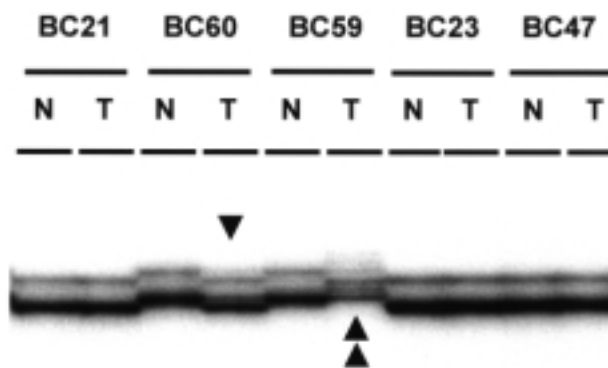


Figure 1. Mitochondrial DNA instability at the D-loop polycytidine repeat in breast cancers. A representative figure with cases named on top is shown. N, normal tissue; T, tumor. Arrowheads pointing up and down indicate insertions and deletions of one repetitive unit each. None of the new variants were detected in the normal tissue counterpart.

Table II. Frequency of microsatellite alterations in BRCA1, plakoglobin and E-cadherin locus in ductal mammary adenocarcinomas.

	BRCA1 <sup>a</sup>		Plakoglobin <sup>b</sup>		E-cadherin <sup>c</sup>			
	%		%		%	%		
Grades I/II	0	(0/13)	15	(2/13)	43	(7/17)	33	(4/12)
Grade III	35	(6/17) <sup>d</sup>	55	(10/18) <sup>e</sup>	35	(6/17)	46	(7/15)

<sup>a</sup>Locus D17S855; <sup>b</sup>locus D17S846; <sup>c</sup>locus 16S2624 and D16S752. Statistics were done with licensed SSPS 8.0 statistical software by using the two-sided  $\chi^2$  test or Fisher's exact test when the number of samples were insufficient for the  $\chi^2$  test. Significance was set at  $p < 0.05$ . Only informative cases were considered. <sup>d</sup> $p < 0.024$ . <sup>e</sup> $p < 0.032$ .

with nuclear polymerases and replicates mtDNA with poor fidelity (28). Whether certain nuclear DNA repair systems might be involved in mtDNA maintenance is unknown. Nonetheless, we have reported that mtDNA instability at this repeat does not associate to nuclear microsatellite instability in tumors with defects in the DNA mismatch repair system such as gastrointestinal tumors of the mutator phenotype (11).

Accordingly, our results confirm the presence of mitochondrial instability in tumors without microsatellite instability. The high number of mitochondrial DNA replications in the tumor cells and the absence of an effective mitochondrial DNA repair system, might explain the progressive accumulation of slippage somatic mutations and the mitochondrial genomic instability found in breast tumors, without implying clonal positive selection processes but random pseudoclonal segregation, as has been also suggested by other authors (29,30). Interestingly, although no statistical association was achieved, 3 of 4 cases with mtDNA instability were grade III, suggesting that high grade tumors might have higher replication activities than low grade, although further analysis are required to confirm this possibility.

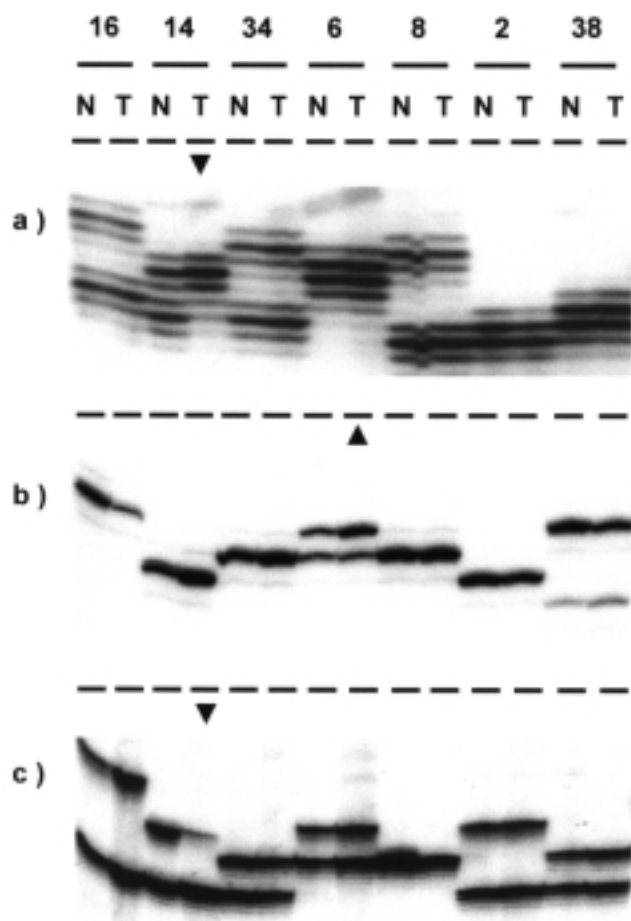


Figure 2. Aneuploid patterns of microsatellite alterations in breast tumors. A representative figure is shown. Cases are named on top. N, normal tissue; T, tumor. Arrowheads pointing up and down respectively indicate genomic gains and losses of the analysed markers. (a), shows a representative figure from the analysis of microsatellite D17S855 that targets *BRCA1*; (b), shows an example of the analysis of D17S846 targeting plakoglobin; and (c), shows the D3S1611 microsatellite, targeting the DNA repair gene *hMLH1*.

Finally, our analysis of microsatellites confirmed that the main pattern of microsatellite alterations in breast tumors is configured by an aneuploid spectrum of genomic alterations, in which allelic gains and losses of certain genomic regions associate to tumor grade and poor prognosis. Among them, high frequencies of LOH were detected in 17S855 targeting *BRCA1* at 17q21 (Tables I and II, and Fig. 2a). Indeed, *BRCA1* LOH was detected in 35% (6 of 17 informative cases) of grade III tumors whereas no LOH was found in tumor grades I and II. Accordingly, *BRCA1* losses associate to poor prognosis and grade III tumors ( $p < 0.024$ ) (Table II). Furthermore, allelic gains at the *plakoglobin* locus 17S846 in 17q21 were detected in 15% (2 out of 13 informative cases) grade I and II tumors, and in 55% (10 out of 18 informative cases) grade III tumors (Table I and Fig. 2b). These results show a significant association of *plakoglobin* gains to high grade tumors and poor prognosis ( $p < 0.032$ ) (Table II), clearly suggesting an oncogenic role for plakoglobin in breast tumorigenesis. High levels of plakoglobin have already been related to poor survival grade III ductal carcinomas by immunohistochemistry (31), and strong

activations of c-myc and the anti-apoptotic protein Bcl-2 by plakoglobin have been reported previously (32,33). Also, other authors have reported frequent gains at 17q in breast tumors by CGH analysis (17,34). These lines of evidence clearly link plakoglobin with cell growth and cell death regulatory signaling, and also its alteration with the activation of specific breast tumorigenic pathways.

On the other hand, even though plakoglobin is highly homologous to  $\beta$ -catenin its participation in the Wnt signalling pathway is still being debated. Recently, it has been shown that plakoglobin can interact with APC and also that high levels of plakoglobin can displace  $\beta$ -catenin from its binding to APC (35). Indeed, the displacement of  $\beta$ -catenin from the APC/GSK degradation machinery results in intracellular accumulation of endogenous  $\beta$ -catenin, which in turns activates LEF/TFC-dependent gene transcription (35,36). This competition might explain, at least partially, the oncogenic activity of plakoglobin. It should be noted though, that plakoglobin is also capable of binding to LEF/TCF and able to induce LEF/TCF gene transactivation (33,36). However, the plakoglobin-LEF/TCF complex has a low ability to form ternary structures with DNA, suggesting that transactivation by plakoglobin might involve other unknown proteins (37). Whether the transcribed target genes are common to the  $\beta$ -catenin-LEF/TCF transcription targets has still to be clarified.

Interestingly, no association between LOH at the *BRCA1* locus and gains of *plakoglobin* was detected even though their relative proximity at 17q21. Also, among 14 grade III tumors that were informative for both locus, four cases did not show any alteration and nine cases showed either *BRCA1* losses or gains of plakoglobin. Only case 55 showed simultaneous loss of *BRCA1* and gain of plakoglobin, which is in agreement with the statistically expected concomitant alterations according to the individual percentages of alterations detected at *BRCA1* (21%, 3 of 14 informative cases) and *plakoglobin* (57%, 8 of 14 informative cases). These results may suggest that both alterations contribute independently to tumor cell clonal selection in breast tumorigenesis.

