



**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

| | |
|--------------------|---|
| <i>PBS</i> | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| <i>PCC</i> | <i>Pearson Correlation Coefficient</i> |
| <i>PCDH7</i> | <i>Protocaherin 7</i> |
| <i>PCR</i> | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| <i>PI4K2B</i> | <i>Phosphatidyl Inositol 4 kinase type 2 Beta</i> |
| <i>PKC</i> | <i>Protein Kinesa C</i> |
| <i>PTEN</i> | <i>Phsphatase and Tensin homologue</i> |
| <i>PTGS2</i> | <i>Prostaglandin-endoperoxide synthase 2</i> |
| <i>qPCR</i> | <i>quantitative PCR</i> |
| <i>RAP-PCR</i> | <i>RNA Arbitrary Primer Polymerase Chain Reaction</i> |
| <i>RB</i> | <i>Retinoblastoma tumor suppressor gene</i> |
| <i>RBPSUH</i> | <i>Recombining Binding Protein Suppressor of Hairless</i> |
| <i>RER</i> | <i>Repair Error</i> |
| <i>REST©</i> | <i>Relative Expression Software Tool</i> |
| <i>RNA</i> | <i>RiboNucleic Acid</i> |
| <i>RT-PCR</i> | <i>Real Time PCR / Reverse Transcribed PCR</i> |
| <i>SBF</i> | <i>Sèrum Boví Fetal</i> |
| <i>siRNA</i> | <i>small interference RNA</i> |
| <i>SLIT2</i> | <i>Slit homologue (Drosophila) 2</i> |
| <i>SMAD</i> | <i>Small Mothers Against Decapentaplegic gene</i> |
| <i>SNP</i> | <i>Single Nucleotide Polymorphism</i> |
| <i>SSCP</i> | <i>Single Strand Conformation Polymorphism</i> |
| <i>STIM1/STIM2</i> | <i>Stromal Interaction Molecule 1 / 2</i> |
| <i>TCF4</i> | <i>Transcription Factor 4</i> |
| <i>TGF-B/TGFBR</i> | <i>Transforming Growth Factor-B/ Factor-B Receptor</i> |
| <i>TMA</i> | <i>Tissue Micro Array</i> |
| <i>TP53</i> | <i>Tumor Protein 53</i> |
| <i>WNT</i> | <i>Wingless-Type MMTV integration site family</i> |

A tots els membres del
Laboratori de Recerca Translacional

Al meu avi, *in memoriam*

Als meus pares i germans

A la Laia i al Gerard

AGRAÏMENTS

Aquest apartat és el que normalment hom dedica als agraïments. Se suposa que, en unes poques línies, has de donar les gràcies a totes les persones que d'una manera o d'una altra han contribuït al desenvolupament d'aquesta Tesi. Sovint també, si es coneix al doctorant i les seves circumstàncies, i si se sap llegir entre línies, es poden descobrir les petites punyalades que aquest dedica als qui al seu parer, han fet d'aquests anys un infern... Sincerament, aquest no és el meu cas. El camí no ha estat fàcil però no puc dir que no se m'hagi tractat bé, molt bé. N'hi que no m'hagi sentit valorat i apreciat pels meus caps i companys. En el meu cas, i després d'iniciar aquest paràgraf unes vint vegades, he decidit defugir originalitats i anar al gra. Per ser sincer, no tinc cap motiu per estar disgustat amb cap de les persones amb les que he treballat i compartit espais i moments al llarg d'aquests anys. Espero que sigui mutu.

Quan vaig arribar, solter i esbojarrat, al Laboratori de Recerca Translacional de l'ICO, hi havia unes 15 persones. Ara que marxo, casat i pare de família, em sembla que ja anem per les 80 o 100 entre els tres labs... Amb això pretenc excusar el fet de no esmentar a tothom i que entengueu que si a algú li sap greu no trobar-se en aquestes línies em perdoni i ho consideri una distracció.

