

**POLIPOSI ADENOMATOSA FAMILIAR I CÀNCER
COLORECTAL**
Estudi genòmic i anàlisi d'alteracions de la via de Wnt

Memòria presentada per

Antònia Obrador Hevia

Per optar al Grau de

Doctor

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

Tesi adscrita al departament de Genètica de la
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona
Programa de Genètica (Bienni 2002-2004)
Tutora: Dra. Marta Pascual

Gabriel Capellà

Marta Pascual

Antònia Obrador

Barcelona, Abril de 2007

Materials i Mètodes

Don't be afraid of going slowly, be afraid of standing still

Proverbi xinès

PACIENTS

FAP

Els teixits estudiats procedeixen de sis pacients diagnosticats de FAP en els hospitals de Bellvitge de l'Hospitalet de Llobregat i Son Dureta de Palma (Mallorca) entre els anys 2001 i 2006, tots amb mutació germinal d'APC identificada per la Unitat de Diagnòstic del laboratori (taula M.1). De cada un d'aquests pacients es varen seleccionar deu adenomes (taula M.2) i la mucosa normal aparellada per realitzar els subseqüents estudis moleculars.

CCR esporàdic

Es varen seleccionar 36 pacients de CCR esporàdic del banc de tumors de l'Institut Català d'Oncologia dels quals hi havia mostres disponibles d'adenomes i carcinomes (vegeu la taula M.3 per a la informació clínica dels pacients inclosos en l'estudi).

Cas	Família	Individu	Sexe	Antecedents familiars	Edat actual	Edat diagnòstic	Nombre pòlips	HCEPR	Osteomes	Tumors intestinals	Tumor desmoide	Mutació germinal APC
PCF1	C	C-III-8	D	sí	35	22	300	no	no	no	no	c.1958+1G>A; r.sp1*
PCF3	F-1241-02	I-2097-02	H	no	41	38	>100, incomptables	no	no	no	no	c.1958+3G>A; r. spl* c.1959G>A; ("p.=")*
PCF4	F-1480-03	I-2516-03	H	no	26	24	>1000	no	no	sí	sí	c.4175C>A; p.Ser1392X
PCF6	GPOL	GPOL-III2	H	no	23	22	>100	no	sí	sí	no	c.4612_4613delGA; p.Glu1538IlefsX5
PCF8	F-302-99	NPD	D	sí	20	18	139	no	no	no	no	c.1262_1263delGGins AA; p.Trp421X
PCF9	B	B-IV-11	D	sí	33	20	800	no	no	no	no	c.3183_3187del AAACA; p.K1061KfsX2

Taula M.1. Dades sobre la història clínica dels sis casos de PAF seleccionats per a l'estudi. Es destaca la presència o absència de les manifestacions extracolòniques més freqüents: HCEPR (hipertròfia congènita de l'epiteli pigmentari de la retina), osteomes, lesions intestinals i tumor desmoide. H: home; D: dona. * alteracions descrites en la publicació Aretz *et al.*, 2004.

PCF1	AD1	AD2	AD3	AD4	AD5	AD6	AD7	AD8	AD9	AD10
localització	R	CT	CD	CA	CT	CD	CT	C	C	CA
mida	<10mm	10-20mm	<10mm	10-20mm	10-20mm	10-20mm	10-20mm	<10mm	<10mm	<10mm
PCF3	AD1	AD2	AD3	AD4	AD5	AD6	AD7	AD8	AD9	AD10
localització	C	CT	CA	R	CD	R	CA	CT	CD	R
mida	10-20mm	<10mm	<10mm	>20mm	>20mm	10-20mm	<10mm	>20mm	<10mm	<10mm
PCF4	AD1	AD2	AD3	AD4	AD5	AD6	AD7	AD8	AD9	AD10
localització	CD	R	CT	CA	C	CT	CT	CD	R	CT
mida	<10mm	<10mm	<10mm	10-20mm	10-20mm	10-20mm	>20mm	<10mm	<10mm	>20mm
PCF6	AD1	AD2	AD3	AD4	AD5	AD6	AD7	AD8	AD9	AD10
localització	CA	CD	CA	C	CT	C	CA	CT	CD	CD
mida	<10mm	<10mm	<10mm	<10mm	<10mm	<10mm	<10mm	<10mm	<10mm	<10mm
PCF8	AD1	AD2	AD3	AD4	AD5	AD6	AD7	AD8	AD9	AD10
localització	R	C	CD	CA	C	R	CD	CT	CA	C
mida	<10mm	<10mm	<10mm	<10mm	<10mm	<10mm	<10mm	<10mm	<10mm	<10mm
PCF9	AD1	AD2	AD3	AD4	AD5	AD6	AD7	AD8	AD9	AD10
localització	R	R	CD	CD	CD	CT	CT	CA	C	C
mida	10-20mm	<10mm	10-20mm	10-20mm	10-20mm	<10mm	<10mm	<10mm	<10mm	<10mm

Taula M.2. Característiques dels 60 adenomes triats per a l'estudi de la FAP. R: recte; CD: còlon descendent; CT: còlon transvers; CA: còlon ascendent; C: cec

ID	Sexe	Edat	Localització	Duke's	Tipus Cirurgia
181	home	76	recte	B2	
292	dona	62	recte	B2	radical
350	home	70	recte	C2	radical
71	dona	54	sigma	D	radical
87	home	58	a. hepàtic	D	pal·liativa
184*	home	84	recte	B1	radical
373	home	72	sigma	B2	radical
563	home	78	a. esplènica	B2	radical
26*	home	64	recte	C2	radical
375	home	70	recte	D	pal·liativa
176	dona	73	descendent	D	pal·liativa
256	home	68	sigma	C2	radical
385	dona	63	sigma	C2	radical
587	home	52	a. hepàtic	D	pal·liativa
593	dona	79	sigma	B2	radical
716	home	68	recte	D	pal·liativa
813*	dona	67	cec	B1	radical
440	home	63	recte	C2	radical
375	home	70	recte	D	pal·liativa
389	dona	71	recte	D	pal·liativa
570	home	72	recte	D	pal·liativa
220*	dona	79	sigma	C2	radical
336*	dona	76	sigma	B1	radical
520	home	82	transvers	B1	radical
731*	home	55	recte	C2	radical
57	dona	76	recte	A	radical
65	home	53	recte	B2	radical
432	home	64	recte	B2	radical
660	home	72	sigma	B2	radical
423	home	58	transvers	B2	radical
376	dona	74	recte	D	pal·liativa
230	dona	78	sigma	C1	radical
436	home	57	sigma	D	pal·liativa
809	home	58	sigma	C2	radical
107	dona	78	a. hepàtic	D	pal·liativa
228*	home	73	ascendent	C2	radical
818	home	54	transvers	C2	radical
287	home	78	recte	A	radical
225	home	37	sigma	B1	radical
378	dona	78	sigma	C1	radical
348	home	86	descendent	A	radical
709	dona	78	a. esplènica	B2	radical
2	dona	75	cec	B2	radical
7	home	83	transvers	B2	radical
6	home	71	recte	C2	radical
405*	home	55	a. hepàtic	D	pal·liativa

* casos en què apareixen diversos pòlips segons l'informe d'Anatomia Patològica

Taula M.3. Informació clínica dels carcinomes esporàdics triats per als diferents estudis.

I. TÈCNiques D'ANÀLISI DEL DNA

I. I ANÀLISI MOLECULAR DEL GEN APC

Detecció de mutacions en l'MCR

Més del 60% de les mutacions somàtiques del gen APC es troben en una regió que representa menys del 10% de la regió codificant del gen entre els codons 1.286 i 1.513 de l'exó 15 (Miyoshi *et al.*, 1992). Aquesta regió la varen anomenar MCR (*mutation cluster region*). Més recentment, Crabtree *et al.* han acotat la seqüència entre els codons 1.250 i 1.450 (Crabtree *et al.*, 2003). Per aquesta raó es va decidir estudiar exclusivament aquesta regió per trobar les mutacions somàtiques en els adenomes. Concretament, es varen dissenyar uns primers que amplifiquen 838 nucleòtids compresos entre els nucleòtids 3.627 i 4.465 del gen i que contenen dels codons 1.203 al 1.482 (figura M.1).

