



ALTERACIONS DE LA VIA RAS-RAF EN CÀNCER GASTROINTESTINAL AMB DEFECTES DE REPARACIÓ GENÒMICA

Memòria presentada per
Enric Domingo Villanueva

per optar al grau de
Doctor per la Universitat de Barcelona

Barcelona, Novembre 2006

Tesi realitzada sota la direcció del Dr. Simó Schwartz Navarro
al laboratori d'Oncologia Molecular i Envelliment
del Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM)
de l'Hospital Universitari Vall d'Hebron

Tesi adscrita al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia
de la Universitat de Barcelona
Programa de Genètica, bienni 2002-2004

Tutor: Dr. Bru Cormand Rifa

Dr. Simó Schwartz
Director

Dr. Bru Cormand
Tutor

Enric Domingo
Doctorand

“La violencia es el último recurso del incompetente”

Salvor Hardin

AGRAÏMENTS

Una tesi doctoral no només és el fruit del treball d'investigació fet per una persona durant un cert temps. Darrera hi ha una llarga història no només professional sinó també personal que és la que acaba desembocant en la consecució de la tesi. Per tant, i sense haver de ser políticament correcte (que no va amb mi), vull agrair a tothom que, directament o indirecta, a col·laborat en la realització d'aquesta tesi, així com a la gent que m'envolta i que d'alguna forma m'ha influenciat per ser com soc (bé, espero que això últim sigui motiu d'agraïment).

Primer de tot i sense cap mena de dubte haig de donar gràcies a **Simo**, el meu director de tesi. És més que evident que sense ell no hi hauria ni tesi ni res. Primer vull agrair-li que en el seu moment em deixés formar part del seu grup i per tant introduir-me en el món de la investigació. I després tot el que m'ha ensenyat i el que he après al seu costat, que no ha estat poc, així com la seva altíssima implicació en la direcció d'aquest projecte d'investigació.

Després vull agrair a tothom que ha compartit el laboratori amb mi, especialment a la gent que ha “perdut” el temps ensenyant-me qualsevol cosa (des de protocols fins a coneixements científics).

Primer vull donar moltes gràcies a la **Laura** per inculcar-me l'esperit de neteja i ordre que necessita tot espai d'ús comú (espero tenir la lliçó apresada), per tota l'ajuda que m'ha donat sempre que ho he necessitat (cosa que ha estat bastant sovint) i pel bon rotllo que dona treballar al seu costat. Ah, i moltes gràcies per tots els seus postres, si algun dia obre una pastisseria ja té el seu primer client. Després com no donar les gràcies al **Hafid** per tot el que em va ensenyar quan vaig entrar al laboratori (tot i que desgraciadament jo no hagi arribat a tenir aquesta vareta màgica que només té ell i que fa que al laboratori tot li surti bé) i per l'ajuda que m'ha donat al deixar obert el camí cap al doctorat. Però sobretot felicitats per ser una de les millors persones que conec. També vull agrair molt a la **Carol** que m'hagi ensenyat com s'ha de treballar en un laboratori (segurament la persona amb qui més coses he après) i que em deixés la seva tesi, que tant bé m'ha anat com a model per fer la meva. I l'**Àngel**, amb qui tantes bones estones he passat parlant des d'investigació fins a les *freakades* més grans (i casi sempre rient). Després donar gràcies a la **Vero** també per mostrar-me els seus coneixements sempre que m'ha fet falta, però sobretot per fer que treballar al laboratori sigui un plaer enlloc d'una càrrega. I com no el **Diego**, que tot i que amb ell he après moltes coses sobre investigació, sempre el recordaré per inaugurar el club del “txupito” (això si que és un descobriment i no el que fem al laboratori). I seguint l'ordre cronològic el **Jose**, que tot i que els seus coneixements informàtics m'han ajudat, que vagi al laboratori en cap de setmana ja no diguem. També a **Julio**, sempre disposat a donar-me un cop de mà al laboratori i en la tesi quan li he demanat (i dels tequiles i els mojitos millor no dir res). I per acabar en **Jordi**, amb qui realment dona gust treballar (sobretot per les ganes que té d'organitzar festes).

Després vull agrair a totes les auxiliars que han passat pel laboratori tota la feina que han fet, immerescudament poc reconeguda. I d'aquestes vull esmentar concretament a la **Luchy**, amb qui tantes bones estones i riures vaig passar al començar, i per tenir sempre una mica de menjar per oferir (encara que ella no en mengés massa).

I també a la **Nuri** i l'**Isabel**, per fer tan bé la seva feina i ser persones amb qui dóna realment gust tractar. I la **Maria José**, que en aquests anys m'ha amenitzat tantes estones al passadís.

Altre gent a la que vull donar les gràcies és a tots els coautors dels articles que he publicat fins ara, sobretot als que estan inclosos en aquesta tesi, per haver-hi contribuït amb la seva feina. I més especialment a **Richard**, per haver-me acollit durant un temps al seu grup i haver-se preocupat en tot moment per mi, fins al punt de deixar-me dormir a l'habitació de la seva filla (evidentment sense ella). I també recordar-me de l'**Oliver** i l'**Alex**, pel que em van ensenyar i pel fil musical de jazz al laboratori.

També vull anomenar a la gent que ha estat en pràctiques amb mi durant aquest temps. Són molta gent que al final m'ha ajudat amb el que feia i que espero que hagin après alguna cosa de mi.

Evidentment també he d'esmentar al **Bru**, el meu tutor de tesi, que en els moments puntuals que l'he necessitat sempre m'ha respost ràpidament i amb molt bon criteri.

Després donar les gràcies als veïns de laboratori que he tingut, per fer-me més fàcil el dia a dia i crear un ambient de treball realment fantàstic. Bé, i perquè negar-ho, per tots els "güateques" que ens hem muntat dins i fora del laboratori. Primer el grup amb qui més temps he coincidit, el grup de mitocòndries: **Tòfol, Ricardo, David, Gisela, Mari Carmen** i **Marc**, a més de l'**Elena, Maya, Ramiro, Ramon** i **Toni**. I ja durant l'últim any la gent de neuro: **Clàudia, Ester, Mario, Marta, Roser** i **Yaris**.

També vull agrair les bones estones passades jugant a futbol amb la gent de l'hospital, que han hagut de suportar haver de jugar amb algú de la meva "qualitat".

I donar tot el meu suport al nou **Col·lectiu de Doctorands de l'IR-HUVH**. Espero que puguin tirar endavant totes les seves iniciatives. Amb el nou estatut que tenen segur que ho podran fer.

I per acabar la part més professional, agrair a tota la gent de l'hospital que en algun moment puntual m'ha ajudat en alguna cosa, i més especialment a tota la gent del **CIBBIM**.

Després vull agrair a la gent de la universitat per totes les bones estones passades durant una època que mai podré oblidar (i en alguns casos més concrets pels apunts que em van ajudar a tirar la carrera endavant). I més especialment a l'**Isra**, ja que si no fos per ell no hauria arribat mai a aquest laboratori i ves a saber què estaria fent jo ara. I també a l'**Óscar**, per ajudar-me i aguantar-me durant els mals rotllos. Bé, i a tots els demés del grup: **Antonio, Cristina, Gloria, Helena, Jose, Kiko, Raul** i **Sansó**. També vull recordar a **Mozhan** per escoltar-me en certa època.

També agrair moltíssim l'amistat amb l'**Àngel** i el **Manolo** des de fa ja tants anys (ja més de mitja vida), que són moltes les coses viscudes. Per concretar una mica, al primer per les bones estones de futbol i burger, de bona música (els grans **Black Orchid** i **Perseus**) i introduir-me al món del rol, i al segon per confiar sempre obertament en mi, i com no, pel pis on estic ara mateix escrivint, mola per tot arreu. Després agrair també totes les festes, vacances, aniversaris i demés que m'han donat tota l'altre gent del grup durant molts anys: **Arnau, Chuse, Dani G, Dani S, Edu, Eva,**

Fabi, Isaac, Javi, Lupi, Pere, Santi i Toni, i a totes les seves respectives en aquests anys. I vull fer una petita menció apart al **Jordi** per ajudar-me amb la portada de la tesi.

Donar gràcies als meus equips de futbol, els ja mítics **Cacauets** (per alguns **KKWTS**) i els **Blacks'n'Deckers**, que sempre m'han demostrat que el més important no és guanyar.

També vull agrair a tota la gent que des del món de la cultura m'ha influenciat, en algunes èpoques més i en d'altres menys, i que encara que no les arribi mai a conèixer personalment, formen part de la meua vida. Per esmentar alguns, de la literatura a l'inigualable **Isaac Asimov** (tan de bo jo pogués seguir els seus passos), **Tolkien** i **Margaret Weis/Tracy Hickman**. Del cinema, **George Lucas**, **Alfred Hitchcock** i **Woody Allen**. I de la música n'hi ha tants que segur que me'n deixo molts, però tot i així ho intentaré: **Alice in Chains**, **Bruce Springsteen**, **El Último de la Fila**, **Lacuna Coil**, **Lindsey Buckingham**, **Megadeth**, **Paradise Lost**, **Roger Hodgson** i **Steve Nicks**.

I per acabar la gent més important, la meua família, que hi són des de sempre i sempre hi seran. Vull aprofitar per fer un recordatori de la meua **àvia** i del meu oncle **Paqui**. Després evidentment anomenar al meu **avi** i a la tieta **Pepita** i l'oncle **Siscu**. I per acabar, la família més directa, que sé que sempre que els necessiti allí seran per ajudar-me a tenir una vida més fàcil, com sempre han fet: la meua **mare** i el meu **pare**, la meua germana **Marta**, la meua germana **Nuri**, el meu cunyat **Mal**, i la nova generació, el meu nebot **Gwyn**, l'alegria de la família.

Finalment recordar a molta gent que no he anomenat, tant sigui per descuit com per falta d'espai i temps.

I vull acabar amb alguna cosa que m'hagi marcat des de fa molt, així que aquí us deixo aquestes últimes línies:

*I been alone
All the years
So many ways to count the tears
I never change
I never will
I'm so afraid the way I feel*

*Days when the rain and the sun are gone
Black as night
Agony's torn at my heart too long
So afraid
Slip and I fall and I die*

Lindsey Buckingham

ÍNDEX

| | |
|---|----|
| Relació de figures | 7 |
| Relació de taules | 9 |
| Abreviatures | 11 |
| I. INTRODUCCIÓ | 15 |
| 1. EL CÀNCER COLORECTAL (CCR) | 17 |
| 1.1 Anatomia i histologia del còlon i el recte | 17 |
| 1.2 Epidemiologia del CCR | 18 |
| 1.3 Factors de risc del CCR | 18 |
| 1.4 Criatge del CCR | 20 |
| 1.5 Estadiatge del CCR | 21 |
| 1.6 Teràpia pel CCR | 23 |
| 1.7 Alteracions moleculars implicades en el CCR | 24 |
| 2. LA VIA WNT | 26 |
| 3. p53 | 27 |
| 4. LES VIES DE RAS | 28 |
| 4.1 Activació de Ras | 29 |
| 4.2 Els gens i les proteïnes Ras: KRAS, HRAS i NRAS | 30 |
| 4.3 Activació oncogènica de Ras | 34 |
| 4.4 La via Ras/Raf/MAPK | 37 |
| 4.5 Els gens i les proteïnes Raf: BRAF, ARAF i CRAF | 38 |
| 4.6 Altres vies de Ras | 46 |
| 4.6.1 La família RASSF | 46 |
| 4.6.2 PI3K | 47 |
| 4.6.3 La família RalGEF | 48 |
| 4.6.4 Altres efectors de Ras | 48 |

| | |
|---|------------|
| 5. LA INESTABILITAT DE MICROSATÈL·LITS (MSI) | 49 |
| 5.1 La reparació d'errors replicatius (MMR) | 49 |
| 5.2 Característiques i diagnòstic de MSI | 51 |
| 5.3 Els gens diana | 53 |
| 5.4 HNPCC i el seu diagnòstic | 54 |
| II. MOTIUS DE LA TESI | 61 |
| III. OBJECTIUS | 65 |
| IV. RESUM GLOBAL | 69 |
| V. PUBLICACIONS | 73 |
| 1. Article 1: <i>BRAF mutations characterise colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency</i> | 75 |
| 2. Article 2: <i>Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and hMLH1 inactivation</i> | 83 |
| 3. Article 3: <i>BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing</i> | 91 |
| 4. Article 4: <i>BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes</i> | 99 |
| 5. Article 5: <i>Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status</i> | 105 |
| VI. DISCUSSIÓ | 117 |
| 1. L'activació de BRAF i KRAS en CCR i CG amb i sense MSI | 119 |
| 2. L'activació de BRAF en CCR MSI esporàdic i HNPCC | 122 |
| 3. L'activació de KRAS en CCR esporàdic MSS i MSI i en HNPCC .. | 127 |
| 4. L'ús de BRAF-V600E en el diagnòstic de HNPCC | 129 |
| VII. CONCLUSIONS | 133 |
| VIII. BIBLIOGRAFIA | 137 |

| | |
|---|-----|
| IX. APÈNDIX | 159 |
| 1. Article A: <i>KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression</i> | 161 |
| 2. Article B: <i>RASSF1A hypermethylation and KRAS/BRAF mutations are not alternative genetic events in mismatch repair defective gastrointestinal cancers</i> | 169 |

RELACIÓ DE FIGURES

| | |
|---|-----|
| Figura 1. Esquema anatòmic del còlon | 17 |
| Figura 2. Capes que formen el teixit colorectal | 17 |
| Figura 3. Causes de CCR | 24 |
| Figura 4. Canvis genètics associats a la progressió tumoral colorectal | 25 |
| Figura 5. A) Via Wnt sense activar B) Via Wnt activada | 27 |
| Figura 6. Activació de Ras | 29 |
| Figura 7. Vies activades per Ras | 30 |
| Figura 8. Estructura dels dominis de les proteïnes Ras | 31 |
| Figura 9. Ruta de les modificacions postraduccional de les proteïnes Ras ... | 33 |
| Figura 10. Representació esquemàtica de les estructures de Ras-GDP i Ras-GTP | 34 |
| Figura 11. La via Ras-Raf | 38 |
| Figura 12. Diagrama de la proteïna BRAF a escala | 39 |
| Figura 13. Mutacions de BRAF en càncer | 45 |
| Figura 14. Mecanisme de la reparació dels errors replicatius (MMR) | 51 |
| Figura 15. Freqüències de mutacions en tumors MSI-H esporàdics de colon, estómac i endometri | 54 |
| Figura 16. Estratègia actual per fer el test genètic de HNPCC | 59 |
| Figura 17. Histograma de la distribució de set gens metilats (MLH1, p16, p14, RASSF1A, APC, MGMT i THBS1) en tumors de CCR MSI | 126 |

RELACIÓ DE TAULES

| | |
|---|-----|
| Taula 1. Estadis TNM en CCR | 22 |
| Taula 2. Comparació entre les classificacions de Dukes i TNM | 23 |
| Taula 3. Mutacions de Ras a diferents teixits | 36 |
| Taula 4. Freqüències de les mutacions més habituals de KRAS en CCR | 36 |
| Taula 5. Exemples de gens amb microsatèl·lits codificants mutats a MSI | 53 |
| Taula 6. Criteris d'Amsterdam I i II i de Bethesda i Bethesda modificats | 58 |
| Taula 7. Resum de les freqüències mutacionals totals descrites a la tesi de BRAF i KRAS en CCR i CG separant els casos MSS, MSI esporàdics i HNPCC | 121 |
| Taula 8. Freqüències mutacionals de BRAF publicades fins l'actualitat en CCR MSS, MSI esporàdic i HNPCC | 121 |
| Taula 9. Diferència significativa en el nombre de mutacions de casos japonesos MSI BRAF positius segons si són KRAS positius o negatius | 122 |
| Taula 10. Representació d'alguns dels casos analitzats per metilació en tumors MSI amb i sense BRAF-V600E | 124 |
| Taula 11. Associació significativa entre BRAF i l'estat de metilació en MSI .. | 125 |
| Taula 12. Associació significativa entre hipermetilació de MLH1 i l'estat de metilació en MSI | 125 |
| Taula 13. Càlcul de la freqüència normalitzada de KRAS | 127 |

ABREVIATURES

| | |
|---------------|---|
| ACF | Focus de criptes aberrants (<i>Aberrant Crypt Foci</i>) |
| ADN | Àcid desoxiribonucleic |
| ADNc | ADN complementari |
| AMPc | Adenosín-monofosfat cíclic |
| ARNm | ARN (àcid ribonucleic) missatger |
| AS | Segment d'activació (<i>Activation Segment</i>) |
| ATP | Adenosín-trifosfat |
| BER | Reparació per escissió de bases (<i>Base Excision Repair</i>) |
| CCR | Càncer colorectal |
| CG | Càncer gàstric |
| CIN | Inestabilitat cromosòmica (<i>Chromosomal INstability</i>) |
| CK2 | Caseïna quinasa 2 |
| CpG | Citosina fosfat guanina |
| CRC | Càncer colorectal (<i>ColoRectal Cancer</i>) |
| CRD | Domini ric en cisteïnes (<i>Cysteine Rich Domain</i>) |
| DGGE | Electroforesis en gel de gradient desnaturalitzant (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>) |
| DNA | Àcid desoxiribonucleic (<i>DeoxyriboNucleic Acid</i>) |
| Dsh | <i>Dishevelled</i> |
| FAP | Poliposi adenomatosa familiar (<i>Familial Adenomatous Polyposis</i>) |
| Frz | <i>Frizzled</i> |
| G-loop | Gir ric en glicines |
| GAP | Proteïna activadora de GTPasas (<i>GTPase Activating Protein</i>) |
| GDP | Guanosina difosfat |
| GEF | Factor intercanviador de guanines (<i>Guanine-nucleotide Exchange Factor</i>) |
| GTP | Guanosina trifosfat |
| HA | Anàlisi d'heterodúplex (<i>Heteroduplex Analysis</i>) |
| HE | Hematoxilina eosina |
| HNPCC | Càncer colorectal hereditari no polipòsic (<i>Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i>) |
| HR | Recombinació homòloga (<i>Homologous Recombination</i>) |

| | |
|-------------------|--|
| IBD | Malaltia inflamatòria intestinal (<i>Inflammatory bowel disease</i>) |
| Icmt | Isoprenilcisteïna carboxil metiltransferasa |
| IH/IHC/IHQ | Immunohistoquímica (<i>Immunohistochemistry</i>) |
| Kb | Kilobase |
| KD | Domini quinasa (<i>Kinase Domain</i>) |
| kDa | Kilodalton |
| LN | Nòdul limfàtic (<i>Lymph Node</i>) |
| MAP | Poliposi associada a MYH (<i>MYH-associated polyposis</i>) |
| MAPK | Proteïna quinasa activada per mitogen (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>) |
| MAPKK | MAPK quinasa |
| MAPKKK | MAPK quinasa quinasa |
| MDE | Gel d'augment de detecció de mutacions (<i>Mutation Detection Enhancement gel</i>) |
| MMR | Reparació d'errors replicatius (<i>MisMatch Repair</i>) |
| MSI | Inestabilitat de microsatèl·lits (<i>MicroSatellite Instability</i>) |
| MSI-H | Alta inestabilitat de microsatèl·lits (<i>MSI-High</i>) |
| MSI-L | Baixa inestabilitat de microsatèl·lits (<i>MSI-Low</i>) |
| MSP | PCR específica de metilació (<i>Methylation Specific PCR</i>) |
| MSS | Estabilitat de microsatèl·lits (<i>MicroSatellite Stable</i>) |
| NCI | <i>National Cancer Institute</i> |
| NER | Reparació per escissió de nucleòtids (<i>Nucleotide Excision Repair</i>) |
| NHEJ | Unió d'extremos no homòlegs (<i>Non-Homologous End-Joining</i>) |
| NLM | Nòduls limfàtics metastàsics |
| Ns | No significatiu |
| PCR | Reacció en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>) |
| Pi | Grup fosfat |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-quinasa |
| PIP2 | Fosfatidilinositol (4,5)-difosfat |
| PIP3 | Fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat |
| PLD1 | Fosfolipasa D1 |
| PP2A | Fosfatasa-2A |
| PTT | Assaig de truncament de proteïna (<i>Protein Truncation Test</i>) |
| RBD | Domini d'unió a Ras (<i>Ras Binding Domain</i>) |

| | |
|-------------|---|
| SAM | S-adenosil-metionina |
| SCRC | Càncer colorectal esporàdic (<i>Sporadic ColoRectal Cancer</i>) |
| SGC | Càncer gàstric esporàdic (<i>Sporadic Gastric Cancer</i>) |
| SRE | Element de resposta al sèrum (<i>Serum Response Element</i>) |
| SSCP | Polimorfisme de conformació de cadena senzilla (<i>Single Strand Conformation Polymorphism</i>) |
| Ter | Codó de terminació |

I. INTRODUCCIÓ

1. EL CÀNCER COLORECTAL (CCR)

1.1 Anatomia i histologia del còlon i el recte

El còlon i el recte són la part terminal del tracte digestiu. Tots dos formen el budell gruixut que té una longitud aproximada de 1,5 metres. La funció del còlon és la d'absorbir nutrients, electròlits i aigua dels aliments ingerits per incorporar-los al torrent sanguini i el recte fa de reservori del material abans de l'expulsió. Anatòmicament el còlon es subdivideix en còlon ascendent, transvers, descendent i sigmoide, tot i que a nivell clinicopatològic sol dividir-se en còlon proximal o dret (que comprèn l'ascendent i el transvers) i distal o esquerre (que comprèn el descendent, el sigmoide i el recte) (Figura 1). Les capes que formen el còlon des de la llum a la capa més externa són les següents: mucosa (formada d'epiteli, làmina pròpia i muscular de la mucosa), submucosa, muscular externa i serosa (Figura 2).

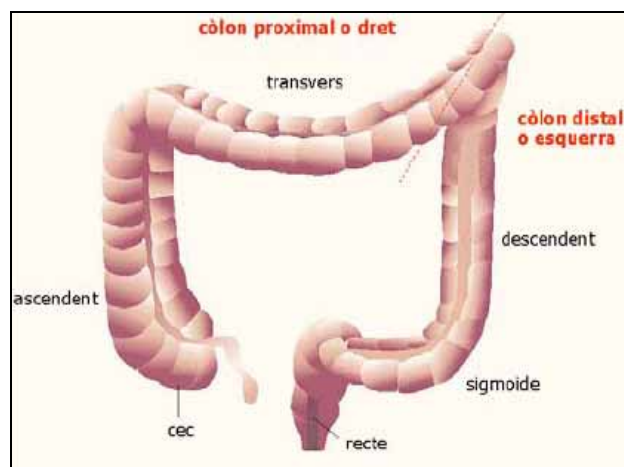


Figura 1. Esquema anatómic del còlon.

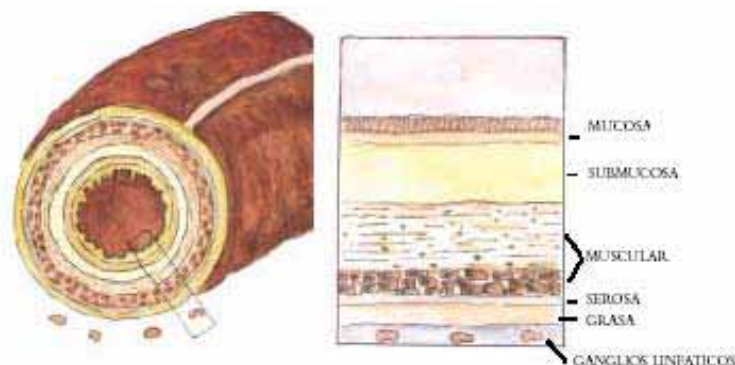


Figura 2. Capes que formen el teixit colorectal.

L'epiteli té unes invaginacions que formen unes glàndules intestinals anomenades criptes de Lieberkühn, que incrementen l'àrea de superfície del budell. Les cèl·lules del fons de les criptes són cèl·lules mare que van renovant les cèl·lules al llarg de l'epiteli en un procés de proliferació, diferenciació i migració cap al lumen del budell. Són cèl·lules totipotents que ocupen la tercera part més basal de la cripta i es divideixen cada 12 hores aproximadament (van de Wetering et al. 2002). A la regió mitjana de la cripta les cèl·lules progenitores es diferencien en enteròcits (absorbeixen aigua i nutrients), cèl·lules caliciformes (productores de mucigen) i cèl·lules neuroendocrines (productores d'hormones). Quan les cèl·lules arriben a la superfície epitelial pateixen un procés d'apoptosis i/o extrusió cap al lumen. Tots aquests fenòmens es donen aproximadament entre 3 i 5 dies (Potten and Loeffler 1990).

1.2 Epidemiologia del CCR

L'any 2002 es van diagnosticar un milió de nous casos de càncer colorectal (CCR) a tot el món. Segons les zones geogràfiques hi ha una gran variació en les incidències de CCR que es poden explicar probablement per diferents exposicions ambientals, segurament ocasionades per l'estil de vida. Indicis d'aquesta relació entre CCR i estil de vida es troben en alguns estudis realitzats amb immigrants. D'aquesta forma s'ha comprovat com els grups migratoris perden de manera progressiva el risc associat a la seva comunitat d'origen i adquireixen el patró de la nova comunitat, que comença a la generació d'arribada. Per exemple, el risc dels descendents de la població japonesa que han emigrat als Estats Units ha canviat i ara està pròxim o per sobre de la població americana blanca i és tres o quatre vegades més alt que la dels japonesos que viuen al Japó. Així, varis estudis suggereixen que els factors ambientals juguen un paper important en l'etiologia de la malaltia.

1.3 Factors de risc

Els principals factors de risc en CCR són els següents:

- **Dieta:** Té una clara importància per l'exposició constant a la que està sotmès el tracte digestiu als nutrients i additius. Tenint en compte les diferències entre l'incidència de CCR a Àfrica i els països occidentals i les seves respectives diferències alimentàries

es recomanen dietes riques en fibres. No obstant, el mecanisme que fa que la fibra protegeixi la mucosa colònica no ha estat aclarit. Hi ha diverses explicacions possibles sobre el que provoca el consum de fibra:

1. Disminueix el temps de trànsit colònic, reduint l'exposició de la mucosa als carcinògens intraluminals.
2. Afavoreix la fixació i dilució dels carcinògens a la llum del colon neutralitzant els seus efectes.
3. Produeix canvis a la flora bacteriana, produint alteracions en el metabolisme dels àcids biliars.
4. Disminueix el pH colònic provocant la desionització dels àcids grassos lliures i dels àcids biliars amb potencial nociu.

Un altre factor protector és el calci, que podria actuar per la seva unió als àcids grassos i a la bilis, que és citotòxica (Kleibeuker et al. 1996), o bé que redueixi la proliferació de la part apical de la cripta (Bostick et al. 1995). En canvi, factors que afavoreixen el CCR són la carn vermella, que té una associació positiva amb l'incidència de CCR (Giovannucci and Willett 1994), els greixos saturats o d'origen animal (Potter 1999) i el consum d'alcohol (Kune and Vitetta 1992).

- **Tabac:** S'ha associat l'hàbit del tabaquisme de més de 35 anys amb un risc 1,47 vegades superior a la mitja (Giovannucci et al. 1994).

- **Edat:** Rarament es pateix CCR abans dels 40 anys, i entre els 40 i els 50 és poc habitual.

- **Activitat física:** Hi ha estudis que reflecteixen un risc menor de CCR a les persones amb hàbits més esportistes que a les més sedentàries. No obstant, seria determinant que aquest hàbit no fos de recent adquisició, ja que sinó seria irrellevant. L'explicació a aquest fet podria ser múltiple, des de les secrecions hormonals fins a l'influència sobre el sistema immunitari (Slattery et al. 1990).

- **Factors hereditaris:** El 10-15% dels casos de CCR tenen un origen hereditari (Schottenfeld 1996). La majoria dels càncers familiars es transmeten amb caràcter autosòmic dominant, amb diferents graus de penetrància.

1.4 Cribatge del CCR

Els pacients amb un estat avançat del tumor tenen poques opcions de tractament, però la supervivència és molt alta si el tumor es extirpat en els estadis inicials de la malaltia. Per això la millor prevenció en el CCR és el diagnòstic precoç, i per tant és necessària una bona estratègia de control. En CCR, la majoria de tumors provenen de pòlips o adenomes, però molts d'aquests no arriben a formar un tumor. Actualment no hi ha cap forma de preveure com evolucionarà un adenoma, i a més aquest és freqüentment asimptomàtic. Quan una persona presenta símptomes significa sovint que el tumor es troba en una fase molt avançada. De totes formes s'estima que el pas d'adenoma a carcinoma triga entre 5 i 10 anys (Schoen 2002). Hi ha diferents mètodes de detectar els adenomes o els carcinomes:

- **Tacte rectal:** Exploració física que realitza el metge introduint un dit per l'anus per detectar anomalies. No és una tècnica massa útil ja que la majoria de tumors solen estar més enllà dels 11 centímetres.

- **Sang en fempta:** Evidencia la presència indirecta d'adenomes o tumors sagnants. No és una tècnica ideal perquè, tot i ser molt simple i senzilla, s'obtenen falsos negatius ja que no tots els adenomes sagnen i hi ha altres motius de sagnat, com ara fissures, fistules o hemorroides.

- **Sigmoïdoscòpia:** És una endoscòpia del tram descendent del còlon. Mitjançant un tub amb una càmera es visualitza la part distal del còlon, i permet fer biòpsies de pòlips petits.

- **Colonoscòpia:** És una endoscòpia de tot el budell gros, que a més permet l'escissió d'adenomes grans i petits. Com que l'examinació és més llarga, aquesta requereix l'administració de sedants perquè pugui ser tolerable. Pot provocar una perforació del budell, complicació que requereix cirurgia major.

- **Enema de bari amb doble contrast:** S'introdueix al colon del pacient sulfat de bari, que al ser radiopac és visible en una placa de raigs X. Si hi ha presència de taques anormals a la placa es fa una colonoscòpia.

- **Colonoscòpia virtual:** És un procediment experimental ja que encara no s'ha demostrat que sigui tant efectiva com les altres proves existents. Es tracta d'una

tomografia computeritzada que permet l'obtenció d'una imatge tridimensional. Les avantatges són que és una prova ràpida, no cal sedar al pacient i té un cost menor que la colonscòpia convencional. Les desavantatges són que no permet fer extirpacions durant el procés i que és menys eficaç que la colonscòpia convencional per detectar pòlips petits.

1.5 Estadiatge del CCR

- **Dukes:** És un dels sistemes de classificació més usats en CCR i molt defensat per la seva simplicitat. Els estadis són els següents:

- A:** Limitat a la paret del recte (mucosa i submucosa), sense afectació ganglionar.
- B:** Afectació del teixit perirectal (fins a la serosa), sense afectació ganglionar.
- C1:** Afectació perirectal amb afectació només als ganglis perirectals.
- C2:** Afectació perirectal amb afectació dels ganglis al punt de lligadura del vas mesentèric (nòduls apicals).
- D:** Metàstasi a distància.

- **Astler-Coller:** Es solapa molt amb la classificació de Dukes. És molt popular pel seu valor pronòstic (Deans et al. 1992). Els estadis que descriu són els següents (Astler and Coller 1954):

- A:** El tumor està situat a la mucosa.
- B1:** El tumor arriba a la muscular però no a la serosa.
- B2:** El tumor arriba a la serosa.
- C1:** Afecta a les mateixes capes que B1, i a més té metàstasi en nòduls limfàtics.
- C2:** Afecta a les mateixes capes que B2, i a més té metàstasi en nòduls limfàtics.
- D:** El tumor presenta metàstasi a distància.

- **TNM:** Aquest estadiatge és un dels més usats en càncer. Va ser presentat l'any 1954 i està basat en l'extensió de la malaltia utilitzant informació tant clínica com patològica (Zinkin 1983). Funciona donant un codi per cada columna, on la T és l'extensió que ocupa el tumor primari, la N refereix a metàstasi als nòduls limfàtics i la M a metàstasi a distància. Cada teixit té el seu propi codi degut a les diferències histològiques existents. La principal avantatge d'aquest mètode radica en que cada columna de la classificació TNM no pressuposa res sobre l'estat de les altres parts, permetent així enquadrar els casos que constitueixen una excepció en el camí normal de la progressió tumoral. No obstant també és criticat per ser el de més difícil aplicació.

Les categories TNM referents al CCR són les següents:

Categories de la T:

Tx: Informació incompleta sobre l'extensió del tumor.

Tis: Tumor in situ. Aquest no surt de la mucosa.

T1: Invasió de la submucosa.

T2: Invasió de la paret muscular.

T3: Invasió de la subserosa.

T4: Invasió d'òrgans o teixits contigus.

Categories de la N:

Nx: Informació incompleta sobre l'afectació dels nòduls limfàtics.

N0: Cap nòdul limfàtic afectat.

N1: Presència de cèl·lules tumorals a entre 1 i 3 nòduls.

N2: Presència de cèl·lules tumorals a 4 o més nòduls.

Categories de la M:

Mx: Informació incompleta sobre metàstasi a distància.