La primera persona que indefectiblement em ve al cap sempre que començo a pensar en els agraïments es L'Alberto Villanueva. A més de donar-te les gràcies et vull felicitar; per tots dos era el primer cop i ho hem fet el millor que hem pogut. Hi ha hagut moments de tots colors; admiració i idolatria i perquè no dir-ho, d'incomprensió i perplexitat. Però no hi ha dubte que sense el teu entusiasme i la teva energia, sense el teu convenciment en les nostres possibilitats, en el potencial del projecte, i la teva confiança en mi, difícilment hauria arribat fins aquí. També vull donar les gràcies al Gabi Capellà, per confiar amb mi i per donar un cop de mà, en lo professional i lo personal, quan ho he necessitat.

A tota la gent que durant aquests anys han format part del meu grup, i especialment al David, us vull donar també les gràcies. Per l'ajut, per la paciència, sobre tot la de la Laura i la Maria, i perquè de ben segur, de tots vosaltres he après alguna cosa útil. David, trobaré a faltar un company com tu allà on em portí el futur professional.

A tota la gent del LRT1 us vull donar les gràcies per ser la meva "altra família" durant aquests anys. Com en totes les famílies, hi ha amb qui t'hi entens més i amb qui menys, però a tots els aprecies i els hi desitges el millor. Alguns ja no hi sou (Antònia, Felip, Jairo, Jordi, Eli, Mar...), i amb d'altres casi no hem coincidit, però de tots me'n porto un bon record. No vull deixar passar l'oportunitat d'esmentar gent que ha estat, d'alguna manera, especial, i que difícilment oblidaré; els RA/TGs, Ramon, Alena, Sònia, Jordi, Juanjo...ah! i la Neus, una amiga per sobre de qualsevol altre cosa. Com el Josep Maria, que com que mai he sabut de quin grup era, l'he acabat

adoptant al dels amics. Una abraçada ben forta als meus companys de menjador i cafetó, variables en número però amb un nucli dur format per l'Ari, la Gemma, el Marc, el Dani i l'Ester, que m'han ajudat a desconnectar una estona pràcticament cada dia. Imprescindibles.

I finalment gràcies també a tota la gent de la tercera planta de l'hospital que d'alguna manera m'han donat una empenta i han contribuït a aquest treball; Els companys del LRT2, la gent de l'IDIBELL, els recentment instal·lats al PEBC, i la gent de l'estabulari, on m'hi vaig passar moltes hores, entre d'altres.

Als meus amics no us puc donar les gràcies. Moro, Vila, Dani, Neus, Gemma... enteneu-ho, si alguna cosa heu fet per mi en aquests anys, ha estat distreure'm, fer que m'oblidés de la tesi tant bon punt posava el peu fora del lab o arribava el cap de setmana. Us he entretingut amb les meves historietes de tumors i ratolins, i us heu apuntat a alguna que altra farra amb la gent del lab. Algun fins i tot, ha acabat treballant aquí també. Hem continuat amb les anades a Sort o Tarrés, els sopars al Born, arreglant el món amb una cervesa a la ma.... Aquests anys de tesi han estat anys intensos per a tots nosaltres. Hem fundat noves llars, hem ampliat el cercle d'amistats i conegut gent magnífica de la mà del Pere i la Isabel. Hem anat a moltes bodes i format famílies i, sobre tot, hem sabut continuar perpetuant la nostra amistat. M'encanta haver acceptat que sou com sou, que hagueu acceptat que sóc com sóc i pensar que ens continuarem estimant per sempre més. Petons a dojo per tot hom i don.

I ara el torn de la família. Als meus pares i germans els hi vull dedicar la tesi. Se que, sobretot als germans, us ha semblat una cosa massa llarga, i de fet teniu raó. Suposo que, durant aquests anys, heu anant entenent que ja no estava a la facultat, que no era un estudiant, i que, tot i que estranya, això que faig és una feina. Papà i mamá, sou segurament les persones que més heu valorat l'esforç del doctorat, i que més contents estan. Mamá, al final he encontrado el gen!!. Sempre m'heu animat i exigit responsabilitat a l'hora d'estudiar i treballar, i sense aquesta base no hagués pogut recórrer el camí de somnis i desenganys que és una tesi. Moltes gràcies. I als meus estimats sogres també agrair-vos el suport rebut. Compartir estones amb vosaltres es com un bàlsam en els moments de tempesta. Una abraçada ben forta.

