



**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

# **Materials i mètodes**



## 1. PACIENTS I MOSTRES

Entre juny de 2002 i juny de 2004 es van recollir 70 mostres provinents de cirurgies de pacients amb càncer colorectal i 22 de pacients operats de hepatectomia per presència de metàstasi. La recollida es va canalitzar a través del Servei d'Anatomia Patològica de l'Hospital Universitari de Bellvitge. Aquests dos grups de mostres són els que es van fer servir per al procés d'implantació en ratolí. Les característiques clinico-patològiques dels pacients s'especifiquen a la taula 7.

D'altra banda, per tal de validar els resultats obtinguts en l'anàlisi genètic, es va recórrer a les mostres del banc de tumors. Les mostres provenien de pacients amb un diagnòstic histològicament confirmat de CCR. Tots els pacients van donar el seu consentiment per a la recollida de les mostres i per a ser analitzades genèticament. Vàrem seleccionar dues cohorts de pacients, una destinada a establir el valor pronòstic de l'hipotètic gen(s) supressor tumoral i l'altre destinada a avaluar el valor predictiu de l'expressió d'aquest gen(s) a la resposta al tractament quimioteràpic basat en el 5-fluoracil. Les característiques clinico-patològiques dels pacients d'ambdues sèries s'especifiquen a les taules 8 i 9, respectivament.

Taula 7. Característiques clinico-patològiques dels pacients les mostres tumorals dels quals han estat xenoempeltades en ratolins atímics

TUMORS COLORECTALS					METÀSTASI HEPÀTIQUES				
	Mostres implantades (N=73)		Tumors xenografts (N = 46)			Mostres implantades (N = 22)		Tumors xenografts (N=20)	
	Nº	%	Nº	%		Nº	%	Nº	%
<b>Edat</b>					<b>Edat</b>				
≤69	31	42,4	18	39,1	≥61	9	40,9	9	45
>69	42	57,6	28	60,9	>61	13	49,1	11	55
<b>Gènere</b>					<b>Gènere r</b>				
Home	43	58,9	24	52,1	Home	11	50	9	45
Dona	30	41,1	22	47,9	Dona	11	50	11	55
<b>Localització</b>					<b>Localització</b>				
Dreta	21	28,7	15	32,6	Colon	11	50	10	50
Transversa	2	2,7	2	4,3	Recte	11	50	10	50
Esquerre	13	17,8	8	17,3	<b>Estadi primari</b>				
Sigma	21	28,7	12	26	II	4	18,2	2	10
Recte	15	20,5	6	13	III	4	18,2	4	20
<b>Diferenciació</b>					IV	14	63,6	14	70
Ben diferenciat	54	73,9	34	73,9	<b>Nº metàstasi</b>				
Mal diferenciat	16	21,9	11	23,9	<3	10	45,4	8	40
No conegut	3	4,1	1	2,1	≥3	12	54,6	12	60
<b>Estadi</b>					<b>Tipus</b>				
I i II	32	43,8	18	39,1	Sincrònic	14	63,6	14	70
III	39	53,4	26	56,5	Metacrònic	8	36,4	6	30
IV	2	2,7	2	4,3	<b>Met. bilobular</b>				
					Si	8	36,4	6	30
					No	14	63,6	14	70

**Taula 8. Característiques clinicopatològiques de la sèrie de pacients en què es va avaluar el valor pronòstic per IHQ sobre TMA. Casos valorables per als dos marcadors**

	PI4K2B		STIM2	
	Casos informatius (N=101)		Casos Informatius (N=113)	
	Nº	%	Nº	%
<b>Edat</b>				
<60	24	23.7	31	27.4
≥60	79	76.3	82	72.6
<b>Sexe</b>				
Home	59	58.4	67	59
Dona	42	41.6	46	41
<b>Localització</b>				
Dreta	32	31.7	34	30
Esquerra	32	31.7	41	36
Recte	36	35.6	38	34
<b>Diferenciació</b>				
Alt grau	13	12.9	13	12
Baix grau	86	86.1	99	88
Desconegut	2	2	1	-
<b>Estadi</b>				
I i II	57	56.4	63	56
III	29	28.7	35	31
IV	14	13.82	15	13
Desconegut	1	1		
<b>Cirurgia</b>				
Radical	83	87.1	96	85
Pal·liativa	16	15.8	17	15
Desconegut	2	2		

**Taula 9. Característiques clinicopatològiques de la sèrie de pacients en que es va avaluar el valor predictiu de resposta al tractament amb 5-FU mitjançant qPCR**