M0: No hi ha metàstasi.

M1: Si hi ha metàstasi.

Aquesta nomenclatura es pot simplificar en estadis (Taula 1), que de fet s'assemblen molt als estadis de Dukes (Taula 2). El fet que existeixin tants tipus de classificacions genera una certa confusió. Per això és imprescindible que a nivell institucional es defineixin bé els criteris i siguin utilitzats de forma acurada i sistemàtica per tot el col·lectiu de metges. Per tal d'evitar cap confusió, sovint a nivell clínic s'utilitzen tots tres sistemes.

| Estadi | Descripció |
|---------------|------------------------------|
| 0 | Tis, N0, M0 |
| I | T1, N0, M0 T2, N0, M0 |
| II | T3, N0, M0 T4, N0, M0 |
| III | T1-4, N1, M0 T1-4, N2, M0 |
| IV | T1-4, N1-2, M1 |

Taula 1. Estadis TNM en CCR.

| | | Tis | T1 | T2 | T3 | T4 |
|----|--------------------------|---------------------------|-------------------------|----|--------------------------|----|
| M0 | N0 | Estadi 0 <i>Dukes A</i> | Estadi I <i>Dukes A</i> | | Estadi II <i>Dukes B</i> | |
| | N1 | Estadi III <i>Dukes C</i> | | | | |
| | N2 | | | | | |
| M1 | Estadi IV <i>Dukes D</i> | | | | | |

Taula 2. Comparació entre les classificacions de Dukes i TNM (Deans et al. 1992).

1.6 Teràpia pel CCR

Actualment l'única teràpia vàlida és la cirurgia i recció total del tumor, amb teràpia adjuvant en molts casos mitjançant quimioteràpia o radioteràpia. El protocol utilitzat està limitat segons l'estat general del pacient, la localització anatòmica del tumor i l'estadiatge que presenti. Al fer la cirurgia s'extirpa el tumor i part del teixit normal adjacent com a mesura de precaució davant possibles cèl·lules tumorals remanents, i s'uneixen els extrems per donar continuïtat al tub digestiu. En cas que el tumor estigués a menys d'uns 10 centímetres de l'esfínter anal, es pot fer una colostomia, consistent a crear una obertura a l'exterior a través de l'abdomen.

La teràpia adjuvant es pot administrar abans de la cirurgia quan es vol reduir les dimensions del tumor, o després quan es vol destruir cèl·lules que puguin haver quedat després de la intervenció. El quimioteràpic més utilitzat és el 5-fluorouracil, tot i que en els últims anys s'han descobert altres alternatives com l'irinotecan o l'oxaliplatí. La radioteràpia s'utilitza rutinàriament en el càncer de recte, que tendeix a reaparèixer a la zona de la intervenció, però no en el de colon, que metastatitza normalment al fetge o als pulmons. En el cas del recte, també es dona radioteràpia o quimioteràpia preoperatòria.

La resposta a la teràpia varia en funció de l'estadi del tumor. Així, els percentatges de curació, si entenem aquesta com a absència de malaltia residual després de cinc anys de la operació, són els següents (Markowitz et al. 2002):

- Estadi I: 90%
- Estadi II: 75%
- Estadi III: 40%

Aquestes dades demostren la gran importància que té la detecció precoç del CCR, ja que millora notablement la supervivència dels pacients. Per això també és molt important detectar quins són els grups de més risc per fer-los un seguiment rutinari.

1.7 Alteracions moleculars implicades en CCR

Tres quartes parts del casos de CCR es donen de forma esporàdica i la resta es donen de forma hereditària (Figura 3). D'aquests, la majoria es donen per mutacions a gens de susceptibilitat amb penetrància baixa encara desconeguts, o amb penetrància alta coneguts, com per exemple en HNPCC (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*) que presenta mutacions en gens implicats en la reparació d'errors replicatius (veure apartat 5.4) o FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*), que les presenta al gen APC.

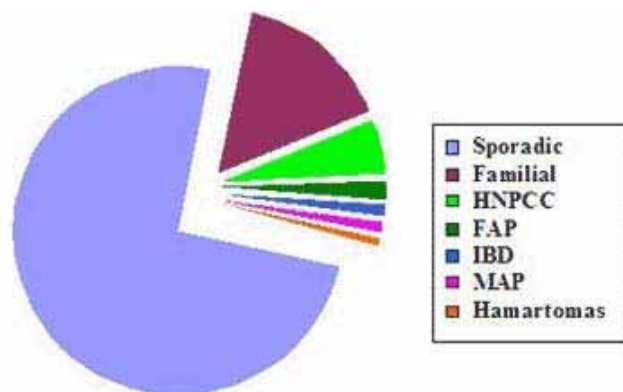


Figura 3. Causes de CCR (Hisamuddin and Yang 2004). HNPCC: *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*; FAP: *Familial Adenomatous Polyposis*; IBD: *Inflammatory Bowel Disease*; MAP: *MYH-Associated Polyposis*

Els estadis pels que passen la majoria dels tumors colorectals són: focus de criptes aberrants (ACF), adenoma primerenc (menys d'un centímetre de diàmetre), adenoma intermedi (més d'un centímetre de diàmetre i sense focus de carcinoma), adenoma tardà (amb focus de carcinoma), carcinoma i metàstasi (Fearon and Vogelstein 1990). Els ACF es defineixen per la seva aparença microscòpica i s'identifiquen per ser criptes més grans que les normals, tenir l'espai pericriptal augmentat de forma que estiguin separades de les criptes normals, tenir una capa més gruixuda de cèl·lules epitelials que sovint es tenyeix més fosca i tenir generalment unes obertures més ovals que circulars (McLellan and Bird 1988).

Els ACF esporàdics presenten metilació a varis gens amb un alta freqüència (Chan et al. 2002b, Li et al. 2003, Suzuki et al. 2004, Luo et al. 2005) i mutacions a KRAS en una freqüència del 65% aproximadament (Pretlow et al. 1993, Yamashita et al. 1995, Losi et al. 1996, Shivapurkar et al. 1997, Takayama et al. 2001), sent per tant factors iniciadors (Figura 4). No obstant no són l'únic event iniciador de CCR ja que per exemple en FAP el factor iniciador són les mutacions germinals d'APC (Grodén et al. 1991, Kinzler et al. 1991), que en els ACF esporàdics són molt poc habituals (0-6%) (Jen et al. 1994, Smith et al. 1994, Otori et al. 1998, Takayama et al. 2001). No obstant un cop format un ACF esporàdic el desencadenant de la formació d'un adenoma serà una alteració a la via de Wnt, principalment per mutacions a APC (veure apartat 2 de l'introducció). Aquest adenoma serà un adenoma tradicional, diferent dels adenomas serrats que es detecten en l'1% dels CCR (Longacre and Fenoglio-Preiser 1990, Jass 1999) i que tenen una arquitectura serrada. Aquests es formen a partir d'ACF amb displasia, que representa un 5-10% del total d'ACF (Roncucci et al. 1991, Jen et al. 1994, Otori et al. 1995, Takayama et al. 1998), i presenten diferències a nivell molecular ja que s'han associat a metilació (Chan et al. 2002a, Park et al. 2003) i a mutacions de BRAF (Chan et al. 2003). Els adenomas tradicionals progressen a estadis més avançats mitjançant altres alteracions com les mutacions a p53 (Figura 4).

També hi ha una altra via diferent a nivell molecular, la inestabilitat de microsatèl·lits, que està detallada a l'apartat 5 d'aquesta introducció, i que afecta tant als adenomas tradicionals com als serrats.

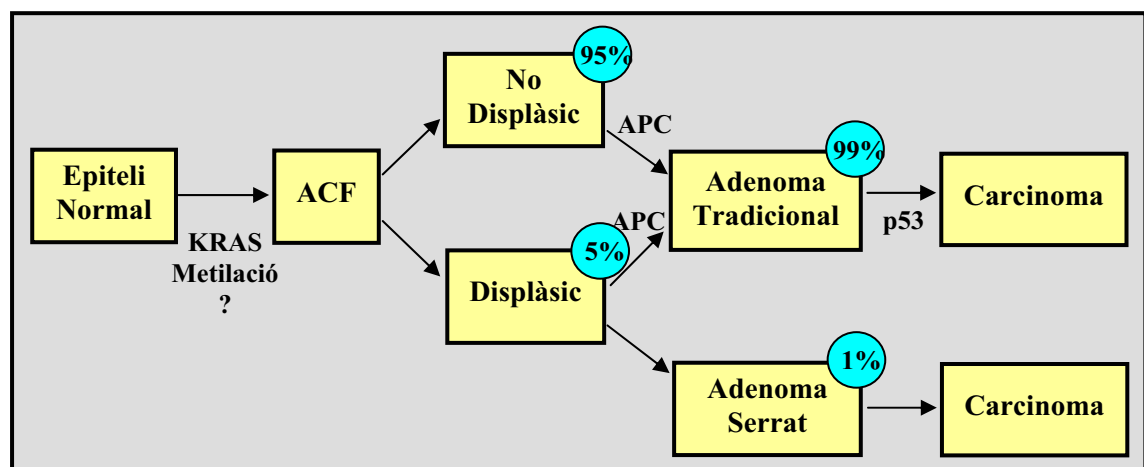


Figura 4. Canvis genètics associats a la progressió tumoral colorectal.

2. LA VIA WNT

Aquesta via participa en el control de la divisió cel·lular com a resposta a determinats estímuls exteriors de la cèl·lula mediat per lligands específics de Wnt, en un procés marcat per una cascada de fosforilacions i defosforilacions. Aquesta via també està implicada en importants processos precoços del desenvolupament embrionari (Wodarz and Nusse 1998) i en tumorigènesis (Polakis 1999).

Quan la via no està activada, β -catenina s'associa a un complex format per APC i axina, que estan fosforilats per GSK-3 β . Així la β -catenina fosforilada es reconeguda i marcada per ser degradada per ubiquitinització al proteasoma (Figura 5A). Però quan es secreta la glicoproteïna Wnt s'activa la via per la seva interacció amb Frizzled (Frz), el seu receptor de membrana. L'activació d'aquest receptor provoca la fosforilació de la proteïna Dishevelled (Dsh), que inhibeix a GSK-3 β fosforilant-la. Aquesta inhibició comporta que β -catenina no estigui fosforilada i per tant estigui activa, es desplaci al nucli cel·lular i s'uneixi als factors de transcripció LEF/TCF, regulant la transcripció gènica de determinats gens com c-myc o ciclina D1, involucrats en processos tumorigènics (He et al. 1998, Shtutman et al. 1999) (Figura 5B). No obstant, β -catenina activada també pot anar a la membrana cel·lular per unir-se a e-cadherina.

Les mutacions en aquesta via es donen sobretot a APC, que trunquen la proteïna prematurament i cancel·len la seva habilitat de marcar per degradar a β -catenina, activant la via constitutivament (Korinek et al. 1997, Morin et al. 1997). Aquestes mutacions es donen en el CCR i poden ser esporàdiques o bé germinals, provocant llavors FAP (Grodén et al. 1991, Kinzler et al. 1991), malaltia en que apareixen centenars de pòlips al colon i recte dels individus afectes. En CCR també hi ha mutacions a β -catenina, que la fan resistents a la fosforilació i que per tant també activen la via constitutivament (Morin et al. 1997), i a Axina2, que estableixen a β -catenina i activen la via β -catenina-TCF (Liu et al. 2000).

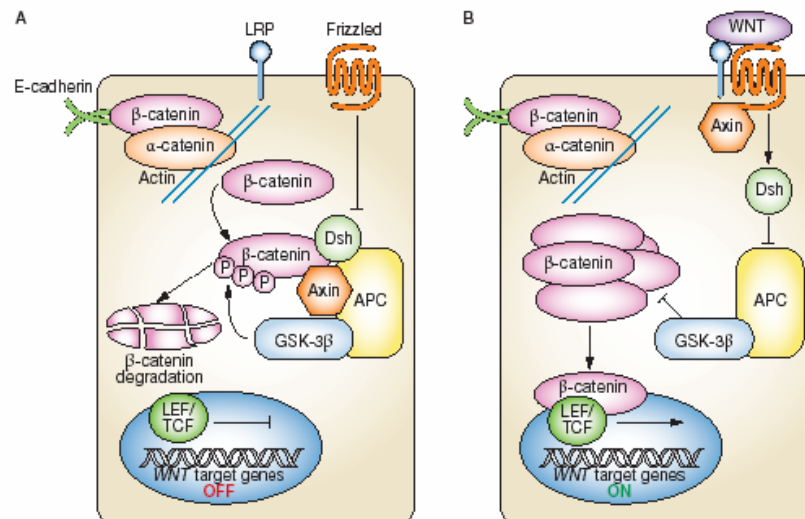


Figura 5. A) Via Wnt sense activar. B) Via Wnt activada (McDonald et al. 2006).

3. p53

La proteïna p53 està codificada pel gen TP53 i és un supressor tumoral que actua sobretot com a factor de transcripció en forma d'homotetràmer capaç d'activar i inhibir un gran nombre de gens. Les seves principals funcions són la d'aturar el cicle cel·lular, reparar l'ADN i iniciar l'apoptosi.

En resposta a l'estrès genotòxic, unes certes proteïnes quinasas sensores com ATM o ATR fosforilen p53 directa o indirectament a múltiples llocs modulant la seva activitat. Així, p53 pot activar proteïnes com p21, que és un potent inhibidor de diverses CDKs responsables del pas de G1 a S (Shiloh 2001). D'aquesta forma p53 atura el cicle cel·lular en aquesta fase, i dona temps a la cèl·lula per poder reparar el dany a l'ADN abans que es repliqui i passi l'error a les cèl·lules filles. Però p53 també actua en la reparació de l'ADN, ja que és capaç d'interaccionar amb proteïnes implicades en la reparació per escissió de nucleòtids (NER), reparació per escissió de bases (BER), unió d'extremes no homòlegs (NHEJ) i recombinació homòloga (HR) (Sengupta and Harris 2005). Però si tot i així la cèl·lula excedeix un llindar crític de dany a l'ADN, p53 induïx l'expressió de gens proapoptòtics com Puma, Noxa o Bax (Chipuk and Green 2006). La funció i el nivell de p53 està fortament inhibida per la proteïna MDM2, que l'ubiquïtinitza i el degrada. Alhora el gen MDM2 està induït per p53, cosa que fa que es reguli el seu nivell d'expressió.

TP53 és el gen més mutat en els càncers humans, amb una incidència aproximada del 50%. Aquest gen també es troba mutat germinalment originant el síndrome de Li-fraumeni, que es caracteritza per una predisposició a patir carcinogènesi prematura a diferents teixits (Malkin et al. 1990, Srivastava et al. 1990). Les mutacions a TP53 provoquen la pèrdua de la activitat transcripcional i consegüentment de la seva propietat antiproliferativa (Hainaut and Hollstein 2000). També algunes mutacions de p53 li confereixen funcions oncogèniques com l'atenuació de la funció de p73 (Strano et al. 2000). Les mutacions tant germinals com esporàdiques són en més del 75% dels casos de sentit incorrecte o *missense* (Olivier et al. 2002) i tot i que poden donar-se a qualsevol lloc, solen situar-se al domini d'unió a l'ADN, entre els codons 92 i 292 (Hollstein et al. 1991, Levine et al. 1991). També es pot donar una pèrdua de funció del p53 salvatge per la sobreexpressió de p53 mutat pel seu efecte dominant negatiu (Ko and Prives 1996).

4. LES VIES DE RAS

Un dels sistemes de senyalització més importants en la regulació de múltiples processos cel·lulars són les vies de transducció de les proteïnes quinases activades per mitogen o MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), que poden controlar entre d'altres la proliferació, la diferenciació i l'apoptosi. El patró que les caracteritza es basa en una proteïna G activable per senyals extracel·lulars que activa una MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), que fosforila i activa una MAPK quinasa (MAPKK) que finalment fosforila i activa una MAPK. Aquesta última és la responsable d'activar els diferents efectors fisiològics. Amb aquest sistema es permet una gran amplificació del senyal i alhora un important nivell de regulació (Kolch 2000). D'aquestes proteïnes G la més estudiada és la proteïna Ras, que és una proteïna de baix pes molecular (21 kDa) que pertany a la superfamília de les GTPases petites.

Les proteïnes Ras funcionen com un interruptor regulat per l'intercanvi entre GDP i GTP situat a la cara interna de la membrana plasmàtica per a la transducció dels estímuls extracel·lulars mitjançant lligand dins del citoplasma. L'activitat biològica de Ras està controlada per un cicle GDP/GTP. La majoria de les molècules de Ras resten a

la cèl·lula en el seu estat inactiu, caracteritzat per una conformació que permet la unió de GDP. L'intercanvi de GDP per GTP es seguida per un canvi conformacional de la proteïna Ras al seu estat actiu. Llavors les proteïnes Ras actives poden interactuar amb molècules efectores i propagar el senyal. La hidròlisi de GTP a GDP retorna a la proteïna Ras activa al seu estat inactiu unit a GDP. Aquesta hidròlisi pot ser feta per l'activitat GTPasa intrínseca de Ras. No obstant, l'activitat GTPasa intrínseca és molt baixa i una hidròlisi més ràpida de GTP es catalitzada per altres molècules. Per tant hi ha dos tipus de reguladors de Ras, els GEFs (*Guanine-nucleotide Exchange Factor*), que promouen la formació a l'estat actiu unit a GTP, i els GAPs (*GTPase Activating Protein*), que promouen la formació a l'estat inactiu unit a GDP. Els GEFs actuen com a reguladors positius o activadors de Ras mentre que els GAPs inhibeixen la transducció de senyals mediada per Ras (Bourne et al. 1991).

4.1 Activació de Ras

Els estímuls que activen la via de Ras comprenen una gran varietat de molècules com hormones, factors de creixement o factors de diferenciació. Aquests arriben a la part externa de la membrana cel·lular i interaccionen amb un receptor, induint la seva dimerització. Exemples d'aquests tipus de receptors són els receptors tirosina quinasa, els de citoquines o els de cèl·lules T. Com a conseqüència es produeix una autofosforilació en residus de tirosina, que faran de lloc d'acoblament del domini SH2 de la proteïna adaptadora Grb2. Aquesta, mitjançant el seu domini SH3, és l'encarregada de reclutar al factor intercanviador de guanines SOS. Aquesta proteïna és una GEF, i per tant intercanvia GDP per GTP, cosa que fa canviar de conformació a Ras i l'activa (Figura 6). Ras activat és responsable de transduir un gran nombre de senyals. Així Ras és capaç d'activar proteïnes com Raf, PI3K o RASSF1 entre altres (Vojtek and Der 1998), totes elles membres de diferents vies d'activació (Figura 7).

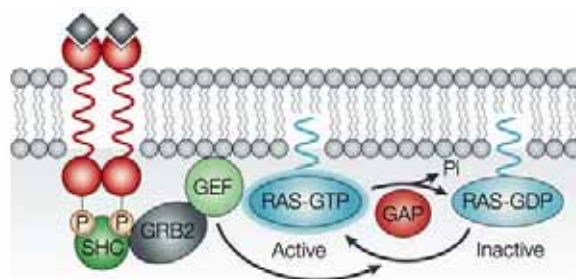


Figura 6. Activació de Ras (Downward 2003).

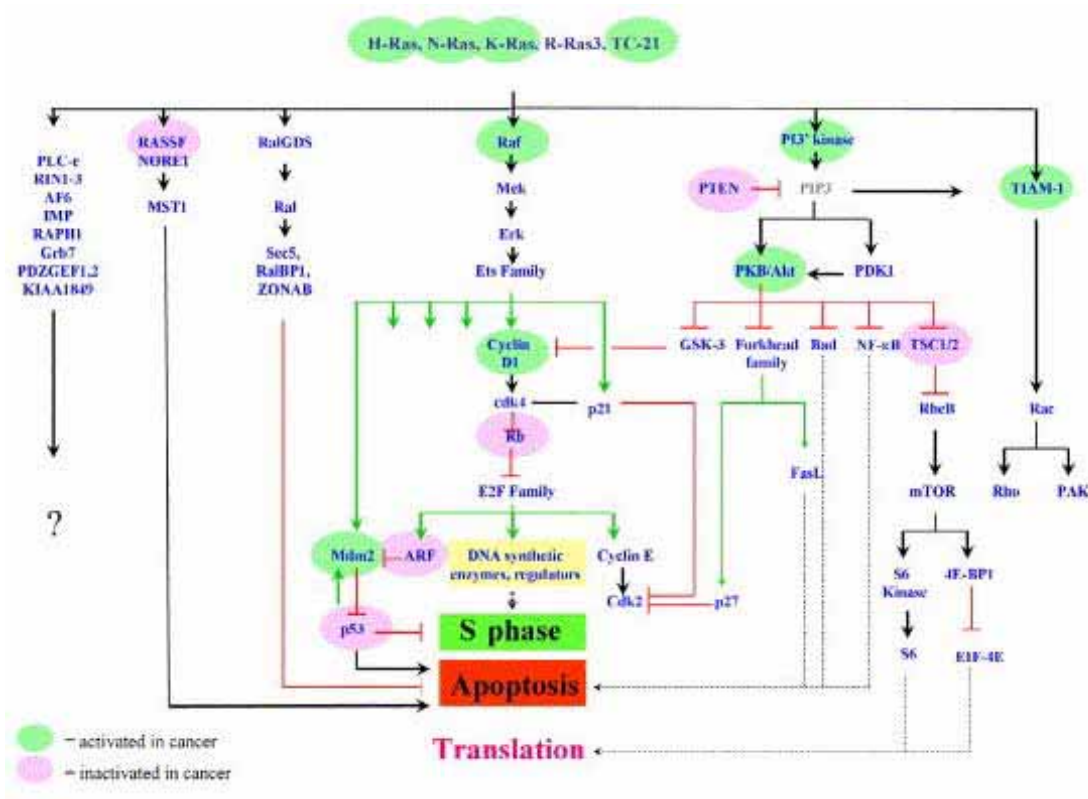


Figura 7. Vies activades per Ras (Rodríguez-Viciano and McCormick 2005).

4.2 Els gens i les proteïnes Ras: KRAS, HRAS i NRAS

La superfamília de Ras és un grup de proteïnes d'unió al nucleòtid guanina d'entre 20 i 25 kDa que comparteixen una homologia estructural. Està formada per més de 60 membres en mamífers i segons tant la seqüència primària com l'activitat biològica es divideix en les subfamílies de Ras, Rho, Rab, Arf, Ran i Rad/Gem (Bourne et al. 1990, Bos 1997). S'han identificat moltes proteïnes Ras en eucariotes com fongs, mosques, granotes o nemàtodes. Les cèl·lules de mamífer codifiquen tres gens Ras funcionals, KRAS, HRAS i NRAS, que presenten una estructura i funció similar. Estan formats per quatre exons codificants més un exó no codificant a l'extrem 5' (exó ϕ) i difereixen àmpliament en les seqüències i tamany intrònics. La seqüència genòmica humana avarca 3 Kb en el cas de HRAS, 7 Kb en el de NRAS i més de 35 Kb en el de KRAS. A més tots tres gens estan situats en cromosomes diferents. El quart exó de KRAS té dos variants alternatives (4A i 4B) que donen lloc a les proteïnes isomòrfiques KRAS-4A i KRAS-4B. Les seves diferències es donen només als últims 25 aminoàcids de l'extrem carboxi-terminal (Barbacid 1987, Lowy and Willumsen 1993). El pes de les

proteïnes Ras és de 21 kDa, on KRAS-4A, HRAS i NRAS contenen 188 aminoàcids per 189 de KRAS-4B.

Els primers 84 aminoàcids del costat amino terminal de les quatre proteïnes són idèntics, i del 85 al 165 la homologia és del 85%. La part carboxi terminal només presenta un 4% d'homologia i es coneix com la zona hipervariable, que està formada per una seqüència d'unió o *linker* (residus 166-180 a HRAS i NRAS i 166-174 a KRAS) i una d'ancoratge (Figura 8). No obstant els últims quatre aminoàcids de l'extrem carboxi terminal corresponen a la seqüència altament conservada CAAX, on C correspon a una cisteïna, les dues A a qualsevol residu alifàtic i la X a qualsevol aminoàcid sense càrrega. El remarcable grau de conservació que hi ha entre espècies tan allunyades evolutivament com els llevats i els humans suggereix que els productes dels gens Ras juguen un paper fonamental en processos cel·lulars claus. Tots tres gens s'han trobat conservats en totes les espècies de mamífers estudiades, cosa que suggereix que les duplicacions que van donar lloc als tres gens van tenir lloc abans de la formació dels mamífers en l'evolució.

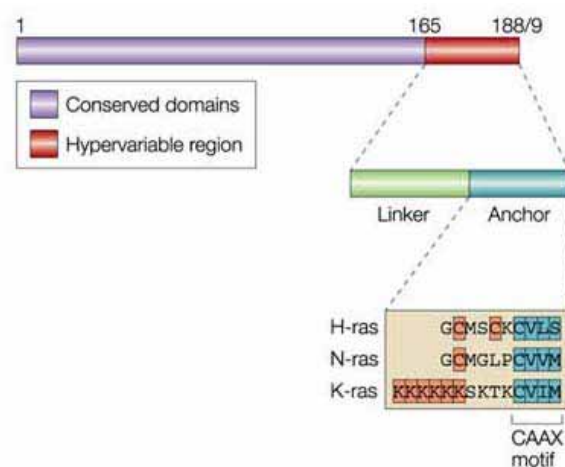


Figura 8. Estructura dels dominis de les proteïnes Ras (Hancock 2003). Els residus en blau són el primer senyal d'ancoratge a membrana: la seqüència CAAX; en taronja són el segon: llocs de palmitolació a HRAS i NRAS i sis lisines contínues a KRAS.

Els promotors dels tres gens Ras tenen un alt contingut en GC i no tenen caixa TATA, característica típica dels gens d'expressió constitutiva (*housekeeping genes*). En mamífers els tres gens Ras s'expressen en tots els tipus cel·lulars i òrgans, tot i que hi ha certes diferències en el nivell d'expressió de cadascun d'aquests gens en el desenvolupament embrionari i en alguns teixits adults (Furth et al. 1987, Leon et al.

1987). KRAS-4A presenta un patró d'expressió més restrictiu (Pells et al. 1997). El diferent patró d'expressió de les quatre proteïnes Ras suggereix una diferència funcional, tot i que al menys un gen ras sempre s'expressa en tots els tipus cel·lulars. En canvi els nivells de ARNm de Ras semblen ser bàsicament constants a la cèl·lula ja que la regulació de l'activitat de Ras es fa per la seva unió a GDP o GTP. L'activitat de la proteïna Ras s'indueix amb sèrum i segons l'assaig usat entre el 0,3 i 5% de les 20.000-30.000 molècules de proteïna Ras per cèl·lula estan en la seva forma activa unida a GTP en cèl·lules NIH3T3 suplementades amb sèrum fetal (Lowy and Willumsen 1993, Scheele et al. 1995). Tot i així no només augmenta l'activitat sinó que l'expressió dels tres gens ras augmenta lleugerament de forma sèrum-depenent (Quincoces and Leon 1995). Ademés també s'ha descrit una regulació en la inducció transcripcional dels gens Ras, sent aquesta inducció depenent d'un element localitzat fora del promotor (Quincoces et al. 1997).

Les proteïnes Ras es sintetitzen en ribosomes lliures al citoplasma i tenen una vida mitja de 24 hores com a mínim (Ulsh and Shih 1984). Les proteïnes Ras són sintetitzades com precursors citosòlics que experimenten processos postraduccionalment per poder associar-se a les membranes cel·lulars. La primera modificació està dirigida per la seqüència CAAX de l'extrem carboxi-terminal. Primer, l'enzim citosòlic farnesiltransferasa uneix un grup farnesil al residu de cisteïna de la seqüència CAAX (Reiss et al. 1990). Després, la seqüència CAAX farnesilada dirigeix Ras a la superfície citosòlica del reticle endoplasmàtic on una endopeptidasa, Rce1, treu el tripèptid AAX (Boyartchuk et al. 1997, Kim et al. 1999, Otto et al. 1999). Després el grup α -carboxil de la que ara és una farnesil-cisteïna carboxi terminal és metilada per una isoprenilcisteïna carboxil metiltransferasa (Icmt) (Hrycyna et al. 1991, Dai et al. 1998), donant lloc a una proteïna més hidrofòbica amb més afinitat per a les membranes. KRAS és metilat molt més eficientment, però se'n desconeix el perquè (Choy et al. 1999). Finalment, després de la metilació, les proteïnes Ras agafen una ruta de dues possibles a la superfície de la cèl·lula, que està dictada per un segon senyal que està localitzat immediatament al costat aminoterminal de la cisteïna farnesilada (Hancock et al. 1990, Hancock et al. 1991). HRAS i NRAS experimenten una palmitolació als residus de cisteïnes de la zona hipervariable i entren a la via exocítica, anant a través del Golgi a la membrana plasmàtica (Choy et al. 1999, Apolloni et al. 2000). KRAS, que té una seqüència polilisina enlloc dels residus de cisteïnes, evita l'entrada al Golgi i arriba a la membrana plasmàtica per un mecanisme actualment desconegut (Choy et al. 1999,

nucleòtids guanina amb gran afinitat i com a mínim quatre dominis estan involucrats en aquesta unió: els residus 10-18, involucrats en la unió a les fosfatases α i β , els residus 57-63, involucrats en la unió al magnesi i a la fosfatasa γ en la forma unida a GTP, i les regions dels residus 116-119 i 144-147, ambdós importants per a la unió de l'anell de guanina (Lowy and Willumsen 1993). De totes formes les principals diferències entre les formes unides a GDP i GTP semblen estar limitades a dos girs de la proteïna: el *switch* I, que avarca els residus 30-38 (gir o *loop* 2), i el *switch* II, que avarca els residus 60-76 (hèlix 2 i gir o *loop* 4) (Figura 10) (Wittinghofer and Pai 1991, Ma and Karplus 1997). Aquestes regions contenen residus hidrofílics localitzats a la superfície externa de la molècula. Les regions *switch* estan properes al fosfat γ de GTP i exhibeixen diferents conformacions depenent de si està unit el GDP o el GTP. La regió *switch* I és el principal lloc d'unió i és en part responsable d'interaccions amb GAPs i efectors. Les interaccions dels GEFs amb Ras són, en part, amb la regió *switch* II. Així, els canvis conformacionals d'aquestes dues regions en el cicle GTP estan involucrades en la unió a proteïnes reguladores i en la transducció del senyal als efectors.

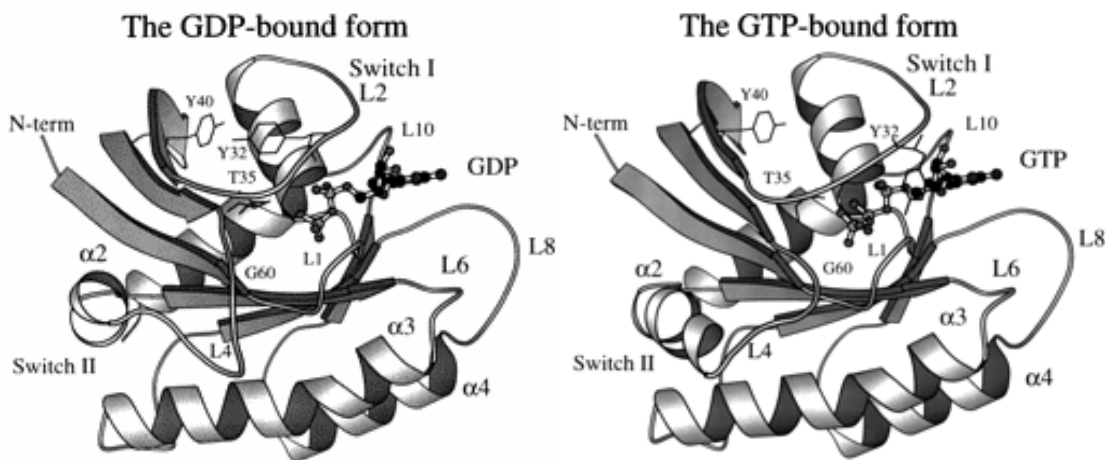


Figura 10. Representació esquemàtica de les estructures de Ras-GDP (esquerra) i Ras-GTP (dreta) (Wittinghofer and Pai 1991, Ma and Karplus 1997).