Laia, espero que hagi notat el meu agraïment moltes altres vegades, de paraula i amb fets. Les nostres vides ja s'havien creuat quan la idea de la tesi ni tant sols existia. Vas ser tú la que la va fer brollar. Tu n'ets l'efecte i la causa. Ets el meu far i ets el port. Sense tu he estat perdut però, junts el món se'ns torna el paradís. Gràcies. Per estimar-me i fer-te estimar. Gerard, petitó, algun dia potser llegiràs això. Segurament, el que t'haig d'agrair és que m'hagis fet veure el que és realment important a la vida. Has estat el punt últim de motivació necessària per seure i posar tot això en ordre. Acabar-ho. Estic boig per tu.

Índex

| | |
|--|------------|
| ÍNDIX | iii |
| ABREVIATURES | v |
| | |
| I. INTRODUCCIÓ | 1 |
| 1. EL CÀNCER COLORECTAL | 3 |
| <i>Epidemiologia i etiologia del càncer colorectal</i> | 3 |
| <i>Anatomia i histologia del còlon i recte</i> | 5 |
| <i>Classificació i estadiatge</i> | 7 |
| <i>Tractament i pronòstic</i> | 8 |
| <i>Classificadors i factors pronòstic moleculars</i> | 10 |
| 2. BIOLOGIA MOLECULAR I CEL·LULAR DEL CÀNCER COLORECTAL | 13 |
| <i>Genètica del càncer colorectal i gens del càncer</i> | 13 |
| <i>Gens supressors tumorals. Acomodant la haploinsuficiència al model de Knudson</i> | 17 |
| <i>La seqüència adenoma-carcinoma. El model de Vogelstein</i> | 21 |
| <i>Inestabilitat genètica i expansió clonal</i> | 22 |
| <i>Alteracions epigenètiques i càncer colorectal</i> | 26 |
| 3. IDENTIFICACIÓ DE GENS RELLEVANTS EN EL PROCÉS TUMORAL | 29 |
| <i>Els models animals</i> | 29 |
| <i>Estratègies moleculars d'anàlisi global</i> | 31 |
| | |
| II. PREMISSA | 39 |
| ALTERACIONS AL BRAÇA CURT DEL CROMOSOMA 4 | 41 |
| | |
| III. HIPÒTESI | 45 |
| | |
| IV. OBJECTIUS | 49 |
| | |
| V. MATERIALS I MÈTODES | 53 |
| 1. PACIENTS I MOSTRES | 55 |
| 1.1. <i>Recollida i processament de les mostres</i> | 57 |
| 1.2. <i>Obtenció dels xenoempelts en ratolins atímics</i> | 57 |
| 2. MÈTODES D'ANÀLISI GENÈTICA | 59 |
| 2.1. <i>Tècniques d'estudi del DNA</i> | 59 |
| <i>Estudi de pèrdua d'heterozigositat a la regió 4p14-16</i> | 59 |
| <i>Estudi mutacional dels gens candidats</i> | 61 |
| <i>Estudi de metilació d'illes CpG</i> | 62 |
| <i>Anàlisi de dosi al·lèlica per FISH</i> | 63 |
| 2.2 <i>Tècniques d'anàlisi de l'expressió gènica</i> | 66 |