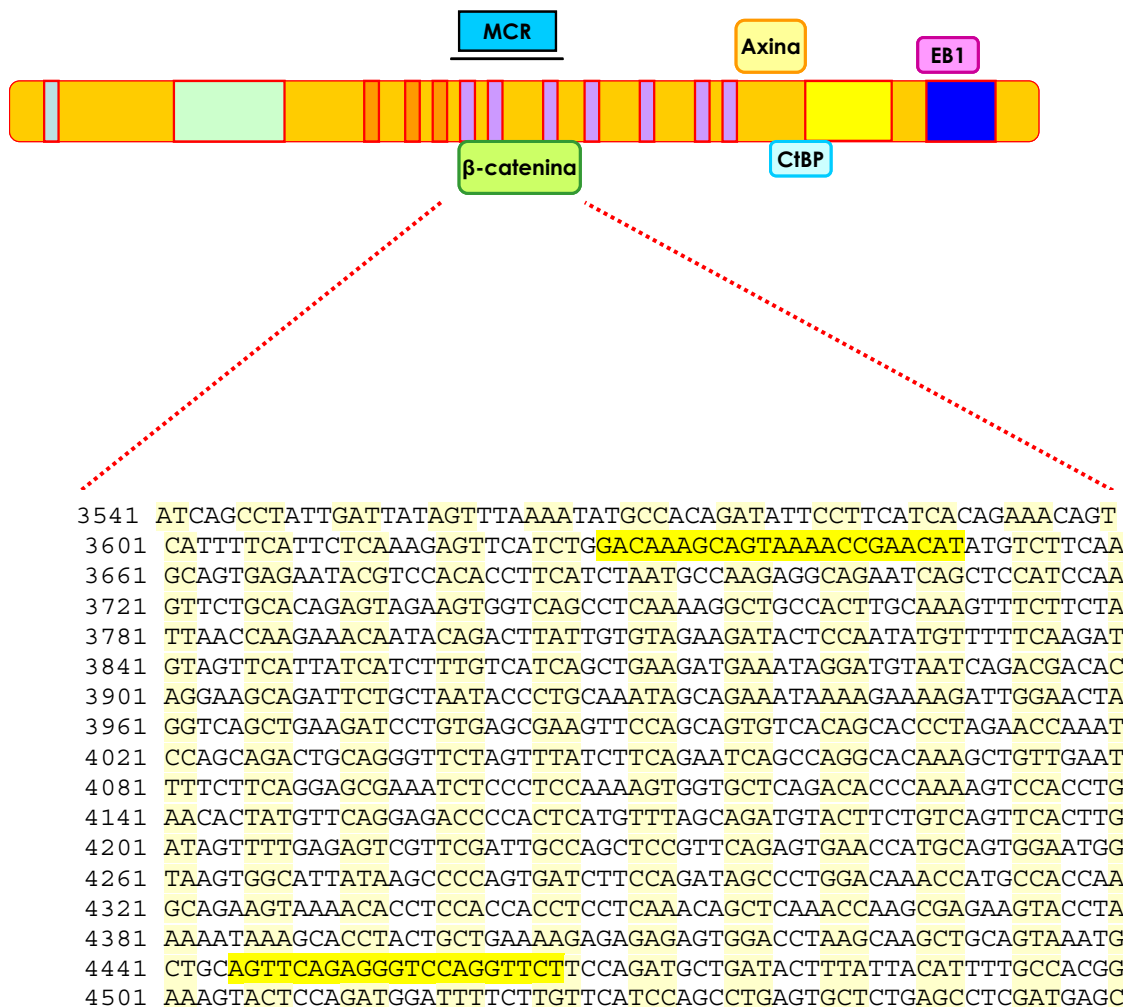


Figura M.1. Fragment de la seqüència de l'exó 15 del gen APC . Localització dels primers (en groc) per amplificar la regió MCR (vegeu la taula M.4 per a més detalls sobre els primers).

Per fer la reacció de PCR (*polymerase chain reaction*) es varen utilitzar 75 ng de DNA extret a partir de les biòpsies dels adenomes. Es varen afegir 1,25 U de DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) d'Invitrogen (5 U/ μ l), 2,5 mM de Mg_2Cl , 0,2 mM de dNTPs, Buffer IX, 0,1 μ M dels primers (vegeu la taula M.4 per a més detalls sobre els primers).

Els productes de la PCR es varen purificar amb el Jetquik PCR purification kit (Genomed) per eliminar els residus de la reacció. A partir de 3-5 μ l de producte purificat, es va fer la reacció de seqüència amb reactius d'Applied Biosystems i es va llegir amb l'equip Abiprism 37.30.

Estudi de la pèrdua al lèlica mitjançant l'anàlisi de microsatèl·lits

Els canvis somàtics més freqüents del gen *APC* que es donen en els adenomes poden ser mutacions puntuals o pèrdues de la regió cromosòmica on es troba el gen. Per estudiar si en els adenomes s'ha donat una pèrdua de la regió del gen, situació que en aquest cas implicaria una pèrdua d'heterozigositat (*loss of heterozygosity*: LOH) es varen estudiar tres marcadors microsatèl·lits a 3' i 5' del gen.

Els primers per a l'amplificació contenen fluorescència, de manera que es poden llegir els pics de fluorescència amb un seqüenciador per conèixer la mida de cada al·lel (vegeu la taula M.4 per a més detalls sobre els primers). Es varen utilitzar els fluorocroms 6-FAM per als microsatèl·lits D5S82 i D5S346 (la llargada dels productes no coincideix: 169-179 i 96-122 respectivament) i NED per D5S299 (llargada del producte: 156-186).

Per fer la PCR es varen utilitzar 200 ng de DNA extret de biòpsies d'adenomes. Es varen afegir 1,25 U de DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) (Invitrogen, 5U/ μ l), 2,5 mM de Mg_2Cl , 0,2 mM de dNTPs, Buffer IX, 0,25 μ M dels primers.

En el cas que el teixit normal fos heterozigot, es procedia a l'anàlisi dels pics en els adenomes per determinar la pèrdua al·lelica. Es va calcular el quocient dels pics dels al·lells de l'adenoma respecte dels pics del teixit normal segons el procediment descrit per Cawkwkell *et al.*, 2003 (Cawkwkell *et al.*, 1993). El llindar de canvi a partir del qual es va decidir que hi havia pèrdua al·lelica va ser 0,7, ja que l'estudi previ de revisió de la histologia dels teixits indicava que la contaminació màxima de teixit normal en els adenomes era d'un 30%.

Gen	Tècnica amplifacació	Regió amplifacació	Mida producte amplifacat (pb)	Seq primer forward	Seq primer reverse	Tm
APC	PCR	MRC	838	GACAAAGCAGTAAAACCGAACAT	AGAACCTGGACCCTCTGAACT	59°
KRAS	PCR	Exó 1	241	GGTGGAGTATTTGATAGTGTA	GGTCCTGCACCAGTAATATGCA	54°
D5S299	PCR	5q21.3	156-185	GTAAGCAGGACAAGATGACAG	GCTATTCTCTCAGGATCTTG	60°
	fluorescència					
D5S82	PCR	5q21.3	169-179	CCCAATTGTATAGATTTAGAAGTC	ATCAGAGTATCAGAATTTCT	55°
	fluorescència					
D5S346	PCR	5q22.3	96-122	ACTCACTCTAGTGATAAATCGGG	AGCAGATAAGACAGTATTACTAGTT	55°
	fluorescència					
C-MYC	PCRq	Exons 1-2	168	GCTGCTTAGACGCTGGATTTT	CTGCTGCTGCTGCTGGTAGAAG	65°
APC	PCRq	Exons 2-3	109	GCTATGGCTTCTTCTGGACA	AACGGAGGGACATTTTTGACC	65°
sFRP1	PCRq	Exons 1-3	248	CTACTGGCCCGAGATGCTTA	GCTTCTTCTTCTTGGGGACA	63°
AXINA2	PCRq	Exons 1-2	106	AGTGTGAGGTCCACGGAAAC	TGGCTGGTGCAAAGACATAG	65°
BUB1B	PCRq	Exons 9-10	115	AGGATCTGCCCCGCTTCCC	GTCGTCTGATAGGTTACTGG	65°
MAD2L1	PCRq	Exons 3-4	111	GGTCCTGGAAAGATGGCAG	ATCACTGAACGGATTTTCATCC	57°
STMN	PCRq	Exons 4-5	87	GAACGTTTGCAGAGAAGGATAA	GTCAGCTTCAGTCTCGTCAGCA	57°
B2MGB	PCRq	Exons 2-3	269	CCAGCAGAGAATGGAAAGTC	GATGCTGCTTACATGTCTCG	63°
CICLOFILINA	PCRq	Exons 1-5	325	CTCCTTTGAGCTGTTTGCAG	CACCACATGCTTGCCATCC	57°

Taula M.4. Primers utilitzats per a les diferents reaccions d'amplificació. Tm: temperatura de *melting*.