4.3 Activació oncogènica de Ras

Els tres gens Ras presenten mutacions puntuals, somàtiques i activants en aproximadament el 30% de tots els tumors sòlids (Bos 1989), fet que els converteixen en una de les alteracions genètiques més freqüents en càncer. Aquestes mutacions activants també es detecten a lesions premalignes, suggerint que tenen un paper

potencial en l'iniciació del tumor. Les mutacions de Ras apareixen durant la vida d'individus sans i poden romandre silencioses fins que apareguin altres alteracions genètiques. Aquestes mutacions oncogèniques mantenen a la proteïna en la seva forma activa unida a GTP de forma constitutiva. Cèl·lules 3T3 transformades per oncogens Ras activats contenen un 29% de la proteïna Ras unida a GTP per un 0,3% a les mateixes cèl·lules però amb el protooncogen (Scheele et al. 1995). Totes les mutacions activants provoquen dos canvis bioquímics principals a la proteïna Ras, que són activitat GTPasa deteriorada o intercanvi facilitat de GDP/GTP, depenent de la localització de la mutació. D'aquesta forma l'activitat GTPasa deteriorada s'associa amb les mutacions de les posicions 12, 13, 59, 61 i 63, mentre que l'intercanvi facilitat de GDP/GTP s'associa a les mutacions de les posicions 16, 17, 116, 117, 119, 144 i 146 (Bollag and McCormick 1991, Lowy and Willumsen 1993). No obstant casi totes les mutacions que presenten els gens ras es troben als codons 12 ó 13 (a l'exó 1) ó 61 (a l'exó 2), que redueixen l'activitat GTPasa intrínseca de la proteïna i la deixen insensible a l'acció de les GAPs (Bos 1989). Com a conseqüència el GTP no es pot hidrolitzar i el senyal es dona de forma constitutiva i independent del estímuls exteriors (Bos 1989).

L'estructura resultant de la cristal·lització de les proteïnes Ras mutades és casi igual que la de les Ras salvatges (Krengel et al. 1990, Tong et al. 1991). Les úniques diferències significatives es veuen en el gir o *loop* 4 i a prop del fosfat gamma. El residu de glicina de la posició 12 es troba a prop del *finger loop* de les proteïnes GAP, que complementa amb el lloc actiu de Ras. Qualsevol mutació en aquesta posició resulta en l'incorporació d'un residu amb una cadena lateral (la glicina és l'únic aminoàcid sense cadena lateral) que interferiria amb la geometria de l'estat transitori en el que el GTP és hidrolitzat en presència dels GAPs. El codó 13 també codifica per una glicina adjacent i per tant podria ser que tingués un efecte semblant en l'interacció de Ras amb les GAPs, tot i que això no s'ha demostrat. L'altre posició que sol presentar mutacions és el codó 61, que codifica per una glutamina i té un paper vital en la catàlisi ja que forma un pont d'hidrogen amb un residu específic de GAP p120 (R789) que permet l'atac nucleofílic d'una molècula d'aigua que és crucial per a la hidròlisi del GTP. Per tant les mutacions en aquest residu resulten en una estabilització reduïda de l'estat transitori i una activitat GTPasa alterada (Krengel et al. 1990, Tong et al. 1991).

Segons el teixit, el gen Ras en concret que es troba mutat és diferent (Taula 3). El que muta més freqüentment és KRAS (85%), seguit de NRAS (15%) i de HRAS

(menys de l'1%). A més també canvia la freqüència del codó en concret que pateix la mutació (Bos 1989), tot i que hi ha molts canvis aminoacídics possibles dins de cada codó. Per exemple les mutacions de KRAS en CCR es donen sobretot al codó 12 i en menor freqüència al 13 (Taula 4) (Samowitz et al. 2000).

| Tipus de tumor | Freqüència (%) | Gen Ras |
|------------------------------------|----------------|---------|
| Pàncreas | 90 | K |
| Tiroides (papil·lar indiferenciat) | 60 | H, K, N |
| Tiroides (folicular) | 55 | H, K, N |
| Colorectal | 45 | K |
| Seminoma | 45 | K, N |
| Síndrome mielodisplàstica | 40 | K, N |
| Pulmó (cè·l·lula no petita) | 35 | K |
| Fetge | 30 | N |
| Leucèmia mielògena aguda | 30 | N |
| Melanoma | 15 | N |
| Bufeta | 10 | H |
| Ronyó | 10 | H |

Taula 3. Mutacions de Ras a diferents teixits (Downward 2003).

| Mutació | Triplet | Aminoàcid | Freqüència (%) |
|---------|--------------------|--------------------|----------------|
| G12D | GGT → G A T | Glicina → Aspàrtic | 10 |
| G12V | GGT → G T T | Glicina → Valina | 6,8 |
| G13D | GGC → G A C | Glicina → Aspàrtic | 6,7 |
| G12C | GGT → T GT | Glicina → Cisteïna | 3 |
| G12S | GGT → A GT | Glicina → Serina | 2,2 |
| G12A | GGT → G C T | Glicina → Alanina | 1,1 |

Taula 4. Freqüències de les mutacions més habituals de KRAS en CCR (Samowitz et al. 2000).

4.4 La via Ras/Raf/MAPK

Aquesta via està evolucionadament conservada i està implicada en el control de molts processos cel·lulars fonamentals com proliferació, apoptosi, motilitat i metabolisme. Els primers efectors de Ras identificats en mamífers van ser la família de quinases de Raf. L'habilitat en que Raf s'uneix a Ras de forma GTP dependent tant *in vitro* com *in vivo* és una clara evidència del paper que té Raf com a efector directe de Ras (Moodie et al. 1993, Vojtek et al. 1993, Warne et al. 1993, Zhang et al. 1993). D'aquesta forma Raf forma part d'un sistema de senyalització conservat que transdueix els senyals des de la superfície cel·lular fins al nucli. Ras activat provoca que es transloquin del citosol a la membrana dues proteïnes: Raf i KSR1. Mentre que en el cas de Raf ho fa per interacció directa amb el seu domini efector, en el cas de KSR1 ho fa indirectament. KSR1 es manté segregat al citosol per la unió de 14-3-3 i per la fosforilació induïda per IMP (Matheny et al. 2004). Quan Ras està activat i per tant unit a GTP indueix la unió de la subunitat B de la fosfatasa-2A (PP2A) a les subunitats A i C, que estan associades constitutivament a KSR1 (Muller et al. 2001). Això provoca la defosforilació de S392 de KSR1 i conseqüentment la dissociació de 14-3-3 del seu lloc d'unió a KSR1, que es translocarà a la membrana cel·lular (Muller et al. 2001). A més, Ras-GTP s'uneix a IMP, que llavors s'autoubiquitinitza i es degrada (Matheny et al. 2004) (Figura 11).

Quan Raf es troba a la membrana cel·lular pateix un procés d'activació. Fosfatases com PP2A treuen fosforilacions inhibitories (Abraham et al. 2000), mentre que moltes quinases com PAK3, la família de tirosin quinases Src o d'altres encara no identificades fosforilen i activen Raf. Cap d'aquests canvis és capaç d'activar completament a Raf per si sols (Chong et al. 2001) ja que han de cooperar entre ells per ajustar el nivell d'activació apropiadament segons l'estímul específic. KSR1 pot unir-se a Raf, MEK i ERK però només ho està de forma constitutiva amb MEK (Morrison 2001). Per tant quan tenim a KSR1 i a Raf activat a la membrana, Raf pot interaccionar tant amb MEK1 com amb MEK2 i els fosforila i activa (Kyriakis et al. 1992) amb el suport físic que KSR1 dona a aquesta interacció. Pel contrari, RKIP pot interrompre físicament la interacció entre Raf i MEK, provocant la inhibició de la via (Yeung et al. 1999). MEK1 i MEK2 són quinases d'especificitat dual que un cop activades també fosforilen i activen a ERK1 i ERK2 (Ahn et al. 1991, Gomez and Cohen 1991), igualment amb el suport físic de KSR1. Al contrari que Raf i MEK, ERK té nombrosos

substrats com p90^{S6}, cPLA2 o PHAS-1 (Marshall 1995). La fosforilació d'ERK provoca la seva homodimerització (Khokhlatchev et al. 1998) i la seva translocació al nucli, on per fosforilació directa és capaç d'activar varis factors de transcripció com Elk-1 o Ets-2. Aquests factors estan implicats en la formació de complexos ternaris en els elements de resposta al sèrum (SRE) (Gille et al. 1992), que regulen l'expressió de gens primerencs com c-fos o HB-EGF i eventualment la proliferació cel·lular (Marshall 1994, Treisman 1996). Ademés ERK intervé en l'expressió gènica a través de la fosforilació i activació de p90^{RSK2}, que fosforila a CREB per activar el seu potencial transactivador (Xing et al. 1996).

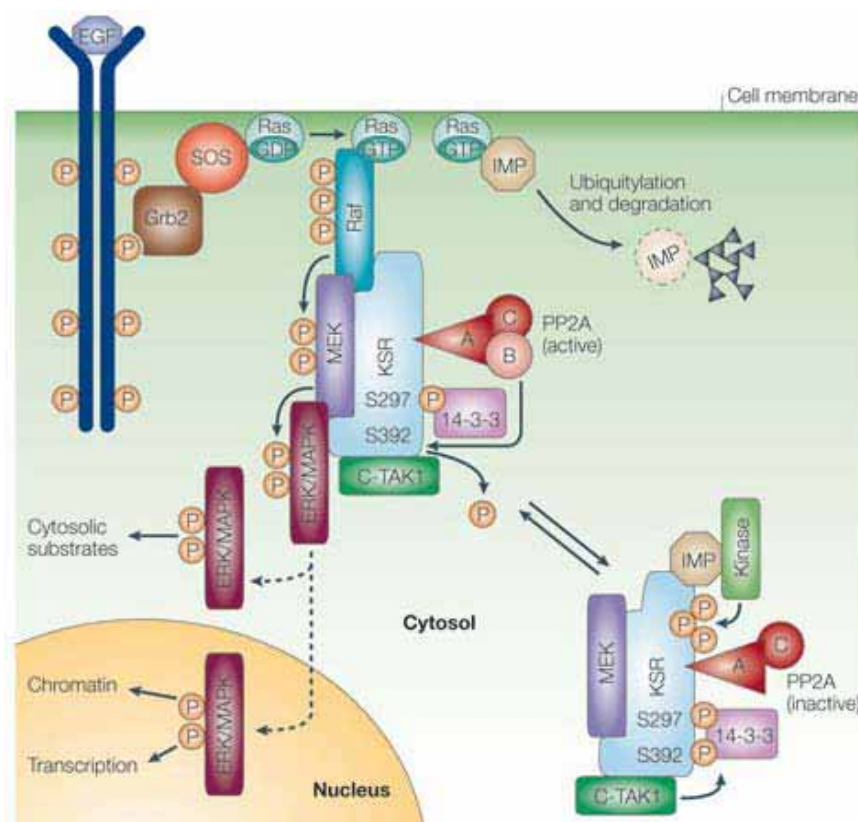


Figura 11. La via Ras-Raf (Kolch 2005).

4.5 Els gens i les proteïnes Raf: BRAF, ARAF i CRAF

En humans els gens Raf formen una família composta per tres isoformes: BRAF, ARAF i CRAF (també conegut com a Raf-1). Totes tres proteïnes són serina/treonina quinases situades a cromosomes diferents però que comparteixen tres regions altament conservades (CR1, CR2 i CR3) encaixades entre seqüències variables molt

diferenciades entre les tres isoformes. CR1 té dos dominis d'unió a Ras-GTP (RBD i CRD) (Mott et al. 1996), i també un domini putatiu d'unió a zinc (Beck et al. 1987, Ghosh and Bell 1994). CR2 és rica en serines i treonines, algunes de les quals són llocs de fosforilació reguladoris. CR3 conté el domini quinasa, que és el domini més homòleg entre les proteïnes Raf (Daum et al. 1994, Morrison and Cutler 1997) (Figura 12). A més, dins d'aquest domini quinasa, hi ha un gir ric en glicines (o *G-loop*) i el segment d'activació. El gir ric en glicines és una regió localitzada a la part amino terminal del domini quinasa i que s'identifica per la seva seqüència consens Gly-X-Gly-X-X-Gly (sent X qualsevol aminoàcid) i que funciona com un gir flexible que ancora els fosfats β i γ de l'ATP per orientar-los dins la zona catalítica (Johnson et al. 1998). Aquesta seqüència està altament conservada a les proteïnes quinases, on la primera glicina es troba en el 95% de totes elles, la segona a més del 99% i la tercera en el 85% (Hemmer et al. 1997). Finalment el segment d'activació és una regió a les proteïnes quinases, flanquejat per seqüències casi invariables DFG i APE, on la majoria de quinases pateixen les fosforilacions reguladores (Johnson et al. 1998).

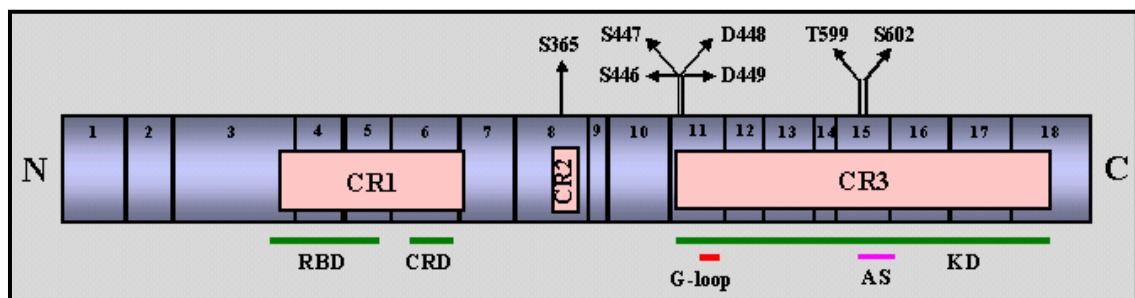


Figura 12. Diagrama de la proteïna BRAF a escala. Els números dins de les caixes blaves indiquen l'exó d'on es tradueix cada part de la proteïna. Les fletxes indiquen els principals llocs de fosforilació. També s'indiquen les regions conservades amb les altres proteïnes Raf (ARAF i CRAF); RBD: *Ras Binding Domain*; CRD: *Cysteine Rich Domain*; KD: *Kinase Domain*; *G-loop*: Gir ric en glicines; AS: Segment d'activació.

Nota: L'agost del 2004 es va fer una actualització de la seqüència de BRAF que afegia tres nucleòtids a l'antiga. Així, la numeració de tots els aminoàcids carboxi terminals a la prolina del codó 32 que s'havia utilitzat fins aquell moment és incorrecta (Wellbrock et al. 2004a). No obstant s'ha de tenir en compte que des de llavors hi ha publicacions que utilitzen tant la nova numeració correcta com l'antiga per mantenir una continuïtat amb les dades publicades anteriorment. Aquí utilitzarem la nomenclatura correcta ja corregida.

Les proteïnes Raf estan subjectes a una regulació complexa, que està reflectida per la presència de nombrosos llocs de regulació distribuïts al llarg de les proteïnes. Alguns d'aquests llocs estan conservats en totes tres proteïnes, indicant mecanismes comuns de regulació, però d'altres no estan conservats, demostrant que aquestes proteïnes poden estar regulades independentment. ARAF és la isoforma més petita, de 68 kDa, mentre que CRAF té 74 kDa. BRAF està subjecte a processaments (*splicing*) alternatius, donant lloc a una variant de proteïnes d'entre 75 i 100 kDa (Storm et al. 1990, Barnier et al. 1995). Així hi ha un mínim de 10 isoformes diferents de BRAF en teixit de ratolí adult d'expressió variable segons el teixit (Storm et al. 1990, Barnier et al. 1995). Aquests es formen pel processament diferencial dels exons 8b i 10a, i també per la presència de dos extrems aminoterminals diferents. Les formes llargues de BRAF contenen 115 aminoàcids addicionals codificats pels exons 1, 2 i part del 3. No està clar si aquests extrems diferents sorgeixen per l'ús de promotors diferents, per l'ús de punts de traducció diferents amb el mateix promotor o per processament alternatiu. L'exó 8b està format per 36 nucleòtids entre els exons 8 i 9 que està en el mateix marc de lectura que la seqüència codificant de BRAF. Les versions de l'ADNc de BRAF que contenen aquest exó es detecten al sistema nerviós central, cor, ovari, testicle i melsa. L'exó 10a està format per 120 nucleòtids entre els exons 9 i 10 i mostra un patró d'expressió més restrictiu, sent més abundant al teixit neuronal.

Els primers estudis van establir que l'ARNm de CRAF s'expressa ubicuament, però que en canvi ARAF i BRAF presenten una expressió més restrictiva, on l'ARNm d'ARAF s'expressa particularment més en òrgans urogenitals i el de BRAF en els teixits neuronals (Storm et al. 1990, Barnier et al. 1995). De totes formes, estudis més recents han observat que ARAF també és bastant ubicu a la majoria dels teixits de ratolins embrionaris i d'adults (Luckett et al. 2000), i que BRAF també s'expressa en un gran nombre de teixits, tot i que a un nivell més baix que als teixits neuronals.

Ras en la seva forma activada per l'unió de GTP s'uneix al domini RBD de Raf directament, i també forma interaccions secundàries amb el domini CRD. Aquesta última unió és independent de l'estat de GDP/GTP de Ras. Ja que Ras està predominantment unit a la cara interna de la membrana plasmàtica, aquesta unió recluta a Raf a la membrana plasmàtica (Hancock 2003), i tot i que per si mateix això és insuficient per estimular la seva activitat quinasa, és el procés iniciador de l'activació de Raf. Tot i que aquest pas sembla ser relativament simple, està subjecte a una regulació

complexa. Les quatre proteïnes Ras que hi ha en humans tenen diferències clares en les seves afinitats per a unir-se al domini RBD de cada proteïna Raf individual (Weber et al. 2000). Encara que no es coneix el significat d'això, dona potencial a una possible regulació diferencial. Les proteïnes Ras individuals es localitzen en diferents microdominis a les membranes (Hancock 2003), per tant unint-se amb les diferents isoformes de Ras les proteïnes Raf estaran exposades a diferents ambients que podrien afectar la seva activitat.

L'estudi del procés d'activació de les proteïnes Raf s'ha focalitzat més en CRAF que en les altres dues isoformes. Sobre l'activació de CRAF, ve donada per tres defosforilacions en llocs inhibitoris i per cinc fosforilacions en llocs activadors en certs residus concrets de la proteïna. Sobre els llocs inhibitoris, CRAF presenta tres serines fosforilades per PKA quan hi ha nivells alts d'AMPc: S43, S233 i S259 (Wu et al. 1993). Aquesta última serina també es pot fosforilar per AKT (Zimmermann and Moelling 1999). Aquestes fosforilacions funcionen independentment per mantenir a CRAF inhibida ja que S43 fosforilat obstaculitza l'unió de Ras a l'extrem amino terminal de CRAF (Wu et al. 1993) i S233 i S259 formen llocs d'unió a la proteïna 14-3-3 (Dumaz and Marais 2003). Llavors Ras i PP2A cooperen per defosforilar a S259 i ajudar a la seva activació (Ory et al. 2003). El mecanisme de defosforilació de les altres dues serines encara està sota discussió. Sobre els llocs activadors, que estan dins o flanquejant el domini quinasa, són S338, Y341, T491, S494 i S621. La fosforilació de S621 provoca la desunió de 14-3-3 a la part carboxi terminal i per tant la seva activació (Tzivion et al. 1998, Yip-Schneider et al. 2000). De totes formes no està clar si aquesta fosforilació està regulada o no. Els primers estudis van trobar que aquesta fosforilació de S621 no canviava durant l'activació de CRAF (Fabian et al. 1993), però informació més recent implica que aquest lloc està subjecte a una regulació molt ràpida i transitòria (Hekman et al. 2004). Sobre els residus S338 i Y341 estan localitzats al costat amino terminal de CR3, en un subdomini anomenat regió N, nom que ve del fet que una càrrega negativa és essencial per a l'activitat quinasa de CRAF dins d'aquesta regió (Fabian et al. 1993). SRC i la família de quinases SRC sembla que fosforilen Y341 *in vitro* i en cultiu cel·lular (Fabian et al. 1993), i s'ha proposat que la fosforilació de la regió N pot superar la funció inhibitoria de l'extrem amino terminal del domini quinasa (Tran and Frost 2003). La quinasa que fosforila de S338 encara s'ha identificar, tot i que s'ha proposat que podrien ser les proteïnes PAK (King et al. 1998). Això és perquè PAK realment fosforila S338, però ho fa al citosol de forma Ras independent, mentre

que està ben establert que S338 es fosforila a la membrana plasmàtica de forma Ras dependent (King et al. 1998, Chiloeches et al. 2001). Finalment la fosforilació de T491 i S494, que estan dins del segment d'activació, són essencials per a l'activació de CRAF (Chong et al. 2001). De totes formes les quinases implicades en aquestes fosforilacions encara no s'han identificat, i podria ser possible que estiguessin subjectes a una autofosforilació de Raf.

La fosforilació d'ARAF sembla que imita a la de CRAF. Els cinc llocs de fosforilació necessaris per estimular l'activitat de CRAF estan conservats a ARAF, i a grans trets ARAF s'activa per mecanismes semblants als de CRAF (Marais et al. 1997). El cas de BRAF és diferent ja que només quatre dels cinc llocs de fosforilació estan conservats i d'aquests només tres semblen tenir funcions similars a BRAF. L'equivalent de S621 a BRAF és S729 i també es creu que intervé en la unió de 14-3-3 a la zona carboxi terminal de BRAF, tot i que això no s'ha provat rigorosament. Similarment la fosforilació dels llocs al segment d'activació T599 i S602 és essencial per a l'activació de BRAF (Zhang and Guan 2000). En canvi la regulació mediada per la regió N és completament diferent en BRAF que en CRAF. La diferència més clara és que BRAF no té cap residu de tirosina equivalent al Y341 de CRAF. En aquesta posició BRAF conté un àcid aspàrtic. Ademés, encara que la posició equivalent a S338 està conservada a BRAF (S446), aquest lloc està fosforilat constitutivament, cosa que no passa a CRAF (Mason et al. 1999). Per tant, mentre que a ARAF i CRAF la regió N ha d'estar carregada per estar actius, a BRAF la regió N està carregada negativament de forma constant i conseqüentment BRAF té un activitat quinasa basal molt elevada en comparació amb CRAF (Mason et al. 1999). El resultat d'això és que BRAF sembla estar preparat per a l'activació i només requereix el reclutament a la membrana mediat per Ras per a l'activació. En contra, ARAF i CRAF necessiten altres activacions de tirosin quinases com SRC, alhora que de quinases desconegudes pel residu S338 de CRAF i pel S299 d'ARAF. La cristal·lització del domini quinasa de BRAF (Wan et al. 2004) ha permès fer un model sobre la seva activació (Wellbrock et al. 2004a). La quinasa està plegada en una conformació que és típica de les quinases actives, però hi ha una interacció intramolecular atípica entre el gir ric en glicines i el segment d'activació que desplaça el segment d'activació i atrapa BRAF en una conformació inactiva (Wan et al. 2004). T599, un dels llocs de fosforilació del segment d'activació, resta amagat dins d'aquest domini. Quan aquest lloc és substituït per una alanina, BRAF no es pot activar (Zhang and Guan 2000), presumiblement perquè no es pot fosforilar. En canvi,

quan T599 és substituït per una isoleucina, que és una mutació que s'ha trobat en baixa freqüència en càncer, BRAF s'activa fortament. Basant-se en aquestes dades, el model proposat pressuposa que la cadena abultada de la isoleucina trencaria l'interacció entre el gir ric en glicines i el segment d'activació, alliberant-lo i permetent a la quinasa plegar-se en la seva conformació activa. De forma similar, la fosforilació de T599 també trencaria l'interacció entre el gir ric en glicines i el segment d'activació i permetria la formació de la conformació activa, proporcionant una explicació satisfactòria de com la fosforilació pot activar a BRAF.

Tot i que l'únic substrate de les proteïnes Raf àmpliament acceptat són MEK1 i MEK2, varis estudis han indicat que les proteïnes Raf de mamífer podrien tenir altres efectors. Un d'aquests candidats és IκB, un regulador negatiu de NF-κB, del que es va publicar que CRAF fosforilava i induïa la seva degradació (Li and Sedivy 1993). Però treballs posteriors van demostrar que CRAF no era el responsable de la fosforilació de IκB sinó la casein quinasa II (CK2), un contaminant de la preparació de CRAF (Janosch et al. 1996). Per tant, tot i que CRAF sembla poder activar NF-κB, el mecanisme no està clar donat que no implica una fosforilació directa a NF-κB per CRAF. Tampoc no sembla requerir la via de MEK-ERK ja que una versió dominant negativa de MEK no bloqueja l'activació de NF-κB mediada per CRAF (Baumann et al. 2000). Aquestes dades impliquen que existeix un substrate no identificat de CRAF. Curiosament s'ha demostrat que mutants activadors de BRAF també activen NF-κB (Ikenoue et al. 2003), indicant que BRAF podria senyalitzar aquest factor de transcripció. Altres substractes que s'ha proposat per CRAF són la fosfatasa CDC25C (Galaktionov et al. 1995) i RB (Wang et al. 1998), ambdós reguladors del cycle cel·lular. Tot i que s'ha demostrat que la fosforilació d'aquests substractes mediada per CRAF afecta a la seva activitat, la rellevància fisiològica no està clara i no s'han fet més estudis sobre el tema. CRAF també s'uneix a BAG1, una proteïna antiapoptòtica que s'uneix al factor de supervivència BCL2 (Wang et al. 1996a, Wang et al. 1996b). Així s'ha proposat que CRAF o una altra quinasa associada podria fosforilar a BAD, proteïna proapoptòtica, i així estimular la supervivència cel·lular (Troppmair and Rapp 2003). A més, CRAF es pot unir al domini regulador d'ASK1, un inductor d'apoptosi, i suprimir la seva activitat pro-apoptòtica (Chen et al. 2001). I només en les condicions apropiades ASK1 pot lliberar-se de CRAF per induir apoptosi. La unió d'aquestes proteïnes és independent de l'activitat quinasa de CRAF. Per tant CRAF sembla que protegeix a les cèl·lules de l'apoptosi de forma quinasa independent, possiblement fent d'adaptador de proteïnes

com ASK1. També s'ha demostrat que ARAF i CRAF regulen la progressió del cicle cel·lular en cèl·lules de melanoma de forma MEK-ERK independent (Karasarides et al. 2004), i per tant ARAF i CRAF podrien tenir funcions independents de la seva habilitat per senyalitzar a través de MEK-ERK. Finalment, formes mutants de BRAF en càncer són incapaces de fosforilar MEK *in vitro*, però tot i així poden activar MEK a les cèl·lules (Ikenoue et al. 2003, Wan et al. 2004). Això sembla passar perquè BRAF activa CRAF, que és el responsable de l'activació de MEK i ERK (Wan et al. 2004). A més BRAF salvatge també activa CRAF. Per tant s'ha demostrat que CRAF és un efector de BRAF i s'ha establert un nou model en la senyalització de Raf que representa un nou paradigma en l'acció dels oncogens.

Tot i que les tres isoformes de Raf poden activar *in vitro* tant a MEK1 com a MEK2 (Marais et al. 1997) difereixen en la seva abilitat per fer-ho. En extractes cel·lulars, BRAF s'uneix i fosforila a ambdós MEKs més de forma més eficient que ARAF o CRAF (Papin et al. 1996, Marais et al. 1997), i estudis de fracció cel·lular demostren que la principal quinasa de MEK a les cèl·lules és BRAF i no CRAF (Catling et al. 1994, Jaiswal et al. 1994). Una forma induïble de BRAF estimula de forma més ràpida i robusta l'activitat d'ERK que constructes similars d'ARAF i CRAF (Pritchard et al. 1995). També fibroblastes embriònics de ratolins BRAF *-/-* tenen molt compromesa l'activitat d'ERK (Wojnowski et al. 2000), mentre que si són de ratolins ARAF *-/-* o CRAF *-/-* l'activació d'ERK és relativament normal (Huser et al. 2001, Mercer et al. 2002). Partint de totes aquestes observacions s'ha proposat que BRAF és el principal activador de MEK a les cèl·lules (Wellbrock et al. 2004a).

Dels tres gens Raf només BRAF presenta mutacions en càncer (Davies et al. 2002). La incidència més alta es dona a melanoma, amb un 70% dels casos, seguida de freqüències també altes al CCR, de tiroïdes i d'ovari, implicant fortament l'activació de BRAF en la tumorogènesis (Wan et al. 2004). Aquestes mutacions són puntuals, somàtiques i activants, i es troben en un 10% a l'exó 11 a les glicines del gir ric en glicines del domini quinasa, i el restant 90% a l'exó 15 dintre o adjacent al segment d'activació també del domini quinasa (Davies et al. 2002) (Figura 13). Però casi totes aquestes mutacions corresponen al mateix canvi nucleotídic T1799A, que a la proteïna comporta el canvi d'aminoàcid de la valina de la posició 600 a àcid glutàmic (V600E) (Davies et al. 2002). La majoria d'aquestes mutacions augmenten l'activitat quinasa de BRAF (Ikenoue et al. 2004) i la seva expressió en línies cel·lulars (Ikenoue et al. 2005)

o embrions de *Xenopus* (Wan et al. 2004) indueixen la fosforilació constitutiva de MEK1/2 i ERK1/2 endògen o cotransfectat. A més també són transformants ja que provoquen alteracions morfològiques a cèl·lules 3T3 (Ikenoue et al. 2004), augmenten la proliferació i/o creixement cel·lular, creixement en agar, requereixen menys factors de creixement (Ikenoue et al. 2004) i són tumorogèniques en ratolins atímics (Davies et al. 2002, Wellbrock et al. 2004b). A més a més, quan BRAF presenta la mutació V600E, ERK activa constantment, entre d'altres, a les ciclines D1, D2 i D3 i c-myc (provocant creixement), VEGT (angiogènesi), la integrina $\beta 3$ (invasió tisular i metastasi) i mdm2 (replicació, evasió de l'apoptosi i angiogènesi) (Mercer and Pritchard 2003). Tot i això, hi ha algunes mutacions de BRAF que presenten una disminució de l'activitat quinasa in vitro però que segueixen induint la fosforilació constitutiva d'ERK in vivo. Aquests mutants activen el CRAF endògen, possiblement per un mecanisme alostèric o de transfosforilació, i per tant provoquen la fosforilació constitutiva d'ERK (Wan et al. 2004).

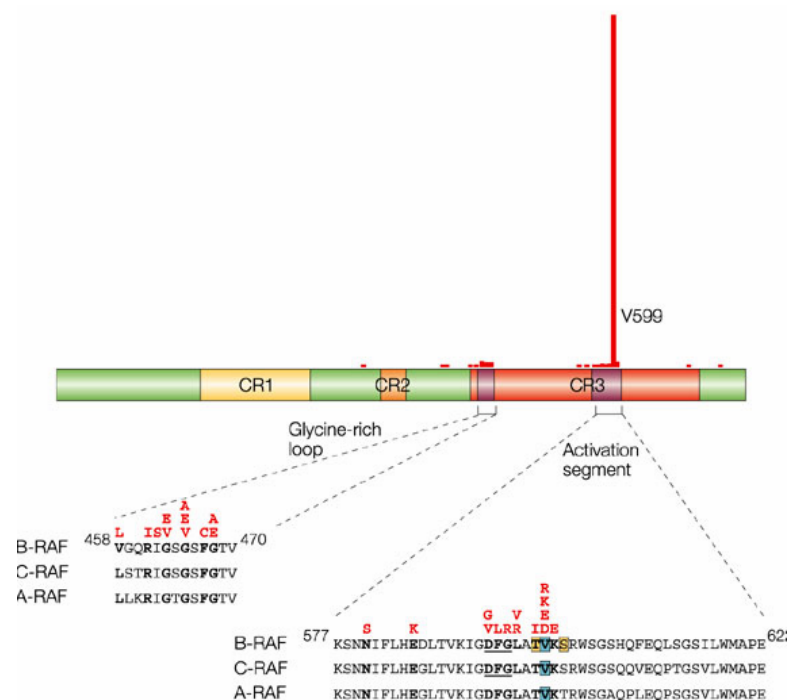


Figura 13. Mutacions de BRAF en càncer (Wellbrock et al. 2004a). La longitud de les barres indica la freqüència relativa de cada mutació en càncer. Els canvis aminoacídics més habituals estan indicats en vermell a sobre de la seqüència. En groc estan representats els llocs de fosforilació de BRAF i en blau la mutació V600E. La numeració utilitzada en aquesta figura és l'antiga.

El punt calent del codó 600, que està altament conservat a tots els gens Raf de diferents espècies, s'hipotetitza que imita a les fosforilacions dels residus adjacents T599 i S602 a l'introduir una càrrega negativa, i que per tant mantindria la proteïna activada de forma continua i independent dels estímuls exteriors. Encara està per explicar de quina manera les altres mutacions augmenten l'activitat quinasa. Les mutacions al segment d'activació no totes introdueixen càrregues negatives i de les del gir ric en glicines, mutacions semblants a la protein quinasa A, redueixen l'activitat quinasa (Hemmer et al. 1997, Grant et al. 1998). En alguns tumors s'han detectat algunes mutacions adjacents al gir ric en glicines, mentre que també s'han trobat a llocs de fosforilació consensuats per AKT (S365, S429 i T440) (Brose et al. 2002). Les mutacions en aquests llocs podrien permetre augmentar l'activitat quinasa de BRAF ja que s'ha proposat que AKT regula negativament l'activitat de BRAF (Guan et al. 2000). De totes formes encara no se sap com contribueixen aquestes mutacions a la tumorigenicitat.