| | |
|---|------------|
| <i>Expressió del mRNA dels gens candidats en les mostres xenoempeltades</i> | 67 |
| <i>Estudi del valor pronòstic de PI4K2B i STIM2</i> | 69 |
| <i>Estudi del valor predictiu de resposta al tractament de PI4K2B i STIM2</i> | 72 |
| 3. ESTUDIS FUNCIONALS | 74 |
| 3.1. <i>Estudi de la regulació transcripcional dels gens candidats</i> | 74 |
| <i>Anàlisi bioinformàtic</i> | 74 |
| <i>Immunoprecipitació de cromatines</i> | 75 |
| 3.2. <i>Caracterització funcional de PI4K2B i STIM2</i> | 76 |
| <i>Nivells d'expressió de PI4K2B i STIM2 en línies cel·lulars</i> | 76 |
| <i>Vectors d'expressió gènica</i> | 77 |
| <i>Transfeccions i selecció de clons estables en SW480</i> | 79 |
| <i>Assaig d'interferència amb siRNA en DLD-1</i> | 81 |
| <i>Assaig de proliferació</i> | 82 |
| <i>Assaig de formació de colònies</i> | 83 |
| <i>Assaig de formació de tumors "in vivo"</i> | 84 |
| VI. RESULTATS | 85 |
| <i>Capítol 1. CARACTERITZACIÓ MOLECULAR DE LA REGIÓ 4P14-16</i> | 87 |
| <i>Capítol 2. ANÀLISI DE L'EXPRESSIÓ GÈNICA A 4P15 I ESTUDI DEL VALOR PRONÒSTIC DE PI4K2B I STIM2</i> | 103 |
| <i>Capítol 3. CARACTERITZACIÓ FUNCIONAL DE PI4K2B I STIM2</i> | 121 |
| VII. DISCUSSIÓ | 135 |
| VIII. SUMARI | 155 |
| IX. CONCLUSIONS | 159 |
| X. BIBLIOGRAFIA | 163 |
| XI. ANNEX | 187 |

ABREVIATURES

| | |
|---------------|--|
| 5-FU | 5 Fluoracil |
| ANAPC4 | Anaphase Promoting Complex 4 |
| APC | Adenomatous Poliposis Coli |
| AP-PCR | Arbitrary Primer Polymerase Chain Reaction |
| B2MG | Beta two MicroGlobuline |
| BRAF | v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B |
| BUB1/BUB1B | Budding Uninhibited by Benzimidazoles 1 / Beta homologue |
| CCND1 | Cyclin D1 gene |
| CCR/CCR-X | Càncer Colorectal / Càncer Colorectal-Xenoempeltat |
| CDK | Cyclin Dependent Kinase |
| cDNA | complementari DNA |
| CGH | Comparative Genomic Hybridization |
| ChIP | Chromatin ImmunoPrecipitation |
| CI | Confidence Interval |
| CIMP-H/CIMP-L | CpG Island Methylator phenotype |
| CIN | Chromosome Instability |
| CpG | Cytosine phosphate Guanine |
| DCC | Deleted in Colorectal Cancer |
| DFS | Disease Free Survivall |
| DMEM | Dullbecco's Modified Eagle's Medium |
| DNA | DeoxyriboNucleic Acid |
| EGF/EGFR | Epidermal growth factor / Epidermal growth factor receptor |
| EPHB | Ephrin B |
| FAP | Familial Adenomatous Polyposis |
| FGFR3 | Fibroblast Growth Factor Receptor 3 |
| FISH | Fluorescent in situ Hybridization |
| HNPCC | Hereditary Non Poliposic Colorectal Cancer |
| HR | Hazard Ratio |
| IHQ | ImmunoHistoQuímica |
| K-RAS/H-RAS | Kirsten /Harvey Rat Sarcoma viral oncogene homolog |
| LOH | Loss Of Heterozigosity |
| MAPK | Mitogen-Activated Protein Kinase |
| MIN | Microsatellite Instability |
| MLH1 | mutL (Drosophila) homologue 1 |
| MMR | MissMatch Repair |
| mRNA | messenger RNA |
| MSH2 | mutS (Drosophila) homolog 2 |
| MSI-H/MSI-L | MicroSatellite Instability-High/Low |
| MYC | c-myc protooncogen product |
| OS | Overall Survivall |
| PAGE | PolyAcrilamide Gel Elecphroresi |