



ESTUDI GENÈTIC INTEGRAL DE LA REGIÓ 4p15 I IDENTIFICACIÓ DE *PI4K2B* I *STIM2* COM A GENS ALTERATS EN CÀNCER COLORECTAL

Memòria presentada per

Álvaro Aytés Meneses

Per optar al grau de

Doctor per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada sota la direcció del
Dr. Alberto Villanueva Garatachea
Al Laboratori de Recerca Translacional de
L'Institut Català d'Oncologia.

Tesi adscrita al departament de Biologia cel·lular i anatomia patològica
Facultat de Medicina
Universitat de Barcelona
Programa de Biologia i patologia cel·lular (bieni 2001-2003)
Tutor: Dr. Carles Enrich

Alberto Villanueva

Carles Enrich

Ávaro Aytés

Barcelona, Juny de 2007

Resultats

Capítol 1

Caracterització molecular de la regió 4p14-16

La presència de desequilibris al·lèlics al braç curt del cromosoma 4 ha estat àmpliament documentada. No obstant això, per a la consecució dels nostres objectius, era necessària l'obtenció d'una sèrie tumoral en la que les alteracions somàtiques que afectessin als gens candidats fossin identificables de forma inequívoca. Per això, vàrem decidir-nos per l'ús de ratolins atímics en què el creixement del tumor empeltat ens permetés analitzar de forma selectiva les alteracions de les cèl·lules tumorals. Malgrat que les freqüències de LOH en CCR han estat ja descrites, i donat que aquest és el primer *hit* d'inactivació gènica, era important establir-ne l'al·lelotip en els mostres obtingudes. Un cop seleccionades les mostres amb aquest primer *hit*, els mecanismes candidats a segon *hit* d'inactivació de l'al·lel intacte serien mutacions puntuals, microdelecions, pèrdues en homozigosi i mecanismes de silenciament epigenètic.

1. Els patrons de desequilibri al·lèlic, manifestats com a LOH, a la regió 4p14-16 són altament complexos.

D'un total de 73 tumors primaris de còlon o recte implantats simultàniament al cec del ratolí i al teixit subcutani, vàrem obtenir un creixement de la massa tumoral en 46 casos (63 %). En una minoria d'ells, el creixement va ser només de l'empelt subcutani, mentre que per la resta, vàrem obtenir un creixement ortotòpic. El *end point* per al sacrifici de l'animal fou o bé la obstrucció de la llum intestinal, o bé la caquèxia associada a disseminació a distància. Aquesta disseminació es va confirmar, macroscòpicament en el moment de l'autòpsia de l'animal, en 9 dels 46 casos (19,5 %). Com era d'esperar, el principal òrgan de disseminació fou el fetge (4 del 9 casos), en segon lloc el pulmó (2 dels 9 casos), i en 3 casos es van obtenir múltiples tumors en la cavitat peritoneal.

Sobre el DNA obtingut dels triplets de mostres mucosa normal / tumor primari / tumor xenoempeltat, es va realitzar l'anàlisi de LOH. Com a primera aproximació es van escollir quatre marcadors microsatèl·lit altament informatius per testar la tècnica de detecció. Aquest estudi preliminar es va fer sobre les mostres de xenoempelt crescudes al teixit subcutani. Tretze dels 46 tumors (28,2 %) presenten LOH, i en tots ells afecta com a mínim al marcador D4S2397 (figura 13).

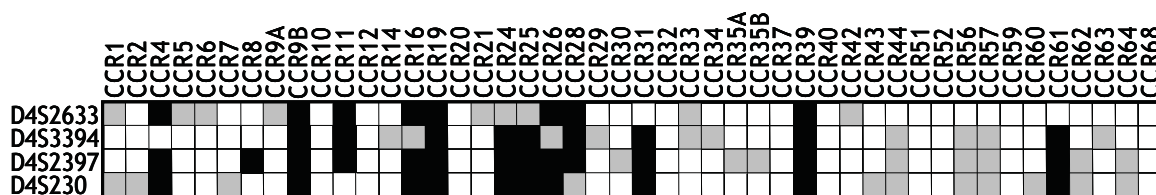


Figura 13. Estudi preliminar de LOH en mostres de CCR. 46 tumors crescuts al teixit subcutani de ratolin atímics són analitzats. Tretze de 46 mostren LOH. Les caixes negres representen LOH, les blanques retenció d'heterozigositat i les grises són no informatives.

Per a un estudi en profunditat de LOH a les mostres xenoempeltades de CCR es van triar 26 microsatèl·lits addicionals (30 en total) que cobrien una regió de prop de 15,2 Mb (figura 14). Aquest estudi exhaustiu el vàrem voler fer sobre les mostres crescudes a nivell ortotòpic. Donat que el creixement ortotòpic és força més lent i que no el vàrem obtenir en el 100 % dels casos, les anàlisis es va dur a terme en una selecció de 24 casos dels que teníem el triplet mucosa normal / tumor primari / tumor xenoempeltat. Aquest 24 casos inclouen 10 dels 13 casos en què ja havíem detectat LOH. Analitzant una col·lecció molt més àmplia de marcadors no hem identificat nous casos amb LOH. Per tant, no apareixen petites subregions de LOH entre els marcadors de l'anàlisi inicial en cap dels casos. Com mostra la figura 14A, la identificació d'una regió mínima comú de LOH és gairebé impossible. Al contrari, el que es troba és un patró de LOH molt complex, amb múltiples subregions. El nombre d'aquestes subregions de LOH varia entre una i sis. La figura 14C mostra exemples de marcadors analitzats mitjançant oligonucleòtids fluorescents i electroforesi capil·lar. Aquests marcadors han confirmat la retenció d'heterozigositat dels microsatèl·lits situats entre regions de LOH.

La detecció de LOH en les disseminacions obtingudes *in vivo* va permetre determinar que no existeix cap tipus de selecció durant el procés metastàtic (figura 14B). Els casos CCR5, CCR12, CCR20 i CCR33 no presenten LOH en el tumor primari implantat, i tampoc cap de les seves metàstasis en presenta. D'altra banda, els casos CCR4, CCR8, CCR11, CCR16 i CCR19, que si presenten LOH en el tumor primari, també el tenen en les seves metàstasis. A més, en els casos amb LOH, els marcadors correspon exactament als mateixos del tumor primari. Un exemple a destacar és el del cas CCR8, en què només hi ha LOH al marcador D4S2397. A les seves metàstasis passa exactament el mateix. Aquests resultats descarten que existeixi cap tipus de pressió selectiva sobre aquesta regió associada específicament al procés metastàtic, ja que en aquest

supòsit esperariem l'aparició de regions de LOH específiques d'aquest estadi tumoral.

Pel que fa al procés d'implantació de metàstasi hepàtiques (MH) en el ratolins atímics (**figura 14**), de 22 implantades ortotòpica i subcutàniament, 20 van desenvolupar massa tumoral (91%) i només dues no van créixer en el ratolí. L'*end point* per al sacrifici de l'animal va ser en la majoria dels casos una caquèxia severa fruit del creixement tumoral, disseminació peritoneal o icterícia associada a la destrucció del parènquima hepàtic. En el cas de les MH xenoempeltades, l'estudi de LOH es va fer directament amb la col·lecció ampliada de marcadors microsatèl·lit. Addicionalment, donat que alguns autors han associat la LOH a regions telomèriques del cromosoma 4 amb el procés metastàtic, es va ampliar la sèrie de marcadors cap a aquesta regió (**figura 14D**). El nombre total de marcadors fou de 57 (30 coincidents amb els de CCR i 27 de nous) sent la regió estudiada de prop de 32 Mb. Només 5 de les 20 MH analitzades (25%) han resultat ser portadores de LOH en alguns dels marcadors analitzats. A partir d'aquests resultats, cal destacar varies coses: (i) Com en els CCR, totes 5 MH amb LOH presenten afectat el marcador D4S2397. (ii) El patró de LOH a les MH és força més senzill que en els CCR. Les subregions que s'hi poden identificar varien en número entre una i tres. Per tant, resulta fins i tot més complicat de definir una regió crítica de LOH. (iii) En les nostres mostres, i amb el gran número de marcadors utilitzats, podem descartar que existeixi un increment de fenòmens de LOH en l'estadi metastàtic en CCR. Si això fos així, algun dels casos que no tenen LOH en la primera sèrie de microsatèl·lits, mostrarien zones de LOH en regions més telomèriques (sèrie de marcadors secundària, en verd a la **figura 14D**).

Tenint en compte que l'objectiu de l'estudi de l'estatus de LOH era acotar una regió crítica, hem seleccionat una regió centrada en D4S2397 que hem anomenat Regió A. Això ha estat així per dos motius: (i) és l'únic marcador que presenta LOH en la totalitat dels casos amb desequilibri al·lèlic, i (ii) ha estat demostrat anteriorment una pitjor supervivència lliure de malaltia per als pacients amb LOH en aquest marcador (Arribas et al., 1999a).

Amb aquest primer anàlisi hem pogut identificar un conjunt de casos de CCR i MH portadors de LOH, és a dir del primer *hit* d'inactivació. Hem seleccionat 10 CCR i 5 MH xenoempeltats per a realitzar l'estudi en profunditat de les aberracions genètiques somàtiques a l'al·lel romanent intacte.

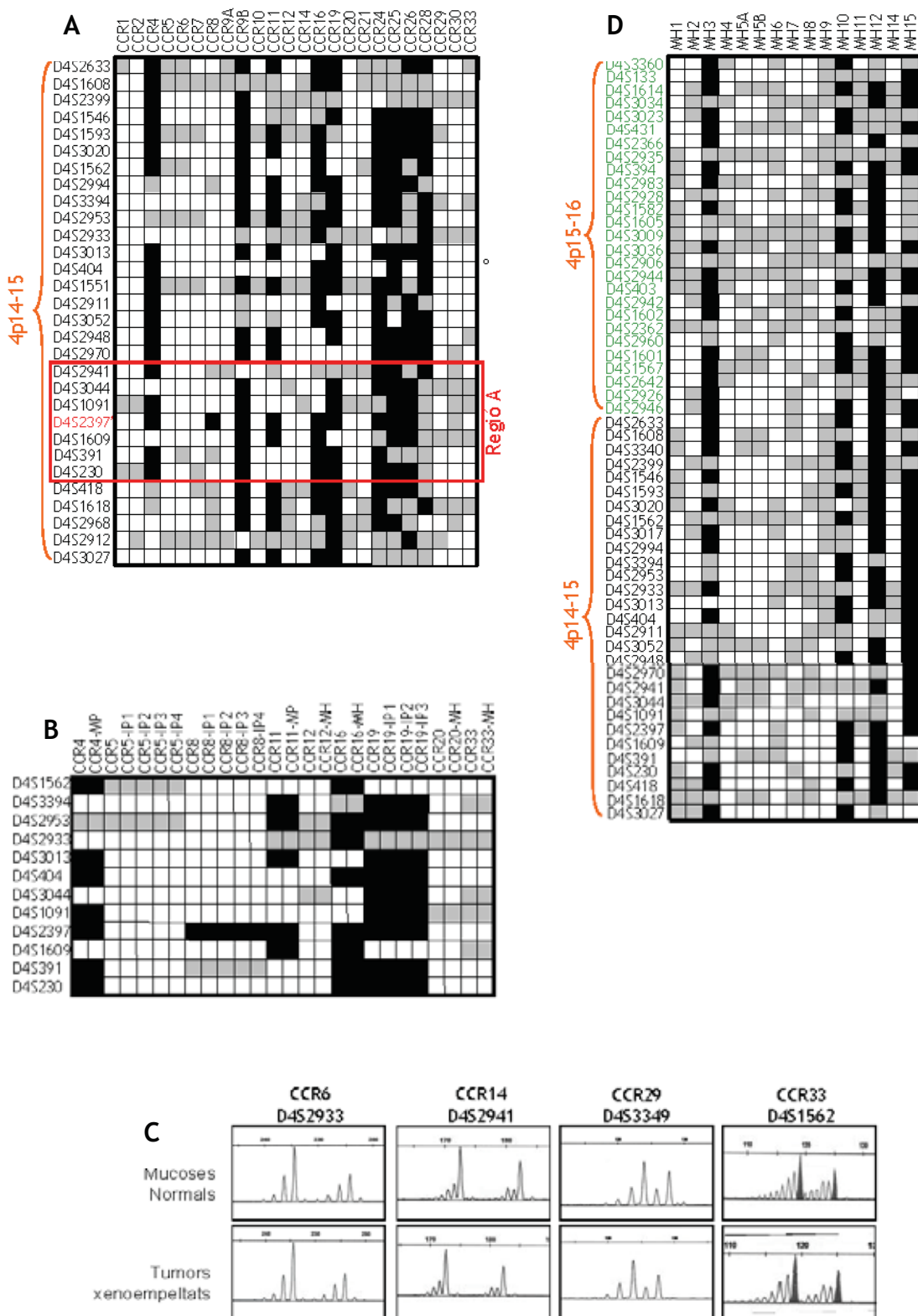


Figura 14. Estudi de LOH sobre els xenoempets en ratlins atímics. (A) Patró de LOH dels CCR. La caixa vermella delimita la Regió A. **(B)** Patró de LOH a les metástasi obtingudes *in vivo* a partir de primaris de CCR implantats ortotòpicament. MP; Metàstasi pulmonar. IP; Implant peritoneal. **(C)** Exemples de marcadors analitzats amb oligonucleòtids fluorescents per confirmar la retenció d’heterozigositat. **(D)** Patró de LOH de les MH xenoempeltades. En verd marcadors de la regió telomèrica.

Les caixes negres corresponen a marcadors amb LOH, les blanques retenció d’heterozigositat i les grises no informatives.

2. Els gens candidats seleccionats a la Regió A no són portadors d'aberracions somàtiques inactivants.

Anàlisi mutacional

Per a seleccionar de entre els gens a la Regió A, els candidats en què es realitzaria l'anàlisi mutacional, es van tenir en compte dues condicions: (i) per una banda, que aquests gens mantinguessin un alt grau d'homologia amb els seus ortòlegs en alguna de les espècies com *Mus musculus*, *Caenorhabditis elegans* o *Drosophila melanogaster*, i (ii) per l'altra, l'exclusió de d'aquest estudi de tots els pseudogèns i gens mitocondrials. La informació existent a les bases de dades públiques sobre el genoma humà ha revelat la existència de 14 gens a la Regió A, ortòlegs de gens de ratolí (*Mus musculus*), situats al seu cromosoma 5. Aquests catorze gens estan resumits a la següent taula.

Taula 10. Gens identificats a la Regió A.