Tot i que la majoria dels teixits que presenten mutacions a BRAF també en presenten a Ras, normalment els dos gens mutats no coincideixen en un mateix tumor (Davies et al. 2002). Això suggereix que les dues mutacions estarien afectant a la mateixa via, ja que es podria veure igualment afectada en un punt o en un altre amb els mateixos efectes tumorogènics i sense que les dues mutacions fossin sinèrgiques dins del tumor.

4.6 Altres vies de Ras

4.6.1 La família RASSF: Aquesta família està formada fins a l'actualitat per 6 proteïnes diferents que van des de RASSF1 fins a RASSF6 i que comparteixen una organització estructural similar. Els gens que les codifiquen formen tots molts transcrits diferents i contenen un domini d'unió a Ras per on fins ara s'ha demostrat que RASSF1, RASSF2, RASSF4 i RASSF5 (o Nore1) interaccionen directament amb la seva forma unida a GTP. El membre més estudiat és RASSF1A, que està involucrat en la regulació del cicle cel·lular, apoptosi i l'estabilitat dels microtúbuls (Shivakumar et al. 2002). D'aquesta forma els components d'aquesta família són supressors tumorals.

Els gens de la família RASSF tenen illes CpG als seus promotors i s'ha demostrat una correlació directa entre la metilació de RASSF1A i la seva pèrdua

d'expressió en un mínim de 37 tipus tumorals diferents utilitzant teixit normal com a control (Agathangelou et al. 2005, Pfeifer and Dammann 2005). Per tant, RASSF1A està involucrat en la carcinogènesi i a causa de l'alta freqüència de metilació que presenta en càncer és un candidat a marcador molecular pel diagnòstic tumoral (Agathangelou et al. 2005, Pfeifer and Dammann 2005). A més RASSF5A s'ha trobat metilat aberrantment a càncer de pulmó de cèl·lula no petita (Hesson et al. 2003), RASSF4 a càncer de pulmó i mama (Eckfeld et al. 2004) i RASSF2A a CCR (Akino et al. 2005, Hesson et al. 2005) i càncer gàstric (Endoh et al. 2005). En canvi, a RASSF3 no s'ha trobat metilació (Hesson et al. 2003) i sobre RASSF6 encara no s'ha publicat res.

4.6.2 PI3K: La fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) és una proteïna quinasa formada per molècules adaptadores p85 i per la subunitat catalítica p110, a la que Ras s'uneix i activa en una interacció que necessita GTP i cap altra proteïna més (Rodriguez-Viciano et al. 1994). PI3K catalitza la fosforilació del fosfatidilinositol (4,5)-bifosfat (PIP2) per formar fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfat (PIP3) com a resposta a molts factors de creixement i citoquines. Aquest segon missatger s'uneix a moltes proteïnes que contenen un domini anomenat d'homologia de pleckstrina, domini format per uns 100 aminoàcids i que facilita l'interacció amb PIP3. PI3K i els seus productes lipídics actuen en vies que controlen la proliferació i supervivència cel·lular i els canvis metabòlics, sovint a través de dues quinases, PDK1 i AKT (també coneguda per PKB). D'aquesta forma PDK1 és important per l'activació de molts membres de la família de serina-treonina quinases AGC, incluint a la mateixa AKT, però també d'altres com p70S6K, algunes PKCs i RSK. A la seva vegada AKT controla la supervivència, creixement i cicle cel·lular així com el metabolisme mitjançant fosforilacions activants o inhibidores a un gran nombre de diferents substrates (Shaw and Cantley 2006).

PI3K s'inhibeix per la fosfatasa lipídica PTEN, que treu el fosfat D3 a PIP3 per limitar i acabar la senyalització de PI3K a les cèl·lules (Maehama and Dixon 1998). S'han detectat mutacions germinals de PTEN en síndromes de càncer hereditaris i dominants amb símptomes superposats, com els síndromes de Cowden o de Bannayan-Zonana (Shaw and Cantley 2006), que presenten hamartomas. A més PTEN també presenta mutacions somàtiques amb una alta freqüència en diferents tipus de càncer. Ademés les vies que activa PI3K també poden presentar mutacions als seus gens en petita freqüència però en diferents tumors, indicant que els gens mutats probablement

tenen efectes tumorigènics equivalents i que operen a través de la mateixa via (Parsons et al. 2005). Així en CCR s'han trobat mutacions a PDK1, AKT2, PAK4, INSR i ERBB4 i amplificacions a AKT2, PAK4 i IRS2, tots implicats en vies de PI3K (Parsons et al. 2005). Ademés, PI3K presenta mutacions en CCR (32%), càncer de cervell (27%) i càncer gàstric (25%) entre d'altres (Samuels et al. 2004). Aquestes mutacions són de sentit incorrecte, es donen principalment als exons 9 i 20 als dominis helical i quinasa respectivament i impliquen que probablement augmenten l'activitat quinasa (Samuels et al. 2004).

4.6.3 La família RalGEF: Aquesta família són factors intercanviadors de nucleòtids de Ral, una GTPasa que és membre de la família de Ras. Així, RalGDS, Rgl1 i Rgl2, per un domini d'unió a Ras de 80-100 residus a l'extrem carboxi-terminal, s'uneixen a Ras quan aquest està unit a GTP com a resposta a estímuls extracel·lulars (Urano et al. 1996). Llavors RalGDS estimula l'intercanvi de GDP per GTP de Ral, que queda estimulat i inhibeix als factors de transcripció *forkhead* de la família FoxO (juntament amb AKT) (De Ruiter et al. 2001), i activa a RALBP1 i a la fosfolipasa D1 (PLD1), que està implicada en la formació de vesícules i en el tràfic a l'aparell de Golgi.

4.6.4 Altres efectors de Ras: Fins a l'actualitat s'han descobert moltes altres proteïnes apart de les anteriors que presenten evidències més o menys clares de ser efectors de Ras, i el nombre d'aquestes proteïnes encara continua augmentant avui en dia. Un exemple és la família de Rho, que està implicada en molts processos cel·lulars com la regulació de l'actina del citoesquelet, la progressió del cycle cel·lular, la transcripció gènica i l'adhesió cel·lular. Rac és una proteïna de la família de Rho que pot activar-se per Ras (de forma PI3K independent) mitjançant interacció directa amb Tiam-1, una RacGEF (Lambert et al. 2002). La família de Rho avarca la principal branca de la superfamília de GTPases de Ras, i al igual que Ras es troben actives unides a GTP i inactives unides a GDP, i tenen molts efectors.

Un altre efector de Ras és la Fosfolipasa C ϵ , que conté dos dominis d'associació a Ras i un domini RasGEF, més el domini phospholipasa C que promou la hidròlisi de PIP2 a diacilglicerol i inositol-1,4,5-trifosfat. Aquesta fosfolipasa podria unir Ras amb l'activació de PKC i la mobilització del calci. D'una altra banda algunes GAPs com p120GAP o NF1 s'uneixen a Ras de forma GTP dependent i interaccionen amb el domini d'efectors de Ras (Adari et al. 1988). També una altra proteïna, Rin1, s'associa

d'aquesta forma a Ras *in vitro* i *in vivo* (Han and Colicelli 1995). Moltes altres proteïnes (AF6, Canoe, etc) contenen dominis d'unió a Ras (Ponting and Benjamin 1996).

5. LA INESTABILITAT DE MICROSATÈL·LITS (MSI)

La inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) està caracteritzada per mutacions, principalment delecions, en seqüències repetitives curtes (microsatèl·lits) del genoma. Està ocasionada per la pèrdua de funció dels gens implicats en la reparació dels errors replicatius (*mismatch repair*, MMR). Aquest fet provoca que s'acumulin mutacions de forma aleatòria per tot el genoma durant la replicació de l'ADN i molt especialment als microsatèl·lits, que per la seva pròpia naturalesa i estructura són inestables i tendeixen a formar bucles que de no ser reparats correctament acabaran sent la font de delecions i insercions (Ionov et al. 1993). Aquest procés, que configura l'anomenat fenotip mutador, és el responsable de l'aparició de milers de mutacions en seqüències repetitives simples en el càncer amb MSI. Algunes de les mutacions es troben en zones codificants i per tant canvien la pauta de lectura i provoquen la inactivació de la proteïna codificada, en la majoria dels casos truncada, i per tant no funcional. La inactivació d'un gen del MMR no és un fet transformant per si mateix, però la gran quantitat de gens mutats i per tant de vies alterades si que facilita la transformació cel·lular i l'expansió clonal del tumor.

5.1 La reparació d'errors replicatius (MMR)

La preservació de la integritat genòmica requereix el funcionament apropiat de varis mecanismes com la replicació, la reparació i la recombinació. Així, la reparació d'errors replicatius (MMR) és un dels mecanismes que té la cèl·lula per corregir errors, ja que elimina els errors de base-base i els bucles d'inserció/deleció que es formen durant la replicació. Estudis en bacteries i llevats han demostrat el funcionament d'aquest sistema alhora que la identificació de la funció protectora del sistema MMR en càncer humà ha ajudat a conèixer millor el mecanisme i ha portat al descobriment de noves funcions del MMR en cèl·lules eucariotes.

Les proteïnes implicades en el procés del MMR estan molt conservades evolutivament, cosa que posa de manifest la importància d'aquest tipus de reparació per mantenir la integritat del genoma a tots els organismes, des de bacteries a eucariotes superiors. Així, a *E. coli* el reconeixement de l'error biosintètic el fa un homodímer de MutS, que recluta a un homodímer de MutL. Llavors s'activa l'activitat endonucleasa de MutH, que fa una mella (*nick*) propera que permet distingir la cadena de nova síntesis ja que encara no s'ha metilat. Posteriorment l'helicasa UvrD desenrolla l'ADN i vàries exonucleases digereixen a partir de la mella fins al nucleòtid incorrecte. Finalment la DNA polimerasa III omple el forat creat i una lligasa segella els dos extrems (Jiricny 2006).

Als eucariotes, com els llevats o els mamífers, hi ha varis homòlegs de MutS i MutL que reflecteixen l'especialització i la superposició del funcionament de les proteïnes del MMR. En aquest cas MSH2 forma dos heterodímers diferents: MutS α (MSH2/MSH6) o MutS β (MSH2/MSH3) (Hughes and Jiricny 1992, Drummond et al. 1995, Acharya et al. 1996, Habraken et al. 1996, Marsischky et al. 1996). Mentre que MutS α s'uneix preferentment a les bases desaparellades i a les zones d'inserció/deleció d'una sola base, MutS β ho fa predominantment a les zones d'inserció/deleció de 2-4 bases (Jiricny 1998). A les cèl·lules humanes el complexe MutS α té una activitat predominant (Genschel et al. 1998, Marra et al. 1998) i necessita estar fosforilat per fer una unió eficient (Christmann et al. 2002). MSH2 i MSH6 tenen activitat intrínseca d'unió i hidròlisis d'ATP que és necessari pel sistema del MMR *in vitro* i *in vivo* (Alani et al. 1997, Iaccarino et al. 1998, Studamire et al. 1998). Aquests gens són imprescindibles per al reconeixement d'errors comesos a la replicació de l'ADN (Drummond et al. 1995, Alani et al. 1997, Gradia et al. 1997, Iaccarino et al. 1998). És probable que la unió i la hidròlisis de l'ATP faciliti les interaccions entre proteïnes i/o el lliscament al llarg de l'ADN (Blackwell et al. 1998a, Blackwell et al. 1998b, Gradia et al. 1999). Posteriorment a MutS s'hi uneix un altre heterodímer, MutL α , format per MLH1 i PMS2 (Prolla et al. 1998). També s'han descrit dos heterodímers més, MutL β (format per MLH1 i PMS1, de funció desconeguda) (Raschle et al. 1999) i MutL γ (format per MLH1 i MLH3, que està involucrat en la recombinació meiótica) (Flores-Rozas and Kolodner 1998, Cannavo et al. 2005). MutL α té una funció acopladora que probablement depèn de la unió de l'ATP i/o de l'activitat d'hidròlisi pels llocs amino terminals conservats de MLH1 i PMS2 (Ban and Yang 1998). El mecanisme pel que es detecten les cadenes errònies és desconegut, tot i que podrien estar implicats PCNA

(Johnson et al. 1996, Umar et al. 1996) i MED1 (Bellacosa et al. 1999). Finalment l'escissió de la cadena amb l'error la fa l'exonucleasa I (Genschel et al. 2002), la resíntesi la polimerasa δ (Longley et al. 1997) i la DNA ligase I completa la reacció del MMR (Figura 14).

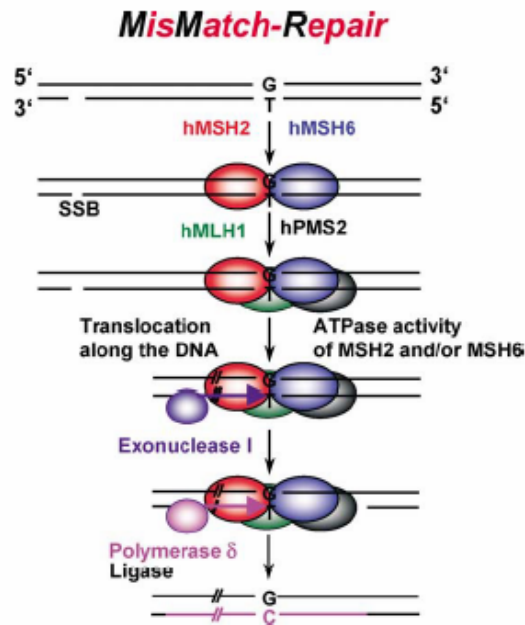


Figura 14. Mecanisme de la reparació dels errors replicatius (MMR) (Christmann et al. 2003).

5.2 Característiques i diagnòstic de MSI

Els tumors MSI-H (amb MSI o tumors inestables) presenten unes característiques clínico-patològiques diferents als MSS (sense MSI o tumors estables), que solen presentar inestabilitat cromosòmica (CIN). Així, els tumors MSI solen ser mucinosos, poc diferenciats, diploides, poc metastàsics, més quimiosensibles i presenten menys mutacions a APC i p53. Per contra els tumors MSS són adenocarcinomes aneuploides amb una elevada freqüència de mutacions a p53 i APC. A més a més en CCR els tumors MSI-H solen donar-se al colon dret o proximal, mentre que els tumors MSS ho fan a l'esquerre o distal. Un altre punt que es discuteix és l'existència real dels tumors MSI-L (de baixa inestabilitat). La majoria dels estudis els solen incloure barrejats amb els MSS perquè presenten característiques clínico-patològiques i fenotípiques molt semblants, i es consideren un estat transitori molt curt en la progressió dels tumors MSS a MSI-H (Tomlinson et al. 2002). No obstant també

s'ha proposat que es troben poques diferències perquè els marcadors de Bethesda no són els adequats per detectar MSI i que són realment un subgrup de tumors que presenten el seu propi mecanisme per promoure la inestabilitat, més específicament per la metilació de MGMT que provocaria la generació d'errors replicatius mG/T que podrien acabar delecionant-se i formar el fenotip MSI-L (Jass 2003).

El diagnòstic de MSI està basat en la detecció de mutacions en els microsatèl·lits. Per això el NCI (*National Cancer Institute*) ha fet un consens acordant l'ús de cinc marcadors, dos mononucleòtids (BAT26 i BAT25) i tres dinucleòtids (D2S123, D5S346 i D17S250), coneguts com a marcadors de Bethesda (Boland CR *et al.*, 1998). Els tumors que presenten inestabilitat en dos o més marcadors són considerats inestables (*MSI-High*), els que només en tenen en un, de baixa inestabilitat (*MSI-Low*) i la resta són MSS. En el cas que s'utilitzessin més marcadors es consideren MSI-H els que tenen més d'un 30-40% de marcadors positius i MSI-L els que en tenen menys. MSS seran sempre els casos sense cap marcador positiu. De totes formes s'ha discutit bastant aquest consens, tot i que és el que s'utilitza més regularment des de que es va establir. Això és a causa de que els dinucleòtids presenten una especificitat i sensibilitat molt més baixes que els mononucleòtids (Elsaleh *et al.* 2000). Per tant, s'ha proposat l'ús de 5 mononucleòtids o fins i tot únicament BAT26 (Loukola *et al.* 2001), que té una especificitat del 100% i una sensibilitat del 92% (Elsaleh *et al.* 2000).

MSI es dona bàsicament en CCR, gàstric i endometrial amb una freqüència en tots tres teixits del 10-15% (Boland *et al.* 1998), tot i que la incidència a Catalunya disminueix fins al 6-7% (no publicat). Puntualment també s'han detectat casos MSI en altres tipus de tumors. La majoria dels casos MSI són esporàdics i en aquest cas l'alteració que tenen en el MMR principalment és la hipermetilació bial·lèlica del promotor de MLH1 (Kane *et al.* 1997, Veigl *et al.* 1998, Fleisher *et al.* 1999, Leung *et al.* 1999, Simpkins *et al.* 1999). La causa de la hipermetilació no ha estat definida, tot i que es planteja la presència d'un mecanisme regulador dels patrons de metilació a tot el genoma en el que es produiria la mutació original. De totes formes MSI també pot ser hereditari per mutacions germinals en gens del MMR, en concret en l'anomenat càncer colorectal hereditari no polipòsic o HNPCC (*hereditary non polyposis colorectal cancer*).

5.3 Els gens diana

Actualment hi ha caracteritzats una sèrie de gens diana amb microsatèl·lits mutats en els tumors MSI amb una clara implicació en processos relacionats amb la tumorigènesi colorectal (Taula 5) (Duval and Hamelin 2002). Tot i això també es poden trobar mutats alguns gens propis dels casos MSS sense seqüències repetitives a causa de la inestabilitat inherent al tumor (Fearon and Vogelstein 1990).

| Funció | Gens |
|---|---------------------------------------|
| Control i regulació del creixement cel·lular | IGFIIR, TCF4, TGF β RII |
| DNA glicosilasa i proteïna d'unió a les illes CpG metilades | MBD4 |
| Factor proapoptòtic | Apaf-1, Bax, Bcl-10, Caspasa-5, Fas |
| Reparació d'errors replicatius | MSH3, MSH6 |
| Resposta al dany l'ADN | ATR, BLM, DNA Helicasa, RAD50, Werner |
| Supressió tumoral i reparació | BRCA1, BRCA2 |

Taula 5. Exemples de gens amb microsatèl·lits codificants mutats a MSI (Duval and Hamelin 2002).

Per definir el gens diana s'han estipulat una sèrie de requeriments (Boland et al. 1998):

1. Alta freqüència d'inactivació
2. Inactivació bial·lèlica per alteració simultània a la repetició del segon al·lel o per mutació puntual o per pèrdua al·lèlica.
3. Implicació del gen diana en una autèntica via supressora del creixement.
4. Demostració d'inactivació en la mateixa via supressora en tumors MSS per mutació al mateix gen o a un altre gen de la via.
5. Demostració de la supressió del creixement per estudis funcionals *in vitro* o models animals.

De totes formes aquests criteris s'han vist qüestionats (Perucho 1999):

1. L'alteració bial·lèlica d'una repetició codificant no és l'únic mecanisme pel qual un putatiu superior tumoral pot ser inactivat, ja que per exemple ho pot estar per imprintatge a un al·lel.
2. La funció supressora esperada del gen diana pot estendre's a gens implicats en senescència, diferenciació, apoptosi i escapament de la vigilància immunològica.

També s'ha proposat que alguns gens diana podrien estar implicats en vies específiques de MSI-H sense estar necessàriament implicats en els tumors MSS. 3. Alguns gens diana no estan involucrats en una via supressora del creixement, com per exemple MSH3 i MSH6. Tampoc s'accepta que la reintroducció a una línia tumoral del gen diana salvatge reverteixi el fenotip transformat, ja que podria estar implicat més d'un gen diana en una mateixa via de senyalització.

Els gens diana presenten freqüències mutacionals bastant semblants entre el CCR i el càncer gàstric en tumors MSI-H, amb poques excepcions. En canvi hi ha una divergència més gran quan els comparem amb els tumors d'endometri MSI-H, que en general presenten una incidència d'instabilitat menor (Figura 15). Els pacients de HNPCC també solen tenir mutacions als mateixos gens diana i amb freqüències comparables, sobretot amb el CCR. De totes formes la majoria d'estudis en HNPCC utilitzen tumors de colon i també se n'han fet pocs estudis (Duval and Hamelin 2002).

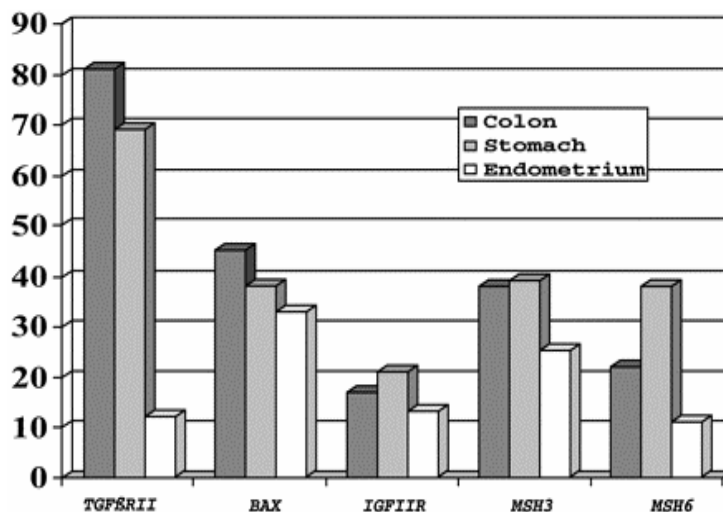


Figura 15. Freqüències de mutacions en tumors MSI-H esporàdics de colon, estómac i endometri (Duval and Hamelin 2002).

5.4 HNPCC i el seu diagnòstic

HNPCC o síndrome de Lynch és una malaltia hereditària autosòmica dominant que predisposa al desenvolupament del càncer. Es caracteritza pel desenvolupament de CCR a una edat prematura, amb la mitja als 44 anys enfront dels 64 de la població general. Freqüentment està acompanyada per la presència de tumors extracolònics, sobretot a l'endometri, però també a estómac, ovaris, budell prim, tracte biliar, uroepiteli, ronyó i sistema nerviós central (Umar et al. 2004a). Així es té un risc del 70-

85% de patir un CCR durant la vida, un 50% d'endometri i un 15% dels altres tumors (Watson and Lynch 1993, Aarnio et al. 1995). En concret, les dones afectes tenen més possibilitats de patir càncer d'endometri que CCR. La incidència a la població general és de 1:1000 individus (Umar et al. 2004a) i representa un 2-7% del total de casos de CCR (Mecklin 1987, Lynch and de la Chapelle 2003). Aproximadament la meitat dels casos sospitosos de ser HNPCC actualment no es poden confirmar per mutacions a gens coneguts i per tant resta com a qüestió clau definir la relació genotip-fenotip en aquests casos (Liu et al. 1996, Peltomaki 1997). La causa de l'altra meitat dels casos de HNPCC són les mutacions germinals heterozigotes a gens del MMR. Les cèl·lules en aquestes circumstàncies poden reparar l'ADN de forma normal (Parsons et al. 1993), però quan hi ha una inactivació somàtica de l'al·lel salvatge, per exemple per pèrdua d'heterocigocitat (Hemminki et al. 1994) o per mutació (Liu et al. 1994), es promou la tumorigènesi i s'estableix un fenotip mutador de caràcter recesiu (Casares et al. 1995).

Les mutacions descrites fins ara afecten als gens MLH1, MSH2 i MSH6, i més recentment també s'han descrit a PMS2, amb una penetrància aproximada del 80% pel CCR, 60% per l'endometrial i menys del 20% pels altres càncers (Lynch and de la Chapelle 2003). Dels casos en que es coneix la mutació, el 90% la tenen a MLH1 o MSH2, i gran part del 10% restant en tenen a MSH6 (Lynch and de la Chapelle 2003). En un principi les mutacions a PMS2 es van trobar en molts pocs casos (Liu et al. 2001), però més recentment s'han trobat en una proporció més considerable (Nakagawa et al. 2004, Truninger et al. 2005) ja que abans pseudogens de PMS2 amagaven les verdaderes mutacions d'aquest gen (Nakagawa et al. 2004). El gen MLH3 també podria estar mutat germinalment en algunes famílies sospitoses de ser HNPCC amb un grau variable de MSI al teixit tumoral, però actualment hi ha poques evidències que donin suport a que MLH3 predisposi al clàssic HNPCC (Wu et al. 2001, Hienonen et al. 2003, Liu et al. 2003). Finalment, també es va descriure una mutació truncant a PMS1 en un pacient de HNPCC (Nicolaidis et al. 1994), però posteriorment es va trobar una mutació a MSH2 a la mateixa família que era la única que cosegregava amb CCR (Liu et al. 2001). Ademés tampoc s'han trobat mutacions en pacients HNPCC sense mutacions conegudes als altres gens del MMR (Liu et al. 2001) i els ratolins PMS1 -/- no presenten cap fenotip perceptible (Prolla et al. 1998). Per tant no hi ha evidències que PMS1 provoqui predisposició a HNPCC (Peltomaki 2005).

Els tipus de mutacions que es donen en aquests gens són molt variats i es localitzen a qualsevol lloc sense cap punt calent obvi. Per tant les estratègies per detectar-les han d'abarcabar la integritat de cada gen sencer (Peltomaki and Vasen 1997). No obstant això, a vegades es troba una mateixa mutació en dos individus ostensiblement no relacionats. Això es pot donar mitjançant dos mecanismes: mutacions recurrents i mutacions fundadores. Les recurrents es donen per factors genètics o d'altres diferents. Un exemple és una transversió a l'adenina donadora pel processament alternatiu de l'intró 5 de MSH2, que fa saltar l'exó 5 a la transcripció i provoca la pèrdua d'expressió de MSH2. La natura recurrent d'aquesta mutació s'explica perquè l'adenina és la primera d'un grup de 26 adenines, que forma un punt calent per aquest canvi concret. Segons anàlisis d'haplotip, aquesta mutació es forma *de novo* a la majoria de casos (Froggatt et al. 1999, Desai et al. 2000). En canvi la mutació fundadora s'hereta a partir d'un ancestre comú de moltes generacions enrera. Característicament apareixen en un únic individu o són introduïdes en una població per un únic individu. La probabilitat que apareixin aquestes mutacions augmenta si hi ha aïllament (absència d'immigració), creixement ràpid de la població, colls d'ampolla al tamany poblacional o deriva genètica. Poblacions fundadores típiques es donen en els finlandesos, islandesos, jueus ashkenazi, canadencs francesos i amish. En algunes poblacions les mutacions fundadores representen una part important del total de casos de HNPCC.

Les mutacions sense sentit, les que afecten als llocs de processament alternatiu i les truncants aparentment són sempre deletèries mentre que les mutacions de sentit incorrecte *a priori* no són causants de la malaltia. En aquests casos els criteris utilitzats per demostrar patogenicitat són un canvi d'aminoàcid de natura no conservativa, conservació de l'aminoàcid salvatge en l'evolució, absència en la població normal, cosegregació amb la malaltia o associació amb MSI o amb la pèrdua de la proteïna concreta en el teixit tumoral (Peltomaki and Vasen 2004). La localització de les mutacions en aquests gens no afecta a la seva penetrància ja que la majoria fan perdre totalment la funció a la proteïna més que guanyar-la o perdre-la parcialment. Però segons el gen en concret si que hi ha diferències, ja que les mutacions a MLH1 i MSH2 no mostren diferències en expressivitat, indicant que les dues són equivalentment importants en el MMR, mentre que MSH6 es comporta de forma diferent. Per això s'ha proposat un tipus de HNPCC atenuat causat per mutacions a MSH6 i caracteritzat per una penetrància més baixa i una edat d'aparició més alta (Miyaki et al. 1997). Les mutacions deletèries i els polimorfismes associats a HNPCC es troben compilats en una

base de dades feta per submissions d'investigadors de tot el món i per cerques a la literatura que es troba disponible per a tothom a www.nfdht.nl.

Per fer un diagnòstic de HNPCC el 1991 es va fer un consens internacional únicament clínic que proporcionava un criteri uniforme quan les bases genètiques del HNPCC encara eren desconegudes, que va ser els anomenats criteris d'Amsterdam I (Vasen et al. 1991) (Taula 6). En resposta a les crítiques de que eren uns criteris massa estrictes el 1998 es van fer els criteris d'Amsterdam II que inclouen els càncers extracolònics associats a HNPCC (Vasen et al. 1999) (Taula 6). D'aquests s'inclouen els que tenen el risc relatiu més alt i que per tant són els més específics per HNPCC, que són els d'endometri, budell prim, urèter i pelvis renal. Per poder decidir si individus amb càncer de famílies que no complien els criteris d'Amsterdam s'havien de sotmetre a un test genètic el 1996 es van fer els criteris de Bethesda (Rodríguez-Bigas et al. 1997) (Taula 6). Aquests inclouen criteris addicionals com l'avaluació patològica dels individus positius pels criteris d'Amsterdam, permetent fer una valoració menys estricta. Posteriorment aquests criteris també s'han modificat i simplificat en els que es coneixen com a criteris de Bethesda modificats (Umar et al. 2004b) (Taula 6).

Actualment dissenyar una estratègia per triar els casos als que s'ha de fer un test genètic és necessari per l'altíssim cost econòmic que implicaria fer l'anàlisi mutacional dels gens del MMR a tots els pacients de CCR. Això és així ja que els gens dels MMR tenen una seqüència molt llarga i molts exons i les mutacions poden donar-se en qualsevol lloc del gen. Igualment fer l'anàlisi de MSI i/o immunohistoquímica (IHQ) dels gens del MMR en tots els casos de CCR tampoc seria adient per la seva baixa relació entre efectivitat i cost econòmic (Rodríguez-Bigas et al. 1997). S'ha de tenir en compte que la majoria dels CCR no tenen defectes al MMR i del 12-15% que sí que en tenen la majoria ho són de forma esporàdica per la hipermetilació de MLH1 i no per mutacions germinals. Per tant el desitjable seria trobar un mètode que diferenciés els casos esporàdics MSI per excloure'ls del test genètic dels gens del MMR i així millorar la relació efectivitat-cost.

criteris d'Amsterdam I (1991):

S'han de complir TOTS els requisits:

1. CCR diagnosticat abans dels 50 anys.
2. Dues generacions succesives afectes.
3. Tres familiars afectats, on un d'ells té parentiu de primer grau amb els altres dos.
4. FAP ha d'estar exclosa.
5. Els tumors s'han de verificar mitjançant examen patològic.

 criteris d'Amsterdam II (1998):

S'han de complir TOTS els requisits:

1. Com a mínim tres parents afectes d'un càncer associat amb HNPCC (CCR, endometri, budell prim, ureter o pelvis renal).
2. Un d'ells té parentiu de primer grau amb els altres dos.
3. Com a mínim dues generacions succesives han de ser afectes.
4. Un dels càncers ha d'estar diagnosticat abans dels 50 anys.
5. FAP ha d'estar exclosa en els casos de CCR.
6. Els tumors s'han de verificar mitjançant examen patològic.

 criteris de Bethesda (1997):

Com a mínim s'ha de complir UN dels requisits:

1. Individus amb càncer de famílies que compleixen els criteris d'Amsterdam.
2. Individus amb dos tumors associats a HNPCC, incluint CCR sincrònic i metacrònic o càncers extracolònics associats (endometri, ovari, gàstric, hepatobiliar, budell prim o carcinoma de cèl·lula transcional de la pèlvis renal o ureter).
3. Individus amb CCR i un parent de primer grau amb CCR i/o extracolònic associat a HNPCC i/o adenoma colorectal. Un dels càncers diagnosticat abans dels 45 anys i l'adenoma abans dels 40.
4. Individus amb CCR o d'endometri diagnosticat abans dels 45 anys.
5. Individus amb CCR dret amb un patró a la histologia poc diferenciat (sòlid/cribiforme) diagnosticat abans dels 45 anys.
6. Individus amb CCR amb cèl·lules en anell de segell diagnosticat abans dels 45 anys.
7. Individus amb adenomas diagnosticats abans dels 40 anys.

 criteris de Bethesda modificats (2003):

Com a mínim s'ha de complir UN dels requisits :

1. CCR diagnosticat abans dels 50 anys.
2. Presència de CCR sincrònic, metacrònic o un altre càncer associat a HNPCC (endometri, gàstric, ovari, pancreas, ureter i pelvis renal, tracte biliar, cervell, adenomas de glàndules sebàcies i queratoacantomas al síndrome de Muir-Torre i carcinoma de budell gros), independentment de l'edat.
3. CCR amb histologia de MSI-H (presència de limfòcits tumorals infiltrats, reacció limfocítica com la de Crohn, diferenciació mucinosa/anell de segell o patró de creixement medul·lar) diagnosticat abans dels 60 anys.
4. CCR diagnosticat en un o més parents de primer grau amb tumor associat a HNPCC, sent un dels càncers diagnosticats abans dels 50 anys.
5. CCR diagnosticat en dos o més parents de primer o segon grau amb tumors associats a HNPCC.

Taula 6. Criteris d'Amsterdam I i II i de Bethesda i Bethesda modificats (Vasen et al. 1991, Rodriguez-Bigas et al. 1997, Vasen et al. 1999, Umar et al. 2004b).