Característiques	Sèrie completa (N=214)		Cohort analitzada (N=140)		P*
	No.	%	No.	%	
<b>Edat</b>					
< 60	96	44.9	54	38.5	0.4828
≥60	118	55.1	86	61.5	
<b>Sexe</b>					
Home	121	56.5	76	54.3	0.307
Dona	93	43.5	64	45.7	
<b>Localització</b>					
Dreta	43	20.1	28	20	0.356
Esquerre	61	28.5	52	37.1	
Recte	110	51.4	60	42.9	
<b>Diferenciació</b>					
Alta	188	87.9	119	85	0.523
Baixa	26	12.1	21	15	
<b>Estadi</b>					
II	64	29.9	47	33.8	0.273
III	121	56.5	68	48.9	
IV	29	13.6	24	17.3	

## 1.1 Recollida i processament de les mostres

Les mostres es recollien a la sala d'operacions i eren immediatament traslladades en gel al servei d'Anatomia Patològica. Es seleccionava un fragment de mucosa normal de l'epiteli intestinal i un fragment tumoral i ambdues mostres es recollien per separat en DMEM (*Dullbecco's Modified Eagle's Medium*)(Gibco) suplementat amb un 20 % de sèrum boví fetal (SBF)(Gibco) i un 2 % de Penicil·lina/Estreptomicina (P/S) (Gibco). Un cop al laboratori la mucosa normal era immediatament congelada. La mostra tumoral es tallava en fragments de 2x2 mm<sup>3</sup> aproximadament, fins un mínim de tres. La resta de la mostra es congelava immediatament.

## 1.2. Obtenció dels xenoempelts en ratolins atímics

Els ratolins atímics, donat que són deficitaris en cèl·lules T, han estat molt útils en el camp de la recerca oncològica ja que no generen rebuig quan són trasplantats amb cèl·lules o tumors d'origen humà. Les mostres tumorals humanes són molt riques en fibroblasts, cèl·lules endotelials, macròfags, i d'altres tipus cel·lulars. Els xenoempelts crescuts en aquests ratolins tenen la particularitat d'haver substituït aquestes cèl·lules no tumorals d'origen humà per d'altres d'origen murí. Així doncs, mitjançant tècniques de biologia molecular és poden tractar aquests tumors xenoempeltats com a tumors 100 % purs, i evitar així la contaminació per cèl·lules normals.

Per als xenoempelts es feien servir ratolins mascles *swiss nu/nu* de 4-6 setmanes de la casa Harlan. Dels tres fragments de tumor humà, 2 eren empeltats de forma subcutània, als flancs posteriors, mitjançant un petit tall que permetia separar la dermis del ratolí i allotjar-hi el fragment. El tall es tancava amb una grapa quirúrgica. El tercer fragment era empeltat de forma ortotòpica en el cec del ratolí. La cirurgia, prèvia anestèsia amb Avertine (2,2,2-tribromoethanol (99 %), Sigma-Aldrich) a una dosi de 25-30 µl/gr, consistia en extreure el cec a través d'una laparotomia subcostal esquerra. Un cop a l'exterior, el fragment es fixava a la paret externa del cec amb fil de sutura Prolene 7/0, es tornava a l'interior de la cavitat abdominal i es suturava la paret abdominal i la pell amb fil de sutura Prolene 6/0. Per als empelts subcutanis

Els ratolins es van revisar a dies alterns durant un període màxim de 6 mesos per ratolí. Es controlava el pes i estat general de l'animal seguint les

recomanacions del Comitè Ètic del Servei d'Estabulari de l'IDIBELL. El creixement dels tumors subcutanis acostuma a ser més ràpid que el dels ortotòpics de tal manera que, quan els empelts assolien una mida màxima d'un cm<sup>3</sup>, s'extirpaven. Tres nous fragments d'aquests xenoempelts es tornaven a implantar en un nou ratolí. Aquest cicle es repetia un tercer cop. L'objectiu de fer tres passes en ratolí era el d'obtenir abundant material per tal de poder realitzar tots els estudis genètics posteriors i al mateix temps, intentar, mitjançant els implants ortotòpics, reproduir els patrons de disseminació a distància.

Els xenoempelts extirpats dels ratolins es congelaven immediatament de diferents formes. Un fragment s'inclouïa en parafina i s'enviava al servei d'anatomia patològica, on el patòleg confirmava el tipus histològic. Al mateix temps, una part del xenoempelt era trossejada i criopreservada en sèrum boví fetal amb un 10% de DMSO. D'aquesta manera els tumors es podrien tornar a implantar, en cas de necessitat, en nous ratolins atímics. La resta de tumor es congelava de forma convencional a -80°C i era la primera mostra en fer-se servir per a l'extracció d'àcids nucleics.