I.2 ANÀLISI MOLECULAR DEL GEN KRAS

En la seqüència adenoma-carcinoma una de les alteracions que es dona en les primeres fases, després de la mutació en el gen *APC*, és la mutació en el gen *KRAS*. La majoria dels adenomes i carcinomes presenten mutacions en aquest gen i en la majoria dels casos les mutacions es donen en els codons 12 i/o 13 de l'exó 1 (Burmer & Loeb, 1989). Per tenir una millor caracterització molecular dels adenomes de FAP, es varen identificar les mutacions en aquesta localització del gen *KRAS*. Això també ens permetia tenir una idea del grau de progressió d'aquests tumors. Es va dissenyar una parella de primers per amplificar una regió de 241 parells de bases (pb) que conté els codons 12 i 13 (figura M.2).

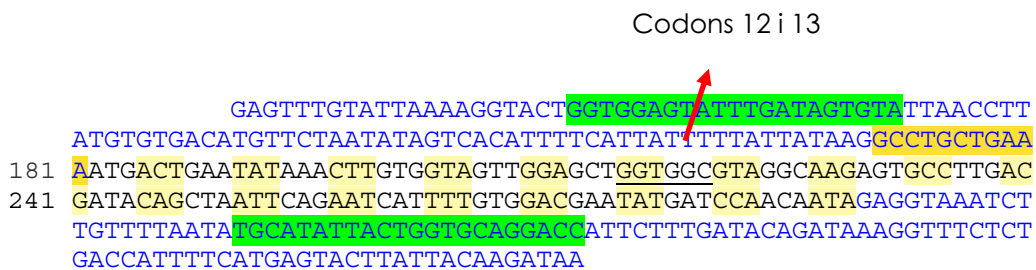


Figura M.2. Fragment de la seqüència de l'exó 1 i regions flanquejants del gen *KRAS*. Localització dels primers (en verd) per amplificar els codons 12 i 13 (vegeu la taula M.4 per a més detalls sobre els primers).

Per fer la reacció de PCR es varen utilitzar 75 ng de DNA extret a partir de les biòpsies dels adenomes. Es varen afegir 1,25 U de DNA polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) d'Invitrogen (5 U/ µl), 2,5 mM de Mg₂Cl, 0,2 mM de dNTPs, Buffer IX, 0,1 µM dels primers (vegeu la taula M.4 per a més detalls sobre els primers).

Els productes de la PCR es varen purificar amb el Jetquik PCR purification kit (Genomed) per eliminar els residus de la reacció. A partir de 3-5 µl de producte purificat, es va fer la reacció de seqüència amb reactius d'Applied Biosystems i es va llegir amb l'equip Abiprism 37.30.

1.3 array COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION

Amb l'objectiu de determinar els guanys i les pèrdues de material genètic i el grau d'instabilitat cromosòmica de 29 adenomes de poliposi adenomatosa familiar, es va usar la tècnica de l'*array comparative genomic hybridization* (aCGH) (vegeu requadre M.1 per a l'explicació de la tècnica).

Es varen fer servir els *microarrays* d'oligonucleòtids fabricats pel Departament de Patologia del VU University Medical Center a Amsterdam a partir de la biblioteca d'oligonucleòtids Human Release 2.0 dissenyats per Compugen (San Jose, CA, USA) que conté oligonucleòtids de 60 pb que representen 28.830 gens únics (obtinguts de Sigma-Genosys, Zwijndrecht, Holanda) i són "espotejats" sobre *microarrays* de CodeLink (Amersham Biosciences).

Els experiments es varen realitzar durant una estada al laboratori de genòmica del càncer del departament d'oncologia de la Universitat de Cambridge liderat pel Dr. Carlos Caldas.

Es va obtenir DNA genòmic a partir de sang de 20 dones i de 20 homes i es varen fer dos *pools* (agrupaments) per tenir un DNA referència de cada sexe. El DNA de les mostres problema es va extreure a partir de biòpsies amb el mètode clàssic d'extracció de DNA fenol-cloroform. El DNA es va marcar per *Random Primer* (encebador aleatori) en una reacció de 100 µl que contenia 300 ng de DNA genòmic, solució 2,5X de *random primers* (BioPrime DNA Labeling System, Invitrogen), Tris 1 mM pH 7,6, EDTA 0,1 mM, dATP, dTTP i dGTP 0,2 mM, dCTP 0,1 mM, Cy3 o Cy5 0,4 mM (Amersham) i 40 U de *Klenow Fragment* (BioPrime DNA Labeling System, Invitrogen) (Snijders *et al.*, 2001). Es va fer servir el fluorocrom Cy3 per a les mostres d'estudi i el Cy5 per al DNA referència. La barreja es va incubar durant 16h a 37°C. El marcatge no incorporat es va eliminar passant el producte de la reacció per les columnes ProbeQuant G50 (Amersham Biosciences) d'acord amb el protocol del fabricant.

Per preparar la solució d'hibridació es varen barrejar 50 µl de DNA problema marcat amb Cy3, 50 µl de DNA referència marcat amb Cy5 i 100 µg de DNA humà Cot-I (Invitrogen) i es va precipitar amb 20 µl de NaAc 3 M pH 5,2 i 550 µl d'etanol absolut. Després de barrejar per inversió, el DNA es va recuperar per centrifugació a 4°C durant 30 minuts a 14.000 rpm. El precipitat es va dissoldre en 13 µl de tRNA de llevat (100 µg/ µl, Invitrogen) i 26 µl d'SDS 20%. Després d'incubar durant quinze minuts a

temperatura ambient, s'hi varen afegir 91 µl de MasterMix (14,3% de sulfat dextrà, 50% formamida (Invitrogen), SSC 2,9% pH7 (Sigma)). Aquesta barreja es va incubar a 73°C durant deu minuts per desnaturalitzar el DNA i després a 37°C una hora per permetre al Cot-I DNA bloquejar les seqüències repetitives. La barreja es va dipositar sobre el *microarray*. La hibridació i les rentades es varen fer automàticament amb l'estació d'hibridació GeneTAC/HybArray12 (Genomic Solutions/Perkin Elmer). La hibridació es va fer durant 38 hores a 37°C i les rentades consistiren en:

- sis cicles (10 segons de flux i 20 de parada) amb formamida 50%, SSC 2X
- dos cicles amb solució fosfat (0,1 M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH8, 0,1 % (v/v) Igepal CA630 (Sigma))
- dos cicles amb 0,2X SSC
- dos cicles amb 0,1X SSC
- dos cicles amb 0,01X SSC

Una vegada rentats, els portaobjectes es varen escanejar amb el Microarray Scanner G2505B (Agilent Technologies).