Gens seleccionats per l'anàlisi genètic			
Nom	Gen	Localització	Exons
PI4K2B	phosphatidylinositol 4-kinase type-II beta	4p15.2	10
ZCCHC4	zing finger, CCHC domain containing 4	4p15.2	13
ANAPC4	anaphase promoting complex subunit 4	4p15.2	28
SLC34A2	solute carrier family 34 (sodium phosphate) member 2	4p15.1-p15.3	12
KIAA0746	KIAA0746 protein	4p15.2	23
LOC389203	hypothetical gene supported by BC032431	4p15.2	4
RBPSUH	recombining binding protein suppressor of hairless	4p15.2	11
CCKAR	cholecystokinin A receptor	4p15.1-p15.2	5
TBC1D19	hypothetical protein FLJ11082	4p15.2	21
STIM2	stromal interaction molecule 2	4p15.2	12
Gens descartats			
FLJ45721	hypothetical protein LOC401123	Absència d'homologia	
LOC389204	Pseudogène supported by LOC389204	Pseudogène	
LOC391642	similar to Immunoglobulin-binding protein 1	Absència d'homologia	
MRPL51P1	mitochondrial ribosomal protein L51 pseudogène	Pseudogène mitocondrial	

En conjunt s'han analitzat mutacionalment 139 exons en 10 casos de CCR i 5 MH, el que suposa 2085 amplificacions i reaccions de seqüència. Malgrat aquest esforç ingent, no s'ha identificat cap mutació puntual, microdeleció o pèrdua en homozigosi. Per a *STIM2*, *RBPSUH*, *CCKAR*, *TBC1D19*, *ZCCHC4*, *SLC34A2* i *ANAPC4*, l'anàlisi per SSCP i la posterior seqüenciació no han revelat cap tipus d'anomalia en cap dels casos.

Pel que fa a *PI4K2B*, s'ha identificat un polimorfisme en un sol cas, MH15. Es tracta d'una substitució d'un nucleòtid al codó 6 de l'exó 1 que genera un canvi d'aminoàcid, de glutamat a lisina (GAG a AAG; Glu > Lys).

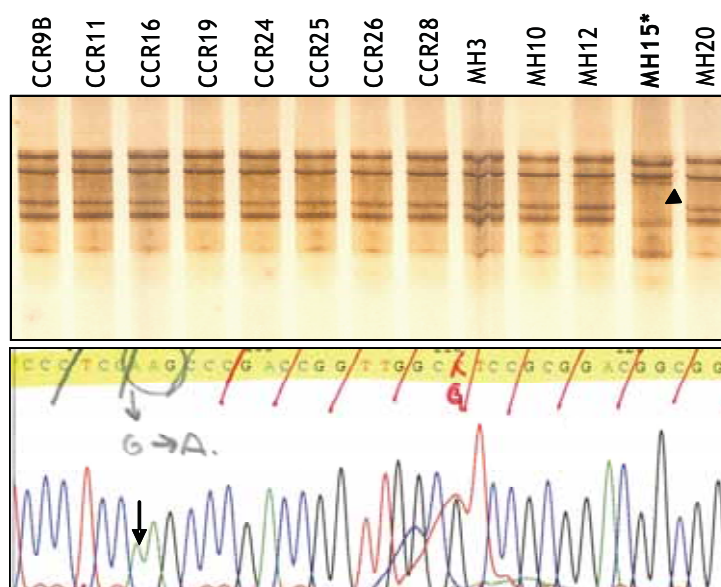


Figura 15. Detecció de mutacions. Exemple de identificació del polimorfisme a *PI4K2B*. L'asterisc marca el cas i les fletxes la banda que desapareix en l'SSCP i el lloc del polimorfisme en la seqüència.

A *LOC389203*, els 10 CCR i les 5 MH són portadors d'un polimorfisme al segon exó que no genera canvi d'aminoàcid. Per últim, a *KIAA0746*, a l'exó 17 s'ha identificat un altre polimorfisme, on la substitució d'un nucleòtid genera un canvi de Leucina a metionina (Met > Leu). Cap dels polimorfismes trobats ha estat identificat per primera vegada i cap d'ells es pot considerar, a priori, inactivant per a la funció del gen.

D'altra banda, l'amplificació d'aquestes regions codificants en les mostres tumorals provinents dels xenografts, ens ha permès descartar possibles pèrdues en homozigosi. L'absència de producte de PCR en tres experiments independents acostuma a ser el criteri per a la sospita d'una possible pèrdua en homozigosi (Reyes et al., 1996; Villanueva et al., 1998). En cap cas, per a cap dels exons, hem identificat ninguna d'aquestes pèrdues.

Estudi de metilació de les illes CpG

Com quedarà demostrat en el Capítol 2 dels resultats, l'expressió de *PI4K2B* i *STIM2*, es troba significativament alterada en una gran majoria de CCR i MH.

Donat que l'anàlisi mutacional dels gens candidats no ha mostrat cap alteració en el cas de *STIM2* i respecte a *PI4K2B*, només un polimorfisme en un dels casos, ens vàrem plantejar si un mecanisme de regulació epigenètic podia explicar aquests canvis d'expressió.

Per això, un cop identificades les regions promotores per a aquests dos gens, es van dissenyar oligonucleòtids que amplifiquessin una regió amb un contingut mínim de 20 residus CpG valorables i susceptibles de patir canvis en el seu patró de metilació. Per a *PI4K2B* s'analitzà una sola illa CpG (CpG97) mentre que per *STIM2* se n'analitzaren dues (CpG58 i CpG121).

En comparar la mucosa normal del còlon amb els tumors primaris i els tumors xenoempeltats, cap dels casos mostra cap alteració en el patró de metilació. Tampoc per a les MH s'han detectat canvis quan es comparen amb un *pool* de mucoses de còlon.

S'han descrit mecanismes de regulació coordinada de l'expressió gènica per a un *cluster* de gens en una mateixa regió (Frigola et al., 2006). Per tal de descartar un mecanisme similar, s'han analitzat també les illes CpG associades a les regions promotores dels gens candidats propers a *PI4K2B* i *STIM2* i que tenen una mateixa orientació transcripcional. Aquests gens són *ZCCHC4* i *ANAPC4* (com a possible *cluster* de *PI4K2B*) i *TBC1D19* (com a possible *cluster* de *STIM2*). Cap de les regions promotores analitzades presenta alterats els seus patrons de metilació quan es compara amb el de la mucosa de còlon. La figura següent és un resum esquemàtic de la regió analitzada i els resultats obtinguts.

(pàgina següent)

Figura 16. Esquema de l'estudi de regulació epigenètica. (A) Regió analitzada a 4p. El rectangle puntejat marca la Regió A que conté els gens candidats analitzats. (B) Una visió ampliada de la regió ens situa cadascun dels gens i les illes CpG associades a les seves regions promotores. Les caixes grises inclouen els *clusters* de gens en què s'ha analitzat una possible regulació transcripcional coordinada. (C) Resultat de la seqüenciació per bisulfit de les illes CpG associades a *PI4K2B* i *STIM2*. En cap d'elles s'han identificat canvis en els patrons de metilació.

3. Les pèrdues d'heterozigotitat de la regió 4p14-16 no comporten una pèrdua de material genètic

La manca d'un segon *hit* d'inactivació per als nostres gens candidats, ens varen fer plantejar l'origen i les conseqüències a nivell genètic de la LOH detectada a les nostres mostres. Era fonamental escatir el dubte sobre la dosi al·lèlica ja que, si bé la LOH pot ser el reflexe d'una pèrdua de material genètic, hi ha mecanismes que poden donar lloc a aquest fenomen sense la conseqüent deleció.

EL primer resultat sorprenent el vàrem tenir en fer, de forma exploratòria, CGH d'algunes de les mostres amb LOH. Aquestes mostres són CCR24, CCR26 i MH15. Per a cap de les tres mostres, la hibridació comparada apunta una pèrdua de material genètic al braç curt de cromosoma 4 (figura 17).

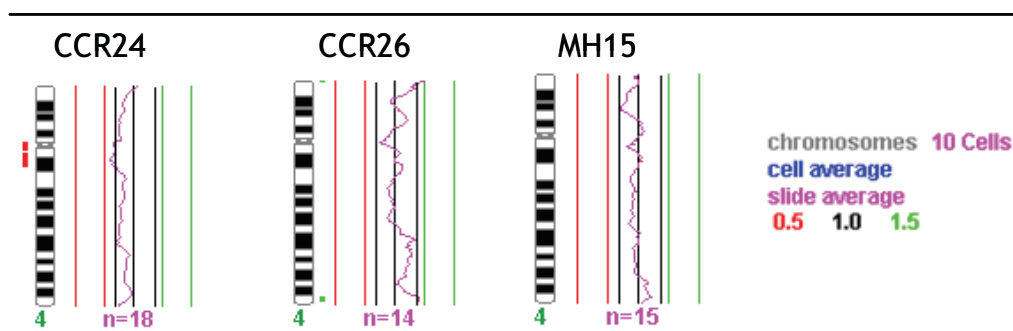


Figura 17. CGH sobre mostres de tumors xenoempeltats. Aquests tres casos es van triar per ser portadors de LOH a la regió 4p14-16. L'anàlisi per CGH no mostra pèrdua de material genètic a la regió analitzada mitjançant marcadors microsatèl·lit.

Com que la CGH no té una sensibilitat massa alta, per a l'estudi complet dels 10 CCR i les 5 MH amb LOH, vàrem escollir la Hibridació Fluorescent *in situ* (FISH) per a avaluar la dosi al·lèlica del *PI4K2B* i *STIM2*. Per tal de tenir mostres control, vàrem seleccionar un altre subgrup de 10 CCR i 5 MH que no tinguessin LOH a la regió d'estudi. Com és d'esperar, aquestes 15 mostres són diploides respecte a aquests dos loci. Només una, CCR7, exhibeix un 20 % de tetraploidia. Sorprenentment, per al grup de mostres amb LOH, només CCR19 i CCR28 són haploides per a aquest loci, mostrant una deleció a la regió que conté aquests dos gens. CCR24 mostra un 18 % de nuclis triploides. Pel que fa a les MH, només una de les 5 amb LOH és haploide, MH10, mentre que dues, MH12 i MH15, són gairebé triploides. Per confirmar aquests resultats vàrem

realitzar els mateixos experiments en les mostres de tumor primari en el cas dels CCR. La concordança entre les mostres aparellades de CCR i CCR-X que es van poder analitzar és del 100 %. En el cas de les hibridacions fetes sobre mostres xenoempeltades, es va hibridar també una mucosa normal de còlon de ratolí per descartar una reacció creuada.

Taula 11. Resultats de l'anàlisi per FISH. Els números indiquen el % de nuclis. CCR i MH són els tumors primaris mentre que CCR_X i MH_X són els xenoempelt. Marcats amb color groc són els únics amb delecions a la Regió A. CCR19, delecio total de 4p. CCR28, delecio intersticial de la regio que conté *PI4K2B* i *STIM2*. MH10, delecio intersticial de la regio que conté *STIM2*.

	Mostra	Sonda	Percentatge de nuclis				
			Wild-type	Delecio	Triploide	Tetraploide	
Tumors Colorectals	CRC4	23A21/ 372F2	nd	nd	nd	nd	
		473F10/ 475J10	98	2	0	0	
	CRC4-X	23A21/ 372F2	nd	nd	nd	nd	
		473F10 /475J10	96	2	2	0	
	CRC8	23A21/ 372F2	96	3	0	1	
		473F10/ 475J10	93	4	1	2	
	CRC8-X	23A21 /372F2	96	2	2	0	
		473F10/ 475J10	98	2	0	0	
	CRC11	23A21/ 372F2	97	3	0	0	
		473F10/ 475J10	98	1	0	0	
	CRC11-X	23A21 /372F2	98	1	1	0	
		473F10/ 475J10	96	3	1	0	
	LOH a 4p-16	CRC19	23A21/ 372F2	9	91	0	0
			473F10/ 475J10	3	96	0	1
		CRC19-X	23A21/ 372F2	2	98	0	0
			473F10/ 475J10	4	96	0	0
	CRC24	23A21/ 372F2	78	1	12	9	
		473F10/ 475J10	68	0	25	9	
	CRC24-X	23A21/ 372F2	nd	nd	nd	nd	
		473F10 /475J10	nd	nd	nd	nd	
	CRC25	23A21/ 372F2	97	0	3	0	
		473F10/ 475J10	98	1	0	0	
	CRC25-X	23A21/ 372F2	94	6	0	0	
		473F10/ 475J10	98	2	0	0	
	CRC26	23A21/ 372F2	98	1	0	1	
		473F10/ 475J10	97	0	1	2	
	CRC26-X	23A21/ 372F2	99	1	0	0	
		473F10/ 475J10	97	2	1	0	
CRC28	23A21/ 372F2	20	80	0	0		
		15	82	0	0		
	473F10/ 475J10	12	87	0	0		
		15	85	0	0		
No LOH a 4p14-16	CRC1	23A21/372F2	95	4	0	0	
		473F10/475J10	96	3	0	1	
	CRC5	23A21/372F2	95	3	0	2	
		473F10/475J10	91	1	2	1	
	CRC7	23A21/372F2	76	5	0	17	
		473F10/475J10	70	3	0	27	
	CRC9A	23A21/372F2	93	2	5	0	
		473F10/475J10	92	3	0	5	
	CRC10	23A21/372F2	93	3	0	4	
		473F10/475J10	50	1	47	2	
	CRC12	23A21/372F2	95	4	0	1	
		473F10/475J10	96	4	0	0	
	CRC14	23A21/372F2	99	1	0	0	
		473F10/475J10	98	2	0	0	
	CRC20	23A21/372F2	95	3	1	1	
		473F10/475J10	97	2	1	0	
	CRC21	23A21/372F2	94	5	0	1	
473F10/475J10		95	3	1	2		

Taula 11 (continuació). Resultats de l'anàlisi per FISH

	Mostra	Sonda	Percentatge de nuclis			
			Wild-type	Deleció	Triploide	Tetraploide
Hepatic metastases	HM3	23A21/372F2	92	4	4	0
		473F10/475J10	94	2	4	0
	HM10	23A21/372F2	98	0	0	2
		473F10/475J10	nd	nd	nd	nd
	HM10-X	23A21/372F2	88	4	8	0
		473F10/475J10	12	85	0	0
	HM12	23A21/372F2	58	2	48	2
		473F10/475J10	76	0	28	0
	HM12-X	23A21/372F2	63	2	30	5
		473F10/475J10	67	0	30	3
	HM15	23A21/372F2	12	0	78	0
		473F10/475J10	8	1	82	0
	HM15-X	23A21/372F2	19	1	80	0
		473F10/475J100	7	0	91	0
	HM20	23A21/372F2	nd	nd	nd	nd
		473F10/475J10	nd	nd	nd	nd
	HM20-X	23A21/372F2	97	1	1	1
		473F10/475J10	96	2	1	1

En resum, només 2 de 20 (10 %) dels casos de CCR i 1 de 10 MH (10 %) analitzats presenten deleció als loci de *PI4K2B* i *STIM2* a la Regió A. Aquests resultats contrasten amb els obtinguts mitjançant l'anàlisi de pèrdues d'heterozigositat en què eren un 28,2 % i un 25 %, respectivament. Per tant podem afirmar que la LOH a la regió 4p15 no és detecta com a conseqüència d'una pèrdua al·lèlica en una àmplia majoria dels casos de CCR i MH.