On the other hand, we also detected a high incidence of losses at 16S2624 and 16S752 (Table I), targeting *CDH1* at 16q22.1, one of the three known common regions of deletion in breast cancer together with 16q23.2-24.1 and 16q24.3 regions (17,18,38). It should be noted however, that the boundaries of the smallest region of overlap reported at 16q22.1 in breast tumors are demarcated by markers D16S398 and D16S301, that limit a region that does not overlap *CDH1* (18). This finding suggests that a TSG other than *CDH1* might be located in this region. Indeed, although *CDH1* clearly plays a role in the tumorigenesis of lobular breast carcinomas (39), its role in ductal tumorigenesis still remains to be established.

Nonetheless, a high incidence of losses of *CDH1* has been lately associated with grade I ductal carcinomas, suggesting that different genetic pathways control the tumorigenic evolution of breast tumors according to the grade of dedifferentiation (17). However, whether grades I or II tumors might evolve to grade III or not, is still a controversial issue (40). According to our data, no associations were found between *CDH1* losses and the tumor grade (Table II). Similarly, no associations have also been reported

by others, who have suggested that discrepancies between CGH and LOH analysis can be attributed to the fact that LOH analysis but not CGH, are able to detect losses after mitotic recombination events (18). Finally, low LOH frequencies were detected in D3S2456 and D3S1768, targeting  $\beta$ -*catenin*, and in D3S1029, D3S1283, D3S1611 and D3S1619, and D5S624 and D5S2107, respectively targeting the MMR genes *hMLH1* and *hMSH2* (Table I and Fig. 2c). Accordingly, our data when qualitatively considered, show that the patterns of microsatellite alterations found in breast tumors were very similar between grades I/II and III, suggesting that high grade tumors might evolve from low grade cancers through progressive tumor cell modulations by specific tumorigenic selection forces.

### Acknowledgements

This study was partially supported by Grant Fis 01/1350 from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS). H.A. was supported by a fellowship from the Spanish Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS).

### References

- Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B and De la Chapelle A: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260: 812-816, 1993.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D and Perucho M: Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363: 558-561, 1993.
- Thibodeau SN, Bren G and Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260: 816-819, 1993.
- Shibata D, Navidi W, Salovaara R, Li Z and Aaltonen LA: Somatic microsatellite mutations as molecular tumor clocks. *Nat Med* 2: 676-681, 1996.
- Wierdl M, Dominska M and Petes TD: Microsatellite instability in yeast: dependence on the length of the microsatellite. *Genetics* 146: 769-779, 1997.
- Ellegren H: Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. *Nature* 24: 400-402, 2000.
- Xu X, Peng M, Fang Z and Xu X: The direction of microsatellite mutations is dependent upon allele length. *Nature* 24: 396-399, 2000.
- Perucho M: Microsatellite instability: the mutator that mutates the other mutator. *Nat Med* 2: 630-631, 1996.
- Habano W, Nakamura S and Sugai T: Microsatellite instability in the mitochondrial DNA of colorectal carcinomas: evidence for mismatch repair systems in mitochondrial genome. *Oncogene* 17: 1931-1937, 1998.
- Habano W, Sugai T, Nakamura SI, Uesugi N, Yoshida T and Sasou S: Microsatellite instability and mutation of mitochondrial and nuclear DNA in gastric carcinoma. *Gastroenterology* 118: 835-841, 2000.
- Schwartz S Jr and Perucho M: Somatic mutations in mitochondrial DNA do not associate with nuclear microsatellite instability in gastrointestinal cancer. *Gastroenterology* 119: 1806-1808, 2000.
- Heerdt BG and Augenlicht LH: Changes in the number of mitochondrial genomes during human development. *Exp Cell Res* 186: 54-59, 1990.
- Schwartz S Jr, Yamamoto H, Navarro M, Maestro M, Reventos J and Perucho M: Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes, in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res* 59: 2995-3002, 1999.
- Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G and Hamelin R: BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 57: 300-303, 1997.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN and Srivastava S: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58: 5248-5257, 1998.
- Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC and Perucho M: Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 275: 967-969, 1997.
- Roylance R, Gorman P, Harris W, Liebmann R, Barnes D, Hanby A and Sheer D: Comparative genomic hybridization of breast tumors stratified by histological grade reveals new insights into the biological progression of breast cancer. *Cancer Res* 59: 1433-1436, 1999.
- Cleton-Jansen A, Callen DF, Seshadri R, Goldup S, McCallum B, Crawford J, Powell JA, Settasiatian C, van Beerendonk H, Moerland EW, Smit VTBHM, Harris WH, Millis R, Morgan NV, Barnes D, Mathew CG and Cornelisse CJ: Loss of heterozygosity mapping at chromosome arm 16q in 712 breast tumors reveals factors that influence delineation of candidate regions. *Cancer Res* 61: 1171-1177, 2001.
- Anbazhagan R, Fujii H and Gabrielson E: Microsatellite instability is uncommon in breast cancer. *Clin Cancer Res* 5: 839-844, 1999.
- Richard SM, Bailliet G, Paez GL, Bianchi MS, Peltomaki P and Bianchi NO: Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer. *Cancer Res* 60: 4231-4237, 2000.
- Tsao JL, Yatabe Y, Salovaara R, Jarvinen HJ, Mecklin JP, Aaltonen LA, Tavare S and Shibata D: Genetic reconstruction of individual colorectal tumor histories. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1236-1241, 2000.
- Duval A, Reperant M, Compoin A, Seruca R, Ranzani GN, Iacopetta B and Hamelin R: Target gene mutation profile differs between gastrointestinal and endometrial tumors with mismatch repair deficiency. *Cancer Res* 62: 1609-1612, 2002.
- Gonzalez-Garcia I, Moreno V, Navarro M, Marti-Rague J, Marcuello E, Benasco C, Campos O, Capella G and Peinado MA: Standardized approach for microsatellite instability detection in colorectal carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 92: 544-549, 2000.
- Sanchez-Cespedes M, Parrella P, Nomoto S, Cohen C, Xiao Y, Esteller M, Jeronimo C, Jordan RCK, Nicol T, Koch WM, Schoenberg M, Mazzarelli P, Fazio VM and Sidransky D: Identification of a mononucleotide repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors. *Cancer Res* 61: 7015-7019, 2001.
- Tan DJ, Bai RK and Wong LJC: Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer. *Cancer Res* 62: 972-976, 2002.
- Backer JM and Weinstein IB: Mitochondrial DNA is a major cellular target for a dihydrodiol-epoxide derivative of benzo[*a*]pyrene. *Science* 209: 297-299, 1980.
- Oberley LW and Buettner GR: Role of superoxide dismutase in cancer: a review. *Cancer Res* 39: 1141-1149, 1979.
- Kunkel TA and Loeb LA: Fidelity of mammalian DNA polymerases. *Science* 213: 765-767, 1981.
- Fliiss MS, Usadel H, Caballero OL, Wu L, Buta MR, Eleff SM, Jen J and Sidransky D: Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science* 287: 2017-2019, 2000.
- Coller HA, Khrapko K, Bodyak ND, Nekhaeva E, Herrero-Jiménez P and Thilly WG: High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. *Nat Genet* 28: 147-150, 2001.
- Gillet CE, Miles DW, Ryder K, Skilton D, Liebman RD, Springall RJ, Barnes DM and Handby AM: Retention of the expression of E-cadherin and catenins is associated with shorter survival in grade III ductal carcinoma of the breast. *J Pathol* 193: 433-441, 2001.
- Hakimelahi S, Parker HR, Gilchrist AJ, Barry M, Li Z, Bleackley RC and Pasdar M: Plakoglobin regulates the expression of the anti-apoptotic protein BCL-2. *J Biol Chem* 275: 10905-10911, 2000.
- Kolligs FT, Kolligs B, Hajra KM, Hu G, Tani M, Cho KR and Fearon ER: Gamma-catenin is regulated by the APC tumor suppressor and its oncogenic activity is distinct from that of beta-catenin. *Genes Dev* 14: 1319-1331, 2000.

34. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Piper J, Tanner M, Stokke T, Chen L, Smith HS, Pinkel D, Gray JW and Waldman FM: Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 2156-2160, 1994.
35. Simcha I, Shtutman M, Salomon D, Zhurinsky J, Sadot E, Geiger B and Ben-Ze'ev A: Differential nuclear translocation and transactivation potential of b-catenin and plakoglobin. *J Cell Biol* 141: 1433-1448, 1998.
36. Zhurinsky J, Shtutman M and Ben-Ze'ev A: Differential mechanisms of LEF/TCF-dependent transcriptional activation by  $\beta$ -catenin and plakoglobin. *Mol Cell Biol* 20: 4238-4252, 2000.
37. Zhurinsky J, Shtutman M and Ben-Ze'ev A: Plakoglobin and  $\beta$ -catenin: protein interactions, regulation and biological roles. *J Cell Sci* 113: 3127-3139, 2000.
38. Whitmore SA, Crawford J, Apostolou S, Eyre H, Baker E, Lower KM, Settasatian C, Goldup S, Seshadri R, Gibson RA, Mathew CG, Cleton-Jansen AM, Savoia A, Pronk JC, Auerbach AD, Doggett NA, Sutherland GR and Callen DF: Construction of a high-resolution physical and transcription map of chromosome 16q24.3: a region of frequent loss of heterozygosity in sporadic breast-cancer. *Genomics* 50: 1-8, 1998.
39. Berx G, Cleton-Jansen AM, Nollet F, De Leeuw WJF, van der Vijver MJ, Cornelisse C and van Roy F: E-cadherin is a tumor suppressor gene mutated in human lobular breast cancers. *EMBO J* 14: 6107-6115, 1995.
40. Millis RR, Barnes DM, Lampejo OT, Egan MK and Smith P: Tumor grade does not change between primary and recurrent mammary carcinoma. *Eur J Cancer* 34: 548-553, 1998.