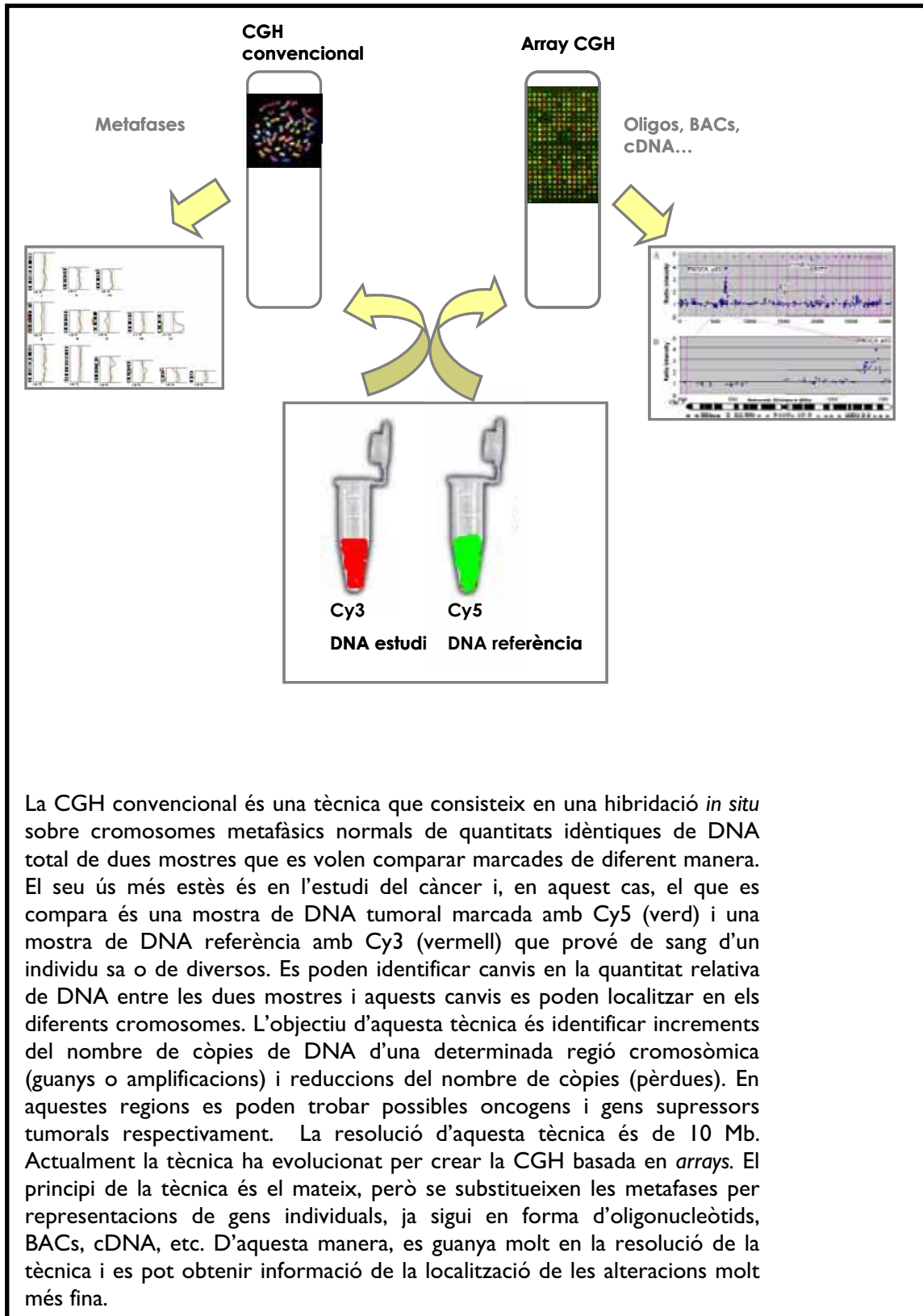
Es varen fer dos experiments de *dye-swap* (canvi de marcatge) per tenir un control de qualitat, de manera que en aquests experiments l'ordre dels fluorocroms s'inverteix (la mostra problema es marca amb Cy3 i la referència amb Cy5). Es volien observar els mateixos canvis però amb una tendència invertida per considerar que els resultats dels experiments són de bona qualitat. En el mateix sentit, totes les mostres es varen hibridar amb una referència del sexe contrari per poder observar les diferències en els cromosomes sexuals com a control de qualitat de la hibridació.

En el procés de l'anàlisi de les imatges, la detecció dels punts i el control de qualitat són automàtics i es varen fer amb BlueFuse versió 3.1 (BlueGenome, Cambridge, UK). Es varen obtenir fitxers en format Bluefuse amb dades d'intensitat per a cada canal i uns indicadors de qualitat per a cada *spot* (punt). Aquestes dades es varen processar en l'entorn d'anàlisi R (www.r-project.org) amb el paquet estadístic snapCGH del dipòsit Bioconductor (www.bioconductor.org).

En primer lloc es varen filtrar els punts amb baixa qualitat segons els índexs del programari de l'escàner. Tots els *microarrays* varen ser analitzats de manera conjunta. Es va realitzar una normalització de cada *microarray* pel mètode de la mediana per a centrar els valors en 0 i posteriorment es varen normalitzar tots els *microarrays* pel mètode dels quantils, de manera que tots tinguessin la mateixa distribució empírica

d'intensitats. Per a poder treballar amb dades completes, els punts perduts varen ser reemplaçats per estimacions obtingudes a partir dels punts veïns propers de la mateixa mostra, la qual cosa és l'estratègia recomanada.

Es varen detectar canvis mitjançant diverses tècniques de segmentació. Finalment, es va optar pel mètode GLAD que va proporcionar regions suavitzades amb canvis i era menys sensible a valors extrems que els mètodes basats en cadenes de Markov ocultes. Cada cromosoma es va processar per separat i posteriorment es varen combinar els segments amb canvis identificats en els diferents adenomes en una única base de dades per a poder analitzar els canvis recurrents.



La CGH convencional és una tècnica que consisteix en una hibridació *in situ* sobre cromosomes metafàsics normals de quantitats idèntiques de DNA total de dues mostres que es volen comparar marcades de diferent manera. El seu ús més estès és en l'estudi del càncer i, en aquest cas, el que es compara és una mostra de DNA tumoral marcada amb Cy5 (verd) i una mostra de DNA referència amb Cy3 (vermell) que prové de sang d'un individu sa o de diversos. Es poden identificar canvis en la quantitat relativa de DNA entre les dues mostres i aquests canvis es poden localitzar en els diferents cromosomes. L'objectiu d'aquesta tècnica és identificar increments del nombre de còpies de DNA d'una determinada regió cromosòmica (guanys o amplifícacions) i reduccions del nombre de còpies (pèrdues). En aquestes regions es poden trobar possibles oncogens i gens supressors tumorals respectivament. La resolució d'aquesta tècnica és de 10 Mb. Actualment la tècnica ha evolucionat per crear la CGH basada en *arrays*. El principi de la tècnica és el mateix, però se substitueixen les metafases per representacions de gens individuals, ja sigui en forma d'oligonucleòtids, BACs, cDNA, etc. D'aquesta manera, es guanya molt en la resolució de la tècnica i es pot obtenir informació de la localització de les alteracions molt més fina.

Requadre M.1. Tècnica de la CGH.

2. TÈCNIQUES D'ANÀLISI DE L'RNA

2.1 PCRq

Es va utilitzar la tècnica de la PCR quantitativa (PCRq) amb dos objectius diferents:

- 1) Caracteritzar els nivells d'expressió de diferents gens que participen en la via de Wnt.
- 2) Estudiar els nivells d'expressió dels gens implicats en el *checkpoint* de mitosi en mostres humanes per validar els resultats obtinguts en models experimentals.

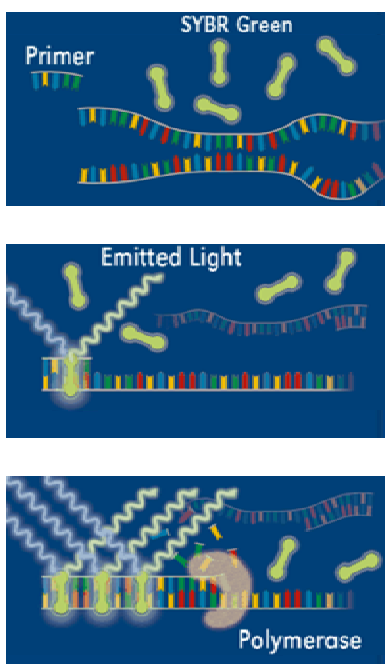
La tècnica de la PCRq permet monitoritzar a temps real els cicles d'amplificació d'una seqüència mitjançant la utilització de fluorocroms durant la reacció. Hi ha diferents mètodes que utilitzen els fluorocroms per a la PCR quantitativa com el SYBR® Green (que s'incorpora al DNA de doble cadena de forma inespecífica) o sondes específiques dissenyades per unir-se a determinades seqüències del DNA com el sistema *Taqman* (Applied Biosystems).