L'estratègia que està acceptada actualment pel diagnòstic de HNPCC consisteix en fer una tria dels candidats a partir de les dades clíniques utilitzant els criteris d'Amsterdam i Bethesda i posteriorment fer un anàlisi genètic dels casos escollits (Figura 16) (Umar et al. 2004a). Així, als pacients que compleixin els criteris d'Amsterdam se'ls farà directament un test genètic per MLH1 i MSH2. De la resta de pacients, als que compleixin els criteris de Bethesda se'ls testarà per MSI i/o IHQ de MLH1 i MSH2, i als que resultin positius se'ls farà el test genètic del gen que presenti una expressió anormal. Els individus que no compleixin els criteris de Bethesda se'ls inclourà amb el grup de risc de la població general i se'ls descartarà com a HNPCC. Als individus i familiars que no se'ls detecti cap mutació en els gens del MMR se'ls farà el consell genètic som si fossin HNPCC. No obstant detectar les mutacions germinals en els pacients HNPCC és molt important ja que permet detectar als portadors de la mutació entre els seus familiars. Així el càncer es pot evitar en individus HNPCC mitjançant mesures primerenques i intenses (Syngal et al. 1998, Jarvinen et al. 2000).

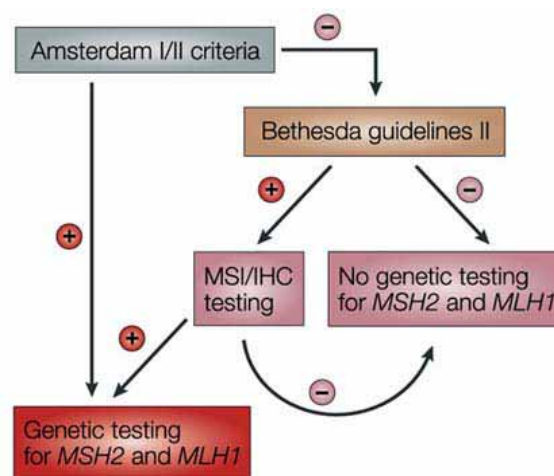


Figura 16. Estratègia actual per fer el test genètic de HNPCC (Umar et al. 2004a).

Tot i que els criteris de Bethesda i Amsterdam no tenen la mateixa finalitat, s'ha demostrat que els criteris de Bethesda són més sensitius (94%) que els d'Amsterdam II (72%) i que els d'Amsterdam I (61%) (Syngal et al. 2000). Posteriorment s'ha comprovat que els criteris de Bethesda revisats són més efectius que els antics ja que detecten algun cas que altrament no s'hauria identificat (Pinol et al. 2005). D'una altra banda s'ha publicat tant que MSI i IHQ tenen una eficàcia equivalent (Pinol et al. 2005) com que MSI és més sensitiu (Lindor et al. 2002). En aquest sentit s'ha proposat que fer primer MSI o IHQ hauria de dependre de la probabilitat de trobar una mutació germinal

(Vasen and Boland 2005). Així, en famílies positives pels criteris d'Amsterdam, que tenen més possibilitats de tenir una mutació germinal, el primer pas seria IHQ per saber quin és el gen candidat, i en cas de no trobar cap expressió anormal fer anàlisis de MSI. En canvi en els casos que compleixen els criteris de Bethesda s'analitzaria primer MSI, i als casos MSI-H se'ls faria IHQ. En les poblacions en que hi ha mutacions fundacionals es recomana testar directament per la mutació als individus d'alt risc (Peltomaki and Vasen 2004).

II. MOTIUS DE LA TESI

El descobriment que BRAF presenta mutacions amb una alta freqüència en melanoma (Davies et al. 2002) va obrir moltes línies d'investigació noves. Un dels descobriments fets és que les mutacions de BRAF i KRAS no es troben mai alhora en un mateix tumor (Rajagopalan et al. 2002). S'hipotetitza que això és perquè les mutacions de BRAF i KRAS tenen efectes tumorigènics equivalents, en que l'alteració de la mateixa via en un punt o un altre tindria el mateix efecte. Un altre dels descobriments és que la mutació V600E de BRAF en càncer colorectal (CCR) s'associa als casos amb inestabilitat de microsatèl·lits (MSI), on es va detectar en un 31% dels casos per un 7% dels MSS (Rajagopalan et al. 2002). Aquest fet és molt inesperat donat que la mutació de BRAF és un canvi nucleotídic i no una inserció/deleció, que són les mutacions típiques dels tumors MSI. Així, la mutació V600E de BRAF és el canvi nucleotídic amb la freqüència més alta en tumors MSI. Tot i que el sistema de reparació d'errors replicatius (MMR) també repara unions incorrectes de base-base, l'alta freqüència d'aquesta mutació, sobretot comparada amb la dels casos MSS, suggeriria un elevat potencial de selecció positiva en MSI. No quedaria clar però la seva possible implicació en altres tumors MSI de tipus gastrointestinal, que també presenten mutacions de KRAS, o si podrien haver diferències en quant a l'origen esporàdic o familiar del MSI (HNPCC) en aquests tumors.

III. OBJECTIUS

Ens hem plantejat els següents objectius per tal de clarificar les causes de l'alta freqüència de les mutacions de BRAF en càncer colorectal amb inestabilitat de microsatèl·lits:

1. Determinar la freqüència de les mutacions de BRAF i KRAS en càncer gàstric i càncer colorectal separant el casos amb inestabilitat de microsatèl·lits dels que no en tenen, i comparar els resultats.
2. Buscar associacions de la mutació de BRAF V600E a nivell molecular i clínico-patològic en els casos de càncer colorectal amb inestabilitat de microsatèl·lits.
3. Determinar la freqüència de la mutació de BRAF en els casos inestables segons el seu origen esporàdic o familiar.
4. Determinar les freqüències de les mutacions de KRAS en càncer colorectal segons l'estat del seu sistema de reparació d'errors replicatius i comparar les dades amb les de BRAF.

IV. RESUM GLOBAL

Els resultats d'aquesta tesi han estat publicats en cinc articles que formen l'apartat de resultats, a més d'unes dades no publicades que estan afegides a l'apartat de discussió. Com apèndix hi ha dos articles que no s'ha considerat necessari incloure'ls dins de la tesi, tot i tenir una relació directa amb la seva temàtica.

El primer objectiu de la tesi conforma l'article 1 (Oliveira et al. 2003), en que hem determinat les freqüències de BRAF i KRAS en càncer colorectal (CCR) i càncer gàstric (CG) separant els casos amb inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) dels que no en tenen (MSS). Així hem confirmat que les mutacions de BRAF en CCR s'associen a MSI mentre que les de KRAS es detecten en ambdós fenotips (Oliveira et al. 2003). En canvi, BRAF no presenta mutacions en CG (ni MSS ni MSI), i les de KRAS s'associen específicament a MSI (Oliveira et al. 2003).

El segon objectiu conforma l'article 2 (Domingo et al. 2004a) més uns resultats no publicats que s'han introduït a la discussió. Hem analitzat tumors de CCR MSI esporàdics amb i sense la mutació V600E de BRAF per mutacions i metilacions en gens que solen estar alterats en CCR. No hem trobat cap associació de V600E amb cap gen mutat però sí una clara associació amb la hipermetilació de MLH1 (Domingo et al. 2004a), així com amb metilació en general utilitzant sis altres gens (no publicat). A més, a nivell clínic-patològic l'única característica a que s'associa BRAF-V600E és al còlon proximal (Domingo et al. 2004a).

El tercer objectiu conforma els articles 3 (Domingo et al. 2004b) i 4 (Domingo et al. 2005). Hem analitzat tumors HNPCC, que són MSI hereditaris sense hipermetilació de MLH1, per la mutació V600E de BRAF. No hem detectat aquesta mutació en cap d'aquests tumors, tant si la mutació germinal es troba a MLH1 o MSH2 (Domingo et al. 2004b) com si la té a MSH6 o no té mutació coneguda (Domingo et al. 2005). Per tant la mutació BRAF-V600E diferencia els tumors MSI esporàdics dels familiars i podria utilitzar-se en el diagnòstic molecular de HNPCC (Domingo et al. 2004b, Domingo et al. 2005).

El quart i últim objectiu conforma l'article 5 (Oliveira et al. 2004), en que hem determinat les mutacions de KRAS segons l'estat de reparació d'errors replicatius en CCR. Hem detectat diferències en la freqüència de KRAS entre els tumors MSS, MSI i HNPCC, i dins dels casos HNPCC aquesta freqüència varia segons quin és el gen de reparació mutat (Oliveira et al. 2004). Els tumors MSI amb MLH1 hipermetilat tenen menys mutacions a KRAS que els que no (siguin esporàdics o familiars) (Oliveira et al. 2004). A més, els tumors HNPCC tenen mutat igualment el codó 12 que el 13, mentre que els altres tumors tenen majoritàriament mutat el codó 12 (Oliveira et al. 2004).

V. PUBLICACIONS

ARTICLE 1**BRAF mutations characterise colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency**

Oliveira C¹, Pinto M¹, Duval A², Brennetot C², **Domingo E**³, Espín E³, Armengol M³, Yamamoto H⁴, Hamelin R², Seruca R¹, Schwartz S Jr³

Oncogene 2003; 22:9192-9196

Recentment s'ha publicat una alta freqüència de la mutació V600E de BRAF en càncer colorectal (CCR) i s'ha associat significativament a una reparació defectiva dels errors replicatius (MMR). Les mutacions de BRAF estan només en tumors amb KRAS salvatge, suggerint que les mutacions activants de KRAS i BRAF poden ser events genètics alternatius en CCR. Nosaltres hem determinat si la selecció tumorogènica positiva exercida per les mutacions de BRAF en CCR està igualment involucrada en la tumorogènesis del càncer gàstric (CG). Conseqüentment detectem les mutacions de BRAF en un 34% (25/74) dels tumors colorectals amb dèficit en el MMR enfront un 5% (7/142) en els que el tenen competent (p=0,0001). Totes les mutacions corresponen al punt calent V600E, a excepció de tres casos MSS que corresponen a dos D594K i un K601E. No obstant, només detectem una mutació de 124 tumors gàstrics MSS analitzats i cap de 37 tumors gàstrics MSI, suggerint clarament que les mutacions de BRAF no estan involucrades en la tumorogènesis gàstrica. D'altre banda es troba una alta incidència de mutacions a KRAS en els tumors gàstrics MSI (p=0,0005), suggerint que l'activació per vies depenents de KRAS contribueixen a la tumorogènesis del CG amb deficiència de MMR. Per tant els nostres resultats mostren evidències que les mutacions de BRAF caracteritzen els tumors de colon però no els gàstrics amb dèficit de MMR i no estan involucrades en la tumorogènesis del CG de la via del fenotip mutador.

¹ Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal

² INSERM U434 CEPH, Paris, France

³ Molecular Pathology Program, Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM), Barcelona, Spain

⁴ First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University, Sapporo, Japan

ARTICLE 2**Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and hMLH1 inactivation**

Domingo E¹, Espín E¹, Armengol M¹, Oliveira C², Pinto M², Duval A³, Brennetot C³, Seruca R², Hamelin R³, Yamamoto H⁴, Schwartz S Jr¹

Genes Chromosomes Cancer 2004; 39:138-142

L'associació de la mutació V600E de BRAF als tumors colorectals amb deficiència en la reparació d'errors replicatius (MMR) suggereix l'envolupament de la via Ras-Raf en la tumorigènesis del càncer colorectal amb inestabilitat de microsatèl·lits, i que les mutacions de KRAS i BRAF són events genètics alternatius. Nosaltres hem determinat si els tumors colorectals deficients en el MMR presenten un genotip específic si diferenciem entre els casos amb la mutació de BRAF V600E i els BRAF salvatge, i si es poden associar a alguna característica clínicopatològica concreta. Hem detectat una associació de la mutació de BRAF, però no d'APC, KRAS2, AXIN2 ni TP53, amb els tumors colorectals MSI proximals i amb hipermetilació de MLH1. Els nostres resultats afavoreixen la hipòtesis que els tumors colorectals deficients en el MMR proximals i distals tenen alteracions genètiques diferents, tot suggerint que l'envolupament de la via Ras-Raf en la tumorigènesis colorectal pot estar modulada diferencialment segons la localització del tumor i la hipermetilació de MLH1.

¹ Molecular Pathology Program, Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM), Barcelona, Spain

² Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal

³ INSERM U434 CEPH, Paris, France

⁴ First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University, Sapporo, Japan

ARTICLE 3**BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing**

Domingo E¹, Laiho P², Ollikainen M², Pinto M³, Wang L⁴, French AJ⁴, Westra J⁵, Frebourg T⁶, Espín E¹, Armengol M¹, Hamelin R⁷, Yamamoto H⁸, Hofstra RMW⁵, Seruca R³, Lindblom A⁹, Peltomaki P², Thibodeau SN⁴, Aaltonen LA², Schwartz S Jr¹

J Med Genet 2004; 41:664-668

Segons el criteri internacional pel diagnòstic de càncer colorectal hereditari no polipòsic (HNPCC), els pacients de càncer amb historial familiar o inici prematur de tumors colorectals amb alta inestabilitat de microsatèl·lits (MSI-H) haurien de rebre consell genètic i se'ls hauria d'oferir un anàlisi de mutacions germinals als gens de reparació de l'ADN, bàsicament MLH1 i MSH2. A l'article anterior nosaltres determinem que la mutació V600E de BRAF s'associa clarament a la hipermetilació de MLH1 en tumors MSI-H esporàdics. Per tant hem determinat la implicació de BRAF en la tumorogènesis de HNPCC, que no presenta MSI-H per hipermetilació de MLH1 sinó per mutacions germinals. Per això hem analitzat BRAF en 111 casos amb mutacions conegudes a MLH1 i MSH2, els dos principals gens causants de HNPCC, i en 45 casos amb expressió anormal de MSH2 per immunohistoquímica. Cap d'aquests casos presenta la mutació BRAF-V600E, mentre que es detecta en un 40% (82/206) dels tumors esporàdics analitzats. Així la detecció de BRAF-V600E en un tumor colorectal MSI-H suggeriria l'absència de mutacions germinals a MLH1 o MSH2. Per tant no caldria fer l'anàlisi d'aquests gens en els casos V600E positius si no hi hagués cap altra evidència clara que suggerís HNPCC, com el compliment dels estrictes criteris d'Amsterdam o una historia familiar clara. En aquest context, l'anàlisi mutacional del punt calent de BRAF és una estratègia fiable, ràpida i de baix cost que simplifica el test genètic per HNPCC.

¹ Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

² Department of Medical Genetics, Biomedicum Helsinki, University of Helsinki, Finland

³ Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal

⁴ Mayo Clinic College of Medicine, Rochester, MN, USA

⁵ Clinical Genetics Centre, Groningen University Hospital, Groningen, The Netherlands

⁶ Service de Génétique, INSERM EMI-9906, IFRMP Faculté de Médecine et de Pharmacie, France

⁷ INSERM U434 CEPH, Paris, France

⁸ First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University, Sapporo, Japan

⁹ Department of Clinical Genetics, Karolinski Hospital, Stockholm, Sweden

ARTICLE 4**BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes**

Domingo E¹, Niessen RC², Oliveira C³, Alhopuro P⁴, Moutinho C³, Espín E¹, Armengol M¹, Sijmons RH⁵, Kleibeuker JH⁶, Seruca R³, Aaltonen LA⁴, Imai K⁷, Yamamoto H⁷, Schwartz S Jr¹, Hofstra RMW²

Oncogene 2005; 24:3995-3998

Als articles anteriors demostrem l'associació de BRAF-V600E al silenciament del gen MLH1 per hipermetilació, però no a les famílies de càncer colorectal hereditari no polipòsic (HNPCC) amb mutacions germinals a MLH1 o MSH2. Aquestes dades suggereixen que l'activació oncogènica de BRAF està involucrada només en la tumorogènesis colorectal amb inestabilitat de microsatèl·lits esporàdica. Per confirmar aquesta hipòtesis hem extés el nostre anàlisi del gen BRAF a un grup de famílies HNPCC sense mutacions germinals a MLH1 o MSH2 en un total de 37 tumors de famílies HNPCC diferents. D'aquests 14 tenen mutacions germinals a MSH6 i els altres 23 no tenen mutacions a MLH1, MSH2 ni MSH6, però 13 compleixen els criteris d'Amsterdam i els altres 10 són sospitosos de ser HNPCC perquè compleixen els criteris de Bethesda. No s'ha detectat cap mutació de BRAF a excepció d'un cas amb mutació germinal a MSH6. No obstant aquest tumor té metilat MLH1 i a més no l'expressa, per tant és probable que la presència de V600E estigui lligada a aquesta metilació i no a la mutació germinal de MSH6. Tota aquesta informació reforça el concepte que BRAF no està involucrat en la tumorogènesis colorectal de HNPCC. Per tant la detecció positiva de la mutació V600E de BRAF suggeriria un origen esporàdic de la malaltia i l'absència d'alteracions germinals a MLH1, MSH2 o MSH6. Aquests descobriments tenen un impacte potencial en el test genètic pel diagnòstic de HNPCC i suggereixen l'ús potencial de BRAF com a criteri d'exclusió de HNPCC o com a marcador molecular de càncer esporàdic.

¹ Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

² Department of Medical Genetics, University of Groningen, The Netherlands

³ Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal

⁴ Department of Medical Genetics, Biomedicum Helsinki, University of Helsinki, Finland

⁵ Department of Clinical Genetics, University Hospital Groningen, The Netherlands

⁶ Department of Gastroenterology, University Hospital Groningen, The Netherlands

⁷ First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University, Sapporo, Japan

ARTICLE 5**Distinct patterns of KRAS mutations in colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status**

Oliveira C¹, Westra JL², Arango D³, Ollikainen M⁴, **Domingo E**⁵, Ferreira A¹, Velho S¹, Niessen R², Lagerstedt K⁶, Alhopuro P³, Laiho P³, Veiga I⁷, Teixeira MR⁷, Ligtenberg M⁸, Kleibeuker JH⁹, Sijmons RH², Plukker JT¹⁰, Imai K¹¹, Lage P¹², Hamelin R¹⁴, Albuquerque C¹³, Schwartz S Jr⁵, Lindblom A⁶, Peltomaki P⁴, Yamamoto H⁹, Aaltonen LA³, Seruca R¹, Hofstra RM²

Hum Mol Genet 2004; 13:2303-2311

La mutació de BRAF V600E en els tumors esporàdics està associada directament a MSI i inversament a les mutacions de KRAS. Nosaltres hem investigat KRAS en 158 tumors de HNPCC amb mutacions germinals a MLH1, MSH2 i MSH6, 166 esporàdics amb inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) i 688 sense (MSS). Tots els tumors han estat caracteritzats per MSI i 81 dels 166 casos MSI esporàdics s'han analitzat per la hipermetilació de MLH1. Les mutacions de KRAS s'observen en un 40% (63/158) dels tumors HNPCC, i la freqüència mutacional difereix segons el gen de la reparació d'errors replicatius afectat: 48% (29/61) a MSH2, 32% (29/91) a MLH1 i 83% (5/6) a MSH6 (p=0,01). La freqüència de mutacions a KRAS és diferent entre HNPCC, MSS i MSI (p=0,002), i MSI amb hipermetilació de MLH1 (p=0,005). Els tumors HNPCC tenen més mutacions G13D que MSS (p<0,0001), MSI (p=0,02) o MSI amb hipermetilació de MLH1 (p=0,03). Els tumors HNPCC i els MSI sense hipermetilació de MLH1 comparteixen una freqüència mutacional de KRAS semblant, i de G13D en particular. En conclusió, hem demostrat que segons el mecanisme genètic o epigenètic que porta a MSI, el resultat en termes d'activació oncogènica pot ser diferent, reforçant el concepte que els tumors de HNPCC, MSI esporàdic (depenent de l'estat de MLH1) i MSS podrien activar diferents quinases dins de la via Ras-Raf-MAPK.

¹ Institute of Molecular Pathology and Immunology, University of Porto, IPATIMUP, Porto, Portugal

² Department of Medical Genetics, University of Groningen, Groningen, The Netherlands

³ Department of Medical Genetics, Haartman Institute, Biomedicum Helsinki, University of Helsinki, Finland

⁴ Department of Medical Genetics, Biomedicum Helsinki, University of Helsinki, Finland

⁵ Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁶ Department of Clinical Genetics, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden

⁷ Department of Genetics, Portuguese Institute of Oncology (IPO), Porto, Portugal

⁸ Department of Human Genetics, UMC Nijmegen, The Netherlands

⁹ Department of Gastroenterology, University Hospital Groningen, The Netherlands

¹⁰ Department of Surgery, University Hospital Groningen, The Netherlands

¹¹ First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University, Sapporo, Japan

¹² Serviço de Gastroenterologia, Instituto Portugues de Oncologia Francisco Gentil, Lisbon, Portugal

¹³ Centro de Investigacao de Patobiologia Molecular-CIPM, Instituto Portugues de Oncologia Francisco Gentil, Lisbon, Portugal

¹⁴ INSERM U434 CEPH, Paris, France

VI. DISCUSSIÓ

La mutació V600E de BRAF es troba en freqüències altes en varis tipus de càncer. Així es detecta en un 70% de melanomas (Brose et al. 2002, Pollock et al. 2003), 35% de càncer d'ovari seròs de baix grau (Sieben et al. 2004) i 30% de càncer de tiroides papilar (Xu et al. 2003). Aquesta mutació té una activitat transformant i oncogènica en cèl·lules NIH3T3 138 vegades més alta que BRAF salvatge (Davies et al. 2002). I la supressió d'expressió en línies cel·lulars de melanoma inhibeix MEK, causa aturada en el creixement i promou apoptosi (Hingorani et al. 2003). Per tant la seva alta freqüència de mutacions en tumors es dona per la seva capacitat tumorogènica i la seva capacitat per induir expansions clonals en cèl·lules tumorals. Però això no passa en altres tipus de tumors com el càncer del tracte biliar o el carcinoma hepatocel·lular en els que BRAF no presenta mutacions. En càncer colorectal (CCR) la mutació V600E s'associa als casos amb inestabilitat de microsatèl·lits (MSI) i és un event alternatiu a les mutacions de KRAS (Rajagopalan et al. 2002). Per tal de determinar si això és específic del CCR MSI l'hem comparat amb el càncer gàstric (CG), que també presenta MSI en la mateixa proporció que el CCR i amb un espectre mutacional molt semblant (Duval and Hamelin 2002).

1. L'activació de BRAF i KRAS en CCR i CG amb i sense MSI

Les dades obtingudes ens indiquen que les mutacions de KRAS estan implicades en la tumorogènesis gàstrica però només quan els tumors presenten MSI (Taula 7). Tenint en compte que el 15% de casos que es donen en CG són MSI, la freqüència calculada per KRAS a partir de la nostra freqüència en MSI (28%) seria del 4% del total de casos gàstrics, freqüència ja publicada anteriorment (Arber et al. 2000). Els tumors amb mutacions de KRAS no presenten cap altra associació estadísticament significativa relativa a cap característica fisiopatològica concreta. En canvi, en CCR KRAS està mutat tant en MSS com en MSI (Taula 7). Per tant, els tumors MSI de CCR i CG, que ja presenten moltes alteracions genètiques comunes, tenen igualment mutacions a KRAS. En canvi en MSS, KRAS només està mutat en CCR i no en CG, exemple il·lustratiu que els tumors MSS presenten unes alteracions concretes segons el tipus de teixit on esdevinguin.

En canvi BRAF no es troba mutat en CG independentment del seu estat MSS/MSI (Taula 7), observació que ha estat confirmada posteriorment per altres grups (Kim et al. 2003, Wu et al. 2004, Zhao et al. 2004), mentre que en CCR ho està sobretot en MSI (40%) (Taula 7), observació que també ha estat confirmada per altres autors (Taula 8). Aquests resultats semblen indicar que BRAF no està implicat en la tumorigènesi gàstrica però sí en la colorectal. Això suggereix que en CCR estigui implicada la via Ras-Raf-MAPK, ja que estan activats tant KRAS com BRAF, mentre que en CG BRAF i KRAS no són events genètics alternatius, qüestionant que la via que activa KRAS en CG MSI sigui la Ras-Raf-MAPK donada l'absència de mutacions a BRAF. Aquesta possibilitat està reforçada perquè tot i que l'espectre mutacional dels gens diana del fenotip mutador del CCR i CG MSI és molt semblant, hi ha una diferència significativa respecte l'activació oncogènica de BRAF i per tant de KRAS/BRAF, mentre que l'activació oncogènica de KRAS per si sola és semblant en tots dos tipus tumorals.

Al contrari que en CG, en CCR sí que hem detectat que BRAF i KRAS són events oncogènics alternatius, amb l'excepció de tres casos MSI japonesos amb mutacions concomitants a BRAF i KRAS. Comparant aquests casos amb la resta de tumors japonesos MSI disponibles amb BRAF-V600E hem detectat que aquests casos concomitants presenten un nivell més alt de mutacions en altres gens que la resta de tumors sense mutacions concomitants (Taula 9). Aquesta hipermutabilitat podria ser deguda a una població clonal heterogènea de cèl·lules dins del mateix tumor. Una altra explicació és que recentment hem detectat que en CCR MSS KRAS i BRAF són events alternatius només en les fases inicials del tumor, més exactament en tumors Tis i T1 (Estadis 0 i I), i que progressivament van apareixent més mutacions concomitants de KRAS i BRAF, podent tenir així efectes sinèrgics (Oliveira et al. 2006). Això podria passar també en els nostres tres casos, tot i ser MSI, ja que dos són T2 (Estadi I) i l'altre és T3N2 (Estadi III). Així es pot especular que el fet que sigui difícil detectar tumors de CCR MSI amb mutacions concomitants a KRAS i BRAF podria ser degut a la falta de malignitat o progressió avançada de la majoria dels tumors MSI, que progressen més lentament, sense que això signifiqui que no estiguin activant a la mateixa via Ras-Raf-MAPK.

| | | MSS | | | MSI esporàdic | | | HNPCC | | |
|-----|------|--------------|--------------|------|---------------|--------------|------|--------------|--------------|------|
| | | Casos Mutats | Casos Totals | Freq | Casos Mutats | Casos Totals | Freq | Casos Mutats | Casos Totals | Freq |
| CCR | BRAF | 9 | 239 | 4% | 82 | 206 | 40% | 0 | 193 | 0% |
| | KRAS | 235 | 688 | 34% | 37 | 166 | 22% | 63 | 158 | 40% |
| CG | BRAF | 1 | 124 | 1% | 0 | 37 | 0% | | | |
| | KRAS | 0 | 124 | 0% | 10 | 36 | 28% | | | |

Taula 7. Resum de les freqüències mutacionals totals descrites a la tesi de BRAF i KRAS en CCR i CG separant els casos MSS, MSI esporàdics i HNPCC. Totes les mutacions de BRAF són V600E menys tres casos MSS (dos D594K i un K601E). Els casos de BRAF a HNPCC només es refereixen a la mutació V600E.

| Referència | MSS | | | MSI esporàdic | | | HNPCC | | | Origen tumors |
|-------------------|-------------|--------------|-----------|---------------|--------------|------------|-------------|--------------|-----------|---------------|
| | Casos BRAF+ | Casos Totals | Freq | Casos BRAF+ | Casos Totals | Freq | Casos BRAF+ | Casos Totals | Freq | |
| Chang, 2006 | 2 | 194 | 1% | 7 | 19 | 37% | - | - | - | Xina |
| Deng, 2004 | 1 | 58 | 2% | 7 | 22 | 32% | 0 | 20 | 0% | EEUU |
| Kambara, 2004 | 7 | 81 | 9% | 35 | 46 | 76% | 0 | 18 | 0% | Austràlia |
| Li, 2006 | 9 | 204 | 4% | 12 | 31 | 39% | - | - | - | Austràlia |
| Miyaki, 2004 | 2 | 53 | 4% | - | - | - | 0 | 33 | 0% | Japó |
| Rajagopalan, 2002 | 15 | 227 | 7% | 15 | 49 | 31% | - | - | - | EEUU |
| Samowitz, 2005b | 40 | 803 | 5% | - | - | - | - | - | - | EEUU |
| Tanaka, 2006 | 9 | 69 | 13% | 12 | 14 | 86% | - | - | - | EEUU |
| Wang, 2003 | 21 | 170 | 12% | 42 | 123 | 34% | 0 | 19 | 0% | EEUU |
| Yuen, 2002 | 8 | 85 | 9% | 3 | 22 | 14% | - | - | - | Hong Kong |
| Total | 114 | 1944 | 6% | 133 | 326 | 41% | 0 | 90 | 0% | |

Taula 8. Freqüències mutacionals de BRAF publicades fins l'actualitat en CCR MSS, MSI esporàdic i HNPCC.

| Mutacions | KRAS | Nombre de casos | Mitja (%) | Des Est* | t-Student |
|----------------------------|------|-----------------|-----------|----------|-----------|
| Gens diana ¹ | - | 15 | 24,77 | 11,3 | p=0,002 |
| | + | 3 | 37,99 | 3 | |
| Total de gens ² | - | 15 | 23,17 | 9,8 | p=0,001 |
| | + | 3 | 35,47 | 2,4 | |

Taula 9. Diferència significativa en el nombre de mutacions de casos japonesos MSI BRAF positius segons si són KRAS positius o negatius; Per calcular-ho s'ha fet la mitja del total de mutacions per cada cas i després t-Student separant els casos KRAS positius dels negatius; ¹TGFβRII, Bax, IGFIIR, hMSH3, hMSH6, ATR, MBD4, Caspasa-5, Rad50, TCF-4, Fas, Werner, BLM, BRCA1, BRCA2, DNA Helicasa, Bcl10 i Apaf-1; ²APC, Axina2, p53 i β-Catenina més els gens anteriors; * Desviació estàndard

A les nostres dades inicials de CCR MSI vam detectar nivells més alts de V600E als casos japonesos que als europeus. Conseqüentment, vam proposar una diferent modulació de la contribució tumorogènica de l'activació de la via Ras-Raf-MAPK segons l'origen i el fons genètic, però posteriorment vam ampliar el nombre de casos estudiats i la diferència en la freqüència mutacional va deixar de ser estadísticament significativa qüestionant aquesta afirmació. A més hem observat que la majoria d'estudis a diferents llocs geogràfics presenten unes freqüències semblants (Taula 8) i en els que no ho són, altres estudis en les mateixes regions detecten igualment les freqüències majoritàries (Taula 8). Això podria ser degut a que aquests laboratoris podrien utilitzar una forma diferent de classificar els casos MSI. Per tant no sembla que l'origen ètnic pugui modular el potencial tumorogènic de l'activació oncogènica de la via Ras-Raf-MAPK.

2. L'activació de BRAF en CCR MSI esporàdic i HNPCC

L'alta incidència de BRAF-V600E en CCR MSI esporàdic i l'absència en MSS originen nombrosos interrogants al respecte. Casi tots els tumors amb la mutació V600E tenen hipermetilat el promotor de MLH1, suggerint que la inactivació d'aquest gen juntament amb l'activació oncogènica de BRAF contribueixen a la tumorogènesis d'aquests casos. Altres grups han confirmat aquesta associació (Wang et al. 2003, Deng et al. 2004, Koinuma et al. 2004, Lubomierski et al. 2005). Tot i que la inactivació de

MLH1 fa augmentar la incidència mutacional de les cèl·lules tumorals, no s'havia detectat mai cap mutació amb una associació tan directa a la hipermetilació de MLH1 com la V600E de BRAF. Aquesta associació explicaria la baixa freqüència de la mutació V600E en els casos de CCR MSS, que només tenen metilat MLH1 en un 18% dels casos (Arnold et al. 2004). No obstant, hem analitzat per BRAF dos tumors MSS amb MLH1 metilat i cap tenia mutació. A nivell clínic-patològic l'activació de BRAF s'associa al colon proximal. Així podem diferenciar dos subgrups de tumors MSI: els tumors proximals amb hipermetilació de MLH1 i mutació a BRAF, i els tumors distals sense metilació a MLH1 ni mutació a BRAF, tot i que encara no està clar quines altres diferències podrien caracteritzar ambdós grups.

Tot i que la hipermetilació de MLH1 s'associa amb l'activació de BRAF, no s'associa amb mutacions a KRAS, APC, AXIN2 ni TP53. Que no s'associï amb KRAS suggereix que podrien haver modulacions específiques de la via Ras/Raf dependent de l'estat de metilació de MLH1 en CCR, o alternativament de la seva inactivació. Per tant es pot qüestionar la hipòtesis de que BRAF i KRAS són events genètics alternatius en aquests tumors i suggerir que altres vies regulades per BRAF independents de KRAS podrien estar contribuint en la tumorigènesis del CCR MSI proximal.