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**

- Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Leach, F.S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Powell, S.M., Jen, J., Hamilton, S.R. & et al. (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*, **260**, 812-6.
- Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Jass, J.R., Green, J.S., Lynch, H.T., Watson, P., Tallqvist, G., Juhola, M. & et al. (1994). Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res*, **54**, 1645-8.
- AAmon, A. (1999). The spindle checkpoint. *Curr Opin Genet Dev*, **9**, 69-75.
- Aarnio, M., Salovaara, R., Aaltonen, L.A., Mecklin, J.P. & Jarvinen, H.J. (1997). Features of gastric cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *Int J Cancer*, **74**, 551-5.
- Abraham, R.T. (2001). Cell cycle checkpoint signaling through the ATM and ATR kinases. *Genes Dev*, **15**, 2177-96.
- Acharya, S., Wilson, T., Gradia, S., Kane, M.F., Guerrette, S., Marsischky, G.T., Kolodner, R. & Fishel, R. (1996). hMSH2 forms specific mismatch-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 13629-34.
- Akiyama, Y., Sato, H., Yamada, T., Nagasaki, H., Tsuchiya, A., Abe, R. & Yuasa, Y. (1997). Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res*, **57**, 3920-3.
- Alani, E., Sokolsky, T., Studamire, B., Miret, J.J. & Lahue, R.S. (1997). Genetic and biochemical analysis of Msh2p-Msh6p: role of ATP hydrolysis and Msh2p-Msh6p subunit interactions in mismatch base pair recognition. *Mol Cell Biol*, **17**, 2436-47.
- Alonso, M., Hamelin, R., Kim, M., Porwancher, K., Sung, T., Parhar, P., Miller, D.C. & Newcomb, E.W. (2001). Microsatellite instability occurs in distinct subtypes of pediatric but not adult central nervous system tumors. *Cancer Res*, **61**, 2124-8.
- Allen, D.J., Makhov, A., Grilley, M., Taylor, J., Thresher, R., Modrich, P. & Griffith, J.D. (1997). MutS mediates heteroduplex loop formation by a translocation mechanism. *Embo J*, **16**, 4467-76.
- Allen, J.A. & Coombs, M.M. (1980). Covalent binding of polycyclic aromatic compounds to mitochondrial and nuclear DNA. *Nature*, **287**, 244-5.
- Aquilina, G., Crescenzi, M. & Bignami, M. (1999). Mismatch repair, G(2)/M cell cycle arrest and lethality after DNA damage. *Carcinogenesis*, **20**, 2317-26.
- Aronshtam, A. & Marinus, M.G. (1996). Dominant negative mutator mutations in the mutL gene of Escherichia coli. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2498-504.
- Au, K.G., Welsh, K. & Modrich, P. (1992). Initiation of methyl-directed mismatch repair. *J Biol Chem*, **267**, 12142-8.
- Augenlicht, L.H. & Heerdt, B.G. (2001). Mitochondria: integrators in tumorigenesis? *Nat Genet*, **28**, 104-5.
- Backer, J.M. & Weinstein, I.B. (1980). Mitochondrial DNA is a major cellular target for a dihydrodiol-epoxide derivative of benzo[a]pyrene. *Science*, **209**, 297-9.
- Baida, A., Lopez, A., Marcos, R. & Velazquez, A. (2003). Germline mutations at microsatellite loci in homozygous and heterozygous mutants for mismatch repair and PCNA genes in Drosophila. *DNA Repair (Amst)*, **2**, 827-33.
- Ban, C., Junop, M. & Yang, W. (1999). Transformation of MutL by ATP binding and hydrolysis: a switch in DNA mismatch repair. *Cell*, **97**, 85-97.
- Ban, C. & Yang, W. (1998a). Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell*, **95**, 541-52.

- Ban, C. & Yang, W. (1998b). Structural basis for MutH activation in E.coli mismatch repair and relationship of MutH to restriction endonucleases. *Embo J*, **17**, 1526-34.
- Bardi, G., Sukhikh, T., Pandis, N., Fenger, C., Kronborg, O. & Heim, S. (1995). Karyotypic characterization of colorectal adenocarcinomas. *Genes Chromosomes Cancer*, **12**, 97-109.
- Bellacosa, A., Cicchillitti, L., Schepis, F., Riccio, A., Yeung, A.T., Matsumoto, Y., Golemis, E.A., Genuardi, M. & Neri, G. (1999). MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3969-74.
- Blackwell, L.J., Bjornson, K.P. & Modrich, P. (1998a). DNA-dependent activation of the hMutSalph $\alpha$  ATPase. *J Biol Chem*, **273**, 32049-54.
- Blackwell, L.J., Martik, D., Bjornson, K.P., Bjornson, E.S. & Modrich, P. (1998b). Nucleotide-promoted release of hMutSalph $\alpha$  from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism. *J Biol Chem*, **273**, 32055-62.
- Blake, C., Tsao, J.L., Wu, A. & Shibata, D. (2001). Stepwise deletions of polyA sequences in mismatch repair-deficient colorectal cancers. *Am J Pathol*, **158**, 1867-70.
- Bogenhagen, D. & Clayton, D.A. (1974). The number of mitochondrial deoxyribonucleic acid genomes in mouse L and human HeLa cells. Quantitative isolation of mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J Biol Chem*, **249**, 7991-5.
- Boland, C.R., Thibodeau, S.N., Hamilton, S.R., Sidransky, D., Eshleman, J.R., Burt, R.W., Meltzer, S.J., Rodriguez-Bigas, M.A., Fodde, R., Ranzani, G.N. & Srivastava, S. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*, **58**, 5248-57.
- Bos, J.L. (1988). The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutat Res*, **195**, 255-71.
- Brown, E.J. & Baltimore, D. (2003). Essential and dispensable roles of ATR in cell cycle arrest and genome maintenance. *Genes Dev*, **17**, 615-28.
- Brown, W.M., George, M., Jr. & Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **76**, 1967-71.
- Cahill, D.P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G.J., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*, **392**, 300-3.
- Calabrese, P., Tsao, J.L., Yatabe, Y., Salovaara, R., Mecklin, J.P., Jarvinen, H.J., Aaltonen, L.A., Tavare, S. & Shibata, D. (2004). Colorectal pretumor progression before and after loss of DNA mismatch repair. *Am J Pathol*, **164**, 1447-53.
- Carethers, J.M., Chauhan, D.P., Fink, D., Nebel, S., Bresalier, R.S., Howell, S.B. & Boland, C.R. (1999). Mismatch repair proficiency and in vitro response to 5-fluorouracil. *Gastroenterology*, **117**, 123-31.
- Casares, S., Ionov, Y., Ge, H.Y., Stanbridge, E. & Perucho, M. (1995). The microsatellite mutator phenotype of colon cancer cells is often recessive. *Oncogene*, **11**, 2303-10.