## 2. MÈTODES D'ANÀLISI GENÈTICA

### 2.1 Tècniques d'estudi del DNA

Per a l'obtenció de l'ADN de les nostres mostres vàrem utilitzar el protocol convencional de fenol més cloroform-isoamilic (FLUKA). El DNA es precipitava amb isopropanol, es rentava amb alcohol al 70% i després de deixar-lo assecar parcialment es rehidratava amb aigua destil·lada estèril. L'extracció es va fer, per a cada cas, del triplet mucosa normal/tumor primari/xenoempelt. Si la mostra estava congelada amb OCT, es tallava en seccions de 15 µm i, previ a l'extracció, es rentava amb 1 ml de PBS (*phosphate-buffered saline*, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,29 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O, 137 mM NaCl, 2,68 mM KCl). Després es centrifugava a 14.000 rpm durant 5 minuts per eliminar les restes d'OCT.

Per a la quantificació del DNA obtingut es feia servir l'equip Nanodrop ND-1000 on a més, la relació entre l'absorbància a 260/280 nm, ens donava idea de la puresa. Els estocs s'emmagatzemaven a -80°C i una alíquota a 100 ng/µl es desava a -20°C.

#### Estudi de pèrdues d'heterozigositat a la regió 4p14-16

Donat que la detecció de LOH de forma recurrent en regions particulars del genoma s'ha associat de forma consistent a la presència de gens supressors tumorals, aquesta va ser la primera aproximació que vàrem fer. Per això vàrem seleccionar 30 marcadors microsatèl·lit per a les mostres de CCR. S'intentava que els marcadors fossin equidistants i informatius, per tant es van triar preferentment repeticions de dinucleòtids CA. Aquests marcadors mapaven una regió de 15 Mbp que contenia 38 gens identificats.

Alguns autors han suggerit que podria existir una major pressió selectiva en favor de les LOH, en aquest braç cromosòmic, en el cas de les metàstasi hepàtiques (Malkhosyan et al., 1998). Per això vàrem ampliar, amb 27 marcadors més, el panell de marcadors per aquestes mostres. Així doncs, per a les MH, la regió analitzada era de 32 Mbp i contenia 225 gens.

- Amplificació per PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Breument, 1 µl de DNA (100 ng/µl) s'amplificava utilitzant 1,25 U de la polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq) d'Invitrogen (5 U/µl), 2,5 mM de Mg<sub>2</sub>Cl, 0,2 mM de dNTPs, tampó 1X i 0,1 mM de *primers*. Els productes de l'amplificació s'analitzaven per electroforesi en gel d'agarosa al 1,5 % en Tris-borat-



EDTA (TBE) 1x (89 mM Tris, 89 mM àcid bòric, 20mM EDTA, pH 8,3) a 120 volts.

- Electroforèsi en gel d'acrilamida: A la practica, l'anàlisi de la LOH consisteix en mesurar la dosi relativa de l'al·lel matern respecte del patern al lloc del polimorfisme. Els polimorfismes de les seqüències repetitives ho són de mida, és a dir, del nombre de repeticions en cada al·lel. Per a poder analitzar-los cal una electroforesi d'alta resolució (diferències de 2 -4 parells de bases). Per això les mostres amplificades és van córrer en gels de SDS-poliacrilamida al 6-8 % 8 M en urea. Breument, les mostres eren diluïdes 1:5 en un tampó de càrrega desnaturalitzant DLB (*Denaturing Loading Buffer*; 93 % formamida desionitzada, 0,01 M EDTA, 0,01 M NaOH, 0,01% xilè cianol), es bullien a 95 °C durant 4 minuts, es clavaven en gel i es corrien durant 3-4 h a 55 watts.
- Tinció de nitrat de plata: Per visualitzar les bandes es va optar per aquesta tinció. El protocol consistia en:
  - Fixar les bandes de DNA amb etanol 10 % durant 10 minuts.
  - Retirar i afegir HNO<sub>3</sub> durant 3 minuts.
  - Rentar amb aigua destil·lada durant 2 minuts
  - Afegir el AgNO<sub>3</sub> durant 20 minuts
  - Rentar amb aigua destil·lada durant 2 minuts
  - Afegir el Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> i esperar que precipiti sobre les bandes on s'ha dipositat el AgNO<sub>3</sub>
  - Retirar el carbonat sòdic. Aturar la reacció amb àcid acètic al 10 %

Quan la mostra normal era heterozigota, la presència de LOH es podia apreciar de forma inequívoca en la mostra del xenoempelt. Sovint la mostra corresponent al tumor primari no era prou definitiva degut a la presència de cèl·lula normal.