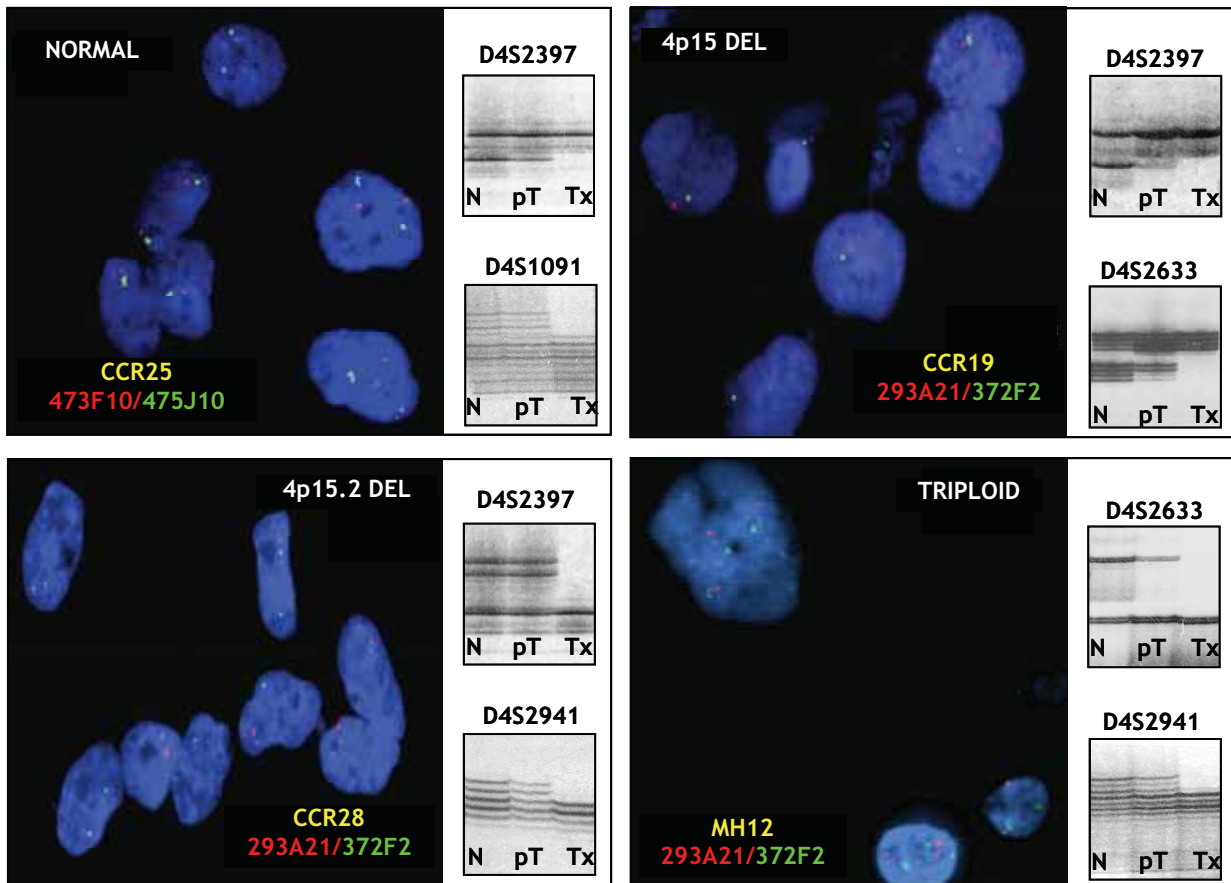


Figura 17. FISH sobre empremtes de teixit. Es mostren 4 casos diferents. A dalt a l'esquerra, un cas de discrepància entre el resultat del FISH de la LOH. A dalt a la dreta i a baix a l'esquerra, les dos únics casos de CCR amb concordança entre el FISH i la LOH. A baix a la dreta un cas de triploïdia.

SUMARI CAPÍTOL 1

Hem generat una col·lecció de tumors primaris de còlon (CCR) i metàstasi hepàtiques (MH) crescudes en ratolins atímics. Com ja hem comentat en diverses ocasions, aquestes mostres són d'una valor excepcional per a la identificació d'alteracions genètiques somàtiques. Una selecció de 24 CCR i 20 MH s'han fet servir per a l'estudi de LOH a la regió 4p14-16. Un 28,2 % i un 25 % de les mostres, respectivament, són portadores d'aquest primer *hit* d'inactivació en algun dels marcadors analitzats. Malgrat que la identificació d'una regió mínima comú de pèrdua no ha estat possible degut a la elevada complexitat dels patrons d'LOH, hem seleccionat una regió de 4,2 Mb centrada en el marcadors D4S2397, a la que hem anomenat Regió A. En totes les mostres amb LOH, aquest marcador es troba alterat. A més, la seva pèrdua ja ha estat associada anteriorment amb un pitjor pronòstic.

En aquesta Regió A hem analitzat mutacionalment 10 gens candidats. En cap d'aquests s'han identificat mutacions puntuals, microdelecions, ni pèrdues en homozigosi. S'han identificat alguns polimorfismes, però cap d'ells es pot considerar un segon *hit* d'inactivació gènica. L'anàlisi de possibles mecanismes de regulació epigenètica han descartat que aquests puguin explicar les alteracions en l'expressió de les que parlarem al Capítol 2. A més, s'ha descartat també una regulació coordinada o per *clusters* com la que s'ha definit per altres regions en CCR. Finalment, un estudi en profunditat de la dosi al·lèlica a la Regió A, ha evidenciat que la pèrdua d'heterozigositat a 4p15 no es dona com a conseqüència d'una pèrdua al·lèlica, en un nombre important de casos.

Capítol 2

Anàlisi de l'expressió gènica i estudi del valor pronòstic

Amb l'abordatge genètic de la Regió A en què es basen els resultats del Capítol 1, nova ser possible identificar el segon *hit* d'inactivació característic dels gens supressors tumorals. Els casos similars en què aquest segon *hit* no s'arriba a trobar mai són molt nombrosos. De fet, darrerament, ha crescut el nombre de gens supressors haploinsuficients identificats. Aquests gens tot i no tenir completament inactivats ambdós al·lells, manifesten un fenotip supressor. Tenint en compte també, que la LOH detectada no suposa, de forma majoritària, una pèrdua al·lèlica en les nostres mostres, valia la pena esbrinar fins a quin punt es trobava afectada la transcripció d'aquests gens. Des d'aquesta perspectiva, vàrem voler saber quins eren els nivells d'expressió dels gens de la regió d'estudi en les nostres mostres, i si n'hi havia algun que estigués significativament alterat. D'aquesta manera, preteníem avaluar el valor pronòstic de les alteracions en l'expressió gènica, en àmplies sèries de tumors disponibles al nostre centre. Aquestes sèries ja havien estat validades per al seu ús com a predictives del pronòstic i la resposta al tractament quimioteràpic.

1. Els gens de la Regió A es troben sobreexpressats en la majoria de casos de CCR i MH.

Per a l'estudi dels nivells d'expressió de mRNA dels gens de la Regió A, vàrem continuar utilitzant les mostres tumorals obtingudes dels xenoempelts. Comparant els nivells d'expressió amb els de les mostres aparellades de mucosa normal de còlon podríem saber fins a quin punt es trobava desregulat algun d'aquests gens. Per assegurar que la contaminació per cèl·lula normal, en aquest cas de ratolí, no emmascararia els resultats d'expressió, vàrem triar la tècnica de PCR quantitativa en temps real, qPCR. Aquesta tècnica ens permetia, dissenyant oligonucleòtids que amplifiquessin de forma selectiva el component humà dels tumors xenoempeltats, treballar amb les nostres mostres com si fossin 100 % tumorals.

Inicialment, es va avaluar quins dels 10 gens candidats de la Regió A, s'expressaven a la mucosa dels còlon i/o a les mostres tumorals utilitzant la tècnica de PCR convencional (semiquantitativa). Només 5 dels 10 gens es van poder amplificar sense necessitat de realitzar *nested*-PCR. Aquests gens són *KIAA0746*, *ANAPC4*, *RBPSUH*, *STIM2* i *PI4K2B*. La resta els vàrem descartar per

a aquest estudi, ja que la detecció mitjançant *nested*-PCR fa poc fiables els resultats de la qPCR (figura 18). Vàrem fer servir *B2-microglobulina* com a control de càrrega de la PCR semiquantitativa i a normalitzar les dades de qPCR.

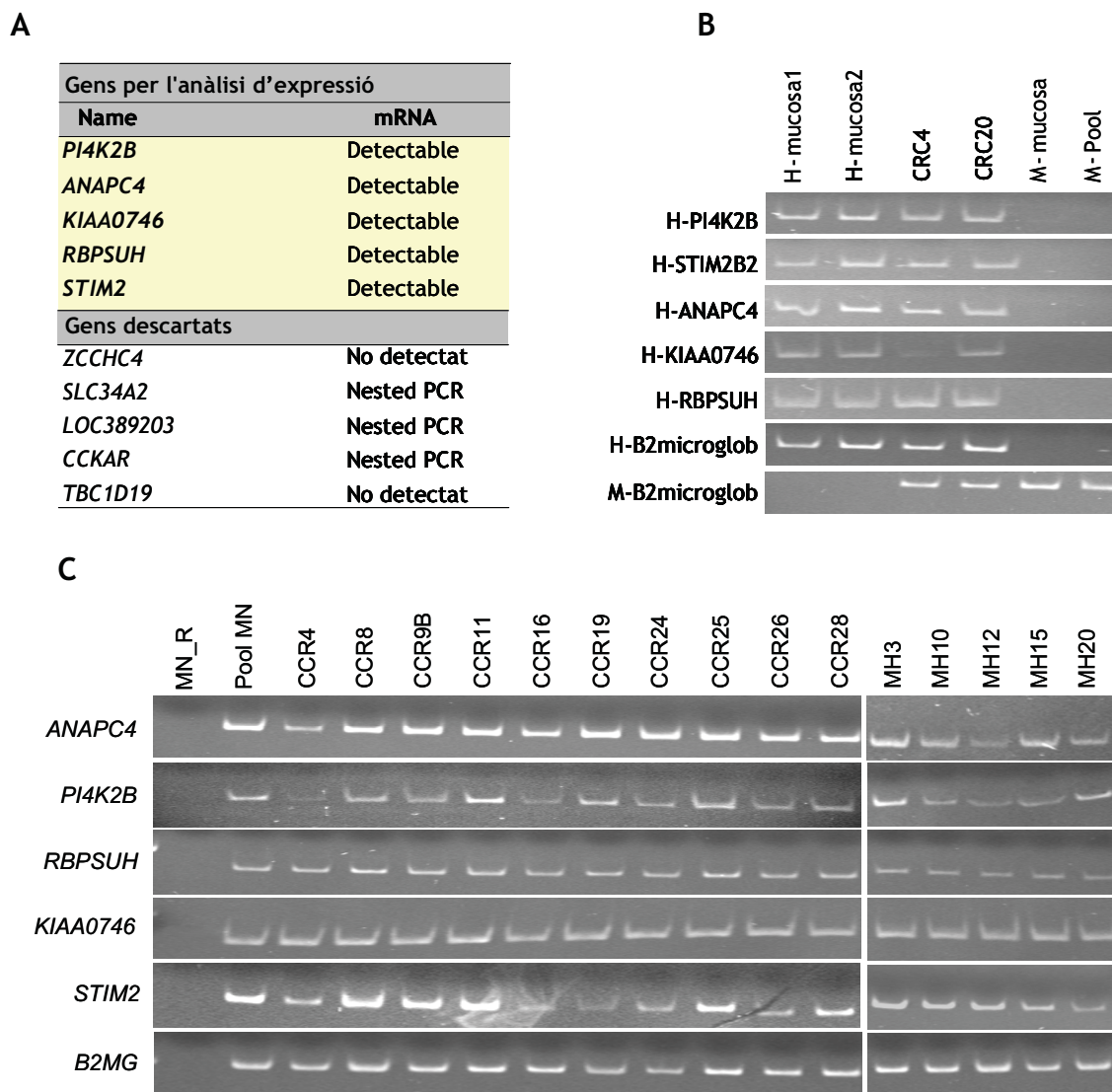


Figura 18. RT-PCR convencional i selecció de gens per a l'estudi d'expressió. (A) Taula amb els gens de la Regió A. Només per a 5 d'ells l'mRNA fou detectable per PCR directa. (B) Els oligonucleòtids específics per a genoma humà (H-) no amplifiquen cDNA de ratolí. Només els oligos per seqüència murina (M-B2microglob) detecten el cDNA de ratolí. (C) El gel mostra l'amplificació del cDNA dels 5 gens seleccionats per a les mostres tumorals dels xenoempelts.

Per als 5 gens seleccionats, es van realitzar els experiments de qPCR sobre les mostres aparellades Normal/xenoempelt, i es van construir les rectes de regressió necessàries per a la quantificació. Un cop normalitzades les dades

amb el gen de referència, es dividia l'expressió de la mostra del xenoempelt per la de la mucosa i se'n obtenia la ràtio d'expressió (taula 12). Quan aquesta ràtio és superior a 1, l'expressió és major al xenoempelt que a la mucosa, i al tumor quan és inferior. En el cas de les MH, com que no disposàvem de la mucosa de colon aparellada, la ràtio es va fer contra un *pool* de 10 mucoses normals de còlon seleccionades a l'atzar del banc de teixits.

Taula 12. Resum de les dades de qPCR. Els números corresponen als *fold change* entre el xenoempelt i la mucosa per als 20 CCR i les 10 MH. Els percentatges ho són del nombre de casos amb sobreexpressió per a cada gen. En gris es marquen les mostres amb LOH.

	STIM2	PI4K2B	KIAA0746	RBPSUH	ANAPC4
	<i>Fold change</i>				
CCR4	0.9	1.8	1.4	0.6	0.6
CCR8	0.4	0.8	0.4	0.1	0.1
CCR9B	1.8	5.8	2.5	2.8	3.2
CCR11	2.7	7.6	2.7	3.6	2.4
CCR16	2.9	5.0	4.7	2.8	2.9
CCR19	0.3	1.9	0.5	0.5	0.5
CCR24	46.1	29.7	31.2	17.3	4.6
CCR25	2.8	5.8	1.5	2.3	4.7
CCR26	11.5	20.7	7.1	7.4	7.3
CCR28	1.8	2.8	3.1	1.9	1.0
CCR1	0.9	2.8	2.3	2.3	1.6
CCR5	2.1	12.3	2.8	5.4	4.2
CCR7	6.1	18.3	15.3	10.5	15.2
CCR9	3.4	2.5	4.8	2.0	1.4
CCR10	0.7	3.8	3.3	3.3	1.5
CCR12	1.3	1.4	0.4	0.2	0.3
CCR14	0.7	2.4	1.8	1.1	1.3
CCR15	2.7	7.7	2.7	3.6	2.4
CCR20	1.8	6.1	7.0	4.2	4.2
CCR21	1.9	3.4	4.6	1.5	1.5
	70%	95%	85%	80%	75%
MH3	2.3	2.2	1.3	1.3	1.3
MH10	15.2	9.3	11.6	15.5	9.3
MH12	7.6	6.6	10.1	9.7	3.9
MH15	1.4	3.2	1.5	1.8	2.5
MH20	2.6	4.4	2.2	2.2	2.5
MH2	7.5	13.0	9.2	12.1	15.2
MH6	1.4	3.8	1.6	1.5	3.7
MH8	2.1	4.9	3.3	3.5	6.3
MH14	2.3	3.0	4.0	2.8	3.4
MH19	10.7	4.7	12.8	5.1	2.1
	100%	100%	100%	100%	100%

Hem trobat que els 5 gens analitzats a la Regió A es troben sobreexpressats en la majoria de mostres de xenoempelt respecte de les seves mucoses normals aparellades. Aquests han estat els resultats obtinguts amb les mostres de CCR i MH (10 + 5) en què s'havia detectat LOH. Ens vàrem preguntar si, d'alguna manera, aquest LOH podria ser el responsable de la sobreexpressió d'aquests

gens. Tal i com ja havíem fet per a l'estudi de FISH (Capítol 1), vàrem analitzar l'expressió en una segona col·lecció de mostres aparellades xenoempelt / mucosa normal de CCR i MH (10 +5) en que no s'havia trobat LOH. El resultat de l'experiment va ser pràcticament idèntic. En aquest grup de casos sense LOH, la majoria de xenoempelts també sobreexpressen els 5 gens de la Regió A.