- Cliby, W.A., Roberts, C.J., Cimprich, K.A., Stringer, C.M., Lamb, J.R., Schreiber, S.L. & Friend, S.H. (1998). Overexpression of a kinase-inactive ATR protein causes sensitivity to DNA-damaging agents and defects in cell cycle checkpoints. *Embo J*, **17**, 159-69.
- Coller, H.A., Khrapko, K., Bodyak, N.D., Nekhaeva, E., Herrero-Jimenez, P. & Thilly, W.G. (2001). High frequency of homoplasmic mitochondrial DNA mutations in human tumors can be explained without selection. *Nat Genet*, **28**, 147-50.
- Cook, D.L., Gerber, A.N. & Tapscott, S.J. (1998). Modeling stochastic gene expression: implications for haploinsufficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 15641-6.
- Copeland, W.C., Wachsman, J.T., Johnson, F.M. & Penta, J.S. (2002). Mitochondrial DNA alterations in cancer. *Cancer Invest*, **20**, 557-69.
- Cortez, D., Wang, Y., Qin, J. & Elledge, S.J. (1999). Requirement of ATM-dependent phosphorylation of brca1 in the DNA damage response to double-strand breaks. *Science*, **286**, 1162-6.
- Cunningham, J.M., Christensen, E.R., Tester, D.J., Kim, C.Y., Roche, P.C., Burgart, L.J. & Thibodeau, S.N. (1998). Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res*, **58**, 3455-60.
- Dao, V. & Modrich, P. (1998). Mismatch-, MutS-, MutL-, and helicase II-dependent unwinding from the single-strand break of an incised heteroduplex. *J Biol Chem*, **273**, 9202-7.
- de Wind, N., Dekker, M., Berns, A., Radman, M. & te Riele, H. (1995). Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer. *Cell*, **82**, 321-30.
- Debnjak, T., Kurzawski, G., Gorski, B., Kladny, J., Domagala, W. & Lubinski, J. (2000). Value of pedigree/clinical data, immunohistochemistry and microsatellite instability analyses in reducing the cost of determining hMLH1 and hMSH2 gene mutations in patients with colorectal cancer. *Eur J Cancer*, **36**, 49-54.
- DeWeese, T.L., Shipman, J.M., Larrier, N.A., Buckley, N.M., Kidd, L.R., Groopman, J.D., Cutler, R.G., te Riele, H. & Nelson, W.G. (1998). Mouse embryonic stem cells carrying one or two defective Msh2 alleles respond abnormally to oxidative stress inflicted by low-level radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11915-20.
- Di Cristofano A, Pesce B, Cordon-Cardo C, Pandolfi PP. Pten is essential for embryonic development and tumour suppression. *Nat Genet*. 1998 Aug;19(4):348-55.
- Dietmaier, W., Wallinger, S., Bocker, T., Kullmann, F., Fishel, R. & Ruschoff, J. (1997). Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res*, **57**, 4749-56.
- Dolan, M.E., Moschel, R.C. & Pegg, A.E. (1990). Depletion of mammalian O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase activity by O6-benzylguanine provides a means to evaluate the role of this protein in protection against carcinogenic and therapeutic alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 5368-72.
- Doxsey, S. (1998). The centrosome--a tiny organelle with big potential. *Nat Genet*, **20**, 104-6.
- Doxsey, S. (2001). Re-evaluating centrosome function. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2**, 688-98.
- Drummond, J.T., Li, G.M., Longley, M.J. & Modrich, P. (1995). Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science*, **268**, 1909-12.

- Duckett, D.R., Drummond, J.T., Murchie, A.I., Reardon, J.T., Sancar, A., Lilley, D.M. & Modrich, P. (1996). Human MutS $\alpha$  recognizes damaged DNA base pairs containing O6-methylguanine, O4-methylthymine, or the cisplatin-d(GpG) adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6443-7.
- Dunlop, M.G., Farrington, S.M., Carothers, A.D., Wyllie, A.H., Sharp, L., Burn, J., Liu, B., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1997). Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet*, **6**, 105-10.
- Eshleman, J.R., Janus, C.E. & Jones, C.R. (1988). Tooth preparation designs for resin-bonded fixed partial dentures related to enamel thickness. *J Prosthet Dent*, **60**, 18-22.
- Fang, Y., Tsao, C.C., Goodman, B.K., Furumai, R., Tirado, C.A., Abraham, R.T. & Wang, X.F. (2004). ATR functions as a gene dosage-dependent tumor suppressor on a mismatch repair-deficient background. *Embo J*, **23**, 3164-74.
- Fink, D., Nebel, S., Aebi, S., Zheng, H., Cenni, B., Nehme, A., Christen, R.D. & Howell, S.B. (1996). The role of DNA mismatch repair in platinum drug resistance. *Cancer Res*, **56**, 4881-6.
- Fliss, M.S., Usadel, H., Caballero, O.L., Wu, L., Buta, M.R., Eleff, S.M., Jen, J. & Sidransky, D. (2000). Facile detection of mitochondrial DNA mutations in tumors and bodily fluids. *Science*, **287**, 2017-9.
- Francisco, L., Wang, W. & Chan, C.S. (1994). Type 1 protein phosphatase acts in opposition to IpL1 protein kinase in regulating yeast chromosome segregation. *Mol Cell Biol*, **14**, 4731-40.
- Franchitto, A., Pichierri, P., Piergentili, R., Crescenzi, M., Bignami, M. & Palitti, F. (2003). The mammalian mismatch repair protein MSH2 is required for correct MRE11 and RAD51 relocalization and for efficient cell cycle arrest induced by ionizing radiation in G2 phase. *Oncogene*, **22**, 2110-20.
- Fritzell, J.A., Narayanan, L., Baker, S.M., Bronner, C.E., Andrew, S.E., Prolla, T.A., Bradley, A., Jirik, F.R., Liskay, R.M. & Glazer, P.M. (1997). Role of DNA mismatch repair in the cytotoxicity of ionizing radiation. *Cancer Res*, **57**, 5143-7.
- Funk, J.O. (1999). Cancer cell cycle control. *Anticancer Res*, **19**, 4772-80.
- Galio, L., Bouquet, C. & Brooks, P. (1999). ATP hydrolysis-dependent formation of a dynamic ternary nucleoprotein complex with MutS and MutL. *Nucleic Acids Res*, **27**, 2325-31.
- Genschel, J., Littman, S.J., Drummond, J.T. & Modrich, P. (1998). Isolation of MutS $\beta$  from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutS $\beta$  and MutS $\alpha$ . *J Biol Chem*, **273**, 19895-901.
- Glover, D.M., Leibowitz, M.H., McLean, D.A. & Parry, H. (1995). Mutations in aurora prevent centrosome separation leading to the formation of monopolar spindles. *Cell*, **81**, 95-105.
- Grabsch H, Takeno S, Parsons WJ, Pomjanski N, Boecking A, Gabbert HE, Mueller W. (2003). Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1, and BUB3 in gastric cancer--association with tumour cell proliferation. *J Pathol*, **200**, 16-22.
- Gradia, S., Acharya, S. & Fishel, R. (1997). The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell*, **91**, 995-1005.

- Gradia, S., Subramanian, D., Wilson, T., Acharya, S., Makhov, A., Griffith, J. & Fishel, R. (1999). hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. *Mol Cell*, **3**, 255-61.
- Grilley, M., Welsh, K.M., Su, S.S. & Modrich, P. (1989). Isolation and characterization of the Escherichia coli mutL gene product. *J Biol Chem*, **264**, 1000-4.
- Gu, L., Hong, Y., McCulloch, S., Watanabe, H. & Li, G.M. (1998). ATP-dependent interaction of human mismatch repair proteins and dual role of PCNA in mismatch repair. *Nucleic Acids Res*, **26**, 1173-8.
- Guerrette, S., Acharya, S. & Fishel, R. (1999). The interaction of the human MutL homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *J Biol Chem*, **274**, 6336-41.
- Guleng, G., Lovig, T., Meling, G.I., Andersen, S.N. & Rognum, T.O. (2005). Mitochondrial microsatellite instability in colorectal carcinomas--frequency and association with nuclear microsatellite instability. *Cancer Lett*, **219**, 97-103.
- Ha, P.K., Tong, B.C., Westra, W.H., Sanchez-Cespedes, M., Parrella, P., Zahurak, M., Sidransky, D. & Califano, J.A. (2002). Mitochondrial C-tract alteration in premalignant lesions of the head and neck: a marker for progression and clonal proliferation. *Clin Cancer Res*, **8**, 2260-5.
- Haber, L.T. & Walker, G.C. (1991). Altering the conserved nucleotide binding motif in the Salmonella typhimurium MutS mismatch repair protein affects both its ATPase and mismatch binding activities. *Embo J*, **10**, 2707-15.
- Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. & Prakash, S. (1996). Binding of insertion/deletion DNA mismatches by the heterodimer of yeast mismatch repair proteins MSH2 and MSH3. *Curr Biol*, **6**, 1185-7.
- Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. & Prakash, S. (1997). Enhancement of MSH2-MSH3-mediated mismatch recognition by the yeast MLH1-PMS1 complex. *Curr Biol*, **7**, 790-3.
- Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. & Prakash, S. (1998). ATP-dependent assembly of a ternary complex consisting of a DNA mismatch and the yeast MSH2-MSH6 and MLH1-PMS1 protein complexes. *J Biol Chem*, **273**, 9837-41.
- Hall, M.C. & Matson, S.W. (1999). The Escherichia coli MutL protein physically interacts with MutH and stimulates the MutH-associated endonuclease activity. *J Biol Chem*, **274**, 1306-12.
- Halling, K.C., French, A.J., McDonnell, S.K., Burgart, L.J., Schaid, D.J., Peterson, B.J., Moon-Tasson, L., Mahoney, M.R., Sargent, D.J., O'Connell, M.J., Witzig, T.E., Farr, G.H., Jr., Goldberg, R.M. & Thibodeau, S.N. (1999). Microsatellite instability and 8p allelic imbalance in stage B2 and C colorectal cancers. *J Natl Cancer Inst*, **91**, 1295-303.
- Hartwell, L.H. & Kastan, M.B. (1994). Cell cycle control and cancer. *Science*, **266**, 1821-8.
- Hastie, N.D. (1994). The genetics of Wilms' tumor--a case of disrupted development. *Annu Rev Genet*, **28**, 523-58.
- Hauswirth, W.W. & Clayton, D.A. (1985). Length heterogeneity of a conserved displacement-loop sequence in human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*, **13**, 8093-104.
- Hawn, M.T., Umar, A., Carethers, J.M., Marra, G., Kunkel, T.A., Boland, C.R. & Koi, M. (1995). Evidence for a connection between the mismatch repair system and the G2 cell cycle checkpoint. *Cancer Res*, **55**, 3721-5.

