



**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

**Premissa**



## ALTERACIONS AL BRAÇ CURT DEL CROMOSOMA 4

### En càncer colorectal

Són molt diversos els tipus de tumors en els quals, des de fa més de 10 anys, s'han anat reportant pèrdues d'heterozigositat recurrents en ambdós braços del cromosoma 4. Com ja s'ha comentat anteriorment, la LOH és un dels indicadors més àmpliament utilitzats per a la localització de gens candidats a supressors tumorals. Per aquest motiu són molts els treballs que han mirat de fer una mapatge d'aquest braç 4p, tractant d'identificar amb major precisió una zona mínima comú de pèrdua entre un conjunt de tumors. Les empremtes genètiques o *fingerprints* que s'obtingueren en els treballs del grup del doctor Perucho, mitjançant la tècnica de la AP-PCR, van permetre detectar seqüències de DNA que, en tumors colorectals, estaven freqüentment perdudes. Addicionalment, cadascuna d'aquestes seqüències van ser aïllades i assignades a un cromosoma humà concret (Peinado et al., 1992; Yasuda et al., 1996). A més, elaborant un cariotip molecular (o "amplotip", com ells el van anomenar) de CCR van poder demostrar que les pèrdues al cromosoma 4 eren específiques del procés metastàtic. Aquests treballs van posar de manifest que, si bé l'anàlisi de seqüències microsatèl·lit per a l'estudi de la LOH (microal·lelotipatge) aportava informació sobre l'equilibri al·lèlic, resultava ambigua a l'hora de determinar si les alteracions observades corresponien a guanys o pèrdues de material genètic (Malkhosyan et al., 1998).

De fet, ja al 1989, un treball revelava que el 25% dels casos de CCR presentaven LOH en marcadors microsatèl·lit telomèrics del braç 4p (Vogelstein et al., 1989). L'estudi d'altres marcadors amb posicions intermèdies, tant per 4p com per 4q, va demostrar freqüències de desequilibri al·lèlic moderades (<25%) que en cap cas es correlacionaven amb l'estadi de progressió del CCR (Thorstensen et al., 1996). De la mateixa manera, estudis de CGH sobre sèries d'adenomes i carcinomes, havien identificat les pèrdues al cromosoma 4 com una de les alteracions més recurrents en estadis malignes (Ried et al., 1996). No va ser fins al 1999, que dos treballs del grup del doctor Peinado aportaren valor pronòstic a les alteracions del braç curt del cromosoma 4. En una primera aproximació, sobre una col·lecció de cinquanta-cinc casos de CCR i mitjançant la tècnica de l'AP-PCR, es van localitzar dos loci, a una distància de entre 2 i 5 Mb, corresponents a la regió 4p14-16.

Aquesta regió es trobava delecionada en el 30% dels casos. A més, un dels loci s'associava amb un pitjor pronòstic independentment de l'estadi de Dukes. Aquest locus mapava just al costat del microsatèl·lit D4S2397, i la LOH d'aquest marcador també tenia valor pronòstic (Arribas et al., 1999b). L'altre treball, ampliava la cohort, el panell de marcadors analitzats per LOH i l'associava a l'estatus mutacional de *TP53* i la invasió de ganglis limfàtics. Es va trobar una altra vegada associació entre LOH a D4S2397 i pitjor supervivència lliure de malaltia dels pacients. A més, hipotetitzaven dos patrons de desequilibri a la regió: (i) grans delecions associades a progressió i probablement degudes a la inestabilitat genòmica i (ii) pèrdues limitades al locus de D4S2397, i associades a una major agressivitat (Arribas et al., 1999a).

En anys posteriors, alguns autors van continuar aportant dades sobre la presència d'aquestes alteracions en 4p en CCR. En la majoria de casos però, les pèrdues al·lèliques reportades formen part d'estudis globals en els quals s'identifiquen regions amb guanys i pèrdues cromosòmiques. Aquests cariotips citogenètics i/o moleculars s'intenten correlacionar amb el pronòstic de la malaltia o l'estadi de progressió (Al-Mulla et al., 2006; Bardi et al., 2004; Diep et al., 2006; Gaasenbeek et al., 2006).

Shivapurkar i col·laboradors, a part de tornar a confirmar la presència d'aquestes alteracions en CCR, van anar una mica més enllà en l'intent d'associar-les a un estadi concret de la malaltia. Mitjançant, també, anàlisi d'LOH amb microsatèl·lits, van suggerir que l'alteració es produïa en un estadi molt inicial de la patogènesi del CCR, ja que van ser capaços d'identificar aquests desequilibris en la mucosa normal pròxima al tumor de casos amb adenomes o carcinomes (Shivapurkar et al., 2001).