S'han analitzat un total de 20 casos de CCR i 10 de MH. Els resultats indiquen que la sobreexpressió d'aquests 5 gens és un fenomen molt freqüent en CCR i MH, i que ho és independentment de la existència o no de LOH a la regió (figura 19).

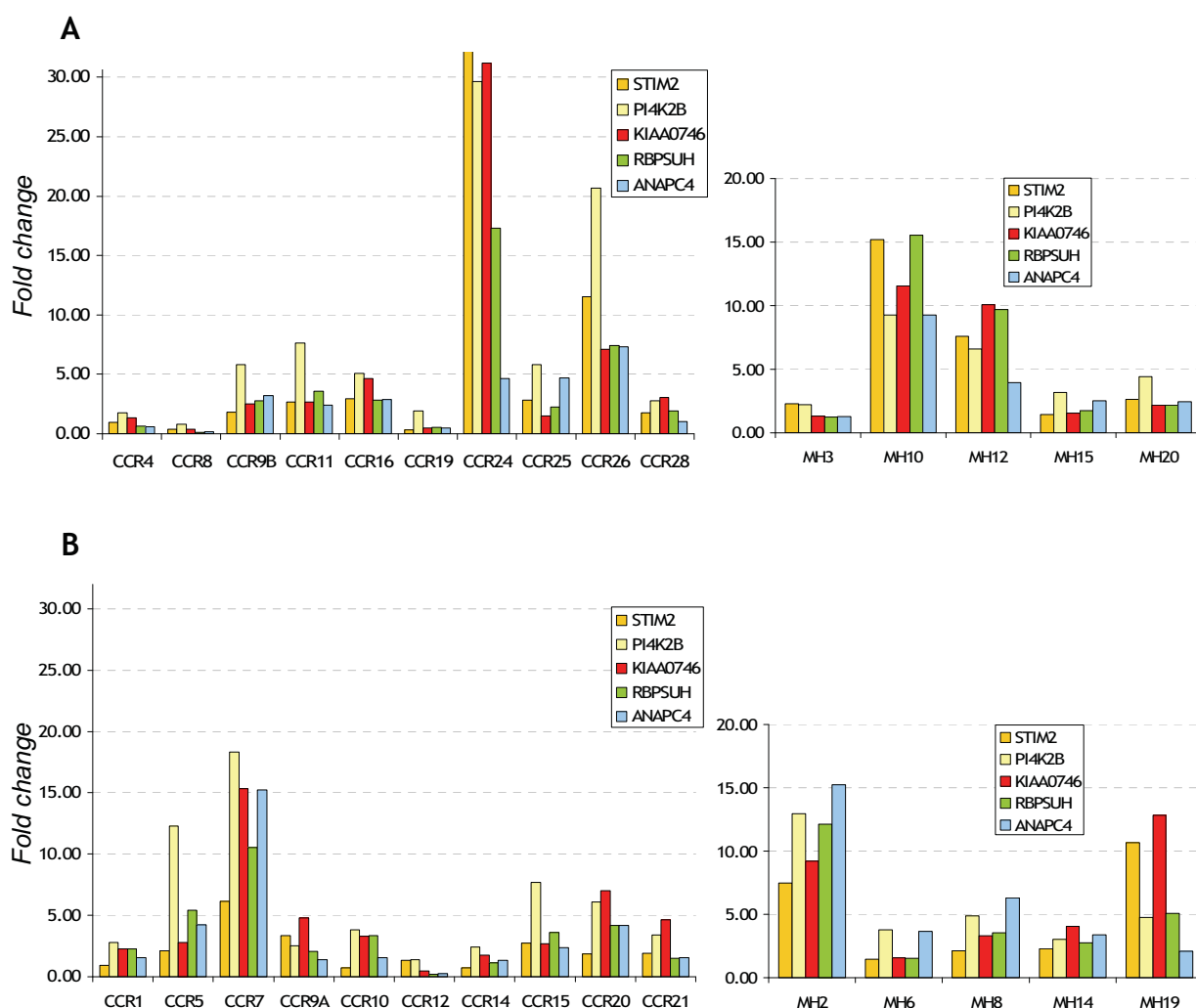


Figura 19. Ràtios d'expressió dels 5 gens analitzats a la Regió A. Per a cada mostra s'ha calculat el valor de canvi o *fold change* entre la mostra de tumor xenoempeltat i la mucosa normal de còlon o un *pool* de mucoses en el cas de les MH.. (A) Grup de CCR (esquerra) i de MH (dreta) en què s'ha trobat LOH. (B) Grup de CCR (esquerra) i de MH (dreta) sense LOH.

2. La sobreexpressió de *PI4K2B* i *STIM2* és estadísticament significativa.

Un cop obtinguts els valor d'expressió dels 5 gens per a tots els casos, tant de la mucosa normal com dels tumors xenoempeltats, i constatar que existia una sobreexpressió generalitzada, vàrem voler saber quina era la rellevància estadística d'aquesta sobreexpressió. Vàrem fer ús del software *REST*[®], les característiques del qual es detallen a la secció de *Materials i mètodes*.

Vàrem interrogar al programa sobre les diferències d'expressió dels 5 gens entre els següents grups de mostres:

- Mucosa normal / xenoempelts amb LOH.
Per avaluar la significació de la sobreexpressió en presència de LOH.
- Mucosa normal / xenoempelts sense LOH.
Per avaluar la significació de la sobreexpressió en absència de LOH.
- Xenoempelts amb LOH / xenoempelts sense LOH.
Per avaluar si l'LOH afecta a la magnitud de la sobreexpressió.
- Mucoses normals de casos amb LOH / mucoses de casos sense LOH.
Per descartar diferències pre-existents entre els dos grups de pacients.

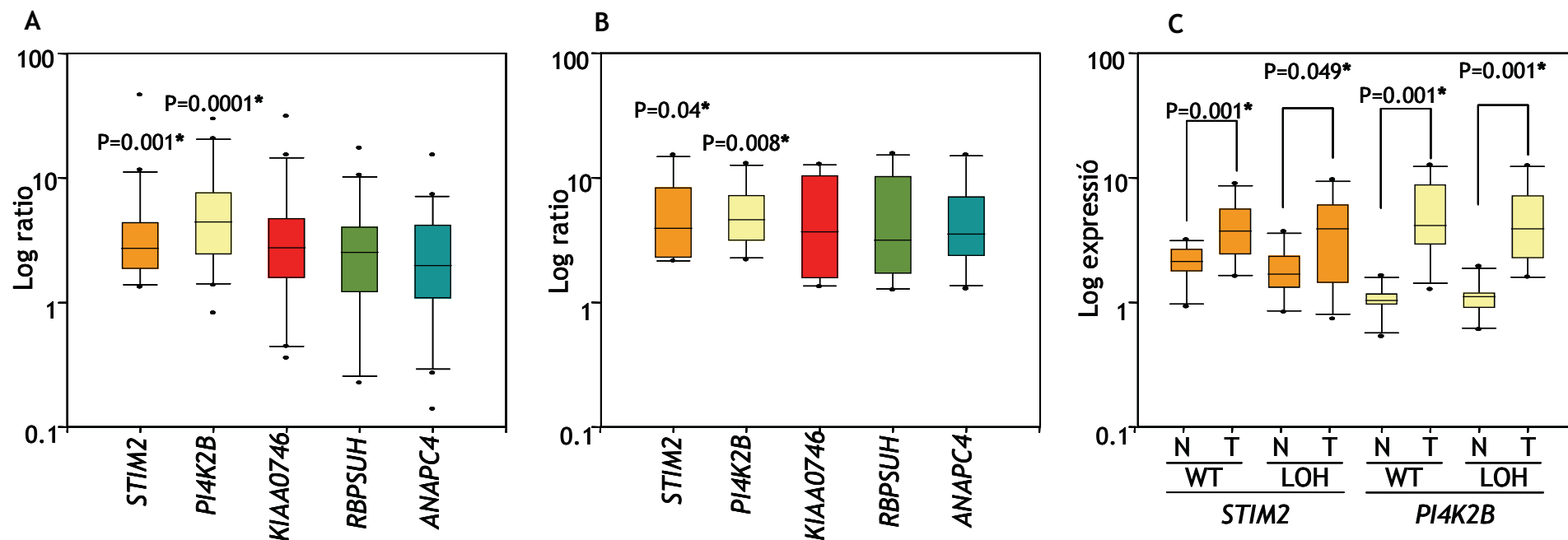
Aquestes comparacions es van fer tant pels casos de CCR com pels de MH. El primer resultat que cal destacar és que no hi ha diferències de base en el grau d'expressió de cap dels gens anallitzats, en les mucoses normals d'ambdós grups de pacients. Això ens garanteix que els les diferències observades a les mostres tumorals són per alteracions somàtiques pròpies de la cèl·lula cancerosa. No existeixen diferències d'expressió per a cap gen entre les mostres tumorals dels pacients amb o sense LOH. Això confirma el fet que la sobreexpressió es produeix independentment del desequilibri al·lèlic. El resultat més interessant és que, tant en un grup de mostres com en l'altre, només *PI4K2B* i *STIM2* estan significativament sobreexpressats. Això no vol dir necessàriament que siguin els que tenen els nivells d'expressió més alts, ni que ho estiguin en un major nombre de casos. El que indica és que, tenint en compte les variables experimentals (mida de la mostra, sensibilitat de la tècnica, eficiència de la reacció), aquests són els dos gens en què la

sobreexpressió és més consistent. Aquests resultats són vàlids tant pels CCR com per les MH. Tots aquests resultats fan que, des del punt de vista de l'anàlisi de l'expressió gènica, deixi de tenir sentit continuar diferenciant aquests dos grups de mostres. La taula de la **figura 20**, és un resum dels resultats estadístics obtinguts en els experiments de PCR quantitativa.

(pàgina següent)

Figura 20. Nivells d'expressió i estudi estadístic dels 5 gens analitzats a la Regió A. (A) El gràfic tipus BoxPlot il·lustra la sobreexpressió dels 5 gens per als casos de CCR. *PI4K2B* i *STIM2* són els únics significativament sobreexpressats quan s'empra el software *REST*[®]. (B) En aquest BoxPlot es mostra el mateix resultat però per a les MH i un altra vegada es pot observar com únicament *PI4K2B* i *STIM2* assoleixen significació. Els valors d'expressió estan representats en Log ràtio (C) Aquest altre BoxPlot vol il·lustrar com la sobreexpressió de *PI4K2B* i *STIM2* es dona tant en el grup de mostres amb LOH com en el de sense. Els valor corresponen al log del valor d'expressió normalitzat. N; Normal. T; Tumor. WT; mostres sense LOH. LOH; mostres amb LOH. (D) Aquesta taula és un resum dels resultats de l'anàlisi estadístic utilitzant el software *REST*[®]. S'indiquen els valors de canvi (fold change) i els *P* valors per a cada gen en funció de les dues poblacions de mostres que es comparen. MN; mucosa normal.

P valors < 0.05 es consideren significatius



D

	<i>PI4K2B</i>		<i>STIM2</i>		<i>KIAA0746</i>		<i>RBPSUH</i>		<i>ANAPC4</i>	
	fold-change	<i>P</i> valor	fold-change	<i>P</i> valor	fold-change	<i>P</i> valor	fold-change	<i>P</i> valor	fold-change	<i>P</i> valor
MN vs. CCR LOH	5.37	0.001*	2.35	0.049*	2.59	0.141	1.83	0.176	3.13	0.202
MN vs. CCR no LOH	10.74	0.001*	2.61	0.001*	1.47	0.59	1.18	0.871	0.94	0.121
CCR LOH vs. no LOH	1.11	0.801^	1.34	0.555^	1.07	0.927^	1	0.995^	1.43	0.501^
MN vs. MH LOH	4.27	0.009*	4.393	0.001*	2.82	0.689	3.5	0.344	2.92	0.263
MN vs. MH no LOH	3.92	0.001*	3.9	0.017*	3.1	0.174	3.63	0.169	4.52	0.158
MH LOH vs. no LOH	1.24	0.427^	1.12	0.427^	1.36	0.603^	1.03	0.951^	1.52	0.408^
MN vs. CCR	7.35	0.0001*	2.47	0.001*	1.95	0.114	1.45	0.365	2.47	0.09
Pool MN vs. MH	3.51	0.008*	4.14	0.04*	2.66	0.208	3.56	0.06	3.66	0.151

3. *PI4K2B* té valor pronòstic i és un indicador de resposta al tractament quimioteràpic.