- Hemminki, A., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Aaltonen, L.A. & Joensuu, H. (2000). Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology*, **119**, 921-8.
- Hemminki, A., Peltomaki, P., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Salovaara, R., Nystrom-Lahti, M., de la Chapelle, A. & Aaltonen, L.A. (1994). Loss of the wild type MLH1 gene is a feature of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet*, **8**, 405-10.
- Hickman, M.J. & Samson, L.D. (1999). Role of DNA mismatch repair and p53 in signaling induction of apoptosis by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 10764-9.
- Hileman, E.A., Achanta, G. & Huang, P. (2001). Superoxide dismutase: an emerging target for cancer therapeutics. *Expert Opin Ther Targets*, **5**, 697-710.
- Hirose, Y., Katayama, M., Stokoe, D., Haas-Kogan, D.A., Berger, M.S. & Pieper, R.O. (2003). The p38 mitogen-activated protein kinase pathway links the DNA mismatch repair system to the G2 checkpoint and to resistance to chemotherapeutic DNA-methylating agents. *Mol Cell Biol*, **23**, 8306-15.
- Hoang, J.M., Cottu, P.H., Thuille, B., Salmon, R.J., Thomas, G. & Hamelin, R. (1997). BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res*, **57**, 300-3.
- Hughes, M.J. & Jiricny, J. (1992). The purification of a human mismatch-binding protein and identification of its associated ATPase and helicase activities. *J Biol Chem*, **267**, 23876-82.
- Humbert, O., Fiumicino, S., Aquilina, G., Branch, P., Oda, S., Zijno, A., Karran, P. & Bignami, M. (1999). Mismatch repair and differential sensitivity of mouse and human cells to methylating agents. *Carcinogenesis*, **20**, 205-14.
- Hutchinson, F. (1985). Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, **32**, 115-54.
- Iaccarino, I., Marra, G., Palombo, F. & Jiricny, J. (1998). hMSH2 and hMSH6 play distinct roles in mismatch binding and contribute differently to the ATPase activity of hMutSalpha. *Embo J*, **17**, 2677-86.
- Iino, H., Simms, L., Young, J., Arnold, J., Winship, I.M., Webb, S.I., Furlong, K.L., Leggett, B. & Jass, J.R. (2000). DNA microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut*, **47**, 37-42.
- Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D. & Perucho, M. (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature*, **363**, 558-61.
- Ishibashi, T., Hayakawa, H. & Sekiguchi, M. (2003). A novel mechanism for preventing mutations caused by oxidation of guanine nucleotides. *EMBO Rep*, **4**, 479-83.
- Jenkins, J.R., Rudge, K. & Currie, G.A. (1984). Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. *Nature*, **312**, 651-4.
- Jin, D.Y., Spencer, F. & Jeang, K.T. (1998). Human T cell leukemia virus type 1 oncoprotein Tax targets the human mitotic checkpoint protein MAD1. *Cell*, **93**, 81-91.
- Jiricny, J. (1998a). Eukaryotic mismatch repair: an update. *Mutat Res*, **409**, 107-21.
- Jiricny, J. (1998b). Replication errors: challenging the genome. *Embo J*, **17**, 6427-36.

- Johansson, B., Mertens, F. & Mitelman, F. (1996). Primary vs. secondary neoplasia-associated chromosomal abnormalities--balanced rearrangements vs. genomic imbalances? *Genes Chromosomes Cancer*, **16**, 155-63.
- Johnson, R.E., Kovvali, G.K., Guzder, S.N., Amin, N.S., Holm, C., Habraken, Y., Sung, P., Prakash, L. & Prakash, S. (1996). Evidence for involvement of yeast proliferating cell nuclear antigen in DNA mismatch repair. *J Biol Chem*, **271**, 27987-90.
- Kaina, B., Ziouta, A., Ochs, K. & Coquerelle, T. (1997). Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. *Mutat Res*, **381**, 227-41.
- Kane, M.F., Loda, M., Gaida, G.M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., Jessup, J.M. & Kolodner, R. (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*, **57**, 808-11.
- Karran, P. & Bignami, M. (1994). DNA damage tolerance, mismatch repair and genome instability. *Bioessays*, **16**, 833-9.
- Kaufmann, W.K. (1995). Cell cycle checkpoints and DNA repair preserve the stability of the human genome. *Cancer Metastasis Rev*, **14**, 31-41.
- Kavanagh, J., Tresukosol, D., Edwards, C., Freedman, R., Gonzalez de Leon, C., Fishman, A., Mante, R., Hord, M. & Kudelka, A. (1995). Carboplatin reinduction after taxane in patients with platinum-refractory epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*, **13**, 1584-8.
- Khanna, K.K., Lavin, M.F., Jackson, S.P. & Mulhern, T.D. (2001). ATM, a central controller of cellular responses to DNA damage. *Cell Death Differ*, **8**, 1052-65.
- Kim, N.G., Choi, Y.R., Baek, M.J., Kim, Y.H., Kang, H., Kim, N.K., Min, J.S. & Kim, H. (2001). Frameshift mutations at coding mononucleotide repeats of the hRAD50 gene in gastrointestinal carcinomas with microsatellite instability. *Cancer Res*, **61**, 36-8.
- Klein, A.P., Hruban, R.H., Brune, K.A., Petersen, G.M. & Goggins, M. (2001). Familial pancreatic cancer. *Cancer J*, **7**, 266-73.
- Klingler, H., Hemmerle, C., Bannwart, F., Haider, R., Cattaruzza, M.S. & Marra, G. (2002). Expression of the hMSH6 mismatch-repair protein in colon cancer and HeLa cells. *Swiss Med Wkly*, **132**, 57-63.
- Knudson, A.G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer*, **1**, 157-62.
- Koi, M., Umar, A., Chauhan, D.P., Cherian, S.P., Carethers, J.M., Kunkel, T.A. & Boland, C.R. (1994). Human chromosome 3 corrects mismatch repair deficiency and microsatellite instability and reduces N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine tolerance in colon tumor cells with homozygous hMLH1 mutation. *Cancer Res*, **54**, 4308-12.
- Kunkel, T.A. & Loeb, L.A. (1981). Fidelity of mammalian DNA polymerases. *Science*, **213**, 765-7.
- Laiho, P., Launonen, V., Lahermo, P., Esteller, M., Guo, M., Herman, J.G., Mecklin, J.P., Jarvinen, H., Sistonen, P., Kim, K.M., Shibata, D., Houlston, R.S. & Aaltonen, L.A. (2002). Low-level microsatellite instability in most colorectal carcinomas. *Cancer Res*, **62**, 1166-70.