Abans de fer la reacció de PCR quantitativa, s'ha d'obtenir l'RNA de les mostres que es volen analitzar i s'ha de retrotranscriure. En concret, es va extreure RNA total de les biòpsies amb *Trizol*® (Invitrogen™ life technologies) seguint les instruccions del fabricant. 1 µg d'aquest RNA es va retrotranscriure a cDNA utilitzant els primers pdN6. Es varen afegir 200 U de la transcriptasa reversa MMLV (Invitrogen™ life technologies), 4 µl de *Buffer* 5X, 0,2 mM de dNTPs, 2 µl de primers pdN6, 0,01 M de DTT, 20 U d'RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega) en un volum final de reacció de 20 µl.

A continuació es varen dur a terme les reaccions de PCRq amb el sistema *LightCycler*® 2.0 (Roche) i la tècnica de detecció amb SYBR® Green (Roche). La tècnica es basa en el principi que en solució, el fluorocrom no emet gaire fluorescència, però una vegada unit al DNA s'incrementa molt la seva fluorescència (figura M.3). Es va utilitzar 1 µl de cDNA obtingut amb la reacció de transcripció reversa i es va afegir 1 µl de *Mix* proporcionada pel fabricant (Roche) la qual conté l'enzim, 0,1 µM de Cl_2M , 0,5 µM de primers en un volum final de reacció de 10 µl.

Els primers es varen dissenyar en exons diferents dels gens per amplificar específicament cDNA (i no DNA genòmic) (vegeu la taula M.4 per a més detalls sobre

els primers). B2MGB (β 2-microglobulina) es va fer servir com a control normalitzador. Les dades obtingudes amb el *LightCycler*[®] es varen analitzar segons la fórmula: $((E_{target})^{\Delta C_{P_{target}(control-sample)}}) / ((E_{ref})^{\Delta C_{P_{ref}(control-sample)}})$ (Pfaffl, 2001) (vegeu el requadre M.2 per a l'explicació sobre els càlculs) per quantificar els nivells de canvi de l'expressió en els adenomes i carcinomes en relació a la seva mucosa normal corresponent. Els nivells d'expressió s'han expressat en Log2 dels quocients. Es varen aplicar a aquests resultats els tests estadístics de t-test i Wilcoxon (més apropiat per una n petita) per avaluar-ne la significació.



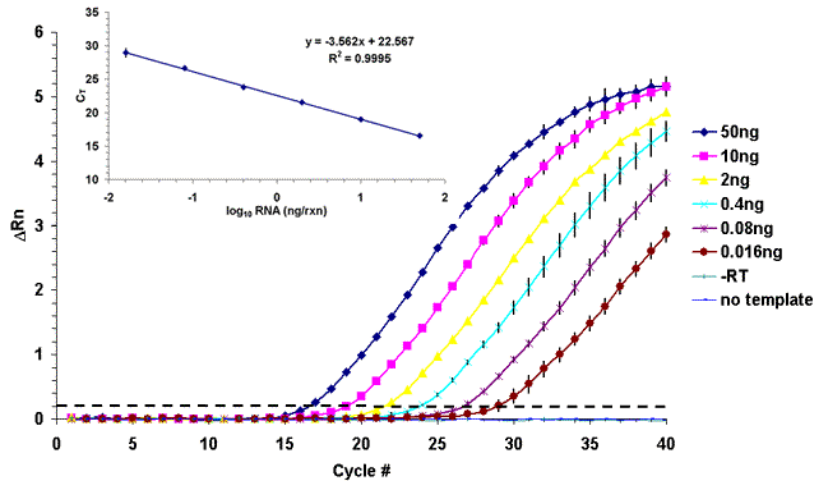
Al principi de l'amplificació, la reacció conté el DNA desnaturalitzat, els primers i el fluorocrom. Les molècules de fluorocrom no unides desprenen molt poca fluorescència que és sostreta durant l'anàlisi informàtica.

Amb la unió dels primers, es van incorporant les molècules de fluorocrom. La unió del SYBR Green amb el DNA dona un important increment de l'emissió de llum a través de l'excitació.

Durant l'elongació, es van unint més molècules de fluorocrom al DNA acabat de formar. Si es monitoritza contínuament la reacció, es pot veure l'augment de la fluorescència en temps real. Es fa una mesura de la quantitat de fluorescència per a la quantificació del producte.

Figura M.3. Reacció de PCR quantitativa amb el sistema SYBR Green resumit en tres fases.

Les lectures de fluorescència obtingudes amb el *LightCycler*[®] ens donen un valor de CP (**Crossing Point**) que és el cicle de la reacció de PCRq a partir del qual el senyal de fluorescència comença a ser exponencial. Així, com més quantitat de DNA motlle hi hagi a l'inici de la reacció, menys cicles trigarà a arribar al seu CP. Aquest valor es pot traduir en un resultat quantitatiu si construïm una recta patró amb dilucions seriades de concentració coneguda:



Amb la recta patró obtenim el valor de l'eficiència de la PCR per cada un dels gens, que es calcula de la següent manera:

$$E = 10^{[-1/\text{slope}]}$$

(on *slope* és el pendent de la recta)

Amb aquest valor es pot aplicar la següent fórmula per calcular la quantitat relativa d'un transcrit entre dues mostres:

$$\left((E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-sample)} \right) / \left((E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(control-sample)} \right)$$

Necessitem la referència interna d'un gen que no presenta canvis en la seva expressió (un gen *housekeeping* en seria un exemple). El nostre gen referència (*ref*) és la *B2MGB*. De cada mostra obtenim el valor per al gen d'interès (*target*) i per al gen referència i comparem dues mostres de manera relativa (mostra control i mostra d'interès (*sample*)).

Requadre M.2. Mètode relatiu de la corba estàndard per al càlcul dels valors de PCRq.

2.2. TRANSFECCIONS

Els resultats derivats de l'estudi dels nivells d'expressió de diferents gens relacionats amb el *checkpoint* de mitosi (objectiu 2 de l'apartat de PCRq) descrits a l'article adjunt d'Abal *et al.*, 2007 (Abal *et al.*, 2007) (annex 2) varen obrir la porta a una nova hipòtesi que preveu la possibilitat que la transcripció d'aquests gens estigui sota el control de la via de Wnt. Per veure si el canvi d'expressió d'aquests gens és un efecte de la inactivació del gen *APC*, es varen fer els experiments de transfeccions de diferents formes del gen en la línia cel·lular de càncer de còlon SW480 (figura M.4 C). Aquesta línia cel·lular humana de càncer colorectal presenta una mutació truncant a l'aminoàcid 1.338 del gen *APC* endogen i, com a conseqüència, la transcripció controlada per β -catenina/TCF4 es troba constitutivament activada. El gen *APC* es troba totalment inactivat en aquestes cèl·lules, ja que en un dels al·lels la seqüència conté la mutació esmentada i l'altre al·lel es perd per pèrdua de la regió cromosòmica del cromosoma 5 on es troba. Es varen fer créixer aquestes cèl·lules en el medi DMEM-F12 (BioWittaker, Walkerville, MD) suplementat amb sèrum boví fetal al 10%; un 1% de penicil·lina i estreptomicina; es varen incubar en el 5% de CO₂ i a una temperatura de 37°C. Els cultius varen donar negatiu pel test de detecció de micoplasma.

Una vegada assolit el 80% de confluència, les cèl·lules SW480 es transfectaven amb 3 μ g dels plasmidis d'expressió pCMV-APC (que conté la forma completa del gen *APC*) o pCMV-APC1309 Δ (que conté un mutant d'*APC* amb l'extrem C-terminal truncat) amablement cedits per B. Vogelstein i K. Kinzler (Johns Hopkins University, Baltimore, MD) juntament amb LipofectAMINE PLUS (Invitrogen) d'acord amb les instruccions del fabricant. El vector pCDNA 3.1 (Invitrogen) es va fer servir com a control negatiu. Hi havia dues situacions experimentals: 1) transfecció amb *APC* wt i 2) transfecció amb *APC* truncat. A causa del fet que les cèl·lules SW480 ja tenen el gen *APC* inactivat que condueix a un augment de la β -catenina i a una activació de la via de Wnt, caldria esperar que amb l'expressió de la proteïna wt (situació 1) disminuïssin els nivells de β -catenina citoplasmàtica i conseqüentment la transcripció gènica promoguda per aquesta (figura M.4 A i B). Per tant, no esperem veure canvis quan expressem la proteïna truncada. Això vol dir que es tracta d'un bon sistema per testar si determinats gens candidats són diana d'aquesta via de transcripció observant els canvis en el nivell d'expressió d'aquests gens en les diferents situacions experimentals.