Com que BRAF-V600E s'associa a la metilació de MLH1 hem determinat la freqüència d'aquesta mutació en els casos HNPCC, que presenten MSI per mutacions a gens del MMR enlloc de per metilació. No obstant, no hem detectat cap mutació en aquests casos, que inclouen pacients amb mutacions germinals als gens MLH1, MSH2 i MSH6, pacients sense mutacions germinals però que compleixen els criteris d'Amsterdam i pacients sospitosos de ser HNPCC que compleixen criteris clínics suggestius de càncer familiar (Taula 6). Altres grups, amb molts menys casos, tampoc han detectat cap mutació V600E en pacients HNPCC (Taula 8). Per tant, BRAF-V600E no està implicat en la tumorigènesis del CCR lligat a HNPCC, independentment de si s'ha diagnosticat per criteris moleculars o clínics. Això demostra que poden haver diferències genotípiques entre el càncer MSI esporàdic i el familiar, tot i que les causes que les ocasionarien encara es desconeixen.

L'absència de V600E en casos HNPCC amb mutacions a MLH1 demostra que BRAF no s'associa directament a MSI sinó que ho fa a la hipermetilació de MLH1, i que és això i no la inactivació del gen el que d'alguna manera promou que hi hagi una alta freqüència de la mutació de BRAF a MSI esporàdic. Per tant la capacitat

oncogènica de BRAF podria estar relacionada amb els mecanismes epigenètics que estan involucrats en la inactivació de MLH1. Així, nosaltres ja hem descrit concomitància de metilació a RASSF1A amb mutacions a BRAF i KRAS en CCR MSI esporàdic (Oliveira et al. 2005), i en càncer de tiroïdes papil·lar BRAF-V600E s'ha associat a 3 de 4 gens analitzats per metilació (Hu et al. 2006). Per tant hem analitzat la relació que té BRAF amb la hipermetilació d'altres gens típicament metilats en CCR. Per això hem caracteritzat els nostres casos MSI esporàdics utilitzant un panell de sis gens que presenten metilació aberrant en CCR (p16, p14, RASSF1A, APC, MGMT i THBS1), i hem diferenciat els casos amb i sense mutació a BRAF a fi d'identificar alguna possible connexió entre BRAF-V600E i metilació (Taula 10).

| Tumor | BRAF | MLH1 | p16 | p14 | RASSF1 | APC | MGMT | THBS1 |
|-------|-------|------|-----|-----|--------|-----|------|-------|
| 13 | V600E | + | + | + | - | + | + | - |
| 25 | V600E | + | + | + | + | + | - | - |
| 34 | V600E | + | + | - | + | - | + | + |
| 5 | V600E | + | - | + | + | + | + | - |
| 9 | V600E | + | + | + | - | - | + | + |
| 7 | V600E | + | + | + | - | - | + | - |
| 12 | V600E | + | + | + | + | - | - | - |
| 24 | V600E | + | + | + | + | - | - | - |
| 3 | V600E | + | + | + | + | - | - | - |
| 4 | V600E | + | + | + | + | - | - | - |
| 22 | V600E | - | - | - | + | + | - | - |
| 14 | V600E | - | - | - | + | - | - | - |
| 6 | - | + | - | - | + | + | + | + |
| 8 | - | + | - | + | + | + | - | + |
| 16 | - | - | - | + | + | - | - | + |
| 23 | - | + | + | - | - | + | + | - |
| 31 | - | + | + | + | + | - | - | - |
| 18 | - | + | + | + | - | - | - | - |
| 21 | - | + | + | - | - | - | - | - |
| 17 | - | - | - | + | - | - | - | - |
| 28 | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 1 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 11 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 33 | - | - | - | - | - | - | - | - |

Taula 10. Representació d'alguns dels casos analitzats per metilació en tumors MSI amb i sense BRAF-V600E.

L'associació de BRAF-V600E amb la metilació de cada marcador per separat només és significativa amb p16 (Taula 11). No obstant, si sumem els resultats de tots els marcadors per obtenir el grau de metilació global obtenim una diferència estadísticament significativa (Taula 11). Per tant BRAF-V600E no només s'associa específicament a la hipermetilació de MLH1 sinó també a un entorn molecular amb més alteracions per metilació que els tumors MSI amb BRAF salvatge. Tot i això, la hipermetilació de MLH1 també s'associa significativament a un estat de metilació, ja que individualment quatre dels sis gens analitzats s'associen a MLH1 significativament i també ho fan tots sis gens alhora (Taula 12). Per tant, podria ser que l'associació de BRAF-V600E amb metilació fos una conseqüència indirecta de que la majoria de tumors que tenen hipermetilat MLH1 també solen presentar metilació generalitzada a tot el genoma. Aquesta hipòtesi es veu afavorida pel fet que mai hi ha mutacions de BRAF en HNPCC, que en baixa freqüència presenta metilació global (Yamamoto et al. 2002). De totes formes, no es podria descartar que hi hagués una associació real de la mutació V600E amb la metilació d'un gen diferent de MLH1, com podria ser el cas de p16.

| BRAF | p16 | p14 | RASSF1A | APC | MGMT | THBS1 | Metilació global |
|----------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|------------------|
| + | 13/18 (72%) | 10/14 (71%) | 10/16 (63%) | 6/16 (38%) | 6/18 (33%) | 4/16 (25%) | 49/98 (50%) |
| - | 6/21 (29%) | 6/16 (38%) | 6/15 (40%) | 5/15 (33%) | 4/21 (19%) | 3/15 (20%) | 30/103 (29%) |
| χ^2 | p<0,01 | ns | ns | ns | ns | ns | p<0,01 |

Taula 11. Associació significativa entre BRAF i l'estat de metilació en MSI;
ns: No significatiu.

| MLH1 | p16 | p14 | RASSF1A | APC | MGMT | THBS1 | Metilació global |
|----------|----------------|----------------|----------------|---------------|---------------|---------------|------------------|
| + | 18/23 (78%) | 14/18 (78%) | 11/20 (55%) | 9/20 (45%) | 9/23 (39%) | 6/20 (30%) | 67/124 (54%) |
| - | 1/16 (6%) | 2/12 (17%) | 6/11 (55%) | 1/11 (9%) | 1/16 (6%) | 1/11 (9%) | 12/77 (16%) |
| χ^2 | p<0,001 | p<0,01 | ns | p<0,05 | p<0,025 | ns | p<0,001 |

Taula 12. Associació significativa entre hipermetilació de MLH1 i l'estat de metilació en MSI; ns: No significatiu.

En CCR s'ha descrit que una proporció de casos presenten un nivell més alt de gens metilats que la resta de tumors i s'ha proposat l'existència d'un fenotip metilador d'illes CpG o CIMP (*CpG Island Methylator Phenotype*) (Toyota et al. 1999). De fet hi ha publicacions que associen específicament BRAF-V600E amb CIMP en CCR esporàdic amb MSI (Kambara et al. 2004, Ogino et al. 2006, Weisenberger et al. 2006), tot i que encara està sota discussió l'existència d'aquest fenotip. Els nostres resultats no confirmarien aquest fet, ja que amb els set gens analitzats per metilació no detectem un patró de tumors sense metilació i d'altres amb molta metilació, sinó que s'observa una distribució estocàstica (Figura 17). Per tant amb l'ús dels set gens que hem analitzat no es detecta un fenotip metilador en CCR esporàdic amb MSI. No obstant, el fet que s'hagi associat BRAF-V600E amb CIMP en aquest tipus de tumors confirma la nostra associació de BRAF amb metilació genòmica.

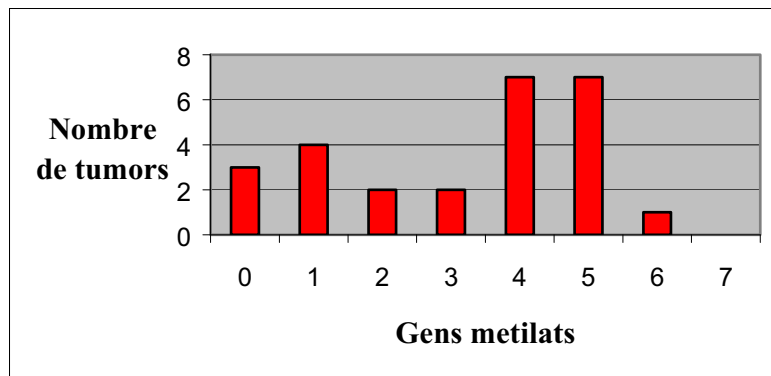


Figura 17. Histograma de la distribució de set gens metilats (MLH1, p16, p14, RASSF1A, APC, MGMT i THBS1) en tumors de CCR MSI.

De totes formes encara es desconeix quin és el mecanisme molecular que dóna tanta facilitat a l'aparició de la mutació V600E de BRAF en aquests tumors i no en d'altres. Tampoc es coneix quin és el factor iniciador del procés: si la mutació de BRAF que d'alguna forma promou la metilació, si és la metilació la que afavoreix l'aparició de V600E o bé si hi ha algun tercer factor implicat encara desconegut que facilita alhora tant la metilació com la mutació de BRAF. Una possible hipòtesis és que BRAF activi una via molecular diferent de la clàssica Ras-Raf-MAPK, que hipotèticament podria acabar activant una metil-transferasa i que la mutació V600E sobreactivés aquesta hipotètica via. En aquest sentit és interessant que la transformació de fibroblastes amb Ras i també amb Fos provoca un augment en l'expressió de la metil-transferasa DNMT1 i un augment global de la metilació (Bakin and Curran 1999, Ordway et al. 2004).

3. L'activació de KRAS en CCR esporàdic MSS i MSI i en HNPCC

Les mutacions de KRAS són l'alteració més preponderant d'un oncogen en càncer, sent diferents segons el tipus tumoral (Bos 1989). Donades les diferències de BRAF-V600E en CCR segons l'entorn molecular, és important determinar com es donen les mutacions de KRAS en aquests casos i comparar-les amb les de BRAF. La freqüència total de mutacions a KRAS obtinguda és del 33%. No obstant la proporció de casos MSI esporàdics i de HNPCC analitzats és més alta que la freqüència que tenen aquests subgrups tumorals a la població, per això hem normalitzat els resultats obtenint pràcticament la mateixa freqüència (32,7%) (Taula 13), que està en concordança amb estudis anteriors (Benhattar et al. 1993, Samowitz et al. 2001). A més, hem detectat una proporció més alta de mutacions en MSS (34%) que en MSI esporàdic (22%), tal i com s'havia publicat anteriorment (Ionov et al. 1993, Konishi et al. 1996, Losi et al. 1997, Fujiwara et al. 1998, Iacopetta et al. 1998, Salahshor et al. 1999, Samowitz et al. 2001), amb alguna excepció (Aaltonen et al. 1993, Olschwang et al. 1997, Tannergard et al. 1997).

| Distribució de CCR | | Freqüència de KRAS | | Freqüència de KRAS normalitzada |
|--------------------|---|--------------------|---|---------------------------------|
| 85% MSS | → | 34% | → | 28,9% |
| 12% MSI esporàdic | → | 22% | → | 2,6% |
| 3% HNPCC | → | 40% | → | 1,2% |
| | | | | Total: 32,7% |

Taula 13. Càlcul de la freqüència normalitzada de KRAS.

També hem detectat una freqüència de mutacions a KRAS en HNPCC (40%) més alta que en els casos MSI esporàdics (22%) i semblant a la dels casos MSS (34%). Curiosament aquesta freqüència a HNPCC varia segons el gen concret que presenta la mutació germinal, ja que els casos amb mutació a MLH1 tenen una freqüència més baixa (32%) que els que la tenen a MSH2 (48%) o MSH6 (83%) ($p=0,01$). La freqüència dels casos amb mutació a MSH6 és especialment alta, tot i que s'ha de tenir en compte que s'han utilitzat només sis tumors. Aquestes diferències en la incidència de

KRAS entre els casos amb mutacions germinals en gens diferents podrien tenir relació amb els diferents fenotips clínics que sembla haver segons el gen concret que es troba mutat germinalment, ja que si és MLH1 els tumors tendeixen a ser solament colònics mentre que si és MSH2 s'associen més a ser també extracolònics (Bandipalliam et al. 2004).

D'una altra banda, dins dels tumors esporàdics MSI la freqüència de mutacions a KRAS varia segons si hi ha hipermetilació de MLH1 (18%) o no (36%), tot i que la diferència no arriba a ser estadísticament significativa. Per tant la freqüència entre el tumors esporàdics sense hipermetilació a MLH1 i la de HNPCC, que tampoc té hipermetilació en aquest gen, és molt similar. Contràriament els casos amb hipermetilació a MLH1 tenen la freqüència molt baixa. Això pot ser perquè les mutacions de BRAF es troben en els casos amb hipermetilació a MLH1, el que dona suport a que KRAS i BRAF estan activant la via Ras-Raf, on s'activarà KRAS o BRAF depenent de si l'entorn molecular té alteracions genètiques o epigenètiques associades. Així, en els tumors MSI sense hipermetilació de MLH1 i HNPCC, que tenen mutacions somàtiques i germinals respectivament, el que sol estar activat és KRAS, mentre que en els tumors MSI amb hipermetilació de MLH1 sol ser BRAF.

D'una altra banda, el 98% dels casos mutats a KRAS tenen afectats el codons 12 i 13 per només un 2% del 61, com ja s'havia establert anteriorment (Bos 1989). Però hi ha una diferència en la freqüència dels codons 12 i 13 entre els diferents tipus de CCR. Així, en HNPCC la freqüència del codó 13 és molt més alta que als tumors esporàdics, com ja va es va publicar anteriorment (Fujiwara et al. 1998). No obstant nosaltres hem observat que això és independent del defecte genètic que es tingui en el MMR, mentre que aquest anterior estudi descrivia que als tumors amb defectes a MSH2 no tenien mutacions al codó 13 (Fujiwara et al. 1998). Aquesta diferència de resultats podria estar causada per la diferència en el nombre de casos analitzats, ja que nosaltres hem analitzat 61 casos amb defectes a MSH2 dels que 29 estaven mutats, i aquest altre estudi va analitzar 17 casos dels que 6 estaven mutats (Fujiwara et al. 1998).

Una possible hipòtesis que expliqui les freqüències en els codons 12 i 13 podria estar en els factors ambientals. S'ha observat en models animals una associació entre exposició química i localització i tipus de mutacions activants a Ras en els tumors resultants (Barbacid 1987). A més les mutacions al codó 12 predominen en els tumors associats a factors ambientals, com el CCR i el de pulmó associats al tabac (Slebos et al.

1991, Rodenhuis and Slebos 1992, Westra et al. 1993, Diergaarde et al. 2003). Per tant, podria ser que els tumors esporàdics tinguessin una susceptibilitat més alta al dany en seqüències específiques de l'ADN per factors ambientals mentre que els tumors hereditaris tindrien lloc per predisposició heretada. Una altra hipòtesis és que les mutacions de KRAS tant en el codó 12 o 13 estiguin activant vies diferents quan estan en un ambient molecular de deficiència de reparació d'errors replicatius ocasionada per mutacions germinals. O sigui, que aquests dos tipus de mutacions activarien vies diferents en funció de la capacitat selectiva conferida per l'entorn molecular de la cèl·lula tumoral. La capacitat positiva dels codons 12 i 13 en HNPCC podria ser similar.

Per un altre costat hem detectat que les transicions G:A, que provoquen els canvis a aspàrtic G12D i G13D, són l'alteració més comú a KRAS i més concretament es troben amb més freqüència en els tumors MSI, siguin esporàdics o hereditaris, que en els MSS. Això està en concordància amb estudis que han demostrat que les alteracions G:A són particularment difícils de reparar, fins i tot en un ambient amb el MMR intacte (Brown and Jiricny 1988). Per contra, KRAS té més substitucions G:T en els tumors MSS que en els MSI. Per tant varia el tipus de substitució aminoacídica de KRAS entre els diferents tipus de CCR. Com a resultat de la substitució G:T es produeix la mutació G12V, que consegüentment també és més freqüent en MSS que en MSI. Aquesta mutació està associada clínicament a un increment del 30% en el risc de recurrència o mort (Andreyev et al. 2001). No està clar si la millor prognòsis dels pacients HNPCC i MSI esporàdics té alguna relació amb la baixa freqüència de la mutació G12V en els seus tumors.

4. L'ús de BRAF-V600E en el diagnòstic de HNPCC

Independentment de les causes que a nivell molecular provoquen l'absència de BRAF-V600E a HNPCC, el fet que això passi és una oportunitat a utilitzar per diferenciar els tumors MSI esporàdics dels familiars. Així, si es detectés la mutació V600E en un tumor MSI-H de CCR no faria falta fer un posterior anàlisi de MLH1, MSH2 ni MSH6 ja que es podria considerar el tumor com esporàdic. De totes formes els casos que compleixin uns requisits estrictes per HNPCC, com els criteris d'Amsterdam, seria millor testar-los pels gens del MMR independentment de la presència de BRAF-V600E com a mesura de precaució, donada la freqüència de CCR en la població general

i a la possibilitat no nul·la que un portador HNPCC pugui igualment desenvolupar un CCR esporàdic.

D'aquesta forma l'ús de BRAF podria unir-se al de MSI i immunohistoquímica (IHQ). Per detectar els casos en que estiguin implicats MSH2 i MSH6 l'estratègia més directa i predictiva d'una mutació germinal és la combinació de MSI amb IHQ. Això és així perquè la informació que dona la IHQ de MSH2 i MSH6 permet identificar el gen concret on probablement hi haurà la mutació germinal. De fet, l'absència d'expressió de MSH2 o MSH6 és molt indicatiu de l'existència d'una mutació. No és el mateix en el cas de MLH1 ja que la gran majoria de tumors en que no es detectaria expressió d'aquesta proteïna serien casos esporàdics per la hipermetilació de MLH1. Per tant, l'ús de la IHQ de MLH1 per detectar casos HNPCC no és massa informativa per si sola, però si que ho seria si se li afegís l'ús de BRAF. Així, en els casos en que per IHQ es detectés que MLH1 està involucrat es podria analitzar BRAF-V600E i en cas de sortir positiu es podria descartar el pacient com a HNPCC ja que es consideraria que el defecte que ocasiona la falta d'expressió de la proteïna seria somàtic. En el cas de que a la població hi hagués alguna mutació fundacional s'hauria d'escollir si fer primer l'anàlisi d'aquesta mutació o la V600E depenent de la que presenti més avantatges metodològiques. Així hem calculat que si seleccionéssim als pacients amb els criteris de Bethesda, en un 17% de casos s'estalviaria fer el test genètic als gens del MMR gràcies al valor predictiu de BRAF-V600E. A més en cas de que es fes IHQ de MSH2 aquest valor augmentaria al 20%. Per tant l'ús diagnòstic de BRAF en els tumors que demostrin MSI-H o bé la implicació de MLH1 per IHQ (sense tenir en compte els tumors de pacients amb un historial clínic clar de HNPCC) representa un nova eina per al diagnòstic molecular d'aquests malalts.

D'una altra banda s'ha demostrat que analitzar únicament els tumors de pacients que compleixen els criteris d'Amsterdam pels gens del MMR detecta el mínim de portadors al cost més baix mentre que el test de MSI a tots els pacients de CCR permetria la detecció de la majoria de portadors, tot i l'alt cost que això comportaria (Reyes et al. 2002). Per tant l'ús dels criteris de Bethesda és una bona estratègia mixta entre les dades clíniques i moleculars a nivell de costos i sensibilitat. No obstant si enlloc d'analitzar únicament els pacients que compleixen els criteris de Bethesda s'analitzessin cohorts no seleccionades el nombre de casos nous diagnosticats HNPCC es doblaria. A més MSI és un factor predictiu en CCR de la resposta tumoral a la

quimioteràpia amb 5-fluorouracil (Ribic et al. 2003) i irinotecan (Fallik et al. 2003) i per tant conèixer l'estat del MMR ajudaria a realitzar tractaments més efectius i específics als pacients de CCR. De totes formes, si s'analitzessin cohorts no seleccionades per MSI igualment s'hauria de tenir en compte l'historial clínic ja que hi ha famílies que compleixen criteris clínics però que no presenten MSI-H. A aquestes famílies se'ls hauria d'oferir l'assessorament i vigilància corresponent a una família de risc.

D'aquesta forma limitar el test de MSI només als pacients que compleixen els requisits de Bethesda potser no és tan efectiu, encara que tindria un cost més elevat. En cas que s'analitzessin cohorts no seleccionades hem calculat que l'ús de BRAF seria encara més beneficiós ja que permetria no haver d'analitzar els gens del MMR en el 31% dels tumors. I si ademés es realitzés la IHQ de MSH2 llavors seria en el 33% dels tumors.

Finalment nosaltres suggerim l'introducció de l'anàlisi de BRAF-V600E en el diagnòstic molecular de HNPCC, que sumada a l'ús de MSI i de IHQ dels gens del MMR ajudarà a decidir quins pacients i quins gens concrets testar. Aquesta nova estratègia és un mètode fiable, ràpid i de baix cost que facilitaria l'actual protocol pel test genètic dels pacients de HNPCC.

VII. CONCLUSIONS

1. En càncer gàstric KRAS té mutacions únicament si hi ha inestabilitat de microsatèl·lits al tumor mentre que BRAF no presenta mutacions independentment de l'estat del sistema de reparació d'errors replicatius.
2. En càncer colorectal la mutació V600E de BRAF s'associa a la inestabilitat de microsatèl·lits esporàdica amb hipermetilació del promotor de MLH1 però no al càncer hereditari, cosa que no passa amb KRAS que presenta mutacions tant en càncer esporàdic com en HNPCC.
3. La mutació V600E de BRAF i la hipermetilació de MLH1 en càncer colorectal amb inestabilitat de microsatèl·lits estan associades a un estat de metilació genòmica.
4. La mutació de BRAF V600E en el càncer colorectal amb inestabilitat de microsatèl·lits s'associa a nivell clínic-patològic únicament al colon proximal, cosa que no passa amb les mutacions de KRAS.
5. En càncer colorectal KRAS presenta més mutacions en tumors sense hipermetilació de MLH1 que en els que si que en tenen, independentment del seu origen esporàdic o hereditari, tot i que en l'esporàdic es donen preponderantment al codó 12 i en l'hereditari es donen indistintament al codó 12 o al 13.
6. En HNPCC KRAS està mutat més freqüentment si la mutació germinal està a MSH2 o MSH6 que si ho està a MLH1.
7. En el càncer colorectal esporàdic les mutacions de KRAS es donen preponderantment al codó 12 mentre que en l'hereditari es donen indistintament al codó 12 o al 13.
8. Les diferències en les freqüències mutacionals de KRAS i BRAF en càncer colorectal esporàdic i hereditari suggereixen una diferent modulació de la via Ras-Raf-MAPK així com una possible activació d'altres vies moleculars alternatives depenent de l'estat en que es trobi el fons genètic i epigenètic del tumor.
9. Hi ha una absència total de la mutació V600E de BRAF en HNPCC que la converteix en una eina fiable, ràpida i de baix cost per al diagnòstic com a criteri d'exclusió de càncer familiar.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Aaltonen, L. A., P. Peltomaki, F. S. Leach, P. Sistonen, L. Pylkkanen, J. P. Mecklin, H. Jarvinen, S. M. Powell, J. Jen, S. R. Hamilton, and et al. 1993.** Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260: 812-6.
- Aarnio, M., J. P. Mecklin, L. A. Aaltonen, M. Nystrom-Lahti, and H. J. Jarvinen. 1995.** Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer* 64: 430-3.
- Abraham, D., K. Podar, M. Pacher, M. Kubicek, N. Welzel, B. A. Hemmings, S. M. Dilworth, H. Mischak, W. Kolch, and M. Baccarini. 2000.** Raf-1-associated protein phosphatase 2A as a positive regulator of kinase activation. *J Biol Chem* 275: 22300-4.
- Acharya, S., T. Wilson, S. Gradia, M. F. Kane, S. Guerrette, G. T. Marsischky, R. Kolodner, and R. Fishel. 1996.** hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 13629-34.
- Adari, H., D. R. Lowy, B. M. Willumsen, C. J. Der, and F. McCormick. 1988.** Guanosine triphosphatase activating protein (GAP) interacts with the p21 ras effector binding domain. *Science* 240: 518-21.
- Agathangelou, A., W. N. Cooper, and F. Latif. 2005.** Role of the Ras-association domain family 1 tumor suppressor gene in human cancers. *Cancer Res* 65: 3497-508.
- Ahn, N. G., R. Seger, R. L. Bratlien, C. D. Diltz, N. K. Tonks, and E. G. Krebs. 1991.** Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase. *J Biol Chem* 266: 4220-7.
- Akino, K., M. Toyota, H. Suzuki, H. Mita, Y. Sasaki, M. Ohe-Toyota, J. P. Issa, Y. Hinoda, K. Imai, and T. Tokino. 2005.** The Ras effector RASSF2 is a novel tumor-suppressor gene in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 129: 156-69.
- Alani, E., T. Sokolsky, B. Studamire, J. J. Miret, and R. S. Lahue. 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.
- Andreyev, H. J., A. R. Norman, D. Cunningham, J. Oates, B. R. Dix, B. J. Iacopetta, J. Young, T. Walsh, R. Ward, N. Hawkins, M. Beranek, P. Jandik, R. Benamouzig, E. Jullian, P. Laurent-Puig, S. Olschwang, O. Muller, I. Hoffmann, H. M. Rabes, C. Zietz, C. Troungos, C. Valavanis, S. T. Yuen, J. W. Ho, C. T. Croke, D. P. O'Donoghue, W. Giaretti, A. Rapallo, A. Russo, V. Bazan, M. Tanaka, K. Omura, T. Azuma, T. Ohkusa, T. Fujimori, Y. Ono, M. Pauly, C. Faber, R. Glaesener, A. F. de Goeij, J. W. Arends, S. N. Andersen, T. Lovig, J. Breivik, G. Gaudernack, O. P. Clausen, P. D. De Angelis, G. I. Meling, T. O. Rognum, R. Smith, H. S. Goh, A. Font, R. Rosell, X. F. Sun, H. Zhang, J. Benhattar, L. Losi, J. Q. Lee, S. T. Wang, P. A. Clarke, S. Bell, P. Quirke, V. J. Bubb, J. Piris, N. R. Cruickshank, D. Morton, J. C. Fox, F. Al-Mulla, N. Lees, C. N. Hall, D. Snary, K. Wilkinson, D. Dillon, J. Costa, V. E. Pricolo, S. D. Finkelstein, J. S. Thebo, A. J. Senagore, S. A. Halter, S. Wadler, S. Malik, K. Krtolica, and N. Urosecvic. 2001.** Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 85: 692-6.
- Apolloni, A., I. A. Prior, M. Lindsay, R. G. Parton, and J. F. Hancock. 2000.** H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol* 20: 2475-87.
- Arber, N., I. Shapira, J. Ratan, B. Stern, H. Hibshoosh, M. Moshkowitz, M. Gammon, I. Fabian, and Z. Halpern. 2000.** Activation of c-K-ras mutations in human gastrointestinal tumors. *Gastroenterology* 118: 1045-50.
- Arnold, C. N., A. Goel, C. Compton, V. Marcus, D. Niedzwiecki, J. M. Dowell, L. Wasserman, T. Inoue, R. J. Mayer, M. M. Bertagnolli, and C. R. Boland. 2004.** Evaluation of microsatellite instability, hMLH1 expression and hMLH1 promoter

- hypermethylation in defining the MSI phenotype of colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 3: 73-8.
- Astler, V. B., and F. A. Collier. 1954.** The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 139: 846-52.
- Bakin, A. V., and T. Curran. 1999.** Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science* 283: 387-90.
- Ban, C., and W. Yang. 1998.** Crystal structure and ATPase activity of MutL: implications for DNA repair and mutagenesis. *Cell* 95: 541-52.
- Bandipalliam, P., J. Garber, R. D. Kolodner, and S. Syngal. 2004.** Clinical presentation correlates with the type of mismatch repair gene involved in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology* 126: 936-7.
- Barbacid, M. 1987.** ras genes. *Annu Rev Biochem* 56: 779-827.
- Barnier, J. V., C. Papin, A. Eychene, O. Lecoq, and G. Calothy. 1995.** The mouse B-raf gene encodes multiple protein isoforms with tissue-specific expression. *J Biol Chem* 270: 23381-9.
- Baumann, B., C. K. Weber, J. Troppmair, S. Whiteside, A. Israel, U. R. Rapp, and T. Wirth. 2000.** Raf induces NF-kappaB by membrane shuttle kinase MEKK1, a signaling pathway critical for transformation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 4615-20.
- Beck, T. W., M. Huleihel, M. Gunnell, T. I. Bonner, and U. R. Rapp. 1987.** The complete coding sequence of the human A-raf-1 oncogene and transforming activity of a human A-raf carrying retrovirus. *Nucleic Acids Res* 15: 595-609.
- Bellacosa, A., L. Cicchillitti, F. Schepis, A. Riccio, A. T. Yeung, Y. Matsumoto, E. A. Golemis, M. Genuardi, and G. Neri. 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.
- Benhattar, J., L. Losi, P. Chaubert, J. C. Givel, and J. Costa. 1993.** Prognostic significance of K-ras mutations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 104: 1044-8.
- Blackwell, L. J., K. P. Bjornson, and P. Modrich. 1998a.** DNA-dependent activation of the hMutSalpha ATPase. *J Biol Chem* 273: 32049-54.
- Blackwell, L. J., D. Martik, K. P. Bjornson, E. S. Bjornson, and P. Modrich. 1998b.** Nucleotide-promoted release of hMutSalpha from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism. *J Biol Chem* 273: 32055-62.
- Boland, C. R., S. N. Thibodeau, S. R. Hamilton, D. Sidransky, J. R. Eshleman, R. W. Burt, S. J. Meltzer, M. A. Rodriguez-Bigas, R. Fodde, G. N. Ranzani, and S. Srivastava. 1998.** A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58: 5248-57.
- Bollag, G., and F. McCormick. 1991.** Regulators and effectors of ras proteins. *Annu Rev Cell Biol* 7: 601-32.
- Bos, J. L. 1989.** ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49: 4682-9.
- Bos, J. L. 1997.** Ras-like GTPases. *Biochim Biophys Acta* 1333: M19-31.
- Bostick, R. M., L. Fosdick, J. R. Wood, P. Grambsch, G. A. Grandits, T. J. Lillemoe, T. A. Louis, and J. D. Potter. 1995.** Calcium and colorectal epithelial cell proliferation in sporadic adenoma patients: a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *J Natl Cancer Inst* 87: 1307-15.
- Bourne, H. R., D. A. Sanders, and F. McCormick. 1990.** The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions. *Nature* 348: 125-32.

- Bourne, H. R., D. A. Sanders, and F. McCormick. 1991.** The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349: 117-27.
- Boyartchuk, V. L., M. N. Ashby, and J. Rine. 1997.** Modulation of Ras and a-factor function by carboxyl-terminal proteolysis. *Science* 275: 1796-800.
- Brose, M. S., P. Volpe, M. Feldman, M. Kumar, I. Rishi, R. Gerrero, E. Einhorn, M. Herlyn, J. Minna, A. Nicholson, J. A. Roth, S. M. Albelda, H. Davies, C. Cox, G. Brignell, P. Stephens, P. A. Futreal, R. Wooster, M. R. Stratton, and B. L. Weber. 2002.** BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. *Cancer Res* 62: 6997-7000.
- Brown, T. C., and J. Jiricny. 1988.** Different base/base mispairs are corrected with different efficiencies and specificities in monkey kidney cells. *Cell* 54: 705-11.
- Buss, J. E., P. A. Solski, J. P. Schaeffer, M. J. MacDonald, and C. J. Der. 1989.** Activation of the cellular proto-oncogene product p21Ras by addition of a myristylation signal. *Science* 243: 1600-3.
- Cannavo, E., G. Marra, J. Sabates-Bellver, M. Menigatti, S. M. Lipkin, F. Fischer, P. Cejka, and J. Jiricny. 2005.** Expression of the MutL homologue hMLH3 in human cells and its role in DNA mismatch repair. *Cancer Res* 65: 10759-66.
- Casares, S., Y. Ionov, H. Y. Ge, E. Stanbridge, and M. Perucho. 1995.** The microsatellite mutator phenotype of colon cancer cells is often recessive. *Oncogene* 11: 2303-10.
- Catling, A. D., C. W. Reuter, M. E. Cox, S. J. Parsons, and M. J. Weber. 1994.** Partial purification of a mitogen-activated protein kinase kinase activator from bovine brain. Identification as B-Raf or a B-Raf-associated activity. *J Biol Chem* 269: 30014-21.
- Chan, A. O., J. P. Issa, J. S. Morris, S. R. Hamilton, and A. Rashid. 2002a.** Concordant CpG island methylation in hyperplastic polyposis. *Am J Pathol* 160: 529-36.
- Chan, A. O., R. R. Broaddus, P. S. Houlihan, J. P. Issa, S. R. Hamilton, and A. Rashid. 2002b.** CpG island methylation in aberrant crypt foci of the colorectum. *Am J Pathol* 160: 1823-30.
- Chan, T. L., W. Zhao, S. Y. Leung, and S. T. Yuen. 2003.** BRAF and KRAS mutations in colorectal hyperplastic polyps and serrated adenomas. *Cancer Res* 63: 4878-81.
- Chang, S. C., J. K. Lin, S. H. Yang, H. S. Wang, A. F. Li, and C. W. Chi. 2006.** Relationship between genetic alterations and prognosis in sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer* 118: 1721-7.
- Chen, J., K. Fujii, L. Zhang, T. Roberts, and H. Fu. 2001.** Raf-1 promotes cell survival by antagonizing apoptosis signal-regulating kinase 1 through a MEK-ERK independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 7783-8.
- Chiloeches, A., C. S. Mason, and R. Marais. 2001.** S338 phosphorylation of Raf-1 is independent of phosphatidylinositol 3-kinase and Pak3. *Mol Cell Biol* 21: 2423-34.
- Chipuk, J. E., and D. R. Green. 2006.** Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ*.
- Chong, H., J. Lee, and K. L. Guan. 2001.** Positive and negative regulation of Raf kinase activity and function by phosphorylation. *Embo J* 20: 3716-27.
- Choy, E., V. K. Chiu, J. Silletti, M. Feoktistov, T. Morimoto, D. Michaelson, I. E. Ivanov, and M. R. Philips. 1999.** Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell* 98: 69-80.
- Christmann, M., M. T. Tomicic, and B. Kaina. 2002.** Phosphorylation of mismatch repair proteins MSH2 and MSH6 affecting MutSalpha mismatch-binding activity. *Nucleic Acids Res* 30: 1959-66.
- Christmann, M., M. T. Tomicic, W. P. Roos, and B. Kaina. 2003.** Mechanisms of human DNA repair: an update. *Toxicology* 193: 3-34.