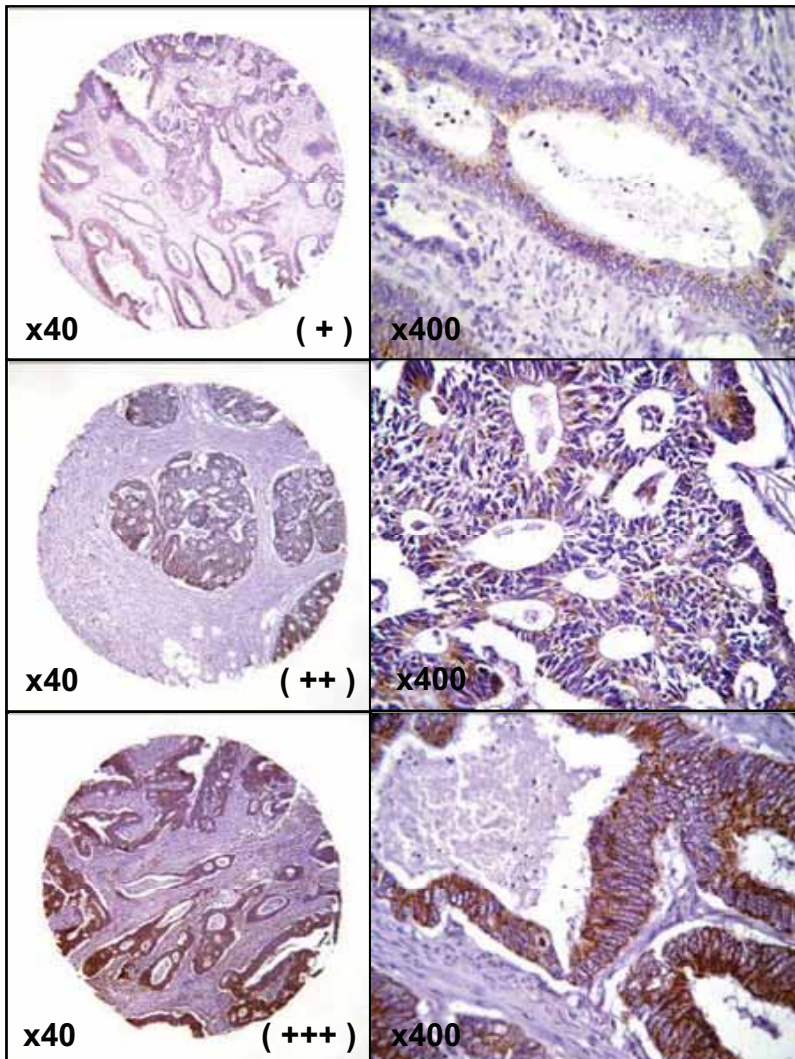
Avaluació del valor pronòstic mitjançant immunohistoquímica

Un cop demostrat que l'expressió de *PI4K2B* i *STIM2* està significativament alterada tant en CCR com en MH, volíem saber si algun d'aquests dos gens podia ser un bon biomarcador del pronòstic i/o la resposta al tractament per als pacients de CCR. Vàrem realitzar immunohistoquímica (IHQ) sobre un TMA (*Tissue Micro Array*) de casos de CCR construït al nostre laboratori. La **figura 21** mostra exemples del resultat de la tinció per als dos gens.

Per a *PI4K2B* s'han obtingut resultats informatius de 101 casos. El patró de tinció varia d'unes mostres a altres amb dos tendències majoritàries; una tinció granular i apical, i una citoplasmàtica i difusa. No hem trobat diferències clinicopatològiques entre els casos corresponents a aquests dos patrons, ni s'ha trobat tampoc cap associació amb el pronòstic dels pacients. La concordança observada entre la IHQ realitzada sobre el TMA i sobre seccions completes d'una selecció aleatòria de casos és excel·lent. El primer paràmetre avaluat ha estat la intensitat de la tinció. La disminució en aquesta intensitat s'associa a una pitjor supervivència global dels pacients quan s'agrupen per una banda els casos amb tinció negativa (-) o feble (+), i per l'altra els casos amb intensitat moderada (++) i forta (+++) (intensitat +/- vs. ++/+++) [$P = 0.047$; Hazard Ratio (HR) = 1.89, 95 % d'Interval de Confiança (CI) = 1.01-3.52]. Aquells pacients els tumors dels quals tenen menor percentatge de tinció de *PI4K2B*, mostren una discreta tendència cap a un pitjor pronòstic quan comparem els casos amb valors < 10 % amb la resta, tot i que lluny de la significació estadística ($P = 0.533$; HR = 1,29, CI = 0,59-2.83). Finalment, hem generat un valor de IHQ (IHQ score) que agrupa les dues variables anteriors. Una altra vegada, els pacients amb valors més baixos d'aquest IHQ score són els que presenten una pitjor supervivència global ($P = 0.021$; HR = 2.12, CI = 1.13-3.97) (taula 13)(figura 22, esquerra).

Per a *STIM2* s'han obtingut resultats informatius de 113 casos. El patró de tinció observat ha estat citoplasmàtic i difús. La concordança entre la IHQ dels talls sencers i la del TMA també ha estat molt bona. No em trobat cap associació amb la supervivència global o lliure de malaltia dels pacients ni amb la intensitat de la tinció ni amb el percentatge de cèl·lules tenyides ni amb el IHQ score (taula 13).

PI4K2B



STIM2

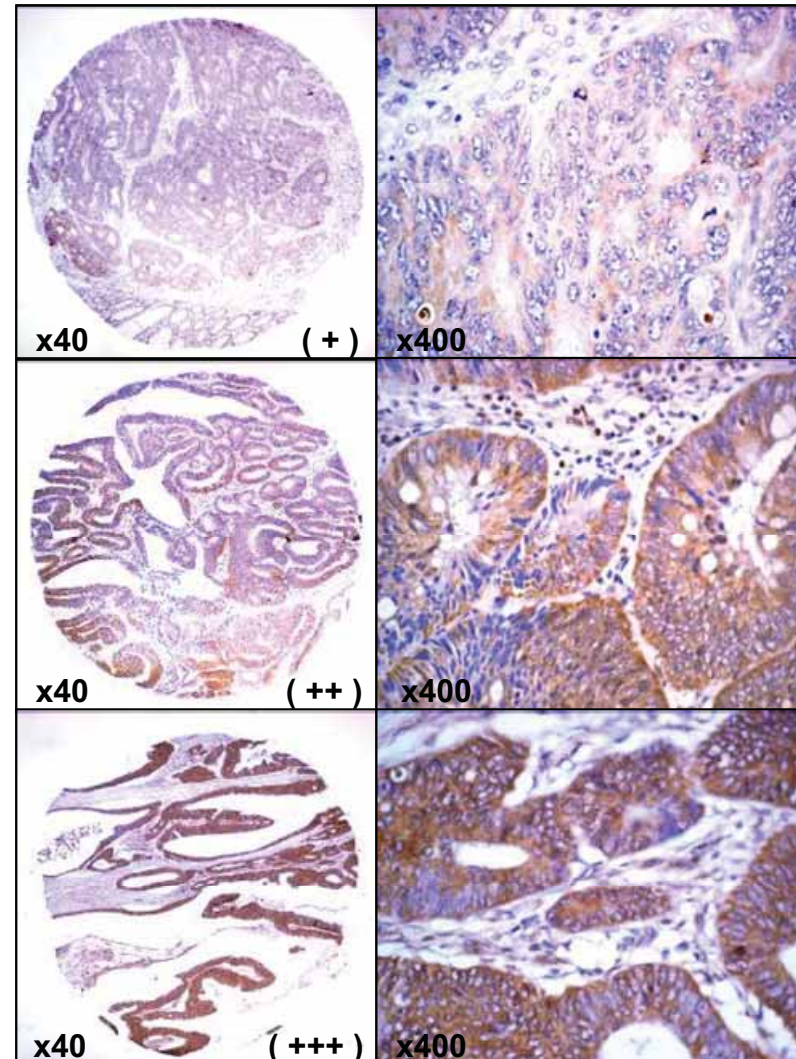


Figura 21. Immunohistoquímica de *PI4K2B* i *STIM2*.

Val a dir que l'anticòs anti-STIM2 ha donat una tinció molt més generalitzada, si bé sembla específica a jutjar pels controls negatius. La gran majoria de casos tenen el 100 % de les cèl·lules tenyides cosa que fa difícil poder comparar diferents grups. Això, de retruc, ha fet que el IHQ score perdés rellevància.

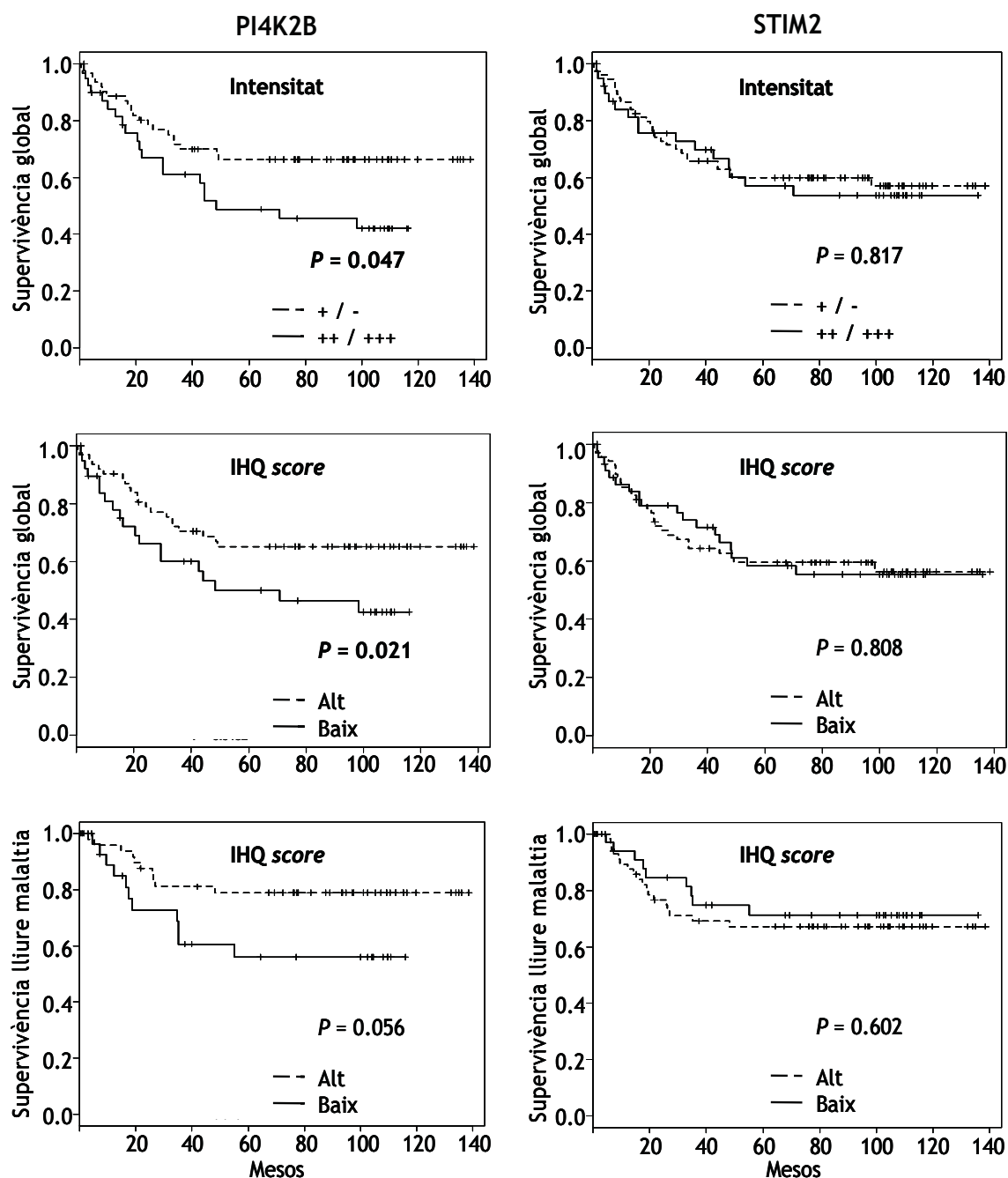


Figura 22. Corbes de Kaplan-Meier per l'anàlisi de la supervivència. Els gràfics mostren les diferències en la supervivència global (OS, *Overall survival*) o lliure de malaltia (DFS, *Disease Free Survival*) per a cadascun dels dos gens en funció de la intensitat de tinció o el IHQ score. Els P valors corresponen al model de regressió de Cox per al càlcul del risc relatiu.

$P < 0.05$ són considerats significatius.

Taula 13. Anàlisi de immunohistoquímic de l'expressió de proteïna PI4K2B i STIM2 en CCR

	Supervivència Global (OS)					Supervivència lliure de malaltia (DFS)				
	No	%	HR	95% CI	P ^s	No	%	HR	95% CI	P ^s
PI4K2B										
Intensitat de tinció*										
++ or +++	61	60.4	1			50	61.7	1		
- or +	40	39.6	1.89	(1.01 - 3.52)	0.047	31	38.3	2.31	(0.98 - 5.44)	0.058
Percentatge de tinció de PI4K2B†										
>10%	84	83.2	1			67	82.7	1		
≤10%	17	17.8	1.29	(0.59 - 2.83)	0.533	14	17.3	1.54	(0.56 - 4.27)	0.424
PI4K2B IHQ score (I:P)‡										
Alt	62	61.4	1			50	61.7	1		
Baix	39	38.6	2.12	(1.13 - 3.97)	0.021	31	38.3	2.32	(0.98 - 5.5)	0.056
STIM2										
Intensitat de tinció*										
++ or +++	74	65.5	1			65	69.1	1		
- or +	39	34.5	0.93	(0.5 - 1.72)	0.817	29	30.9	0.75	(0.32 - 1.78)	0.508
Percentatge de tinció de STIM2†										
100%	97	85.8	1			81	86.2	1		
<100%	16	14.2	0.67	(0.28 - 1.6)	0.346	13	13.8	0.96	(0.33 - 2.79)	0.937
STIM2 IHQ score (I:P)‡										
Alt	68	60.2	1			59	62.8	1		
Baix	45	39.8	0.93	(0.51 - 1.69)	0.808	35	37.2	0.81	(0.36 - 1.8)	0.602

Abreviacions: HR, Risc relatiu (*hazard ratio*); CI, Interval de confiança; I, intensitat; P, percentatge

*Intensitat de tinció: - = negatiu; + = feble; ++ = moderada; +++ = elevada

† Percentatge de cèl·lules tumorals tenyides expressant PI4K2B (≤10% or >10%) i STIM2 (100% or <100%).

‡ IHQ score de PI4K2B i STIM2 considerant la intensitat I el percentatge [(I + 1) x P] i agrupant els valors en Alt [2-5] o Baix [5-12] IHQ score.

P valors corresponents al model de regressió de Cox per al càlcul del risc relatiu i ajustat per l'estadi tumora. P < 0.5 es consideren significatius.

Avaluació del valor predictiu de resposta al tractament quimioteràpic mitjanant qPCR.

En CCR, els mecanismes de resistència als tractaments basats en l'administració de 5-Fluoracil són una de les principals causes de progressió de la malaltia, i tenen un impacte importantíssim en el pronòstic dels malalts. La necessitat de trobar biomarcadors amb capacitat de predir la resposta al tractament és de vital importància ja que pot ajudar a la presa de decisions terapèutiques.

Amb aquest objectiu, vàrem realitzar l'estudi de qPCR de *PI4K2B* i *STIM2*, sobre una cohort de 140 pacients. Aquesta cohort forma part d'una sèrie cas-control més amplia que ja ha estat validada per a l'estudi del valor predictiu d'altres biomarcadors (Dotor et al., 2006). Per a cadascun dels gens, vàrem fer dos grups de pacients en funció del grau d'expressió normalitzada. El punt de tall va ser la mediana dels valors de canvi (*fold change*) i per tant, es generaven dos grups d'igual mida (N = 70), un anomenat d'alt grau d'expressió i l'altre de baix grau. Per a determinar si hi havia diferències en la supervivència global (OS) i/o lliure de malaltia (DFS), vàrem fer les anàlisis estadístiques corresponents, similars a les de l'estudi del valor pronòstic.