Després de la transfecció es va verificar la correcta expressió de l'mRNA d'APC amb PCRq. Per a l'anàlisi de l'expressió de l'mRNA es va extreure l'RNA total de les cèl·lules 24 hores després de ser transfectades utilitzant el *Trizol*[®] (Invitrogen[™] life technologies) i seguint el protocol d'acord amb les instruccions del fabricant. Es varen fer servir un parell de *primers* que amplifiquen la part N-terminal i que no es troben a cap regió de *splicing alternatiu* per obtenir un sol fragment apte per quantificar. Es va utilitzar el gen *C-MYC* com a control de gen diana conegut de la via, per comprovar que érem capaços de detectar canvis en l'expressió de gens de la via com a resultat de les transfeccions amb diferents formes del gen *APC*. Els gens candidats estudiats com a possibles dianes de la via de Wnt són *BUB1B*, *MAD2L1* i *STMN1*. Per a detalls sobre la reacció de PCRq vegeu l'apartat PCRq. Es varen fer tres experiments independents en duplicat o triplicat (n=11 per cada situació).

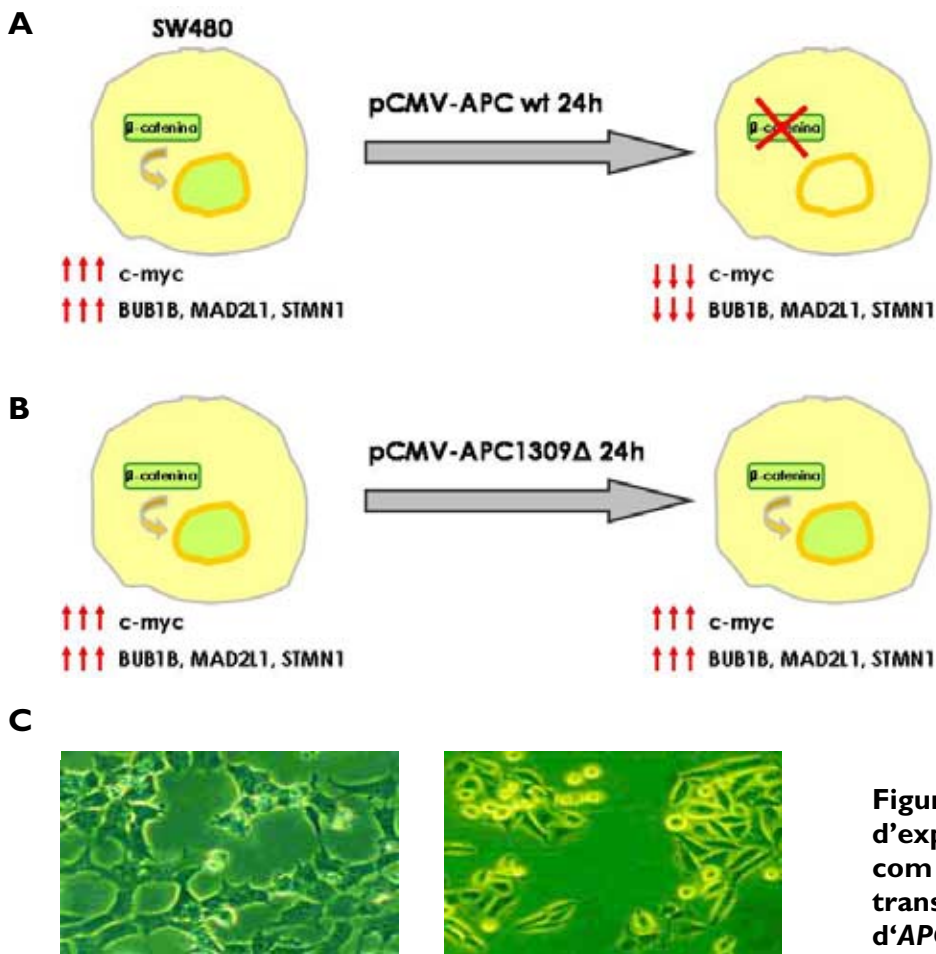


Figura M.4. Hipòtesi sobre el canvi d'expressió de determinats gens com a conseqüència de la transfecció de plasmidis d'expressió d'APC wt (A) i APC mutat (B) en cèl·lules SW480. C) Imatges de les dues morfologies que coexisteixen en els cultius de cèl·lules SW480.

Per avaluar les diferències entre APC1309 Δ i APC wt respecte al pcDNA 3.1 en les dades d'expressió, es va aplicar un model de regressió lineal el qual es va ajustar per tal d'eliminar l'efecte de la variabilitat deguda al dia. Les dades es varen escalar a Log2. La significació es va calcular usant els paràmetres estimats i l'error estàndard del model. Es varen fer servir els *BoxPlots* (gràfiques de caixes) per visualitzar i interpretar els efectes observats respecte a la categoria basal del pcDNA 3.1. Aquests gràfics ens ajuden a visualitzar la variació en les dades, utilitzant la mediana, els quartils i els valors màxims i mínims. Es va establir un nivell de significació del 0,05 per al càlcul dels p-valors.

A més, es va transfectar la línia cel·lular 293 amb RNA d'interferència contra APC. Es varen fer servir dos siRNA diferents: siAPC ID 42.812 i siAPC ID 122.391 (Ambion, Austin, TX) i un control negatiu siRNA ID 4.626 (també d'Ambion). Es va fer servir la Lipofectamina (Lipofectamine 2000, Invitrogen) i els siRNA a una concentració final entre 50-75 nM. 48 hores després de la transfecció es va extreure RNA, es va retrotranscriure i es varen mesurar els nivells d'RNA amb PCRq. Les transfeccions es varen dur a terme en tres experiments independents i es varen obtenir tres rèpliques.

2.3. MICROARRAYS D'EXPRESSIÓ

L'interès en aplicar aquesta tècnica es va centrar en mostres de càncer colorectal esporàdic de les quals es disposava de teixit normal, adenoma i carcinoma del mateix pacient. L'objectiu era trobar els gens diferencialment expressats en els tres estadis de la malaltia i identificar marcadors de diagnòstic. Es varen estudiar 36 pacients que es varen classificar en sis grups diferents segons dos criteris dictats pel carcinoma: estadi i localització. Dins la categoria d'estadi es varen distingir els que tenien estadis I-II i els que tenien estadis III-IV (per a l'explicació sobre els diferents sistemes i estadis del càncer, vegeu el requadre M.3). Dins la categoria de la localització es varen definir tres possibles llocs: còlon dret, còlon esquerre i recte.

Per a l'extracció de l'RNA total, es va fer servir el mateix procediment que l'anteriorment esmentat en l'apartat de PCRq.

Les mostres d'RNA extretes dels teixits es varen analitzar amb la plataforma de genòmica utilitzant *microarrays* de DNA de disseny propi d'Oryzon Genomics. Aquest *microarray* (Oncochip) contenia oligonucleòtids representatius d'un total de 4.528 gens

humans. Les anàlisis d'expressió gènica es varen portar a terme usant xips sintetitzats a mida per Agilent, usant un disseny realitzat amb l'algorisme de disseny d'oligonucleòtids; Tethys. A part dels oligos específics per a la detecció de gens humans, el disseny dels *microarrays* inclou oligos control que serveixen per determinar el rang de detecció, l'especificitat i pel processament de les dades crues.

Alguns dels gens representats en l'Oncochip varen ser seleccionats perquè estaven implicats en processos relacionats amb la transformació neoplàstica: angiogènesi (72 gens), control del cicle cel·lular i reparació i replicació (202 gens), estructura cel·lular i citoesquelet (104 gens), hormones (20 gens), inflamació i resposta immune (210 gens), metàstasi i invasió tumoral (120 gens), molècules d'adhesió (94 gens), oncogens i protooncogens (227 gens), receptors i factors de creixement (129 gens), transducció de senyal (274 gens).