- Lee, D.Y. & Clayton, D.A. (1998). Initiation of mitochondrial DNA replication by transcription and R-loop processing. *J Biol Chem*, **273**, 30614-21.
- Lee, H.C., Yin, P.H., Chi, C.W. & Wei, Y.H. (2002). Increase in mitochondrial mass in human fibroblasts under oxidative stress and during replicative cell senescence. *J Biomed Sci*, **9**, 517-26.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1997). Genetic instability in colorectal cancers. *Nature*, **386**, 623-7.
- Lengauer, C., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, **396**, 643-9.
- Li, G.M. & Modrich, P. (1995). Restoration of mismatch repair to nuclear extracts of H6 colorectal tumor cells by a heterodimer of human MutL homologs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 1950-4.
- Li, H.R., Shagisultanova, E.I., Yamashita, K., Piao, Z., Perucho, M. & Malkhosyan, S.R. (2004). Hypersensitivity of tumor cell lines with microsatellite instability to DNA double strand break producing chemotherapeutic agent bleomycin. *Cancer Res*, **64**, 4760-7.
- Lin, K.M., Shashidharan, M., Ternent, C.A., Thorson, A.G., Blatchford, G.J., Christensen, M.A., Lanspa, S.J., Lemon, S.J., Watson, P. & Lynch, H.T. (1998a). Colorectal and extracolonic cancer variations in MLH1/MSH2 hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds and the general population. *Dis Colon Rectum*, **41**, 428-33.
- Lin, Y.L., Shivji, M.K., Chen, C., Kolodner, R., Wood, R.D. & Dutta, A. (1998b). The evolutionarily conserved zinc finger motif in the largest subunit of human replication protein A is required for DNA replication and mismatch repair but not for nucleotide excision repair. *J Biol Chem*, **273**, 1453-61.
- Lindor, N.M., Burgart, L.J., Leontovich, O., Goldberg, R.M., Cunningham, J.M., Sargent, D.J., Walsh-Vockley, C., Petersen, G.M., Walsh, M.D., Leggett, B.A., Young, J.P., Barker, M.A., Jass, J.R., Hopper, J., Gallinger, S., Bapat, B., Redston, M. & Thibodeau, S.N. (2002). Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol*, **20**, 1043-8.
- Lingle, W.L., Barrett, S.L., Negron, V.C., D'Assoro, A.B., Boeneman, K., Liu, W., Whitehead, C.M., Reynolds, C. & Salisbury, J.L. (2002). Centrosome amplification drives chromosomal instability in breast tumor development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1978-83.
- Liu, B., Parsons, R., Papadopoulos, N., Nicolaidis, N.C., Lynch, H.T., Watson, P., Jass, J.R., Dunlop, M., Wyllie, A., Peltomaki, P., de la Chapelle, A., Hamilton, S.R., Vogelstein, B. & Kinzler, K.W. (1996). Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med*, **2**, 169-74.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X.S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L.A. & Elledge, S.J. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev*, **14**, 1448-59.
- Liu, V.W., Shi, H.H., Cheung, A.N., Chiu, P.M., Leung, T.W., Nagley, P., Wong, L.C. & Ngan, H.Y. (2001). High incidence of somatic mitochondrial DNA mutations in human ovarian carcinomas. *Cancer Res*, **61**, 5998-6001.

- Liu, V.W., Yang, H.J., Wang, Y., Tsang, P.C., Cheung, A.N., Chiu, P.M., Ng, T.Y., Wong, L.C., Nagley, P. & Ngan, H.Y. (2003). High frequency of mitochondrial genome instability in human endometrial carcinomas. *Br J Cancer*, **89**, 697-701.
- Loeb, K.R. & Loeb, L.A. (2000). Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*, **21**, 379-85.
- Loeb, L.A. (1991). Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res*, **51**, 3075-9.
- Lopez, A., Xamena, N., Marcos, R. & Velazquez, A. (2002). Germ cells microsatellite instability. The effect of different mutagens in a mismatch repair mutant of *Drosophila* (spell). *Mutat Res*, **514**, 87-94.
- Loukola, A., Eklin, K., Laiho, P., Salovaara, R., Kristo, P., Jarvinen, H., Mecklin, J.P., Launonen, V. & Aaltonen, L.A. (2001). Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res*, **61**, 4545-9.
- Lynch, H.T., Bardawil, W.A., Harris, R.E., Lynch, P.M., Guirgis, H.A. & Lynch, J.F. (1978). Multiple primary cancers and prolonged survival: familial colonic and endometrial cancers. *Dis Colon Rectum*, **21**, 165-8.
- Lynch, H.T. & de la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*, **348**, 919-32.
- Lynch, H.T., Smyrk, T. & Lynch, J. (1997). An update of HNPCC (Lynch syndrome). *Cancer Genet Cytogenet*, **93**, 84-99.
- Malkhosyan, S., Rampino, N., Yamamoto, H. & Perucho, M. (1996). Frameshift mutator mutations. *Nature*, **382**, 499-500.
- Mambo, E., Gao, X., Cohen, Y., Guo, Z., Talalay, P. & Sidransky, D. (2003). Electrophile and oxidant damage of mitochondrial DNA leading to rapid evolution of homoplasmic mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1838-43.
- Marcelino, L.A. & Thilly, W.G. (1999). Mitochondrial mutagenesis in human cells and tissues. *Mutat Res*, **434**, 177-203.
- Marra, G., Iaccarino, I., Lettieri, T., Roscilli, G., Delmastro, P. & Jiricny, J. (1998). Mismatch repair deficiency associated with overexpression of the MSH3 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8568-73.
- Marra, G. & Schar, P. (1999). Recognition of DNA alterations by the mismatch repair system. *Biochem J*, **338** ( Pt 1), 1-13.
- Marsischky, G.T., Filosi, N., Kane, M.F. & Kolodner, R. (1996). Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes Dev*, **10**, 407-20.
- Maximo, V., Soares, P., Lima, J., Cameselle-Teijeiro, J. & Sobrinho-Simoes, M. (2002). Mitochondrial DNA somatic mutations (point mutations and large deletions) and mitochondrial DNA variants in human thyroid pathology: a study with emphasis on Hurthle cell tumors. *Am J Pathol*, **160**, 1857-65.
- Mellon, I., Rajpal, D.K., Koi, M., Boland, C.R. & Champe, G.N. (1996). Transcription-coupled repair deficiency and mutations in human mismatch repair genes. *Science*, **272**, 557-60.
- Michel, L.S., Liberal, V., Chatterjee, A., Kirchwegger, R., Pasche, B., Gerald, W., Dobles, M., Sorger, P.K., Murty, V.V. & Benezra, R. (2001). MAD2 haploinsufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. *Nature*, **409**, 355-9.

- Miyaki, M., Konishi, M., Tanaka, K., Kikuchi-Yanoshita, R., Muraoka, M., Yasuno, M., Igari, T., Koike, M., Chiba, M. & Mori, T. (1997). Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet*, **17**, 271-2.
- Miyoshi H, Nakau M, Ishikawa TO, Seldin MF, Oshima M, Taketo MM. Gastrointestinal hamartomatous polyposis in Lkb1 heterozygous knockout mice. *Cancer Res*. 2002 Apr 15;62(8):2261-6.
- Modica-Napolitano, J.S. & Singh, K. (2002). Mitochondria as targets for detection and treatment of cancer. *Expert Rev Mol Med*, **2002**, 1-19.
- Modrich, P. (1997). Strand-specific mismatch repair in mammalian cells. *J Biol Chem*, **272**, 24727-30.
- Modrich, P. & Lahue, R. (1996). Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination, and cancer biology. *Annu Rev Biochem*, **65**, 101-33.
- Moraes, C.T., Andreetta, F., Bonilla, E., Shanske, S., DiMauro, S. & Schon, E.A. (1991). Replication-competent human mitochondrial DNA lacking the heavy-strand promoter region. *Mol Cell Biol*, **11**, 1631-7.
- Muleris, M., Delattre, O., Olschwang, S., Dutrillaux, A.M., Remvikos, Y., Salmon, R.J., Thomas, G. & Dutrillaux, B. (1990). Cytogenetic and molecular approaches of polyploidization in colorectal adenocarcinomas. *Cancer Genet Cytogenet*, **44**, 107-18.
- Myeroff, L.L., Parsons, R., Kim, S.J., Hedrick, L., Cho, K.R., Orth, K., Mathis, M., Kinzler, K.W., Lutterbaugh, J., Park, K. & et al. (1995). A transforming growth factor beta receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res*, **55**, 5545-7.
- Nass, M.M. (1969). Mitochondrial DNA. I. Intramitochondrial distribution and structural relations of single- and double-length circular DNA. *J Mol Biol*, **42**, 521-8.
- Nehme, A., Baskaran, R., Aebi, S., Fink, D., Nebel, S., Cenni, B., Wang, J.Y., Howell, S.B. & Christen, R.D. (1997). Differential induction of c-Jun NH2-terminal kinase and c-Abl kinase in DNA mismatch repair-proficient and -deficient cells exposed to cisplatin. *Cancer Res*, **57**, 3253-7.
- Ohmiya, N., Matsumoto, S., Yamamoto, H., Baranovskaya, S., Malkhosyan, S.R. & Perucho, M. (2001). Germline and somatic mutations in hMSH6 and hMSH3 in gastrointestinal cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Gene*, **272**, 301-13.
- Olivero, O.A., Chang, P.K., Lopez-Larrazza, D.M., Semino-Mora, M.C. & Poirier, M.C. (1997). Preferential formation and decreased removal of cisplatin-DNA adducts in Chinese hamster ovary cell mitochondrial DNA as compared to nuclear DNA. *Mutat Res*, **391**, 79-86.
- Ouyang, H., Shiwaku, H.O., Hagiwara, H., Miura, K., Abe, T., Kato, Y., Ohtani, H., Shiiba, K., Souza, R.F., Meltzer, S.J. & Horii, A. (1997). The insulin-like growth factor II receptor gene is mutated in genetically unstable cancers of the endometrium, stomach, and colorectum. *Cancer Res*, **57**, 1851-4.
- Park, J.G., Vasen, H.F., Park, Y.J., Park, K.J., Peltomaki, P., de Leon, M.P., Rodriguez-Bigas, M.A., Lubinski, J., Beck, N.E., Bisgaard, M.L., Miyaki, M., Wijnen, J.T., Baba, S., Lindblom, A., Madlensky, L. & Lynch, H.T. (2002). Suspected HNPCC and Amsterdam criteria II: evaluation of mutation detection rate, an international collaborative study. *Int J Colorectal Dis*, **17**, 109-14.