Els tumors de baix grau d'expressió de *PI4K2B* s'associen a una pitjor supervivència lliure de malaltia ($P = 0.027$; HR = 2.25; CI = 1.07-4.7). Hi ha una tendència similar pel que fa a la supervivència global ($P = 0.068$; HR = 1.72; CI = 0.95-3.1). Igual que ja hem vist per a la sèrie de pronòstic, no hem observat cap associació entre el grau d'expressió de *STIM2* i la supervivència global ($P = 0.94$) o lliure de malaltia ($P = 0.64$). Finalment, hem avaluat un possible efecte sinèrgic en l'expressió d'aquests dos gens pel que fa a la resposta al tractament. Aquest efecte s'ha valorat des de dues perspectives; que segueixi un model additiu -es compara la sobreexpressió dels dos gens contra la de només un o cap d'ells- o un model dominant -es compara el fet que un o els dos estiguin sobreexpressats contra que no ho estigui cap-. No hem trobat cap associació amb un efecte sinèrgic, ni en la supervivència global ni lliure de malaltia (taula 14)(figura 23).

Taula 14. Anàlisi per qPCR de PI4K2B i STIM2 en pacients de CCR tractats amb quimioteràpia basada en 5-FU. Estudi de supervivència.

Nivells d'expressió	Supervivència global (OS)					Supervivència lliure de malaltia (DFS)				
	No	%	HR	95% CI	P*	No	%	HR	95% CI	P*
PI4K2B†										
Alt grau	70	50	1			55	50.5	1		
Baix grau	70	50	1.72	(0.95 - 3.1)	0.068	54	49.5	2.25	(1.07 - 4.7)	0.027
STIM2 †										
Alt grau	70	50	1			61	56	1		
Baix grau	70	50	1.02	(0.55 - 1.9)	0.94	48	44	0.84	(0.41 - 1.74)	0.64
Models sinèrgics										
<i>Model additiu‡</i>										
PI4K2B i STIM2 amb alt grau	52	37.1	1			46	42.2	1		
Un o els dos amb baix grau	88	62.9	1.57	(0.8 - 3.07)	0.19	63	57.8	1.79	(0.84 - 3.8)	0.12
<i>Model dominant§</i>										
PI4K2B i/o STIM2 amb alt grau	88	62.9	1			70	64.2	1		
Ambdós amb baix grau	52	37.1	1.23	(0.68 - 2.22)	0.50	39	35.8	1.09	(0.52 - 2.28)	0.82

Abreviacions: HR, Risc relatiu (*Hazard Ratio*); CI, Interval de confiança (*confidence Interval*)

† En relació a PI4K2B i STIM2, els pacients es divideixen en alt o baix grau emprant la mediana dels valors de canvi (*fold change*) entre tumor i normal

‡ Model additiu: avalua el risc de que els dos gens tinguin alt grau d'expressió per a un mateix pacient comparat amb que només ho tingui un dels dos.

§ Model dominant: avalua el risc que els dos gens tinguin baix grau d'expressió en un mateix pacient.

*P valors corresponents al model de regressió de Cox per al càlcul del risc relatiu i ajustat per l'estadi tumoral. $P < 0.5$ es consideren significatius.

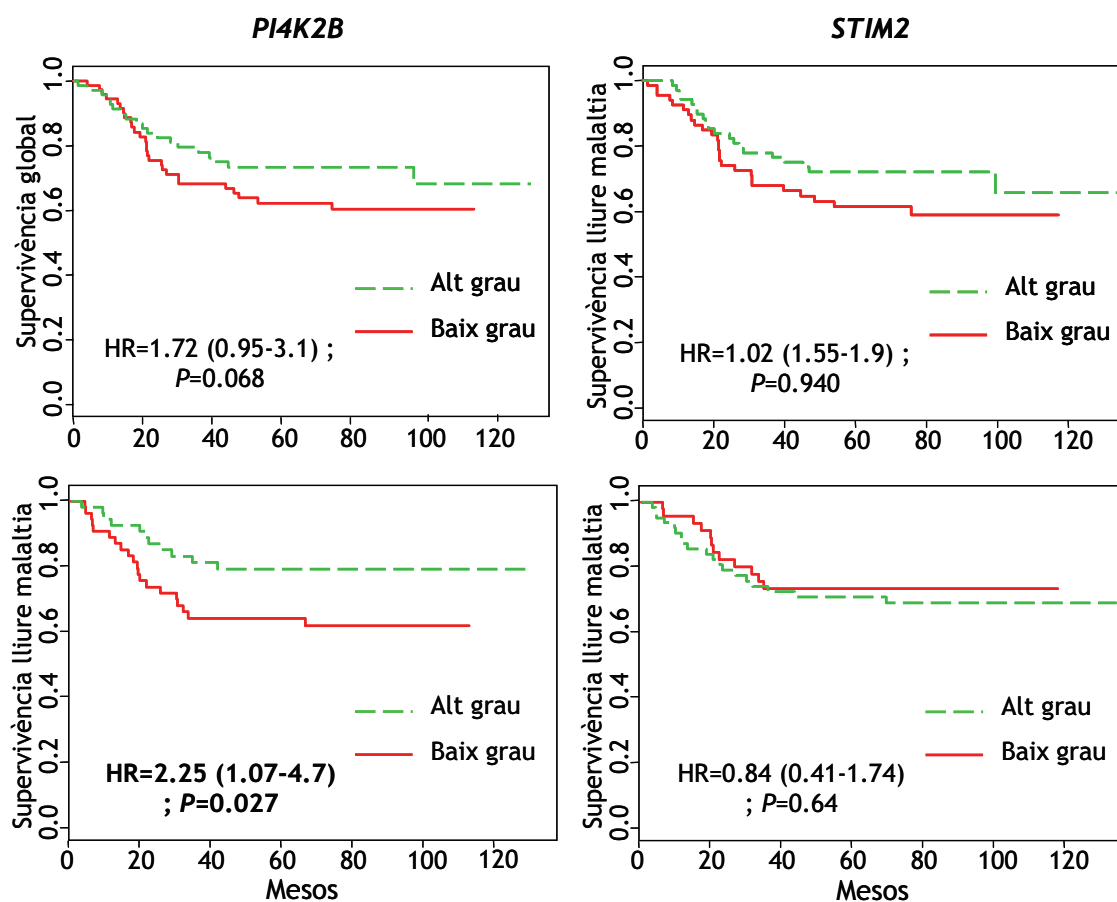


Figura 23. Corbes de Kaplan-Meier per l'anàlisi de la supervivència. Els gràfics mostren les diferències en la supervivència global (OS, Overall survival) o lliure de malaltia (DFS, Disease Free Survival) per a cadascun dels dos gens en funció de si tenen alt o baix grau d'expressió detectat per qPCR. Els P valors corresponen al model de regressió de Cox per al càlcul del risc relatiu. $P < 0.05$ són considerats significatius.

SUMARI CAPÍTOL 2

Dels 10 gens candidats que conté la Regió A, 5 s'han pogut analitzar des del punt de vista de l'expressió gènica. Per a tots 5, hem detectat un cert grau de sobreexpressió en els tumors respecte de les seves mucoses normals aparellades. Aquesta sobreexpressió, com ja permetia intuir el resultat de dosi al·lèlica obtingut en el Capítol 1, és independent de la presència o no de fenòmens de LOH a la regió 4p14-16. Aquest grau de sobreexpressió ha estat curosament analitzat i s'han identificat dos gens, *PI4K2B* i *STIM2*, pels quals aquest increment en la taxa de transcripció gènica és estadísticament significatiu.

Per tal d'analitzar la rellevància clínica de les nostres troballes, hem volgut saber quin era el valor pronòstic d'aquests dos biomarcadors. *PI4K2B* ha resultat ser un excel·lent marcador pronòstic quan la seva expressió s'avalua mitjançant immunohistoquímica. Els pacients amb nivells més baixos d'aquesta proteïna presenten una pitjor supervivència global i lliure de malaltia. De la mateixa manera, *PI4K2B* és un bon indicador de la resposta al tractament bastat en 5-FU, quan s'avalua els pacients en funció de la quantitat relativa de mRNA en els tumors respecte a la mucosa normal. Aquells pacients amb nivells més baixos de missatger, presenten una menor supervivència lliure de malaltia en ser tractats amb quimioteràpia adjuvant. Pel que fa a *STIM2*, no hem trobat cap associació entre el pronòstic o la predicció de resposta al tractament i els seus nivells d'expressió.

Aquests resultats posen de manifest el fet que, tot i no ser portadores de perturbacions somàtiques clàssiques, les regions amb d'alteracions recurrents com l'LOH, continuen sent interessants des del punt de vista de la presència de gens rellevants per a la tumorigènesi.

Capítol 3
Caracterització funcional de
PI4K2B i *STIM2*

Els resultats obtinguts fins al moment assenyalaven *PI4K2B* i *STIM2* com a dos gens importants per al procés cancerigen en CCR. El fet que l'alteració que havíem trobat en aquests dos gens tingués a veure amb la seva taxa de transcripció, ens va portar a avaluar la relació entre ells i una de les vies de senyalització més freqüentment alterada en CCR, la via de Wnt/ β -catenina. Aquesta via és fonamental per al manteniment de l'homeòstasi de l'epiteli del còlon, i molts dels gens que són regulats per ella estan implicats en processos de proliferació i diferenciació cel·lular. Així doncs, a més d'intentar ubicar aquests dos gens en la complicada xarxa d'interaccions moleculars que regulen el creixement cel·lular, vàrem estudiar quin era l'efecte concret de l'alteració majoritàriament trobada per a aquests dos gens en la nostra col·lecció de tumors. Els resultats obtinguts en avaluar l'efecte de la sobreexpressió i el silenciament sobre línies cel·lulars de CCR van donar més solidesa a les troballes descrites al Capítol 2. Tot sembla indicar que la sobreexpressió d'aquests gens provoca una disminució de la proliferació i per tant, un efecte supressor del creixement.

1. *PI4K2B* i *STIM2* estan sota control transcripcional de la via de senyalització Wnt/ β -catenina.

En col·laboració amb la Unitat de Bioinformàtica i Bioestadística del nostre centre, vàrem avaluar quines eren les correlacions entre els gens candidats de la Regió A i TCF4, el factor de transcripció principal de la via Wnt/ β -catenina. Per això, es va recórrer a la informació pública sobre dades de *micro-arrays* d'expressió. Aquestes dades són accessibles de forma gratuïta a través del *International Genomics Consortium* i l'*Expression Project for Oncology*.

Les correlacions que s'han trobat entre els diferents gens de la Regió A i TCF4 són de diferent signe. Per *KIAA0746*, *LOC389203* i *PI4K2B*, aquesta correlació és clarament negativa, mentre que per *RBPSUH*, *STIM2* i *TBC1D19* és positiva. Per a *CCAKR*, *ANAPC4*, *SLC34A2* i *ZCCHC4* les correlacions, existents, són més febles (**figura 24A, panell superior**) o hi ha més variabilitat en els resultats segons les sondes. En conjunt però, aquests resultats suggereixen que algun d'aquests gens està regulat per TCF4. En comparar el coeficient de correlació

de Pearson (PCC) per als nostres 10 gens amb les correlacions de 10.000 grups de 10 gens triats aleatòriament, vàrem veure que el nostre grup de gens es troba en el percentil 76 del transcriptoma humà. Això vol dir que els nostres gens estan més regulats per TCF4 que qualsevol altre grup de 10 gens triat a l'atzar (**figura 24A, panell inferior**).

Volíem saber si aquestes elevades correlacions representaven regulacions transcripcionals directes de TCF4 o altres factors de transcripció relacionats amb la via de Wnt. Per això, es va examinar una xarxa d'interaccions de regulació transcripcional utilitzant la informació de 295 hibridacions sobre *micro-arrays* d'expressió de CCR. La nostra xarxa d'interaccions es va construir de tal manera que només les interaccions directes estiguessin representades. Els resultats mostren com diversos factors de transcripció, a més de TCF4, estan regulant un o varis dels nostres gens. SMAD4, TCF3 i TCF25 són alguns d'aquests factors de transcripció relacionats amb la via de Wnt. *PI4K2B* i *STIM2* van ser predits com a regulats per tres i dos d'aquests factors de transcripció respectivament. L'únic factor de transcripció comú als dos gens és TCF4 (**figura 24B**).

Per a comprovar experimentalment aquestes regulacions transcripcionals, vàrem dur a terme experiments d'immunoprecipitació de cromatina (ChIP, *cromatin immunoprecipitation*). β -catenina és un cofactor que s'uneix a TCF4 per formar el complex de transcripció. Utilitzant un anticòs anti- β -catenina vàrem immunoprecipitar les seqüències promotores d'aquells gens que tenen dominis d'unió a aquest complex. Després les vàrem amplificar per PCR. Com a control positiu es van fer servir els *inputs*, o cromatines sense immunoprecipitar, i com a control negatiu, cromatines immunoprecipitades amb un anti-IgG irrellevant. Hem emprat 6 línies cel·lulars, tres de CCR i tres que no són de CCR. Per a les tres línies de CCR la banda corresponent a l'amplificació de l'immunoprecipitat és clara mentre que no apareix en les tres línies que no són de CCR (**figura 24C**). Les línies de CCR són SW480, HCT116 i LS174T i les tres presenten la regulació mitjançada per β -catenina constitutivament activada així que els nostres resultats estan en concordança amb el que esperaríem trobar en comparar aquest dos grups de línies. Els resultats avalen les prediccions fetes amb l'aproximació bioinformàtica i confirmen que *PI4K2B* i *STIM2* són gens diana de la via de Wnt, i que la seva transcripció està regulada pel complex β -catenina/TCF4.