Es poden definir els estadis del càncer colorectal a través de diferents sistemes. Entre els quals trobem el de Duke's, d'Astler-Coller i el d'AJCC/TNM. Els dos primers defineixen els estadis amb lletres de la A a la D i l'últim sistema els defineix amb números romans del I al IV. Els tres sistemes es basen en la descripció de la disseminació del tumor en les diferents capes de la paret del còlon i recte i en altres òrgans.

El sistema AJCC/TNM descriu com s'estén el tumor primari (**T**), l'absència o presència de metàstasis en els nòduls limfàtics propers (**N**) i l'absència o presència de metàstasis a distància (**M**).

Tx	Informació incompleta
Tis	Carcinoma in situ. Només afecta a la mucosa
T1	El tumor s'estén a la submucosa
T2	El tumor ha passat la submucosa i arriba a la capa muscular
T3	El tumor ha crescut fins a la capa subserosa
T4	El tumor ha passat a altres òrgans o teixits propers
Nx	Informació incompleta
N0	No hi ha nòduls limfàtics afectats
N1	Es troben cèl·lules canceroses en 1-3 nòduls limfàtics
N2	Es troben cèl·lules canceroses en 4 o més nòduls limfàtics
Mx	Informació incompleta
M0	No hi ha disseminació a distància
M1	Disseminació a distància

Una vegada s'han determinat les categories TNM, es combinen per poder determinar l'estadi, que s'expressa en números romans. En la taula a continuació podem veure els estadis corresponents al TNM i la seva correspondència amb els sistemes de Duke's i d'Astler-Coller.

Estadi	TNM	Dukes	Astler-Coller
0	Tis, N0, M0		
I	T1, N0, M0 o T2, N0, M0	A	A, B1
IIA	T3, N0, M0	B	B2
IIB	T4, N0, M0	B	B3
IIIA	T1-2, N1, M0	C	C1
IIIB	T3-4, N1, M0	C	C2, C3
IIIC	Qualsevol T, N2, M0	C	C1, C2, C3
IV	Qualsevol T, Qualsevol N, M1		D

Requadre M.3. Estadiatge del càncer colorectal.

Els xips es varen hibridar comparant mostres d'RNA de carcimomes o adenomes marcats amb el fluorocrom Cy3 amb mostres d'RNA de teixit normal del mateix pacient marcat amb el fluorocrom Cy5. Els xips es varen escanejar amb un equip Genepix 4000B d'Axon i les dades crues es varen obtenir usant el programari GenePix Pro. Els resultats crus es varen processar utilitzant l'eina Polyphemous, desenvolupada a Oryzon Genomics per a la compensació, la normalització, l'anàlisi estadística i la interpretació de dades de *microarrays* de DNA.

A causa de les limitacions econòmiques i de temps, es va decidir fer un disseny experimental basat en el *pooling* (agrupament) d'RNA de mostres del mateix tipus per minimitzar el nombre d'hibridacions. Així mateix, es va decidir hibridar de forma individual mostres de deu pacients representatius de cada un dels sis grups per tenir informació més fina de les diferències en la progressió dels tumors en un mateix individu. El tipus d'hibridació va ser *two-color* (dos fluorocroms) i va consistir a cohibridar les mostres de tumor (tant els adenomes com els carcinomes) amb la seva mucosa normal corresponent (figura M.5).

Les dades varen ser normalitzades amb el mètode no lineal que utilitza l'anàlisi de la distribució de les intensitats i *splines* cúbics, el qual va ser descrit per Workman *et al.* (Workman *et al.*, 2002). Els controls que hi ha al xip (tant negatius com positius) es varen fer servir per a una posterior verificació de l'èxit de la normalització. El *data set* (dades processades) final contenia els nivells relatius d'expressió de 4.278 gens (quocient tumor/mucosa normal en logaritme en base 2 = *logratio*). Les *logratios* positives indicaven un valor d'expressió més elevat en mostres tumorals (adenomes i carcinomes) respecte a la mostra normal; mentre que *logratios* negatives indicaven valors disminuïts en mostres tumorals.

Es varen fer dues anàlisis en paral·lel, per a les mostres dels *pools* i per a les mostres individuals. Es va aplicar el t-test per determinar els gens diferencialment expressats i els criteris per seleccionar els gens varen ser una *logratio* major d'1 o menor de -1 i un p-valor inferior a 0,01. En paral·lel es va aplicar el FDR (**F**alse **D**iscovery **R**ate) d'acord amb l'aproximació d'Storey i Tibshirani (Storey & Tibshirani, 2003) que té en compte les múltiples comparacions de l'anàlisi i indica la taxa de falsos positius entre els gens seleccionats com a significatius.

Amb l'objectiu de detectar els gens que diferencien els adenomes dels carcinomes, es va fer una anàlisi en què es varen calcular les *logratios* entre carcinoma i adenoma de manera indirecta, ja que recordem que no s'han hibridat aquestes dues mostres, sinó que cada una s'ha hibridat amb el seu teixit normal. Com que tenim els valors de *logratios* en escala logarítmica, el quocient carcinoma/adenoma es pot calcular amb una simple diferència ($r_{CA/AD} = r_{CA/N} - r_{AD/N}$). La variabilitat d'aquest quocient serà major que en les hibridacions directes, ja que acumulen la variabilitat de dues estimacions. Això implica que hi haurà una pèrdua de poder estadístic que condueix a una probabilitat menor de detectar vertaders gens diferencialment expressats. Es va aplicar el t-test de manera idèntica a la descrita anteriorment.

Per analitzar les diferències entre els grups segons les variables comparades de dues en dues es va aplicar el paquet Limma per R que utilitza un model lineal. Per determinar quins són els gens diferencialment expressats (GDE) es va aplicar el mètode empíric de Bayes i els p-valors varen ser ajustats pel FDR.

Es va aplicar una anàlisi de GO terms (*gene ontology terms*: gens definits segons la seva funció molecular, el component cel·lular i el procés biològic) i de KEGG pathways (*Kyoto encyclopedia of genes and genomes*: mapes de vies moleculars que representen les interaccions moleculars conegudes) per aquells grups que presentaven gens diferencialment expressats en l'estudi de comparacions. Es varen fer servir les eines Onto-express i Onto-compare disponibles a la web <http://vortex.cs.wayne.edu>. La significació de l'enriquiment es va determinar mitjançant una distribució hipergeomètrica i el problema de les comparacions múltiples es va corregir amb el FDR.

Es va realitzar un agrupament jeràrquic (*hierarchical clustering*) amb la mesura de la distància d'acord amb la correlació centrada de Pearson utilitzant tots els gens del *microarray*.

Amb l'objectiu de focalitzar l'atenció en els gens de les vies de Wnt i *checkpoint* de mitosi, es varen identificar els gens d'aquestes vies representats en els *microarrays*. En concret, es varen identificar 53 gens per la via de Wnt i vuit de la via de mitosi i es va posar atenció en els canvis d'aquests gens amb l'anàlisi anterior aplicant el t-test. A més, es va voler realitzar una anàlisi de coregulació d'aquests dos grups de gens. Es va

considerar que una parella de gens estan coregulats si les seves *logratios* són estadísticament i significativament correlacionades. La correlació es va avaluar aplicant el coeficient de Pearson. Les matrius de correlació per a totes les comparacions dels gens de dues en dues es varen representar amb escala de colors (*heatmap*) (vermell indica correlació positiva i verd indica correlació inversa). Després, es va aplicar un agrupament jeràrquic per classificar els gens segons els seu nivell de coregulació. La distància utilitzada és 1 menys la correlació en valors absoluts.

Una vegada obtinguts els gens diferencialment expressats, es va voler fer una validació externa dels resultats de la tècnica dels *microarrays* amb una tècnica alternativa. La tècnica d'elecció va ser la PCRq i es varen validar els gens *C-MYC*, *APC*, *AXINA2*, *SFRP1*, *STMN1* i *BUB1B* aprofitant els resultats dels experiments previs de PCRq amb les mostres de càncer colorectal esporàdic. La correlació entre les dues tècniques es va avaluar amb l'índex de correlació i la significació es va determinar amb el p-valor.