- Dai, Q., E. Choy, V. Chiu, J. Romano, S. R. Slivka, S. A. Steitz, S. Michaelis, and M. R. Philips. 1998.** Mammalian prenylcysteine carboxyl methyltransferase is in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 273: 15030-4.
- Daum, G., I. Eisenmann-Tappe, H. W. Fries, J. Troppmair, and U. R. Rapp. 1994.** The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* 19: 474-80.
- Davies, H., G. R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M. J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B. A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G. J. Riggins, D. D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J. W. Ho, S. Y. Leung, S. T. Yuen, B. L. Weber, H. F. Seigler, T. L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C. J. Marshall, R. Wooster, M. R. Stratton, and P. A. Futreal. 2002.** Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417: 949-54.
- De Ruiter, N. D., B. M. Burgering, and J. L. Bos. 2001.** Regulation of the Forkhead transcription factor AFX by Raf-dependent phosphorylation of threonines 447 and 451. *Mol Cell Biol* 21: 8225-35.
- Deans, G. T., T. G. Parks, B. J. Rowlands, and R. A. Spence. 1992.** Prognostic factors in colorectal cancer. *Br J Surg* 79: 608-13.
- Deng, G., I. Bell, S. Crawley, J. Gum, J. P. Terdiman, B. A. Allen, B. Truta, M. H. Sleisenger, and Y. S. Kim. 2004.** BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 10: 191-5.
- Desai, D. C., J. C. Lockman, R. B. Chadwick, X. Gao, A. Percesepe, D. G. Evans, M. Miyaki, S. T. Yuen, P. Radice, E. R. Maher, F. A. Wright, and A. de La Chapelle. 2000.** Recurrent germline mutation in MSH2 arises frequently de novo. *J Med Genet* 37: 646-52.
- Diergaarde, B., A. Vrieling, A. A. van Kraats, G. N. van Muijen, F. J. Kok, and E. Kampman. 2003.** Cigarette smoking and genetic alterations in sporadic colon carcinomas. *Carcinogenesis* 24: 565-71.
- Domingo, E., E. Espin, M. Armengol, C. Oliveira, M. Pinto, A. Duval, C. Brennetot, R. Seruca, R. Hamelin, H. Yamamoto, and S. Schwartz, Jr. 2004a.** Activated BRAF targets proximal colon tumors with mismatch repair deficiency and MLH1 inactivation. *Genes Chromosomes Cancer* 39: 138-42.
- Domingo, E., R. C. Niessen, C. Oliveira, P. Alhopuro, C. Moutinho, E. Espin, M. Armengol, R. H. Sijmons, J. H. Kleibeuker, R. Seruca, L. A. Aaltonen, K. Imai, H. Yamamoto, S. Schwartz, Jr., and R. M. Hofstra. 2005.** BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene* 24: 3995-8.
- Domingo, E., P. Laiho, M. Ollikainen, M. Pinto, L. Wang, A. J. French, J. Westra, T. Frebourg, E. Espin, M. Armengol, R. Hamelin, H. Yamamoto, R. M. Hofstra, R. Seruca, A. Lindblom, P. Peltomaki, S. N. Thibodeau, L. A. Aaltonen, and S. Schwartz, Jr. 2004b.** BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 41: 664-8.
- Downward, J. 2003.** Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3: 11-22.
- Drummond, J. T., G. M. Li, M. J. Longley, and P. Modrich. 1995.** Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science* 268: 1909-12.
- Dumaz, N., and R. Marais. 2003.** Protein kinase A blocks Raf-1 activity by stimulating 14-3-3 binding and blocking Raf-1 interaction with Ras. *J Biol Chem* 278: 29819-23.

- Duval, A., and R. Hamelin. 2002.** Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res* 62: 2447-54.
- Eckfeld, K., L. Hesson, M. D. Vos, I. Bieche, F. Latif, and G. J. Clark. 2004.** RASSF4/AD037 is a potential ras effector/tumor suppressor of the RASSF family. *Cancer Res* 64: 8688-93.
- Elsaleh, H., D. Joseph, F. Grieu, N. Zeps, N. Spry, and B. Iacopetta. 2000.** Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 355: 1745-50.
- Endoh, M., G. Tamura, T. Honda, N. Homma, M. Terashima, S. Nishizuka, and T. Motoyama. 2005.** RASSF2, a potential tumour suppressor, is silenced by CpG island hypermethylation in gastric cancer. *Br J Cancer* 93: 1395-9.
- Fabian, J. R., I. O. Daar, and D. K. Morrison. 1993.** Critical tyrosine residues regulate the enzymatic and biological activity of Raf-1 kinase. *Mol Cell Biol* 13: 7170-9.
- Fallik, D., F. Borrini, V. Boige, J. Viguiet, S. Jacob, C. Miquel, J. C. Sabourin, M. Ducreux, and F. Praz. 2003.** Microsatellite instability is a predictive factor of the tumor response to irinotecan in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 63: 5738-44.
- Fearon, E. R., and B. Vogelstein. 1990.** A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61: 759-67.
- Fleisher, A. S., M. Esteller, S. Wang, G. Tamura, H. Suzuki, J. Yin, T. T. Zou, J. M. Abraham, D. Kong, K. N. Smolinski, Y. Q. Shi, M. G. Rhyu, S. M. Powell, S. P. James, K. T. Wilson, J. G. Herman, and S. J. Meltzer. 1999.** Hypermethylation of the hMLH1 gene promoter in human gastric cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 59: 1090-5.
- Flores-Rozas, H., and R. D. Kolodner. 1998.** The *Saccharomyces cerevisiae* MLH3 gene functions in MSH3-dependent suppression of frameshift mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12404-9.
- Froggatt, N. J., J. Green, C. Brassett, D. G. Evans, D. T. Bishop, R. Kolodner, and E. R. Maher. 1999.** A common MSH2 mutation in English and North American HNPCC families: origin, phenotypic expression, and sex specific differences in colorectal cancer. *J Med Genet* 36: 97-102.
- Fujiwara, T., J. M. Stolker, T. Watanabe, A. Rashid, P. Longo, J. R. Eshleman, S. Booker, H. T. Lynch, J. R. Jass, J. S. Green, H. Kim, J. Jen, B. Vogelstein, and S. R. Hamilton. 1998.** Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 153: 1063-78.
- Furth, M. E., T. H. Aldrich, and C. Cordon-Cardo. 1987.** Expression of ras proto-oncogene proteins in normal human tissues. *Oncogene* 1: 47-58.
- Galaktionov, K., C. Jessus, and D. Beach. 1995.** Raf1 interaction with Cdc25 phosphatase ties mitogenic signal transduction to cell cycle activation. *Genes Dev* 9: 1046-58.
- Genschel, J., L. R. Bazemore, and P. Modrich. 2002.** Human exonuclease I is required for 5' and 3' mismatch repair. *J Biol Chem* 277: 13302-11.
- Genschel, J., S. J. Littman, J. T. Drummond, and P. Modrich. 1998.** Isolation of MutSbeta from human cells and comparison of the mismatch repair specificities of MutSbeta and MutSalpha. *J Biol Chem* 273: 19895-901.
- Ghosh, S., and R. M. Bell. 1994.** Identification of discrete segments of human Raf-1 kinase critical for high affinity binding to Ha-Ras. *J Biol Chem* 269: 30785-8.
- Gille, H., A. D. Sharrocks, and P. E. Shaw. 1992.** Phosphorylation of transcription factor p62TCF by MAP kinase stimulates ternary complex formation at c-fos promoter. *Nature* 358: 414-7.

- Giovannucci, E., and W. C. Willett. 1994.** Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med* 26: 443-52.
- Giovannucci, E., G. A. Colditz, M. J. Stampfer, D. Hunter, B. A. Rosner, W. C. Willett, and F. E. Speizer. 1994.** A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in U.S. women. *J Natl Cancer Inst* 86: 192-9.
- Gomez, N., and P. Cohen. 1991.** Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature* 353: 170-3.
- Gradia, S., S. Acharya, and R. Fishel. 1997.** The human mismatch recognition complex hMSH2-hMSH6 functions as a novel molecular switch. *Cell* 91: 995-1005.
- Gradia, S., D. Subramanian, T. Wilson, S. Acharya, A. Makhov, J. Griffith, and R. Fishel. 1999.** hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. *Mol Cell* 3: 255-61.
- Grant, B. D., W. Hemmer, I. Tsigelny, J. A. Adams, and S. S. Taylor. 1998.** Kinetic analyses of mutations in the glycine-rich loop of cAMP-dependent protein kinase. *Biochemistry* 37: 7708-15.
- Groden, J., A. Thliveris, W. Samowitz, M. Carlson, L. Gelbert, H. Albertsen, G. Joslyn, J. Stevens, L. Spirio, M. Robertson, and et al. 1991.** Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 66: 589-600.
- Guan, K. L., C. Figueroa, T. R. Brtva, T. Zhu, J. Taylor, T. D. Barber, and A. B. Vojtek. 2000.** Negative regulation of the serine/threonine kinase B-Raf by Akt. *J Biol Chem* 275: 27354-9.
- Habraken, Y., P. Sung, L. Prakash, and S. Prakash. 1996.** Binding of insertion/deletion DNA mismatches by the heterodimer of yeast mismatch repair proteins MSH2 and MSH3. *Curr Biol* 6: 1185-7.
- Hainaut, P., and M. Hollstein. 2000.** p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 77: 81-137.
- Han, L., and J. Colicelli. 1995.** A human protein selected for interference with Ras function interacts directly with Ras and competes with Raf1. *Mol Cell Biol* 15: 1318-23.
- Hancock, J. F. 2003.** Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 373-84.
- Hancock, J. F., H. Paterson, and C. J. Marshall. 1990.** A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* 63: 133-9.
- Hancock, J. F., K. Cadwallader, H. Paterson, and C. J. Marshall. 1991.** A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *Embo J* 10: 4033-9.
- He, T. C., A. B. Sparks, C. Rago, H. Hermeking, L. Zawel, L. T. da Costa, P. J. Morin, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler. 1998.** Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281: 1509-12.
- Hekman, M., S. Wiese, R. Metz, S. Albert, J. Troppmair, J. Nickel, M. Sendtner, and U. R. Rapp. 2004.** Dynamic changes in C-Raf phosphorylation and 14-3-3 protein binding in response to growth factor stimulation: differential roles of 14-3-3 protein binding sites. *J Biol Chem* 279: 14074-86.
- Hemmer, W., M. McGlone, I. Tsigelny, and S. S. Taylor. 1997.** Role of the glycine triad in the ATP-binding site of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 272: 16946-54.
- Hemminki, A., P. Peltomaki, J. P. Mecklin, H. Jarvinen, R. Salovaara, M. Nystrom-Lahti, A. de la Chapelle, and L. A. Aaltonen. 1994.** Loss of the wild type MLH1 gene is a feature of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 8: 405-10.

- Hesson, L., A. Dallol, J. D. Minna, E. R. Maher, and F. Latif. 2003.** NORE1A, a homologue of RASSF1A tumour suppressor gene is inactivated in human cancers. *Oncogene* 22: 947-54.
- Hesson, L. B., R. Wilson, D. Morton, C. Adams, M. Walker, E. R. Maher, and F. Latif. 2005.** CpG island promoter hypermethylation of a novel Ras-effector gene RASSF2A is an early event in colon carcinogenesis and correlates inversely with K-ras mutations. *Oncogene* 24: 3987-94.
- Hienonen, T., P. Laiho, R. Salovaara, J. P. Mecklin, H. Jarvinen, P. Sistonen, P. Peltomaki, R. Lehtonen, N. N. Nupponen, V. Launonen, A. Karhu, and L. A. Aaltonen. 2003.** Little evidence for involvement of MLH3 in colorectal cancer predisposition. *Int J Cancer* 106: 292-6.
- Hingorani, S. R., M. A. Jacobetz, G. P. Robertson, M. Herlyn, and D. A. Tuveson. 2003.** Suppression of BRAF(V599E) in human melanoma abrogates transformation. *Cancer Res* 63: 5198-202.
- Hisamuddin, I. M., and V. W. Yang. 2004.** Genetics of colorectal cancer. *MedGenMed* 6: 13.
- Hollstein, M., D. Sidransky, B. Vogelstein, and C. C. Harris. 1991.** p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53.
- Hrycyna, C. A., S. K. Sapperstein, S. Clarke, and S. Michaelis. 1991.** The *Saccharomyces cerevisiae* STE14 gene encodes a methyltransferase that mediates C-terminal methylation of a-factor and RAS proteins. *Embo J* 10: 1699-709.
- Hu, S., D. Liu, R. P. Tufano, K. A. Carson, E. Rosenbaum, Y. Cohen, E. H. Holt, K. Kiseljak-Vassiliades, K. J. Rhoden, S. Tolaney, S. Condouris, G. Tallini, W. H. Westra, C. B. Umbricht, M. A. Zeiger, J. A. Califano, V. Vasko, and M. Xing. 2006.** Association of aberrant methylation of tumor suppressor genes with tumor aggressiveness and BRAF mutation in papillary thyroid cancer. *Int J Cancer*.
- Hughes, M. J., and J. Jiricny. 1992.** The purification of a human mismatch-binding protein and identification of its associated ATPase and helicase activities. *J Biol Chem* 267: 23876-82.
- Huser, M., J. Luckett, A. Chiloehes, K. Mercer, M. Iwobi, S. Giblett, X. M. Sun, J. Brown, R. Marais, and C. Pritchard. 2001.** MEK kinase activity is not necessary for Raf-1 function. *Embo J* 20: 1940-51.
- Iaccarino, I., G. Marra, F. Palombo, and J. Jiricny. 1998.** hMSH2 and hMSH6 play distinct roles in mismatch binding and contribute differently to the ATPase activity of hMutSalpha. *Embo J* 17: 2677-86.
- Iacopetta, B. J., J. Welch, R. Soong, A. K. House, X. P. Zhou, and R. Hamelin. 1998.** Mutation of the transforming growth factor-beta type II receptor gene in right-sided colorectal cancer: relationship to clinicopathological features and genetic alterations. *J Pathol* 184: 390-5.
- Ikenoue, T., Y. Hikiba, F. Kanai, Y. Tanaka, J. Imamura, T. Imamura, M. Ohta, H. Ijichi, K. Tateishi, T. Kawakami, J. Aragaki, M. Matsumura, T. Kawabe, and M. Omata. 2003.** Functional analysis of mutations within the kinase activation segment of B-Raf in human colorectal tumors. *Cancer Res* 63: 8132-7.
- Ikenoue, T., Y. Hikiba, F. Kanai, J. Aragaki, Y. Tanaka, J. Imamura, T. Imamura, M. Ohta, H. Ijichi, K. Tateishi, T. Kawakami, M. Matsumura, T. Kawabe, and M. Omata. 2004.** Different effects of point mutations within the B-Raf glycine-rich loop in colorectal tumors on mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase/extracellular signal-regulated kinase and nuclear factor kappaB pathway and cellular transformation. *Cancer Res* 64: 3428-35.

- Ikenoue, T., F. Kanai, Y. Hikiba, Y. Tanaka, J. Imamura, M. Ohta, A. Jazag, B. Guleng, Y. Asaoka, K. Tateishi, T. Kawakami, M. Matsumura, T. Kawabe, and M. Omata. 2005.** Functional consequences of mutations in a putative Akt phosphorylation motif of B-raf in human cancers. *Mol Carcinog* 43: 59-63.
- Ionov, Y., M. A. Peinado, S. Malkhosyan, D. Shibata, and M. Perucho. 1993.** Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363: 558-61.
- Jaiswal, R. K., S. A. Moodie, A. Wolfman, and G. E. Landreth. 1994.** The mitogen-activated protein kinase cascade is activated by B-Raf in response to nerve growth factor through interaction with p21ras. *Mol Cell Biol* 14: 6944-53.
- Janosch, P., M. Schellerer, T. Seitz, P. Reim, M. Eulitz, M. Brielmeier, W. Kolch, J. M. Sedivy, and H. Mischak. 1996.** Characterization of IkappaB kinases. IkappaB-alpha is not phosphorylated by Raf-1 or protein kinase C isozymes, but is a casein kinase II substrate. *J Biol Chem* 271: 13868-74.
- Jarvinen, H. J., M. Aarnio, H. Mustonen, K. Aktan-Collan, L. A. Aaltonen, P. Peltomaki, A. De La Chapelle, and J. P. Mecklin. 2000.** Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 118: 829-34.
- Jass, J. R. 1999.** Serrated adenoma and colorectal cancer. *J Pathol* 187: 499-502.
- Jass, J. R. 2003.** Re: Tomlinson et al. Does MSI-low exist. *J Pathol* 2002; 197: 6-13. *J Pathol* 199: 267-9; author reply 269-70.
- Jen, J., S. M. Powell, N. Papadopoulos, K. J. Smith, S. R. Hamilton, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler. 1994.** Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res* 54: 5523-6.
- Jiricny, J. 1998.** Replication errors: cha(lle)nging the genome. *Embo J* 17: 6427-36.
- Jiricny, J. 2006.** The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 335-46.
- Johnson, L. N., E. D. Lowe, M. E. Noble, and D. J. Owen. 1998.** The Eleventh Datta Lecture. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Lett* 430: 1-11.
- Johnson, R. E., G. K. Kovvali, S. N. Guzder, N. S. Amin, C. Holm, Y. Habraken, P. Sung, L. Prakash, and S. Prakash. 1996.** Evidence for involvement of yeast proliferating cell nuclear antigen in DNA mismatch repair. *J Biol Chem* 271: 27987-90.
- Kambara, T., L. A. Simms, V. L. Whitehall, K. J. Spring, C. V. Wynter, M. D. Walsh, M. A. Barker, S. Arnold, A. McGivern, N. Matsubara, N. Tanaka, T. Higuchi, J. Young, J. R. Jass, and B. A. Leggett. 2004.** BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 53: 1137-44.
- Kane, M. F., M. Loda, G. M. Gaida, J. Lipman, R. Mishra, H. Goldman, J. M. Jessup, and R. Kolodner. 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.
- Karasarides, M., A. Chilioches, R. Hayward, D. Niculescu-Duvaz, I. Scanlon, F. Friedlos, L. Ogilvie, D. Hedley, J. Martin, C. J. Marshall, C. J. Springer, and R. Marais. 2004.** B-RAF is a therapeutic target in melanoma. *Oncogene* 23: 6292-8.
- Khokhlatchev, A. V., B. Canagarajah, J. Wilsbacher, M. Robinson, M. Atkinson, E. Goldsmith, and M. H. Cobb. 1998.** Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93: 605-15.
- Kim, E., P. Ambroziak, J. C. Otto, B. Taylor, M. Ashby, K. Shannon, P. J. Casey, and S. G. Young. 1999.** Disruption of the mouse Rce1 gene results in defective Ras processing and mislocalization of Ras within cells. *J Biol Chem* 274: 8383-90.

- Kim, I. J., J. H. Park, H. C. Kang, Y. Shin, H. W. Park, H. R. Park, J. L. Ku, S. B. Lim, and J. G. Park. 2003.** Mutational analysis of BRAF and K-ras in gastric cancers: absence of BRAF mutations in gastric cancers. *Hum Genet* 114: 118-20.
- King, A. J., H. Sun, B. Diaz, D. Barnard, W. Miao, S. Bagrodia, and M. S. Marshall. 1998.** The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* 396: 180-3.
- Kinzler, K. W., M. C. Nilbert, L. K. Su, B. Vogelstein, T. M. Bryan, D. B. Levy, K. J. Smith, A. C. Preisinger, P. Hedge, D. McKechnie, and et al. 1991.** Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253: 661-5.
- Kleibeuker, J. H., N. H. Mulder, A. Cats, R. van der Meer, and E. G. de Vries. 1996.** Calcium and colorectal epithelial cell proliferation. *Gut* 39: 774-5.
- Ko, L. J., and C. Prives. 1996.** p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev* 10: 1054-72.
- Koinuma, K., K. Shitoh, Y. Miyakura, T. Furukawa, Y. Yamashita, J. Ota, R. Ohki, Y. L. Choi, T. Wada, F. Konishi, H. Nagai, and H. Mano. 2004.** Mutations of BRAF are associated with extensive hMLH1 promoter methylation in sporadic colorectal carcinomas. *Int J Cancer* 108: 237-42.
- Kolch, W. 2000.** Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* 351 Pt 2: 289-305.
- Kolch, W. 2005.** Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 827-37.
- Konishi, M., R. Kikuchi-Yanoshita, K. Tanaka, M. Muraoka, A. Onda, Y. Okumura, N. Kishi, T. Iwama, T. Mori, M. Koike, K. Ushio, M. Chiba, S. Nomizu, F. Konishi, J. Utsunomiya, and M. Miyaki. 1996.** Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* 111: 307-17.
- Korinek, V., N. Barker, P. J. Morin, D. van Wichen, R. de Weger, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, and H. Clevers. 1997.** Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275: 1784-7.
- Krengel, U., L. Schlichting, A. Scherer, R. Schumann, M. Frech, J. John, W. Kabsch, E. F. Pai, and A. Wittinghofer. 1990.** Three-dimensional structures of H-ras p21 mutants: molecular basis for their inability to function as signal switch molecules. *Cell* 62: 539-48.
- Kune, G. A., and L. Vitetta. 1992.** Alcohol consumption and the etiology of colorectal cancer: a review of the scientific evidence from 1957 to 1991. *Nutr Cancer* 18: 97-111.
- Kyriakis, J. M., H. App, X. F. Zhang, P. Banerjee, D. L. Brautigan, U. R. Rapp, and J. Avruch. 1992.** Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358: 417-21.
- Lacal, P. M., C. Y. Pennington, and J. C. Lacal. 1988.** Transforming activity of ras proteins translocated to the plasma membrane by a myristoylation sequence from the src gene product. *Oncogene* 2: 533-7.
- Lambert, J. M., Q. T. Lambert, G. W. Reuther, A. Malliri, D. P. Siderovski, J. Sondek, J. G. Collard, and C. J. Der. 2002.** Tiam1 mediates Ras activation of Rac by a PI(3)K-independent mechanism. *Nat Cell Biol* 4: 621-5.
- Leon, J., I. Guerrero, and A. Pellicer. 1987.** Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol Cell Biol* 7: 1535-40.
- Leung, S. Y., S. T. Yuen, L. P. Chung, K. M. Chu, A. S. Chan, and J. C. Ho. 1999.** hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 59: 159-64.
- Levine, A. J., J. Momand, and C. A. Finlay. 1991.** The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 351: 453-6.

- Li, H., L. Myeroff, D. Smiraglia, M. F. Romero, T. P. Pretlow, L. Kasturi, J. Lutterbaugh, R. M. Rerko, G. Casey, J. P. Issa, J. Willis, J. K. Willson, C. Plass, and S. D. Markowitz. 2003.** SLC5A8, a sodium transporter, is a tumor suppressor gene silenced by methylation in human colon aberrant crypt foci and cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 8412-7.
- Li, S., and J. M. Sedivy. 1993.** Raf-1 protein kinase activates the NF-kappa B transcription factor by dissociating the cytoplasmic NF-kappa B-I kappa B complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 9247-51.
- Li, W. Q., K. Kawakami, A. Ruskiewicz, G. Bennett, J. Moore, and B. Iacopetta. 2006.** BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *Mol Cancer* 5: 2.
- Lindor, N. M., L. J. Burgart, O. Leontovich, R. M. Goldberg, J. M. Cunningham, D. J. Sargent, C. Walsh-Vockley, G. M. Petersen, M. D. Walsh, B. A. Leggett, J. P. Young, M. A. Barker, J. R. Jass, J. Hopper, S. Gallinger, B. Bapat, M. Redston, and S. N. Thibodeau. 2002.** Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 20: 1043-8.
- Liu, B., R. E. Parsons, S. R. Hamilton, G. M. Petersen, H. T. Lynch, P. Watson, S. Markowitz, J. K. Willson, J. Green, A. de la Chapelle, and et al. 1994.** hMSH2 mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. *Cancer Res* 54: 4590-4.
- Liu, B., R. Parsons, N. Papadopoulos, N. C. Nicolaides, H. T. Lynch, P. Watson, J. R. Jass, M. Dunlop, A. Wyllie, P. Peltomaki, A. de la Chapelle, S. R. Hamilton, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler. 1996.** Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 2: 169-74.
- Liu, H. X., X. L. Zhou, T. Liu, B. Werelius, G. Lindmark, N. Dahl, and A. Lindblom. 2003.** The role of hMLH3 in familial colorectal cancer. *Cancer Res* 63: 1894-9.
- Liu, T., H. Yan, S. Kuismanen, A. Percesepe, M. L. Bisgaard, M. Pedroni, P. Benatti, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, M. Ponz de Leon, P. Peltomaki, and A. Lindblom. 2001.** The role of hPMS1 and hPMS2 in predisposing to colorectal cancer. *Cancer Res* 61: 7798-802.
- Liu, W., X. Dong, M. Mai, R. S. Seelan, K. Taniguchi, K. K. Krishnadath, K. C. Halling, J. M. Cunningham, L. A. Boardman, C. Qian, E. Christensen, S. S. Schmidt, P. C. Roche, D. I. Smith, and S. N. Thibodeau. 2000.** Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet* 26: 146-7.
- Longacre, T. A., and C. M. Fenoglio-Preiser. 1990.** Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 14: 524-37.
- Longley, M. J., A. J. Pierce, and P. Modrich. 1997.** DNA polymerase delta is required for human mismatch repair in vitro. *J Biol Chem* 272: 10917-21.
- Losi, L., L. Roncucci, C. di Gregorio, M. P. de Leon, and J. Benhattar. 1996.** K-ras and p53 mutations in human colorectal aberrant crypt foci. *J Pathol* 178: 259-63.
- Losi, L., M. Ponz de Leon, J. Jiricny, C. Di Gregorio, P. Benatti, A. Percesepe, R. Fante, L. Roncucci, M. Pedroni, and J. Benhattar. 1997.** K-ras and p53 mutations in hereditary non-polyposis colorectal cancers. *Int J Cancer* 74: 94-6.
- Loukola, A., K. Eklin, P. Laiho, R. Salovaara, P. Kristo, H. Jarvinen, J. P. Mecklin, V. Launonen, and L. A. Aaltonen. 2001.** Microsatellite marker analysis in screening for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res* 61: 4545-9.
- Lowy, D. R., and B. M. Willumsen. 1993.** Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem* 62: 851-91.

- Lubomierski, N., G. Plotz, M. Wormek, K. Engels, S. Kriener, J. Trojan, B. Jungling, S. Zeuzem, and J. Raedle. 2005. BRAF mutations in colorectal carcinoma suggest two entities of microsatellite-unstable tumors. *Cancer* 104: 952-61.
- Luckett, J. C., M. B. Huser, N. Giagtzoglou, J. E. Brown, and C. A. Pritchard. 2000. Expression of the A-raf proto-oncogene in the normal adult and embryonic mouse. *Cell Growth Differ* 11: 163-71.
- Luo, L., W. D. Chen, and T. P. Pretlow. 2005. CpG island methylation in aberrant crypt foci and cancers from the same patients. *Int J Cancer* 115: 747-51.
- Lynch, H. T., and A. de la Chapelle. 2003. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348: 919-32.
- Ma, J., and M. Karplus. 1997. Molecular switch in signal transduction: reaction paths of the conformational changes in ras p21. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11905-10.
- Maehama, T., and J. E. Dixon. 1998. The tumor suppressor, PTEN/MMAC1, dephosphorylates the lipid second messenger, phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J Biol Chem* 273: 13375-8.
- Malkin, D., F. P. Li, L. C. Strong, J. F. Fraumeni, Jr., C. E. Nelson, D. H. Kim, J. Kassel, M. A. Gryka, F. Z. Bischoff, M. A. Tainsky, and et al. 1990. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250: 1233-8.
- Marais, R., Y. Light, H. F. Paterson, C. S. Mason, and C. J. Marshall. 1997. Differential regulation of Raf-1, A-Raf, and B-Raf by oncogenic ras and tyrosine kinases. *J Biol Chem* 272: 4378-83.
- Markowitz, S. D., D. M. Dawson, J. Willis, and J. K. Willson. 2002. Focus on colon cancer. *Cancer Cell* 1: 233-6.
- Marra, G., I. Iaccarino, T. Lettieri, G. Roscilli, P. Delmastro, and J. Jiricny. 1998. Mismatch repair deficiency associated with overexpression of the MSH3 gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 8568-73.
- Marshall, C. J. 1994. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev* 4: 82-9.
- Marshall, M. S. 1995. Ras target proteins in eukaryotic cells. *Faseb J* 9: 1311-8.
- Marsischky, G. T., N. Filosi, M. F. Kane, and R. Kolodner. 1996. Redundancy of *Saccharomyces cerevisiae* MSH3 and MSH6 in MSH2-dependent mismatch repair. *Genes Dev* 10: 407-20.
- Mason, C. S., C. J. Springer, R. G. Cooper, G. Superti-Furga, C. J. Marshall, and R. Marais. 1999. Serine and tyrosine phosphorylations cooperate in Raf-1, but not B-Raf activation. *Embo J* 18: 2137-48.
- Matheny, S. A., C. Chen, R. L. Kortum, G. L. Razidlo, R. E. Lewis, and M. A. White. 2004. Ras regulates assembly of mitogenic signalling complexes through the effector protein IMP. *Nature* 427: 256-60.
- McDonald, S. A., S. L. Preston, M. J. Lovell, N. A. Wright, and J. A. Jankowski. 2006. Mechanisms of disease: from stem cells to colorectal cancer. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 3: 267-74.
- McLellan, E. A., and R. P. Bird. 1988. Aberrant crypts: potential preneoplastic lesions in the murine colon. *Cancer Res* 48: 6187-92.
- Mecklin, J. P. 1987. Frequency of hereditary colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 93: 1021-5.
- Mercer, K., A. Chiloehes, M. Huser, M. Kiernan, R. Marais, and C. Pritchard. 2002. ERK signalling and oncogene transformation are not impaired in cells lacking A-Raf. *Oncogene* 21: 347-55.