- Park, Y.J., Shin, K.H. & Park, J.G. (2000). Risk of gastric cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer in Korea. *Clin Cancer Res*, **6**, 2994-8.
- Parsons, R., Li, G.M., Longley, M., Modrich, P., Liu, B., Berk, T., Hamilton, S.R., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1995). Mismatch repair deficiency in phenotypically normal human cells. *Science*, **268**, 738-40.
- Peltomaki, P. & Vasen, H.F. (1997). Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, **113**, 1146-58.
- Penta, J.S., Johnson, F.M., Wachsman, J.T. & Copeland, W.C. (2001). Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res*, **488**, 119-33.
- Perera, F.P., Motzer, R.J., Tang, D., Reed, E., Parker, R., Warburton, D., O'Neill, P., Albertini, R., Bigbee, W.L., Jensen, R.H. & et al. (1992). Multiple biological markers in germ cell tumor patients treated with platinum-based chemotherapy. *Cancer Res*, **52**, 3558-65.
- Pihan, G.A., Purohit, A., Wallace, J., Malhotra, R., Liotta, L. & Doxsey, S.J. (2001). Centrosome defects can account for cellular and genetic changes that characterize prostate cancer progression. *Cancer Res*, **61**, 2212-9.
- Poetsch, M., Dittberner, T., Petersmann, A. & Woenckhaus, C. (2004). Mitochondrial DNA instability in malignant melanoma of the skin is mostly restricted to nodular and metastatic stages. *Melanoma Res*, **14**, 501-8.
- Prolla, T.A., Baker, S.M., Harris, A.C., Tsao, J.L., Yao, X., Bronner, C.E., Zheng, B., Gordon, M., Reneker, J., Arnheim, N., Shibata, D., Bradley, A. & Liskay, R.M. (1998). Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1, Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair. *Nat Genet*, **18**, 276-9.
- Prolla, T.A., Christie, D.M. & Liskay, R.M. (1994). Dual requirement in yeast DNA mismatch repair for MLH1 and PMS1, two homologs of the bacterial mutL gene. *Mol Cell Biol*, **14**, 407-15.
- Qiu, H., Sirivongs, P., Rothenberger, M., Rothenberger, D.A. & Garcia-Aguilar, J. (2000). Molecular prognostic factors in rectal cancer treated by radiation and surgery. *Dis Colon Rectum*, **43**, 451-9.
- Rampino, N., Yamamoto, H., Ionov, Y., Li, Y., Sawai, H., Reed, J.C. & Perucho, M. (1997). Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science*, **275**, 967-9.
- Richard, S.M., Bailliet, G., Paez, G.L., Bianchi, M.S., Peltomaki, P. & Bianchi, N.O. (2000). Nuclear and mitochondrial genome instability in human breast cancer. *Cancer Res*, **60**, 4231-7.
- Riggins, G.J., Thiagalingam, S., Rozenblum, E., Weinstein, C.L., Kern, S.E., Hamilton, S.R., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W. & Vogelstein, B. (1996). Mad-related genes in the human. *Nat Genet*, **13**, 347-9.
- 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. & Srivastava, S. (1997). A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*, **89**, 1758-62.
- Samowitz, W.S., Slattery, M.L., Potter, J.D. & Leppert, M.F. (1999). BAT-26 and BAT-40 instability in colorectal adenomas and carcinomas and germline polymorphisms. *Am J Pathol*, **154**, 1637-41.

- Sanchez-Cespedes, M., Parrella, P., Nomoto, S., Cohen, D., Xiao, Y., Esteller, M., Jeronimo, C., Jordan, R.C., Nicol, T., Koch, W.M., Schoenberg, M., Mazzarelli, P., Fazio, V.M. & Sidransky, D. (2001). Identification of a mononucleotide repeat as a major target for mitochondrial DNA alterations in human tumors. *Cancer Res*, **61**, 7015-9.
- Sanger, F. (1981). Determination of nucleotide sequences in DNA. *Science*, **214**, 1205-10.
- Schmutte, C., Marinescu, R.C., Sadoff, M.M., Guerrette, S., Overhauser, J. & Fishel, R. (1998). Human exonuclease I interacts with the mismatch repair protein hMSH2. *Cancer Res*, **58**, 4537-42.
- Schwartz, S., Jr. & Perucho, M. (2000). Somatic mutations in mitochondrial DNA do not associate with nuclear microsatellite instability in gastrointestinal cancer. *Gastroenterology*, **119**, 1806-8.
- Schwartz, S., Jr., Yamamoto, H., Navarro, M., Maestro, M., Reventos, J. & Perucho, M. (1999). Frameshift mutations at mononucleotide repeats in caspase-5 and other target genes in endometrial and gastrointestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cancer Res*, **59**, 2995-3002.
- Shibata, D., Peinado, M.A., Ionov, Y., Malkhosyan, S. & Perucho, M. (1994). Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet*, **6**, 273-81.
- Shieh, S.Y., Ahn, J., Tamai, K., Taya, Y. & Prives, C. (2000). The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev*, **14**, 289-300.
- Shiloh, Y. (2003). ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nat Rev Cancer*, **3**, 155-68.
- Sobol, R.W., Horton, J.K., Kuhn, R., Gu, H., Singhal, R.K., Prasad, R., Rajewsky, K. & Wilson, S.H. (1996). Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair. *Nature*, **379**, 183-6.
- Sobol, R.W., Prasad, R., Evenski, A., Baker, A., Yang, X.P., Horton, J.K. & Wilson, S.H. (2000). The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity. *Nature*, **405**, 807-10.
- Sonneveld, E., Vrieling, H., Mullenders, L.H. & van Hoffen, A. (2001). Mouse mismatch repair gene Msh2 is not essential for transcription-coupled repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers. *Oncogene*, **20**, 538-41.
- Spruck, C.H., Won, K.A. & Reed, S.I. (1999). Deregulated cyclin E induces chromosome instability. *Nature*, **401**, 297-300.
- Studamire, B., Quach, T. & Alani, E. (1998). Saccharomyces cerevisiae Msh2p and Msh6p ATPase activities are both required during mismatch repair. *Mol Cell Biol*, **18**, 7590-601.
- Szankasi, P. & Smith, G.R. (1995). A role for exonuclease I from *S. pombe* in mutation avoidance and mismatch correction. *Science*, **267**, 1166-9.
- Szczesny, B., Hazra, T.K., Papaconstantinou, J., Mitra, S. & Boldogh, I. (2003). Age-dependent deficiency in import of mitochondrial DNA glycosylases required for repair of oxidatively damaged bases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 10670-5.
- Takai, H., Naka, K., Okada, Y., Watanabe, M., Harada, N., Saito, S., Anderson, C.W., Appella, E., Nakanishi, M., Suzuki, H., Nagashima, K., Sawa, H., Ikeda, K. & Motoyama, N. (2002). Chk2-deficient mice exhibit radioresistance and defective p53-mediated transcription. *Embo J*, **21**, 5195-205.