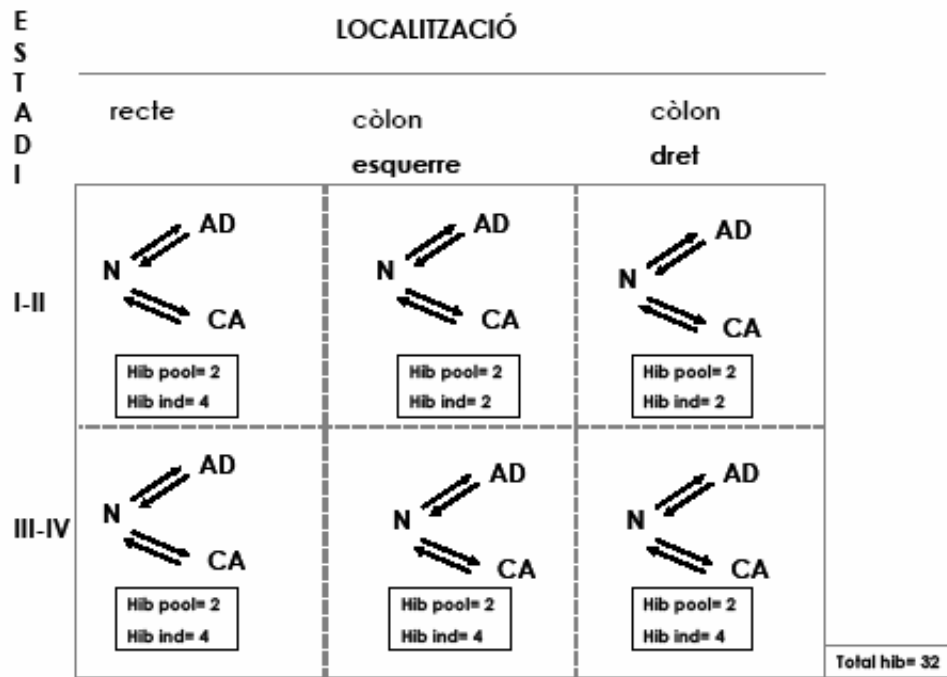


Figura M.5. Disseny dels experiments de *microarrays*. Dins cada un dels sis grups es varen fer *pools* de cada tipus de mostra i es varen hibridar sempre els adenomes i carcinomes amb el seu teixit normal corresponent. Això representa dues hibridacions per grup. Per altra banda, algunes de les mostres es varen hibridar individualment. De manera que es va hibridar l'adenoma i el carcinoma d'un individu determinat amb la seva mucosa normal corresponent. En alguns grups es varen fer hibridacions d'un pacient individualment (n=2) i en alguns grups de dos pacients (n=4). Es varen fer en total 32 hibridacions.

3. TÈCNiques D'ANÀLISI DE PROTEÏNES

3.1 IMMUNOHISTOQUÍMICA

β-catenina

Amb l'objectiu de conèixer el grau d'activació de la via de Wnt, es va determinar el nivell d'expressió i la localització cel·lular de la β-catenina. S'ha descrit que, a mesura que avança la progressió tumoral, augmenten els nivells de β-catenina cel·lular i augmenta la translocació de la proteïna des del citoplasma al nucli (Hao et al., 1997) (figura M.6).

La immunohistoquímica es va fer sobre seccions d'OCT (component soluble en aigua amb glicol i resina per incloure mostres congelades) de 5 μm de les biòpsies. Les seccions d'OCT es varen tractar amb formaldehid 37% per fixar-les i tot seguit es varen fer tres rentades d'un minut amb aigua destil·lada i tres rentades de cinc minuts amb PBS IX (*phosphate buffered saline*). Es varen tractar amb 3% de peròxid d'hidrògen per bloquejar-les i es varen fer dues rentades de cinc minuts amb aigua destil·lada, dues rentades de cinc minuts amb PBS IX i una rentada de deu minuts amb PBS IX+

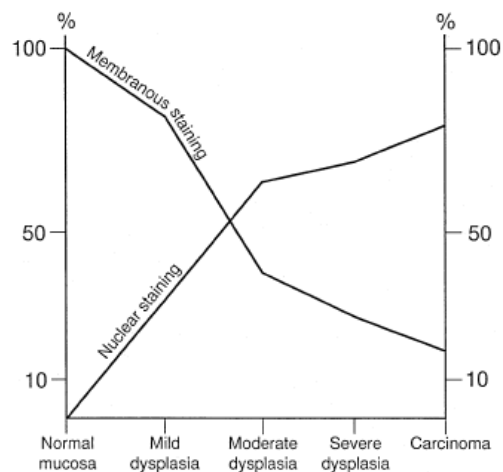
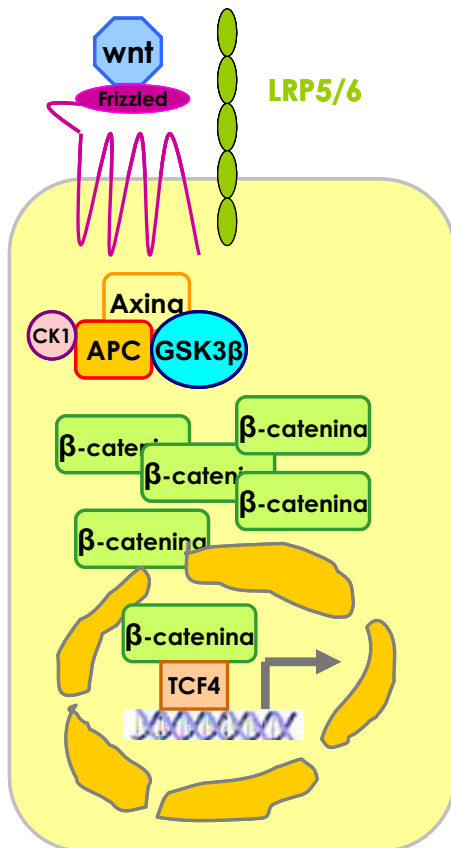


Figura M.6. Localització cel·lular de la β-catenina. Al llarg de la progressió tumoral, es va reduir la quantitat de tinció membranosa de la β-catenina per passar a augmentar la tinció nuclear. Adaptat de Hao et al 1997.

0,1% de Tween 20. L'anticòs utilitzat per a la reacció va ser l'anticòs monoclonal de ratolí anti- β -catenina (1:90; Dako) que es va incubar en una cambra humida fosca durant 16 hores. Es va deixar reposar a temperatura ambient durant 30 minuts i després de fer tres rentades de cinc minuts amb PBS IX+ 0,1% Tween 20, es va fer una incubació de 30 minuts amb el sistema EnVision HRP d'anticòs secundari antiratolí de Dako (basat en el sistema de la peroxidasa). L'absència d'aquest anticòs servia com a control negatiu. Després de fer tres rentades de cinc minuts amb PBS IX+ 0,1% Tween 20 es va revelar la reacció amb el sistema de la 3-3' diaminobezidina de Dako (*Dako Cytomation Liquid DAB Substrate Chromogen System*) que després de l'oxidació, forma un producte final de color marró en la zona de l'antigen diana. Es va fer una rentada amb aigua corrent i tot seguit es va contrastar la tinció amb hematoxilina. Es va fer una altra rentada amb aigua corrent i es va deshidratar la mostra amb una sèrie d'alcohols (70% 30", 3X 96% 30", 3X 100% 30") i seguit de 4X xilol I'. Es va muntar la preparació amb el medi de muntatge DPX (mescla de **distirè**, un **plastitzador** (tricresyl fosfat) i **xilè**).

BUBIB i MAD2LI

La immunohistoquímica es va fer sobre seccions d'OCT de 5 μ m de les biòpsies. De manera anàloga a la descrita per la β -catenina, es varen tractar les mostres amb 37% de formaldehid per fixar-les i 3% de peròxid d'hidrogen per bloquejar. Els anticossos utilitzats varen ser l'anticòs policlonal de conill anti-BUBIB (dilució 1:50, Abgent, San Diego, CA, USA) i l'anticòs policlonal de conill anti-MAD2L (dilució 1:400, amablement cedit per E.D. Salmon (*Waters et al.*, 1998)). Després de fer rentades amb 0,1% PBS Tween 20, es va fer una incubació de 30 minuts amb el sistema EnVision HRP d'anticòs secundari anti-conill de Dako. L'absència d'aquest anticòs servia com a control negatiu.