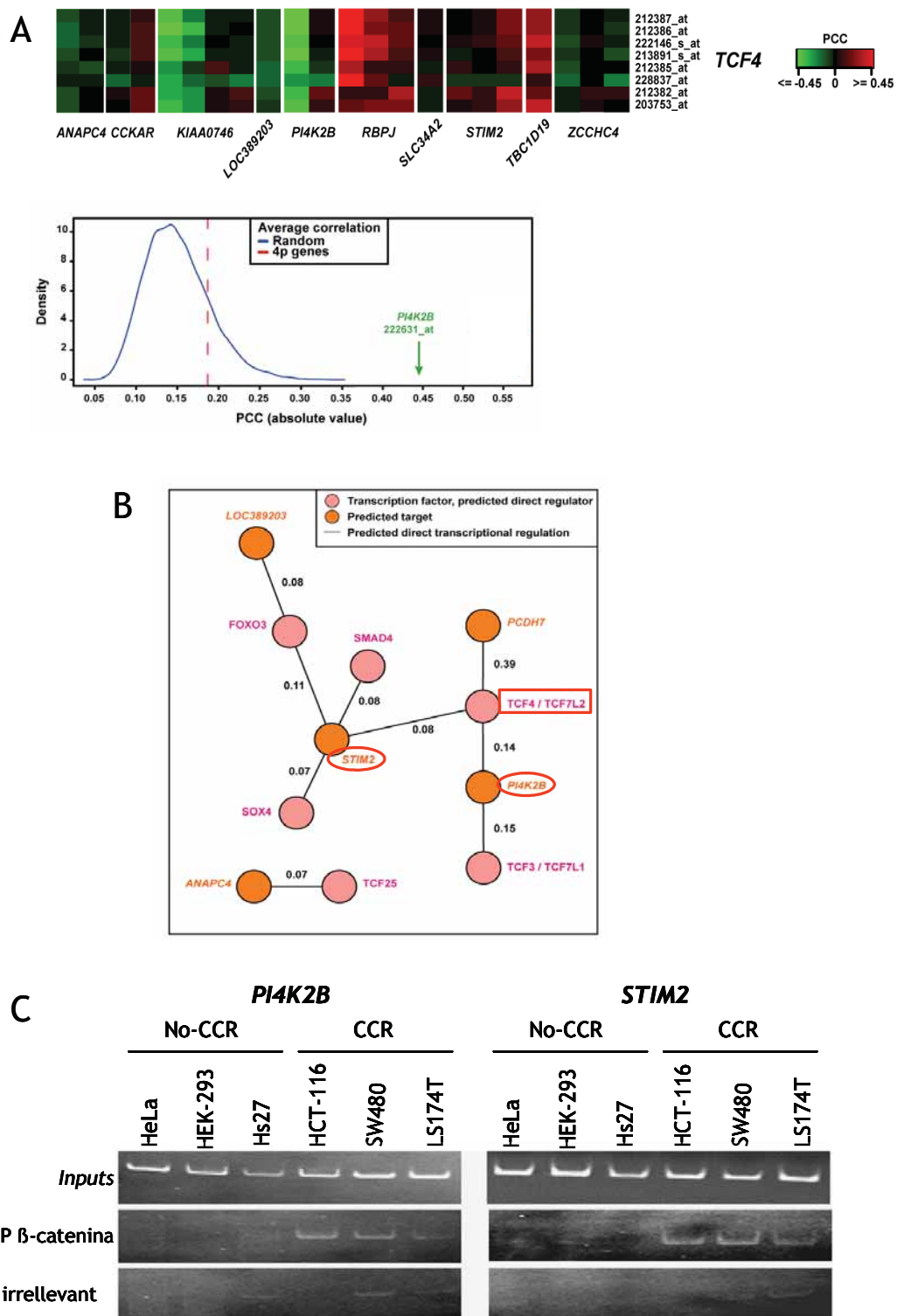


Figura 24. Assajos de regulació transcripcional per TCF4. (A) Panell superior, Correlacions dels perfils de transcripció de 295 CCR entre els gens de la Regió A i TCF4 mesurats per PCC. Panell inferior, distribució de la mitjana absoluta dels PCC per grups aleatoris de 10 gens (blau) i per als gens de la Regió A (línia vermella puntejada) (B) Regulacions transcripcionals directes predites per a gens de la Regió A. (C) Verificació experimental de les prediccions de regulació de *PI4K2B* i *STIM2* per TCF4/ β -catenina mitjançant immunoprecipitació de cromatina (ChIP).

2. *PI4K2B* i *STIM2* exhibeixen un fenotip supressor del creixement cel·lular *in vitro*.

Després d'haver trobat que *PI4K2B* i *STIM2* són gens diana de la via de senyalització de Wnt, ens vàrem preguntar quin serien els efectes de la desregulació de l'expressió d'aquests gens. Per això, es van utilitzar dues línies de CCR amb diferents nivells d'expressió d'aquests dos gens. Per una banda SW480 presenta nivells molt baixos (similars als de la mucosa normal del còlon) per a ambdós gens i va ser la línia escollida per als experiments de sobreexpressió. Per l'altra, DLD-1, amb uns elevats nivells d'expressió també d'ambdós gens, es va triar per als assajos de inhibició mitjançant siRNA. Els nivells d'expressió en aquestes línies es va avaluar per qPCR (figura 25)

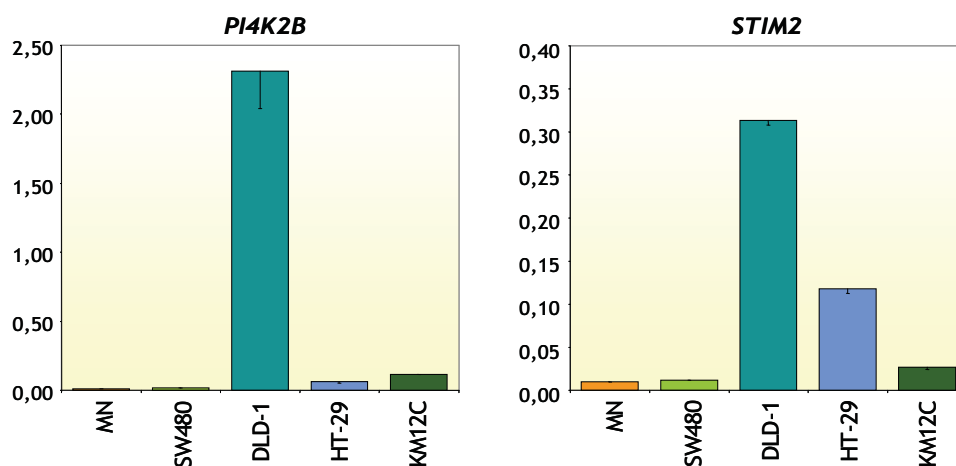


Figura 25. Nivells d'expressió de *PI4K2B* i *STIM2* en un panell de línies cel·lulars de CCR. MN; Mucosa normal.

Experimets d'inhibició mitjançant siRNA.

D'acord amb els resultats obtinguts de les sèries tumorals, els pacients que presenten nivells més baixos de mRNA o proteïna *PI4K2B* tenen pitjor pronòstic. Tanmateix, per *STIM2*, malgrat els resultats no han estat tant espectaculars, s'hi observa en alguns anàlisis una tendència similar. Aquest tipus d'associació seria la que esperàriem d'un gen supressor tumoral clàssic però, paradoxalment, els nostres dos gens estan sobreexpressats en un alt percentatge de CCR i MH. Per tal d'aprofundir en la possible funció d'aquets dos gens, i conèixer quin era l'efecte de la seva inactivació en el creixement i la proliferació cel·lular, es van realitzar els experiments d'interferència amb siRNA. Preteníem simular el que possiblement estigui succeint en els tumors amb un baix grau d'expressió d'aquests dos marcadors.

Per a ambdós gens, la transfecció amb siRNA sobre la línia DLD-1 ha resultat en una excel·lent reducció de al voltant del 70 % de la quantitat de proteïna detectada per *western blot*. Per avaluar la capacitat de proliferació d'aquestes cèl·lules, un cop transfectades, es van realitzar experiments d'incorporació de timidina tritiada. Aquest és un anàleg de la timina que s'incorpora al DNA durant la replicació i per tant, ens permet identificar aquelles cèl·lules amb una elevada taxa de proliferació i quantificar-la. Tant per a *PI4K2B* com per a *STIM2*, la seva inhibició ha donat lloc a un increment de la proliferació. Aquests increments han estat del 60 % i 45 % respectivament i en ambdós casos han estat estadísticament significatius amb P valors $< 0,01$. La **figura 26** resumeix els experiments de siRNA realitzats.

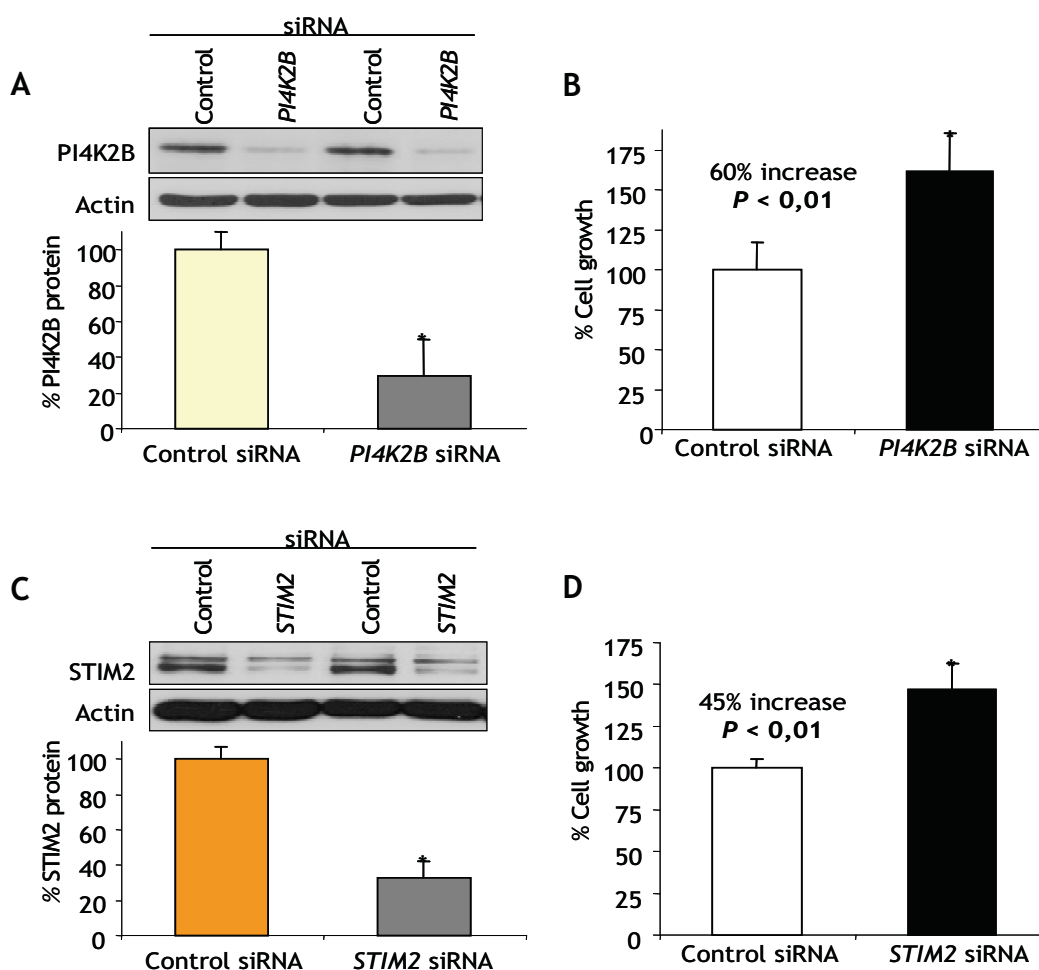


Figura 26. Experimentes de siRNA sobre DLD-1. La reducció de la proteïna és de prop del 70 % tant per *PI4K2B* com per a *STIM2* quan comparem amb un siRNA control (N=3) (A, C). També en comparar la proliferació respecte de la cèl·lula transfectada amb el siRNA control, aquesta incrementa en un 60 % i un 45 %, respectivament, ambdós casos amb significació estadística (N=3) (B, D). P valors $< 0,05$ es consideren estadísticament significatius.

Aquests resultats estan en consonància amb els obtinguts en la validació del valor pronòstic, principalment pel que fa a *PI4K2B*. Sembla lògic pensar que, si la inhibició d'aquests gens dona lloc a un increment de la proliferació, aquells tumors amb nivells d'expressió més baixos tinguin un pitjor pronòstic.

Experiments de sobreexpressió.

Per mirar de traslladar els resultats obtinguts amb els siRNA a un model *in vivo* i, al mateix temps, confirmar-los amb una altra aproximació, vàrem realitzar experiments de transfecció de *PI4K2B* i *STIM2* a la línia SW480. La intenció era generar clons d'expressió estable de cadascuna de les proteïnes per, posteriorment, avaluar el creixement de tumors generats per injecció subcutània en ratolins atímics. Si bé *PI4K2B* ja el teníem clonat en un vector d'expressió amb un *tag-MYC* preparat per a ser transfectat, en el cas d'*STIM2*, vàrem haver de subclonar-lo des del pBluescript II KS/SK (+) a un pCMV2 amb un *tag-FLAG*.

En la transfecció d'ambdós gens i posterior comprovació per *western blot* vàrem obtenir resultats diferents. pCMV5- *PI4K2B* es va transfectar molt bé i va donar lloc a una proteïna de ≈65 kDa que concorda amb el pes molecular esperat per a *PI4K2B* més el *tag-MYC*. Pel que fa a *STIM2*, la seqüenciació del clonatge va verificar que la inserció estava en *frame*. Però tot i el *tag-FLAG* que incorpora, els *western blots* no van acabar de ser satisfactoris. Com a alternativa es va comprovar la transfecció avaluant l'increment de mRNA corresponent a *STIM2*.

Un cop havíem comprovat la transfecció, per a la selecció dels clons estables es van incubar les cèl·lules amb neomicina (G418). Les cèl·lules de les plaques control (cèl·lules SW480 sense transfectar) van trigar entre 10 i 15 dies a morir. En aquest punt es van seleccionar clons de les plaques amb cèl·lules transfectades.