- Mercer, K. E., and C. A. Pritchard. 2003.** Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* 1653: 25-40.
- Miyaki, M., T. Iijima, T. Yamaguchi, T. Kadofuku, N. Funata, and T. Mori. 2004.** Both BRAF and KRAS mutations are rare in colorectal carcinomas from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Lett* 211: 105-9.
- Miyaki, M., M. Konishi, K. Tanaka, R. Kikuchi-Yanoshita, M. Muraoka, M. Yasuno, T. Igari, M. Koike, M. Chiba, and T. Mori. 1997.** Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 17: 271-2.
- Moodie, S. A., B. M. Willumsen, M. J. Weber, and A. Wolfman. 1993.** Complexes of Ras.GTP with Raf-1 and mitogen-activated protein kinase kinase. *Science* 260: 1658-61.
- Morin, P. J., A. B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein, and K. W. Kinzler. 1997.** Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275: 1787-90.
- Morrison, D. K. 2001.** KSR: a MAPK scaffold of the Ras pathway? *J Cell Sci* 114: 1609-12.
- Morrison, D. K., and R. E. Cutler. 1997.** The complexity of Raf-1 regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9: 174-9.
- Mott, H. R., J. W. Carpenter, S. Zhong, S. Ghosh, R. M. Bell, and S. L. Campbell. 1996.** The solution structure of the Raf-1 cysteine-rich domain: a novel ras and phospholipid binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 8312-7.
- Muller, J., S. Ory, T. Copeland, H. Piwnica-Worms, and D. K. Morrison. 2001.** C-TAK1 regulates Ras signaling by phosphorylating the MAPK scaffold, KSR1. *Mol Cell* 8: 983-93.
- Nakagawa, H., J. C. Lockman, W. L. Frankel, H. Hampel, K. Steenblock, L. J. Burgart, S. N. Thibodeau, and A. de la Chapelle. 2004.** Mismatch repair gene PMS2: disease-causing germline mutations are frequent in patients whose tumors stain negative for PMS2 protein, but paralogous genes obscure mutation detection and interpretation. *Cancer Res* 64: 4721-7.
- Nicolaidis, N. C., N. Papadopoulos, B. Liu, Y. F. Wei, K. C. Carter, S. M. Ruben, C. A. Rosen, W. A. Haseltine, R. D. Fleischmann, C. M. Fraser, and et al. 1994.** Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 371: 75-80.
- Ogino, S., M. Cantor, T. Kawasaki, M. Brahmandam, G. J. Kirkner, D. J. Weisenberger, M. Campan, P. W. Laird, M. Loda, and C. S. Fuchs. 2006.** CpG island methylator phenotype (CIMP) of colorectal cancer is best characterised by quantitative DNA methylation analysis and prospective cohort studies. *Gut* 55: 1000-6.
- Oliveira, C., S. Velho, E. Domingo, A. Preto, R. M. Hofstra, R. Hamelin, H. Yamamoto, R. Seruca, and S. Schwartz, Jr. 2005.** Concomitant RASSF1A hypermethylation and KRAS/BRAF mutations occur preferentially in MSI sporadic colorectal cancer. *Oncogene* 24: 7630-4.
- Oliveira, C., M. Pinto, A. Duval, C. Brennetot, E. Domingo, E. Espin, M. Armengol, H. Yamamoto, R. Hamelin, R. Seruca, and S. Schwartz, Jr. 2003.** BRAF mutations characterize colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency. *Oncogene* 22: 9192-6.
- Oliveira, C., S. Velho, C. Moutinho, A. Ferreira, A. Preto, E. Domingo, A. F. Capelinha, A. Duval, R. Hamelin, J. C. Machado, S. Schwartz, Jr., F. Carneiro, and R. Seruca. 2006.** KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. *Oncogene*.
- Oliveira, C., J. L. Westra, D. Arango, M. Ollikainen, E. Domingo, A. Ferreira, S. Velho, R. Niessen, K. Lagerstedt, P. Alhopuro, P. Laiho, I. Veiga, M. R. Teixeira, M. Ligtenberg, J. H. Kleibeuker, R. H. Sijmons, J. T. Plukker, K. Imai, P. Lage, R. Hamelin, C. Albuquerque, S. Schwartz, Jr., A. Lindblom, P. Peltomaki, H. Yamamoto, L. A. Aaltonen, R. Seruca, and R. M. Hofstra. 2004.** Distinct patterns of KRAS mutations in

- colorectal carcinomas according to germline mismatch repair defects and hMLH1 methylation status. *Hum Mol Genet* 13: 2303-11.
- Olivier, M., R. Eeles, M. Hollstein, M. A. Khan, C. C. Harris, and P. Hainaut. 2002.** The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 19: 607-14.
- Olschwang, S., R. Hamelin, P. Laurent-Puig, B. Thuille, Y. De Rycke, Y. J. Li, F. Muzeau, J. Girodet, R. J. Salmon, and G. Thomas. 1997.** Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12122-7.
- Ordway, J. M., K. Williams, and T. Curran. 2004.** Transcription repression in oncogenic transformation: common targets of epigenetic repression in cells transformed by Fos, Ras or Dnmt1. *Oncogene* 23: 3737-48.
- Ory, S., M. Zhou, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, and D. K. Morrison. 2003.** Protein phosphatase 2A positively regulates Ras signaling by dephosphorylating KSR1 and Raf-1 on critical 14-3-3 binding sites. *Curr Biol* 13: 1356-64.
- Otori, K., K. Sugiyama, T. Hasebe, S. Fukushima, and H. Esumi. 1995.** Emergence of adenomatous aberrant crypt foci (ACF) from hyperplastic ACF with concomitant increase in cell proliferation. *Cancer Res* 55: 4743-6.
- Otori, K., M. Konishi, K. Sugiyama, T. Hasebe, T. Shimoda, R. Kikuchi-Yanoshita, K. Mukai, S. Fukushima, M. Miyaki, and H. Esumi. 1998.** Infrequent somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in aberrant crypt foci of human colon tissue. *Cancer* 83: 896-900.
- Otto, J. C., E. Kim, S. G. Young, and P. J. Casey. 1999.** Cloning and characterization of a mammalian prenyl protein-specific protease. *J Biol Chem* 274: 8379-82.
- Papin, C., A. Denouel, G. Calothy, and A. Eychene. 1996.** Identification of signalling proteins interacting with B-Raf in the yeast two-hybrid system. *Oncogene* 12: 2213-21.
- Park, S. J., A. Rashid, J. H. Lee, S. G. Kim, S. R. Hamilton, and T. T. Wu. 2003.** Frequent CpG island methylation in serrated adenomas of the colorectum. *Am J Pathol* 162: 815-22.
- Parsons, D. W., T. L. Wang, Y. Samuels, A. Bardelli, J. M. Cummins, L. DeLong, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, J. K. Willson, S. Markowitz, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, C. Lengauer, and V. E. Velculescu. 2005.** Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature* 436: 792.
- Parsons, R., G. M. Li, M. J. Longley, W. H. Fang, N. Papadopoulos, J. Jen, A. de la Chapelle, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, and P. Modrich. 1993.** Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER⁺ tumor cells. *Cell* 75: 1227-36.
- Pells, S., M. Divjak, P. Romanowski, H. Impey, N. J. Hawkins, A. R. Clarke, M. L. Hooper, and D. J. Williamson. 1997.** Developmentally-regulated expression of murine K-ras isoforms. *Oncogene* 15: 1781-6.
- Peltomaki, P. 1997.** DNA mismatch repair gene mutations in human cancer. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 4: 775-80.
- Peltomaki, P. 2005.** Lynch syndrome genes. *Fam Cancer* 4: 227-32.
- Peltomaki, P., and H. F. Vasen. 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.
- Peltomaki, P., and H. Vasen. 2004.** Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers* 20: 269-76.
- Perucho, M. 1999.** Correspondence re: C.R. Boland et al., 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. *Cancer Res* 59: 249-56.

- Pfeifer, G. P., and R. Dammann. 2005.** Methylation of the tumor suppressor gene RASSF1A in human tumors. *Biochemistry (Mosc)* 70: 576-83.
- Pinol, V., A. Castells, M. Andreu, S. Castellvi-Bel, C. Alenda, X. Llor, R. M. Xicola, F. Rodriguez-Moranta, A. Paya, R. Jover, and X. Bessa. 2005.** Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Jama* 293: 1986-94.
- Polakis, P. 1999.** The oncogenic activation of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev* 9: 15-21.
- Pollock, P. M., U. L. Harper, K. S. Hansen, L. M. Yudt, M. Stark, C. M. Robbins, T. Y. Moses, G. Hostetter, U. Wagner, J. Kakareka, G. Salem, T. Pohida, P. Heenan, P. Duray, O. Kallioniemi, N. K. Hayward, J. M. Trent, and P. S. Meltzer. 2003.** High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 33: 19-20.
- Ponting, C. P., and D. R. Benjamin. 1996.** A novel family of Ras-binding domains. *Trends Biochem Sci* 21: 422-5.
- Potten, C. S., and M. Loeffler. 1990.** Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110: 1001-20.
- Potter, J. D. 1999.** Fiber and colorectal cancer--where to now? *N Engl J Med* 340: 223-4.
- Pretlow, T. P., T. A. Brasitus, N. C. Fulton, C. Cheyer, and E. L. Kaplan. 1993.** K-ras mutations in putative preneoplastic lesions in human colon. *J Natl Cancer Inst* 85: 2004-7.
- Pritchard, C. A., M. L. Samuels, E. Bosch, and M. McMahon. 1995.** Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol Cell Biol* 15: 6430-42.
- Prolla, T. A., S. M. Baker, A. C. Harris, J. L. Tsao, X. Yao, C. E. Bronner, B. Zheng, M. Gordon, J. Reneker, N. Arnheim, D. Shibata, A. Bradley, and R. M. Liskay. 1998.** Tumour susceptibility and spontaneous mutation in mice deficient in Mlh1, Pms1 and Pms2 DNA mismatch repair. *Nat Genet* 18: 276-9.
- Quincoces, A. F., and J. Leon. 1995.** Serum growth factors up-regulate H-ras, K-ras, and N-ras proto-oncogenes in fibroblasts. *Cell Growth Differ* 6: 271-9.
- Quincoces, A. F., I. Polanco, T. Thomson, and J. Leon. 1997.** Positive autoregulation of ras genes expression in fibroblasts. *FEBS Lett* 416: 317-23.
- Rajagopalan, H., A. Bardelli, C. Lengauer, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, and V. E. Velculescu. 2002.** Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 418: 934.
- Raschle, M., G. Marra, M. Nystrom-Lahti, P. Schar, and J. Jiricny. 1999.** Identification of hMutLbeta, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *J Biol Chem* 274: 32368-75.
- Reiss, Y., J. L. Goldstein, M. C. Seabra, P. J. Casey, and M. S. Brown. 1990.** Inhibition of purified p21ras farnesyl:protein transferase by Cys-AAX tetrapeptides. *Cell* 62: 81-8.
- Reyes, C. M., B. A. Allen, J. P. Terdiman, and L. S. Wilson. 2002.** Comparison of selection strategies for genetic testing of patients with hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma: effectiveness and cost-effectiveness. *Cancer* 95: 1848-56.
- Ribic, C. M., D. J. Sargent, M. J. Moore, S. N. Thibodeau, A. J. French, R. M. Goldberg, S. R. Hamilton, P. Laurent-Puig, R. Gryfe, L. E. Shepherd, D. Tu, M. Redston, and S. Gallinger. 2003.** Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 349: 247-57.
- Rodenhuis, S., and R. J. Slebos. 1992.** Clinical significance of ras oncogene activation in human lung cancer. *Cancer Res* 52: 2665s-2669s.

- Rodriguez-Bigas, M. A., C. R. Boland, S. R. Hamilton, D. E. Henson, J. R. Jass, P. M. Khan, H. Lynch, M. Perucho, T. Smyrk, L. Sobin, and S. Srivastava. 1997.** A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 89: 1758-62.
- Rodriguez-Viciana, P., and F. McCormick. 2005.** RalGDS comes of age. *Cancer Cell* 7: 205-6.
- Rodriguez-Viciana, P., P. H. Warne, R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, M. J. Fry, M. D. Waterfield, and J. Downward. 1994.** Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370: 527-32.
- Roncucci, L., D. Stamp, A. Medline, J. B. Cullen, and W. R. Bruce. 1991.** Identification and quantification of aberrant crypt foci and microadenomas in the human colon. *Hum Pathol* 22: 287-94.
- Salahshor, S., U. Kressner, L. Pahlman, B. Glimelius, G. Lindmark, and A. Lindblom. 1999.** Colorectal cancer with and without microsatellite instability involves different genes. *Genes Chromosomes Cancer* 26: 247-52.
- Samowitz, W. S., K. Curtin, D. Schaffer, M. Robertson, M. Leppert, and M. L. Slattery. 2000.** Relationship of Ki-ras mutations in colon cancers to tumor location, stage, and survival: a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 1193-7.
- Samowitz, W. S., C. Sweeney, J. Herrick, H. Albertsen, T. R. Levin, M. A. Murtaugh, R. K. Wolff, and M. L. Slattery. 2005.** Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res* 65: 6063-9.
- Samowitz, W. S., J. A. Holden, K. Curtin, S. L. Edwards, A. R. Walker, H. A. Lin, M. A. Robertson, M. F. Nichols, K. M. Gruenthal, B. J. Lynch, M. F. Leppert, and M. L. Slattery. 2001.** Inverse relationship between microsatellite instability and K-ras and p53 gene alterations in colon cancer. *Am J Pathol* 158: 1517-24.
- Samuels, Y., Z. Wang, A. Bardelli, N. Silliman, J. Ptak, S. Szabo, H. Yan, A. Gazdar, S. M. Powell, G. J. Riggins, J. K. Willson, S. Markowitz, K. W. Kinzler, B. Vogelstein, and V. E. Velculescu. 2004.** High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science* 304: 554.
- Scheele, J. S., J. M. Rhee, and G. R. Boss. 1995.** Determination of absolute amounts of GDP and GTP bound to Ras in mammalian cells: comparison of parental and Ras-overproducing NIH 3T3 fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1097-100.
- Scheffzek, K., M. R. Ahmadian, W. Kabsch, L. Wiesmuller, A. Lautwein, F. Schmitz, and A. Wittinghofer. 1997.** The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 277: 333-8.
- Schoen, R. E. 2002.** The case for population-based screening for colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 65-70.
- Schottenfeld, D. 1996.** Basal-cell carcinoma of the skin: a harbinger of cutaneous and noncutaneous multiple primary cancer. *Ann Intern Med* 125: 852-4.
- Sengupta, S., and C. C. Harris. 2005.** p53: traffic cop at the crossroads of DNA repair and recombination. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 44-55.
- Shaw, R. J., and L. C. Cantley. 2006.** Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. *Nature* 441: 424-30.
- Shiloh, Y. 2001.** ATM and ATR: networking cellular responses to DNA damage. *Curr Opin Genet Dev* 11: 71-7.
- Shivakumar, L., J. Minna, T. Sakamaki, R. Pestell, and M. A. White. 2002.** The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Mol Cell Biol* 22: 4309-18.

- Shivapurkar, N., L. Huang, B. Ruggeri, P. A. Swalsky, A. Bakker, S. Finkelstein, A. Frost, and S. Silverberg. 1997.** K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. *Cancer Lett* 115: 39-46.
- Shtutman, M., J. Zhurinsky, I. Simcha, C. Albanese, M. D'Amico, R. Pestell, and A. Ben-Ze'ev. 1999.** The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 5522-7.
- Sieben, N. L., P. Macropoulos, G. M. Roemen, S. M. Kolkman-Uljee, G. Jan Fleuren, R. Houmadi, T. Diss, B. Warren, M. Al Adnani, A. P. De Goeij, T. Krausz, and A. M. Flanagan. 2004.** In ovarian neoplasms, BRAF, but not KRAS, mutations are restricted to low-grade serous tumours. *J Pathol* 202: 336-40.
- Simpkins, S. B., T. Bocker, E. M. Swisher, D. G. Mutch, D. J. Gersell, A. J. Kovatich, J. P. Palazzo, R. Fishel, and P. J. Goodfellow. 1999.** MLH1 promoter methylation and gene silencing is the primary cause of microsatellite instability in sporadic endometrial cancers. *Hum Mol Genet* 8: 661-6.
- Slattery, M. L., N. Abd-Elghany, R. Kerber, and M. C. Schumacher. 1990.** Physical activity and colon cancer: a comparison of various indicators of physical activity to evaluate the association. *Epidemiology* 1: 481-5.
- Slebos, R. J., R. H. Hruban, O. Dalesio, W. J. Mooi, G. J. Offerhaus, and S. Rodenhuis. 1991.** Relationship between K-ras oncogene activation and smoking in adenocarcinoma of the human lung. *J Natl Cancer Inst* 83: 1024-7.
- Smith, A. J., H. S. Stern, M. Penner, K. Hay, A. Mitri, B. V. Bapat, and S. Gallinger. 1994.** Somatic APC and K-ras codon 12 mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 54: 5527-30.
- Srivastava, S., Z. Q. Zou, K. Pirollo, W. Blattner, and E. H. Chang. 1990.** Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348: 747-9.
- Storm, S. M., J. L. Cleveland, and U. R. Rapp. 1990.** Expression of raf family proto-oncogenes in normal mouse tissues. *Oncogene* 5: 345-51.
- Strano, S., E. Munarriz, M. Rossi, B. Cristofanelli, Y. Shaul, L. Castagnoli, A. J. Levine, A. Sacchi, G. Cesareni, M. Oren, and G. Blandino. 2000.** Physical and functional interaction between p53 mutants and different isoforms of p73. *J Biol Chem* 275: 29503-12.
- Studamire, B., T. Quach, and E. Alani. 1998.** *Saccharomyces cerevisiae* Msh2p and Msh6p ATPase activities are both required during mismatch repair. *Mol Cell Biol* 18: 7590-601.
- Suzuki, H., D. N. Watkins, K. W. Jair, K. E. Schuebel, S. D. Markowitz, W. D. Chen, T. P. Pretlow, B. Yang, Y. Akiyama, M. Van Engeland, M. Toyota, T. Tokino, Y. Hinoda, K. Imai, J. G. Herman, and S. B. Baylin. 2004.** Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat Genet* 36: 417-22.
- Syngal, S., J. C. Weeks, D. Schrag, J. E. Garber, and K. M. Kuntz. 1998.** Benefits of colonoscopic surveillance and prophylactic colectomy in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer mutations. *Ann Intern Med* 129: 787-96.
- Syngal, S., E. A. Fox, C. Eng, R. D. Kolodner, and J. E. Garber. 2000.** Sensitivity and specificity of clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer associated mutations in MSH2 and MLH1. *J Med Genet* 37: 641-5.
- Takayama, T., S. Katsuki, Y. Takahashi, M. Ohi, S. Nojiri, S. Sakamaki, J. Kato, K. Kogawa, H. Miyake, and Y. Niitsu. 1998.** Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med* 339: 1277-84.
- Takayama, T., M. Ohi, T. Hayashi, K. Miyanishi, A. Nobuoka, T. Nakajima, T. Satoh, R. Takimoto, J. Kato, S. Sakamaki, and Y. Niitsu. 2001.** Analysis of K-ras, APC, and beta-

- catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 121: 599-611.
- Tanaka, H., G. Deng, K. Matsuzaki, S. Kakar, G. E. Kim, S. Miura, M. H. Sleisenger, and Y. S. Kim. 2006.** BRAF mutation, CpG island methylator phenotype and microsatellite instability occur more frequently and concordantly in mucinous than non-mucinous colorectal cancer. *Int J Cancer* 118: 2765-71.
- Tannergard, P., T. Liu, A. Weger, M. Nordenskjold, and A. Lindblom. 1997.** Tumorigenesis in colorectal tumors from patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Genet* 101: 51-5.
- Tomlinson, I., S. Halford, L. Aaltonen, N. Hawkins, and R. Ward. 2002.** Does MSI-low exist? *J Pathol* 197: 6-13.
- Tong, L. A., A. M. de Vos, M. V. Milburn, and S. H. Kim. 1991.** Crystal structures at 2.2 Å resolution of the catalytic domains of normal ras protein and an oncogenic mutant complexed with GDP. *J Mol Biol* 217: 503-16.
- Toyota, M., N. Ahuja, M. Ohe-Toyota, J. G. Herman, S. B. Baylin, and J. P. Issa. 1999.** CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8681-6.
- Tran, N. H., and J. A. Frost. 2003.** Phosphorylation of Raf-1 by p21-activated kinase 1 and Src regulates Raf-1 autoinhibition. *J Biol Chem* 278: 11221-6.
- Treisman, R. 1996.** Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr Opin Cell Biol* 8: 205-15.
- Troppmair, J., and U. R. Rapp. 2003.** Raf and the road to cell survival: a tale of bad spells, ring bearers and detours. *Biochem Pharmacol* 66: 1341-5.
- Truninger, K., M. Menigatti, J. Luz, A. Russell, R. Haider, J. O. Gebbers, F. Bannwart, H. Yurtsever, J. Neuweiler, H. M. Riehle, M. S. Cattaruzza, K. Heinemann, P. Schar, J. Jiricny, and G. Marra. 2005.** Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. *Gastroenterology* 128: 1160-71.
- Tzivion, G., Z. Luo, and J. Avruch. 1998.** A dimeric 14-3-3 protein is an essential cofactor for Raf kinase activity. *Nature* 394: 88-92.
- Ulsh, L. S., and T. Y. Shih. 1984.** Metabolic turnover of human c-rasH p21 protein of EJ bladder carcinoma and its normal cellular and viral homologs. *Mol Cell Biol* 4: 1647-52.
- Umar, A., J. I. Risinger, E. T. Hawk, and J. C. Barrett. 2004a.** Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 4: 153-8.
- Umar, A., A. B. Buermeier, J. A. Simon, D. C. Thomas, A. B. Clark, R. M. Liskay, and T. A. Kunkel. 1996.** Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* 87: 65-73.
- Umar, A., C. R. Boland, J. P. Terdiman, S. Syngal, A. de la Chapelle, J. Ruschoff, R. Fishel, N. M. Lindor, L. J. Burgart, R. Hamelin, S. R. Hamilton, R. A. Hiatt, J. Jass, A. Lindblom, H. T. Lynch, P. Peltomaki, S. D. Ramsey, M. A. Rodriguez-Bigas, H. F. Vasen, E. T. Hawk, J. C. Barrett, A. N. Freedman, and S. Srivastava. 2004b.** Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 96: 261-8.
- Urano, T., R. Emkey, and L. A. Feig. 1996.** Ral-GTPases mediate a distinct downstream signaling pathway from Ras that facilitates cellular transformation. *Embo J* 15: 810-6.
- van de Wetering, M., E. Sancho, C. Verweij, W. de Lau, I. Oving, A. Hurlstone, K. van der Horn, E. Batlle, D. Coudreuse, A. P. Haramis, M. Tjon-Pon-Fong, P. Moerer, M. van den Born, G. Soete, S. Pals, M. Eilers, R. Medema, and H. Clevers. 2002.** The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111: 241-50.

- Vasen, H. F., and C. R. Boland. 2005. Progress in genetic testing, classification, and identification of Lynch syndrome. *Jama* 293: 2028-30.
- Vasen, H. F., J. P. Mecklin, P. M. Khan, and H. T. Lynch. 1991. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 34: 424-5.
- Vasen, H. F., P. Watson, J. P. Mecklin, and H. T. Lynch. 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., L. Kasturi, J. Olechnowicz, A. H. Ma, J. D. Lutterbaugh, S. Periyasamy, G. M. Li, J. Drummond, P. L. Modrich, W. D. Sedwick, and S. D. Markowitz. 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.
- Vojtek, A. B., and C. J. Der. 1998. Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 273: 19925-8.
- Vojtek, A. B., S. M. Hollenberg, and J. A. Cooper. 1993. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell* 74: 205-14.
- Wan, P. T., M. J. Garnett, S. M. Roe, S. Lee, D. Niculescu-Duvaz, V. M. Good, C. M. Jones, C. J. Marshall, C. J. Springer, D. Barford, and R. Marais. 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 116: 855-67.
- Wang, H. G., U. R. Rapp, and J. C. Reed. 1996a. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell* 87: 629-38.
- Wang, H. G., S. Takayama, U. R. Rapp, and J. C. Reed. 1996b. Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 7063-8.
- Wang, L., J. M. Cunningham, J. L. Winters, J. C. Guenther, A. J. French, L. A. Boardman, L. J. Burgart, S. K. McDonnell, D. J. Schaid, and S. N. Thibodeau. 2003. BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res* 63: 5209-12.
- Wang, S., R. N. Ghosh, and S. P. Chellappan. 1998. Raf-1 physically interacts with Rb and regulates its function: a link between mitogenic signaling and cell cycle regulation. *Mol Cell Biol* 18: 7487-98.
- Warne, P. H., P. R. Viciana, and J. Downward. 1993. Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro. *Nature* 364: 352-5.
- Watson, P., and H. T. Lynch. 1993. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 71: 677-85.
- Weber, C. K., J. R. Slupsky, C. Herrmann, M. Schuler, U. R. Rapp, and C. Block. 2000. Mitogenic signaling of Ras is regulated by differential interaction with Raf isozymes. *Oncogene* 19: 169-76.
- Weisenberger, D. J., K. D. Siegmund, M. Campan, J. Young, T. I. Long, M. A. Faasse, G. H. Kang, M. Widschwendter, D. Weener, D. Buchanan, H. Koh, L. Simms, M. Barker, B. Leggett, J. Levine, M. Kim, A. J. French, S. N. Thibodeau, J. Jass, R. Haile, and P. W. Laird. 2006. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 38: 787-93.
- Wellbrock, C., M. Karasarides, and R. Marais. 2004a. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 875-85.
- Wellbrock, C., L. Ogilvie, D. Hedley, M. Karasarides, J. Martin, D. Niculescu-Duvaz, C. J. Springer, and R. Marais. 2004b. V599EB-RAF is an oncogene in melanocytes. *Cancer Res* 64: 2338-42.

- Westra, W. H., R. J. Slebos, G. J. Offerhaus, S. N. Goodman, S. G. Evers, T. W. Kensler, F. B. Askin, S. Rodenhuis, and R. H. Hruban. 1993.** K-ras oncogene activation in lung adenocarcinomas from former smokers. Evidence that K-ras mutations are an early and irreversible event in the development of adenocarcinoma of the lung. *Cancer* 72: 432-8.
- Willumsen, B. M., A. Christensen, N. L. Hubbert, A. G. Papageorge, and D. R. Lowy. 1984.** The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* 310: 583-6.
- Wittinghofer, A., and E. F. Pai. 1991.** The structure of Ras protein: a model for a universal molecular switch. *Trends Biochem Sci* 16: 382-7.
- Wodarz, A., and R. Nusse. 1998.** Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14: 59-88.
- Wojnowski, L., L. F. Stancato, A. C. Larner, U. R. Rapp, and A. Zimmer. 2000.** Overlapping and specific functions of Braf and Craf-1 proto-oncogenes during mouse embryogenesis. *Mech Dev* 91: 97-104.
- Wu, J., P. Dent, T. Jelinek, A. Wolfman, M. J. Weber, and T. W. Sturgill. 1993.** Inhibition of the EGF-activated MAP kinase signaling pathway by adenosine 3',5'-monophosphate. *Science* 262: 1065-9.
- Wu, M., S. Semba, N. Oue, N. Ikehara, W. Yasui, and H. Yokozaki. 2004.** BRAF/K-ras mutation, microsatellite instability, and promoter hypermethylation of hMLH1/MGMT in human gastric carcinomas. *Gastric Cancer* 7: 246-53.
- Wu, Y., M. J. Berends, R. H. Sijmons, R. G. Mensink, E. Verlind, K. A. Kooi, T. van der Sluis, C. Kempinga, A. G. van dDer Zee, H. Hollema, C. H. Buys, J. H. Kleibeuker, and R. M. Hofstra. 2001.** A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 29: 137-8.
- Xing, J., D. D. Ginty, and M. E. Greenberg. 1996.** Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science* 273: 959-63.
- Xu, X., R. M. Quiros, P. Gattuso, K. B. Ain, and R. A. Prinz. 2003.** High prevalence of BRAF gene mutation in papillary thyroid carcinomas and thyroid tumor cell lines. *Cancer Res* 63: 4561-7.
- Yamamoto, H., Y. Min, F. Itoh, A. Imsumran, S. Horiuchi, M. Yoshida, S. Iku, H. Fukushima, and K. Imai. 2002.** Differential involvement of the hypermethylator phenotype in hereditary and sporadic colorectal cancers with high-frequency microsatellite instability. *Genes Chromosomes Cancer* 33: 322-5.
- Yamashita, N., T. Minamoto, A. Ochiai, M. Onda, and H. Esumi. 1995.** Frequent and characteristic K-ras activation and absence of p53 protein accumulation in aberrant crypt foci of the colon. *Gastroenterology* 108: 434-40.
- Yeung, K., T. Seitz, S. Li, P. Janosch, B. McFerran, C. Kaiser, F. Fee, K. D. Katsanakis, D. W. Rose, H. Mischak, J. M. Sedivy, and W. Kolch. 1999.** Suppression of Raf-1 kinase activity and MAP kinase signalling by RKIP. *Nature* 401: 173-7.
- Yip-Schneider, M. T., W. Miao, A. Lin, D. S. Barnard, G. Tzivion, and M. S. Marshall. 2000.** Regulation of the Raf-1 kinase domain by phosphorylation and 14-3-3 association. *Biochem J* 351: 151-9.
- Zhang, B. H., and K. L. Guan. 2000.** Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *Embo J* 19: 5429-39.
- Zhang, X. F., J. Settleman, J. M. Kyriakis, E. Takeuchi-Suzuki, S. J. Elledge, M. S. Marshall, J. T. Bruder, U. R. Rapp, and J. Avruch. 1993.** Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* 364: 308-13.

- Zhao, W., T. L. Chan, K. M. Chu, A. S. Chan, M. R. Stratton, S. T. Yuen, and S. Y. Leung. 2004.** Mutations of BRAF and KRAS in gastric cancer and their association with microsatellite instability. *Int J Cancer* 108: 167-9.
- Zimmermann, S., and K. Moelling. 1999.** Phosphorylation and regulation of Raf by Akt (protein kinase B). *Science* 286: 1741-4.
- Zinkin, L. D. 1983.** A critical review of the classifications and staging of colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 26: 37-43.

IX. APÈNDIX

ARTICLE A***KRAS* and *BRAF* oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression**

Oliveira C¹, Velho S¹, Moutinho C¹, Ferreira A¹, Preto A¹, **Domingo E**², Capelinha AF³, Duval A⁴, Hamelin R⁴, Machado JC^{1,5}, Schwartz S Jr², Carneiro F^{1,3,5}, Seruca R^{1,5}

Oncogene 2006; *Epub ahead of print*

En càncer colorectal (CCR) esporàdic les mutacions de KRAS i BRAF tenen una freqüència del 30% i 10% respectivament i són events genètics alternatius. Per entendre la implicació de l'activació oncogènica de KRAS-BRAF en la progressió tumoral i metastasi hem analitzat KRAS i BRAF en 250 tumors primaris de CCR esporàdics sense inestabilitat de microsatèl·lits (MSS) i 45 nòduls limfàtics metastàsics (NLM) i hem analitzat les seves característiques patològiques. El 45% dels tumors de CCR MSS tenen mutacions en un dels dos gens i les mutacions s'associen amb invasió de les parets (p=0,02), presència i nombre de NLM (p=0,02 i p=0,03, respectivament), metastasis distants (p=0,004) i estadi avançat (p=0,01). Hem demostrat que KRAS i BRAF són events alternatius en Tis i T1 en CCR MSS i que les mutacions de KRAS, enlloc de les de BRAF, contribueixen a la progressió tumoral del CCR MSS. La freqüència de les mutacions de KRAS i BRAF és més alta als NLM que als tumors primaris (p=0,0002). Els NLM tenen mutació o a KRAS o a KRAS i BRAF alhora. Les mutacions concomitants de KRAS i BRAF augmenten al llarg de la progressió en el CCR MSS, suggerint que l'activació d'ambdós gens és probable que tingui un efecte sinèrgic.

¹ Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal

² Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

³ Pathology Department, Hospital de S. Joao, Porto, Portugal

⁴ INSERM U762 CEPH, INSERM, Paris, France

⁵ Faculty of Medicine, University of Porto, Portugal

ARTICLE B***RASSF1A* hypermethylation and *KRAS/BRAF* mutations are not alternative genetic events in mismatch repair defective gastrointestinal cancers**

Velho S¹, Oliveira C¹, **Domingo E**², Preto A¹, Hofstra RMW³, Hamelin R⁴, Yamamoto H⁵, Seruca R^{1,6}, Schwartz S Jr²

Oncogene 2005; 24:7630-7634

RASSF1A s'inactiva per metilació en molts tipus tumorals com el càncer colorectal (CCR) i el càncer gàstric (CG), però es desconeix la seva implicació en tumors gastrointestinals amb inestabilitat de microsatèl·lits (MSI). Nosaltres hem analitzat 76 tumors MSI (31 de CCR esporàdic, 25 de CG esporàdic i 20 de HNPCC) per la hipermetilació de RASSF1A i les mutacions de KRAS i BRAF, i hem analitzat les seves característiques clínicopatològiques. La freqüència de la hipermetilació de RASSF1A és del 52% en CCR MSI, 44% en CG MSI i 30% en HNPCC, sent diferències no significatives ($p=0,31$). Els tumors de CCR i CG MSI esporàdics amb RASSF1A hipermetilat són poc diferenciats ($p=0,05$ i $p=0,03$ respectivament). El 36% dels tumors de CCR MSI esporàdic presenten hipermetilació de RASSF1A i mutacions a KRAS i/o BRAF, mentre que el CG MSI esporàdic i HNPCC tenen concomitant la hipermetilació de RASSF1A i la mutació de KRAS en un 10% i 8% respectivament, sense tenir mutacions a BRAF. Ademés, el CCR MSI esporàdic acumula significativament més alteracions genètiques/epigenètiques a RASSF1A i KRAS/BRAF que el CG MSI esporàdic i el HNPCC ($p=0,016$). El perfil de les alteracions a RASSF1A i KRAS/BRAF és diferent entre els tres grups de càncer gastrointestinal MSI. Aquests resultats podrien tenir implicacions terapèutiques per la possibilitat d'utilitzar inhibidors específics de quinases, sols o amb agents demetilants, en tumors MSI amb mutacions a KRAS o BRAF i hipermetilació a RASSF1A.

¹ Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto (IPATIMUP), Porto, Portugal

² Centre d'Investigacions en Bioquímica i Biologia Molecular (CIBBIM), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

³ Department of Medical Genetics, University of Groningen, The Netherlands

⁴ INSERM U434 CEPH, Paris, France

⁵ First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University, Sapporo, Japan

⁶ Faculty of Medicine, University of Porto, Portugal