- Takano, T., Hasegawa, Y., Matsuzuka, F., Miyauchi, A., Yoshida, H., Higashiyama, T., Kuma, K. & Amino, N. (2000). Gene expression profiles in thyroid carcinomas. *Br J Cancer*, **83**, 1495-502.
- Talarico, T., Cullinane, C.M., Gray, P.J., Webster, L.K., Deacon, G.B. & Phillips, D.R. (2001). Nuclear and mitochondrial distribution of organoamidoplatinum(II) lesions in cisplatin-sensitive and -resistant adenocarcinoma cells. *Anticancer Drug Des*, **16**, 135-41.
- Thibodeau, S.N., French, A.J., Cunningham, J.M., Tester, D., Burgart, L.J., Roche, P.C., McDonnell, S.K., Schaid, D.J., Vockley, C.W., Michels, V.V., Farr, G.H., Jr. & O'Connell, M.J. (1998). Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res*, **58**, 1713-8.
- Thomas, D.C., Roberts, J.D. & Kunkel, T.A. (1991). Heteroduplex repair in extracts of human HeLa cells. *J Biol Chem*, **266**, 3744-51.
- Thorson, A.G., Knezetic, J.A. & Lynch, H.T. (1999). A century of progress in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Dis Colon Rectum*, **42**, 1-9.
- Thorstensen, L., Diep, C.B., Meling, G.I., Aagesen, T.H., Ahrens, C.H., Rognum, T.O. & Lothe, R.A. (2001). WNT1 inducible signaling pathway protein 3, WISP-3, a novel target gene in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Gastroenterology*, **121**, 1275-80.
- Tishkoff, D.X., Amin, N.S., Viars, C.S., Arden, K.C. & Kolodner, R.D. (1998). Identification of a human gene encoding a homologue of *Saccharomyces cerevisiae* EXO1, an exonuclease implicated in mismatch repair and recombination. *Cancer Res*, **58**, 5027-31.
- Tishkoff, D.X., Boerger, A.L., Bertrand, P., Filosi, N., Gaida, G.M., Kane, M.F. & Kolodner, R.D. (1997). Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* EXO1, a gene encoding an exonuclease that interacts with MSH2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 7487-92.
- Togo, G., Shiratori, Y., Okamoto, M., Yamaji, Y., Matsumura, M., Sano, T., Motojima, T. & Omata, M. (2001). Relationship between grade of microsatellite instability and target genes of mismatch repair pathways in sporadic colorectal carcinoma. *Dig Dis Sci*, **46**, 1615-22.
- Tran, H.T., Gordenin, D.A. & Resnick, M.A. (1999). The 3'-->5' exonucleases of DNA polymerases delta and epsilon and the 5'-->3' exonuclease Exo1 have major roles in postreplication mutation avoidance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 2000-7.
- Tsao, J.L., Yatabe, Y., Salovaara, R., Jarvinen, H.J., Mecklin, J.P., Aaltonen, L.A., Tavaré, S. & Shibata, D. (2000). Genetic reconstruction of individual colorectal tumor histories. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 1236-41.
- Uchino S, Tsuda H, Noguchi M, Yokota J, Terada M, Saito T, Kobayashi M, Sugimura T, Hirohashi S. (1992). Frequent loss of heterozygosity at the DCC locus in gastric cancer. *Cancer Res*, **52**, 3099-102.
- Umar, A., Boland, C.R., Terdiman, J.P., Syngal, S., de la Chapelle, A., Ruschhoff, 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. & Srivastava, S. (2004). Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis

- colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*, **96**, 261-8.
- Umar, A., Buermeier, A.B., Simon, J.A., Thomas, D.C., Clark, A.B., Liskay, R.M. & Kunkel, T.A. (1996). Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell*, **87**, 65-73.
- Unsal-Kacmaz K, Sancar A. Quaternary structure of ATR and effects of ATRIP and replication protein A on its DNA binding and kinase activities. *Mol Cell Biol*, **24**, 1292-300.
- Vasen, H.F., Mecklin, J.P., Khan, P.M. & Lynch, H.T. (1991). The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum*, **34**, 424-5.
- Vasen, H.F., Watson, P., Mecklin, J.P., Jass, J.R., Green, J.S., Nomizu, T., Muller, H. & Lynch, H.T. (1994). The epidemiology of endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Anticancer Res*, **14**, 1675-8.
- Vasen, H.F., Watson, P., Mecklin, J.P. & Lynch, H.T. (1999). New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*, **116**, 1453-6.
- Veigl, M.L., Kasturi, L., Olechnowicz, J., Ma, A.H., Lutterbaugh, J.D., Periyasamy, S., Li, G.M., Drummond, J., Modrich, P.L., Sedwick, W.D. & Markowitz, S.D. (1998). Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 8698-702.
- Viel, A., Novella, E., Genuardi, M., Capozzi, E., Fornasarig, M., Pedroni, M., Santarosa, M., De Leon, M.P., Della Puppa, L., Anti, M. & Boiocchi, M. (1998). Lack of PMS2 gene-truncating mutations in patients with hereditary colorectal cancer. *Int J Oncol*, **13**, 565-9.
- Viguera, E., Canceill, D. & Ehrlich, S.D. (2001). Replication slippage involves DNA polymerase pausing and dissociation. *Embo J*, **20**, 2587-95.
- Vilkki, S., Tsao, J.L., Loukola, A., Poyhonen, M., Vierimaa, O., Herva, R., Aaltonen, L.A. & Shibata, D. (2001). Extensive somatic microsatellite mutations in normal human tissue. *Cancer Res*, **61**, 4541-4.
- Wallace, D.C. (1992). Diseases of the mitochondrial DNA. *Annu Rev Biochem*, **61**, 1175-212.
- Wallace, D.C. (1999). Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, **283**, 1482-8.
- Wang, Q., Zhang, H., Guerrette, S., Chen, J., Mazurek, A., Wilson, T., Slupianek, A., Skorski, T., Fishel, R. & Greene, M.I. (2001). Adenosine nucleotide modulates the physical interaction between hMSH2 and BRCA1. *Oncogene*, **20**, 4640-9.
- Wang, Y., Cortez, D., Yazdi, P., Neff, N., Elledge, S.J. & Qin, J. (2000). BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev*, **14**, 927-39.
- Wang, Y. & Qin, J. (2003). MSH2 and ATR form a signaling module and regulate two branches of the damage response to DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 15387-92.
- Watson, P. & Lynch, H.T. (1993). Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer*, **71**, 677-85.

- Watson, P., Vasen, H.F., Mecklin, J.P., Jarvinen, H. & Lynch, H.T. (1994). The risk of endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Med*, **96**, 516-20.
- Weinstein M, Yang X, Deng C. Functions of mammalian Smad genes as revealed by targeted gene disruption in mice. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2000 Mar-Jun;11(1-2):49-58.
- Wilson, D.M., 3rd, Carney, J.P., Coleman, M.A., Adamson, A.W., Christensen, M. & Lamerdin, J.E. (1998). Hex1: a new human Rad2 nuclease family member with homology to yeast exonuclease 1. *Nucleic Acids Res*, **26**, 3762-8.
- Wright, J.A., Keegan, K.S., Herendeen, D.R., Bentley, N.J., Carr, A.M., Hoekstra, M.F. & Concannon, P. (1998). Protein kinase mutants of human ATR increase sensitivity to UV and ionizing radiation and abrogate cell cycle checkpoint control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7445-50.
- Wu, T.H. & Marinus, M.G. (1999). Deletion mutation analysis of the mutS gene in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **274**, 5948-52.
- Yamada, N.A. & Farber, R.A. (2002). Induction of a low level of microsatellite instability by overexpression of DNA polymerase Beta. *Cancer Res*, **62**, 6061-4.
- Yamaguchi, M., Dao, V. & Modrich, P. (1998). MutS and MutL activate DNA helicase II in a mismatch-dependent manner. *J Biol Chem*, **273**, 9197-201.
- Yamamoto, H., Gil, J., Schwartz, S., Jr. & Perucho, M. (2000). Frameshift mutations in Fas, Apaf-1, and Bcl-10 in gastro-intestinal cancer of the microsatellite mutator phenotype. *Cell Death Differ*, **7**, 238-9.
- Yamashita, K., Arimura, Y., Kurokawa, S., Itoh, F., Endo, T., Hirata, K., Imamura, A., Kondo, M., Sato, T. & Imai, K. (2000). Microsatellite instability in patients with multiple primary cancers of the gastrointestinal tract. *Gut*, **46**, 790-4.
- Yan, T., Schupp, J.E., Hwang, H.S., Wagner, M.W., Berry, S.E., Strickfaden, S., Veigl, M.L., Sedwick, W.D., Boothman, D.A. & Kinsella, T.J. (2001). Loss of DNA mismatch repair imparts defective cdc2 signaling and G(2) arrest responses without altering survival after ionizing radiation. *Cancer Res*, **61**, 8290-7.
- Yarden, R.I., Pardo-Reoyo, S., Sgagias, M., Cowan, K.H. & Brody, L.C. (2002). BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet*, **30**, 285-9.
- Zhou, H., Kuang, J., Zhong, L., Kuo, W.L., Gray, J.W., Sahin, A., Brinkley, B.R. & Sen, S. (1998a). Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. *Nat Genet*, **20**, 189-93.
- Zhou, X.P., Hoang, J.M., Cottu, P., Thomas, G. & Hamelin, R. (1997). Allelic profiles of mononucleotide repeat microsatellites in control individuals and in colorectal tumors with and without replication errors. *Oncogene*, **15**, 1713-8.
- Zhou, X.P., Hoang, J.M., Li, Y.J., Seruca, R., Carneiro, F., Sobrinho-Simoes, M., Lothe, R.A., Gleeson, C.M., Russell, S.E., Muzeau, F., Flejou, J.F., Hoang-Xuan, K., Lidereau, R., Thomas, G. & Hamelin, R. (1998b). Determination of the replication error phenotype in human tumors without the requirement for matching normal DNA by analysis of mononucleotide repeat microsatellites. *Genes Chromosomes Cancer*, **21**, 101-7.
- Zmudzka, B.Z., Fornace, A., Collins, J. & Wilson, S.H. (1988). Characterization of DNA polymerase beta mRNA: cell-cycle and growth response in cultured human cells. *Nucleic Acids Res*, **16**, 9587-96.