### **Evidències en altres tipus tumorals**

La implicació del braç curt del cromosoma 4 no només s'ha descrit en CCR. El fet que aquesta regió cromosòmica es trobi també freqüentment alterada en altres tipus tumorals, reforça la idea que contingui gens clau per al procés cancerós. Les pèrdues d'heterozigositat recurrents s'han reportat, per exemple, en el cas del càncer de cèrvix. A més, els autors suggeriren la presència d'un gen supressor tumoral a 63 cM del marcador D4S1627 (Hampton et al., 1996). El mateix trobem en el cas del carcinoma escamós de cap i coll. Pershouse i col·laboradors van publicar freqüències de LOH molt

similars a les descrites per Hampton i les trobades en el cas del CCR (Pershouse et al., 1997a). Però l'interès d'aquests autors pel cromosoma 4 no va acabar aquí. També van demostrar que la transferència a cèl·lules U251 de Glioma d'un cromosoma 4 intacte suprimia el fenotip tumoral (Pershouse et al., 1997b).

Continuant amb les pèrdues d'heterozigositat, aquestes s'han trobat també en mesotelioma maligne, carcinoma de pulmó de cèl·lula petita (Shivapurkar et al., 1999b), càncer de mama (Shivapurkar et al., 1999a) i neuroblastoma (Perri et al., 2002). En aquest darrer cas, la presència d'LOH en pacients amb malaltia familiar, va permetre, mitjançant anàlisi de lligament, definir un locus portador d'un gen de susceptibilitat (gen supressor). I, evidentment, també s'han fet estudis de signatura cariotípica citogenètica i/o molecular com, per exemple, en carcinoma escamós de la cavitat oral (Jin et al., 2006) o en tumors germinals testiculars (Bergthorsson et al., 2006), en els quals la pèrdua de 4p era una de les més freqüents.

### Gens candidats

Tot i la gran quantitat de bibliografia que emfatitza que 4p sigui una regió recurrent de LOH, hi ha pocs treballs que hagin intentat localitzar-hi gens alterats. Com s'ha pogut comprovar en l'apartat anterior, la majoria d'informació en relació a aquesta regió cromosòmica és redundant i en els investigacions realitzades, manca el pas decisiu cap a la identificació i caracterització dels putatius gens supressors tumorals. Tanmateix, els objectius d'aquests treballs eren els de determinar una regió mínima de pèrdua. En aquest sentit, es pot afirmar que en el braç curt del cromosoma 4 hi ha dues regions "calentes" o *hot-spots* de LOH: (i) una regió més telomèrica, situada en 4p16, entre els marcadors D4S43 I D4S127; i (ii) una regió més centromèrica, situada en 4p15.1-15.3, entre els marcadors D4S1546 i D4S2397.

Una característica singular d'aquest braç 4p és que conté un dels majors deserts genètics del genoma humà (Hillier et al., 2005). De fet, enmig d'aquest gran desert, de prop de 9 Mbp, hi ha només un gen, *PCDH7* (*Brain-Heart protocadherin*), una protocadherina que ha estat proposat com un dels gens candidat de la regió (Bergthorsson et al., 2006). Aquest gen mapa, centromèricament, just fora de la regió a 4p15.1-15.3.

A la regió 4p16 està localitzat *FGFR3* (*fibroblast growth factor receptor 3*). Aquest gen s'ha trobat mutacionalment inactivat en càncer de bufeta (Hernandez et al., 2007). En el cas del mieloma múltiple, la davallada en l'expressió de *FGFR3* es dona per una translocació entre els cromosomes 4 i 14 (Santra et al., 2003).

Mitjançant array-CGH i d'expressió s'han identificat diversos gens que, sorprenentment, es troben amplificats i/o sobreexpressats en pacients de glioblastoma multiforme (Ruano et al., 2006). Els autors descriuen un amplicó a 4p15, i destaquen *STIM2* (*stromal interaction molecule 2*) i *LOC389203* (*hypothetical gene supported by BC032431*) com a gens rellevants en aquesta patologia.

Però sens dubte, el gen que més consistentment ha estat proposat com a candidat a supressor tumoral és *SLIT2* (*slit homolog 2 (Drosophila)*). Està mapat a 4p15.31-15.2. La inactivació d'aquest gen s'ha reportat per CCR (Dallol et al., 2003b), glioma (Dallol et al., 2003a), medul·loblastoma (Werbowetski-Ogilvie et al., 2006), pulmó i mama (Dallol et al., 2002; Prasad et al., 2004), neuroblastoma, tumor de Wilm i carcinoma de cèl·lula renal (Astuti et al., 2004). Tots els treballs coincideixen en que la inactivació es dona per hipermetilació de la regió promotora i cap dels que ha cercat mutacions en regions codificants n'ha trobat. Encara però, resta esbrinar quin és el rol que, en el procés cancerós, juguen molts dels gens que és troben en aquesta regió cromosòmica.