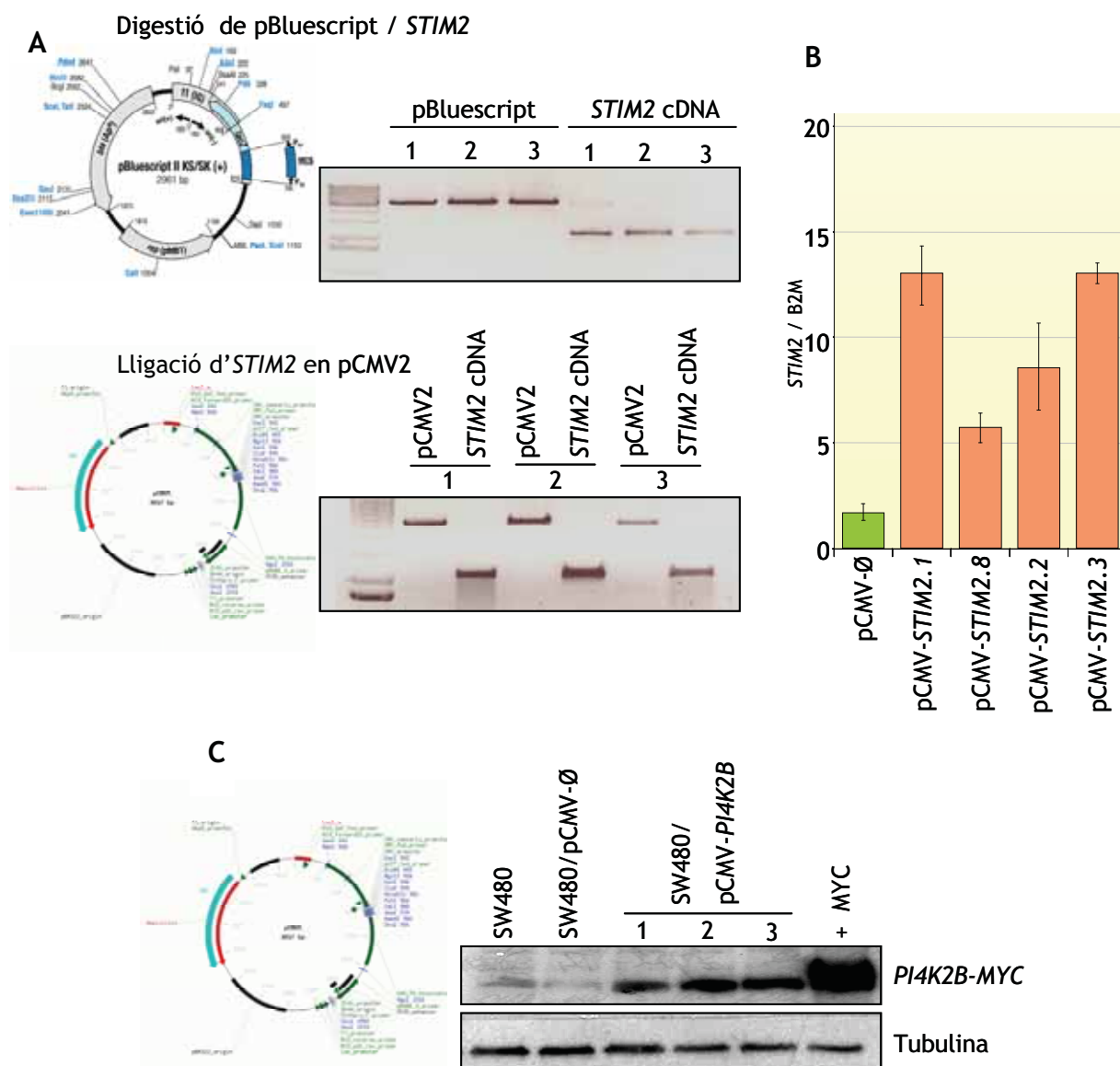


Figura 27. Experiments de clonatge i transfecció de *PI4K2B* i *STIM2* sobre SW480. (A) La figura i panell superiors mostren el pBluescript on teníem clonat *STIM2*, d'on es va alliberar per digestió enzimàtica. Al panell i figura inferiors es mostra el pCMV2 on subclonem *STIM2* per a expressar-lo en SW480. El gel mostra la digestió de les minipreps després de la lligació de l'insert. (B) qPCR d'alguns dels clons amb expressió estable. Es va seleccionar pCMV-STIM2.2 per a l'assaig *in vivo*. (C) La figura mostra el pCMV5 on està clonat *PI4K2B*; el gel mostra la detecció per *western blot* de la proteïna utilitzant l'anticòs anti-MYC. Com a control de càrrega es va utilitzar anti-tubulina.

El resultat d'aquest procés de selecció va ser molt revelador pel que fa a *PI4K2B*. Les cèl·lules transfectades amb aquest gen morien de la mateixa manera que ho feien les no transfectades en presència de l'agent de selecció. Vàrem voler saber si això era degut a l'efecte de l'antibiòtic, així que per a les cèl·lules transfectades amb *PI4K2B* es va disminuir la dosi de 750 µg/ml a

300 µg/ml. Un cop més les cèl·lules transfectades amb *PI4K2B* van patir un procés similar a les de la placa sense transfectar. Tot i així, es van agafar totes les cèl·lules SW480/pCMV5- *PI4K2B* supervivents, i es van sembrar sense l'agent de selecció G418. Seguidament, es va fer un assaig de formació de colònies per comparar la capacitat clonogènica entre les SW480/pCMV-Ø i les SW480/pCMV5-*PI4K2B*. El resultat no ofereix dubtes; les cèl·lules transfectades amb *PI4K2B* pateixen algun efecte citopàtic i no tenen capacitat per formar colònies (figura 28)

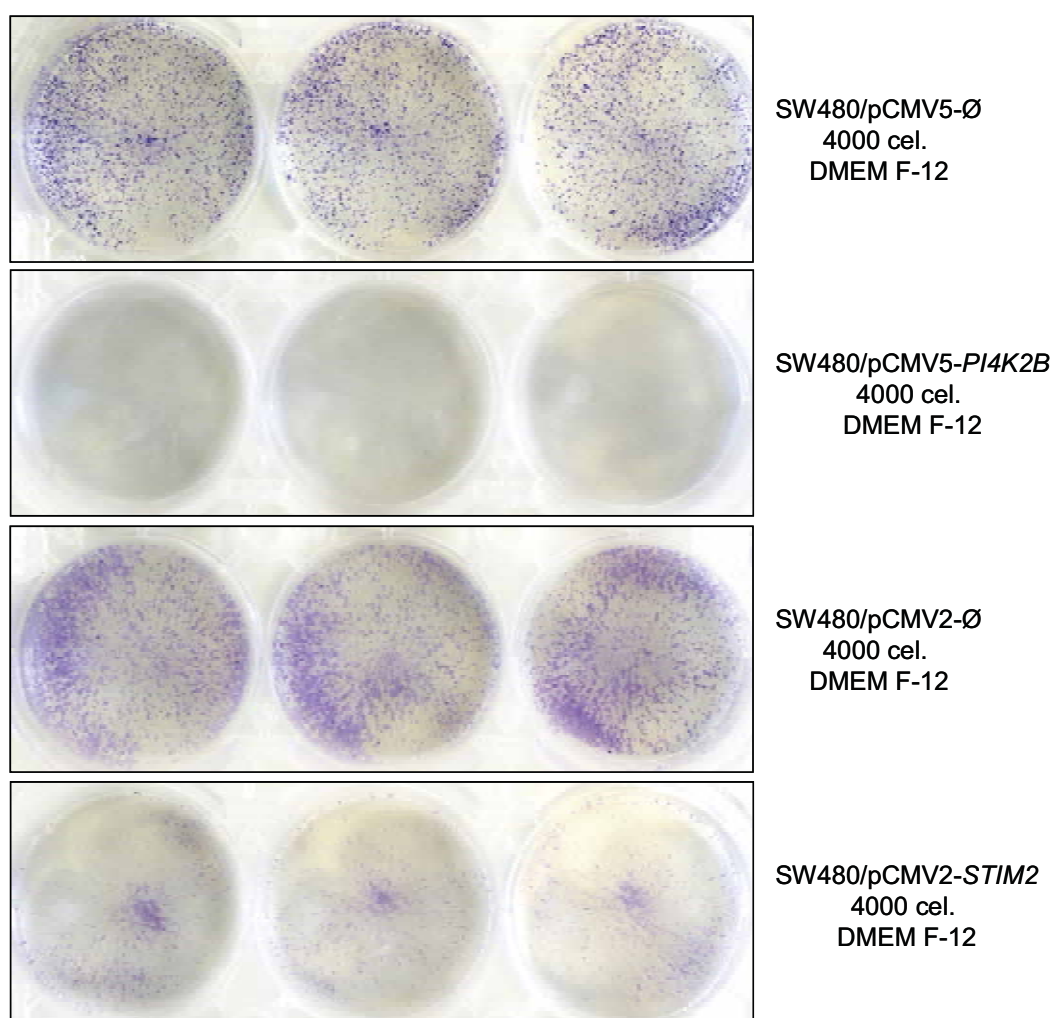


Figura 28. Assaig de formació de colònies. En plaques de 6 pous es van sembrar 4.000 cèl·lules SW480 transfectades amb les següents construccions: (A) SW480/pCMV5-Ø, (B) SW480/pCMV5-*PI4K2B*, (C) SW480/pCMV2- Ø i (D) SW480/pCMV2-*STIM2*. El medi era DMEM F-12 10% SBF 1% P/S. Les plaques es van incubar entre 10 i 15 dies a 37 °C i es van tenyir amb Cristall violeta.

Pel que fa a *STIM2*, la selecció de clons estables va ser molt més senzilla. Als 10 dies de la transfecció transitòria havien mort totes les cèl·lules de la placa control. Es van seleccionar clons de les plaques SW480/pCMV2-*STIM2* i s'hi va avaluar l'expressió de *STIM2*. La **figura 27A** mostra l'expressió dels deferents clons seleccionats. Per a l'estudi de formació de tumors *in vivo*, vàrem seleccionar un clon amb un grau de sobreexpressió mitjana (*STIM2.2*). Es pretenia evitar que la selecció d'un clon amb una sobreexpressió exageradament alta restés vàlida als resultats. És van injectar cèl·lules SW480/pCMV2- Ø a un flanc del ratolí i SW480/pCMV2- *STIM2* a l'altre. Als 15 dies post-injecció es van començar a palpar els tumors. A partir d'aquell dia es van mesurar dos cops per setmana fins al dia 40 post-injecció. A dia 40 es van extirpar els tumors.

Els tumors formats per les cèl·lules transfectades amb *STIM2* van resultar tenir un creixement més lent. El volum i el pes d'aquests tumors en el moment del sacrifici dels animals va ser significativament inferior als tumors formats per les cèl·lules no transfectades.

No s'ha pogut comprovar *in vivo* l'efecte de la sobreexpressió de *PI4K2B*. No obstant, la mort cel·lular observada després de la transfecció transitòria i la incapacitat per formar colònies indiquen que la sobreexpressió d'aquesta proteïna pot tenir un possible efecte citotòxic, supressor del creixement de les cèl·lules tumorals. Per a *STIM2* si que s'ha pogut realitzar l'experiment *in vivo* i s'ha demostrat que, els tumors amb sobreexpressió d'aquesta proteïna exhibeixen un fenotip supressor del creixement tumoral. És probable que estiguem observant el mateix efecte però que aquest sigui molt més agressiu en el cas de *PI4K2B* i que per tant, en el cas d'aquest gen, siguin necessaris sistemes d'expressió condicional més sofisticats.

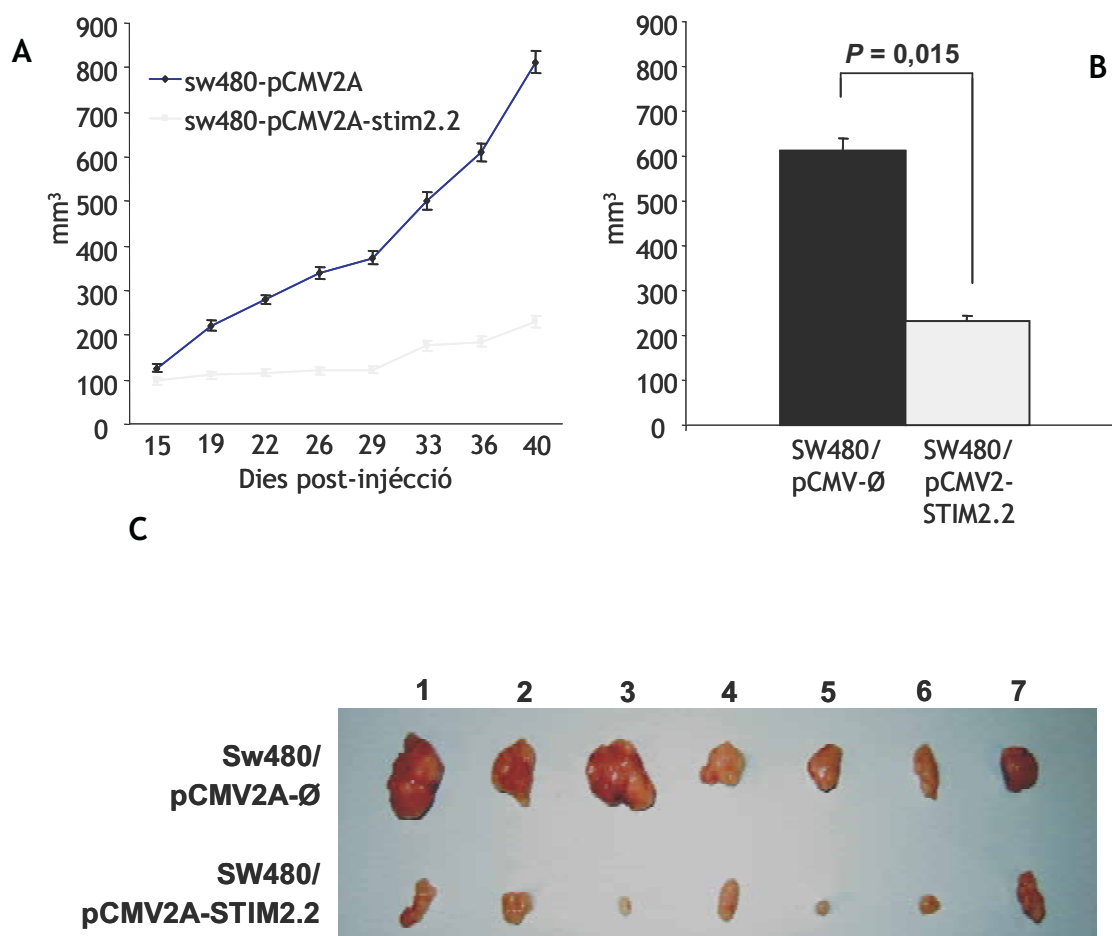


Figura 29. Assaig de formació de tumors. Els tumors són procedent de transfeccions en SW480. **(A)** Formació de tumors al llarg dels 25 dies en que es va monitoritzar el creixement i es van fer mesures per calcular-ne el volum. **(B)** La reducció en el volum dels tumors transfectats amb *STIM2* és estadísticament significativa segons el test T-student amb un a *P* valor de 0,015. $P < 0,05$ es van considerar significatives. **(C)** Exemples dels tumors extirpats a dia 40. Per cada ratolí hi ha una parella de tumors, un control (pCMV- Ø) i l'altre transfectat amb *STIM2*.

SUMARI CAPÍTOL 3

L'estudi de regulació transcripcional de la Règió A ha confirmat que alguns dels gens que s'hi troben poden estar implicats en el procés tumoral. Hem pogut demostrar que *PI4K2B* i *STIM2* són dos gens diana de la via de Wnt que estan regulats pel complex TCF4/ β -catenina. Donat que aquesta és una de les vies més freqüentment alterada en CCR, hem conduït experiments per dilucidar l'efecte de l'alteració que aquests dos gens pateixen en CCR, la desregulació de la seva expressió gènica. Els experiments d'interferència per RNA en línies cel·lulars han demostrat que la pèrdua d'aquesta expressió s'associa, en ambdós gens, a un fenotip tumoral més agressiu per un increment de la capacitat proliferativa. Aquest resultat està en concordança i reforça els resultats obtinguts en el Capítol 2 amb les sèries tumorals.

Quan hem intentats veure l'efecte de la sobreexpressió d'aquests dos gens, ens hem trobat amb el resultat lògic i complementari a l'anterior. Pel que fa a *PI4K2B*, les cèl·lules transfectades presenten un fort efecte citopàtic i una incapacitat per formar colònies. Per a *STIM2*, probablement perquè l'efecte tòxic de la seva sobreexpressió no és tant fort, hem pogut seleccionar clons amb expressió estable i realitzar un experiment de formació de tumors *in vivo*. Els tumors generats a partir de cèl·lules que sobreexpressen aquest gen són més petits i creixen més lentament que els tumors control.

En resum, els assajos funcionals han demostrat que *PI4K2B* i *STIM2* exhibeixen un fenotip supressor del creixement de les cèl·lules tumorals quan es troben sobreexpressats, i que la seva inactivació incrementa la proliferació cel·lular.