- Electroforesi en capil·lar: En algunes ocasions, tot i ser heterozigots, la diferència en el nombre de repeticions entre al·lells era molt baixa i aquesta tècnica d'UREA-PAGE (*Urea Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis*), no era prou resolutive. Per això es van amplificar algunes mostres amb primers marcats amb fluorescència. Els amplicons resultants s'analitzaven en un seqüenciador ABI Prism 3730 (Applied Biosystems). L'anàlisi de LOH es feia mesurant els pics de la mostra tumoral respecte de la normal. El software utilitzat era el GeneMapper 3.0. La pèrdua d'heterozigositat

corresponia a la desaparició d'un dels pics. Quan la desaparició era parcial, possiblement degut a una heterogeneïtat del propi tumor, s'aplicava el procediment descrit per Cawkwell *et al.*, (Cawkwell *et al.*, 1993). El llindar de canvi per a assignar LOH es va posar a 0.5.

### Estudi mutacional dels gens candidats

Per l'anàlisi mutacional dels gens candidats escollits, els *primers* per a l'amplificació es col·locaven en els introns que flanquejaven cada exó. Això ens permetria identificar possibles alteracions en els llocs d'*splicing* i al mateix temps, discriminar l'amplificació de genoma murí. Es va optar per una estratègia doble: amplificació seguida de (i) anàlisi dels polimorfismes de conformació de cadena senzilla o SSCP (de l'anglès, *Single-Strand Conformation Polymorfism*) i (ii) seqüenciació.

- L'anàlisi per SSCP es basa en el fet que, un cop desnaturalitzades, les cadenes senzilles del DNA adquireixen una conformació o estructura secundària determinada. Quan es produeix una mutació (deleció, inserció o substitució) de pocs parells de bases, aquesta estructura secundària té un patró de mobilitat en gel d'electroforesi diferent a la de la cadena de DNA salvatge. Permet la resolució de fragments de fins a 400 pb.

Els gels per SSCP eren de poliacrilamida a un percentatge que variava en funció de la mida del fragment amplificat entre un 6 i un 10 %. Primer es comprovava en gel d'agarosa la qualitat de l'amplificació. Posteriorment es muntava el gel de SSCP. Els vidres utilitzats eren de 50 cm de llarg per 30 cm d'ample, i entre ells polimeritzava una barreja de: 6 ml de TBE 10x, 12 ml de solució d'acrilamida:bisacrilamida (29:1) al 40 %, 600 µl de persulfat amònic (APS) al 10 %, 25 µl de TEMED (N, N, N, N,-tetrametiletlen-diamina) i 42 ml d'aigua bidestil·lada. Als vidres, després de 2 X rentats amb etanol absolut i 2 X etanol 70%, se'ls hi feia un tractament específic. Al gran, 800 µl de SIGMACOTE (Sigma Chemical Co.), una solució de silicona repel·lent que evita que s'hi enganxi el gel. Al vidre petit, per facilitar que s'hi enganxés el gel i poder-lo tenyir còmodament, se li feia un tractament amb GORP (γ-metacriloxipropil-trimetoxisilà, Sigma Chemical Co.) en una solució que contenia 150 µl d'àcid acètic al 10 %, 5 ml d'etanol absolut i 5 µl de GORP.

Les mostres es diluïen 2:5 en DLB i es desnaturalitzaven 4 minuts a 95 °C, es clavaven en gel i es carregaven 5 µl. L'electroforesi es feia a baixa potència (7 watts) durant 10 a 16 hores en funció de la mida del fragment.

- La seqüenciació la vàrem fer utilitzant el kit *BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems) per electroforesi en capil·lar en el seqüenciador automàtic ABI Prism 3730 (Applied Biosystems). Breument, els productes de PCR es purificaven amb el kit *JETQUICK PCR Purification Spin Kit* (Genomed) seguint les instruccions del fabricant. Un cop purificats, per a la seqüència, es diluïa la mostra o no en funció de la intensitat de la banda observada en el gel d'agarosa. En qualsevol cas, la reacció de seqüència contenia 1 µl de *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*, 1,5 µl de *BigDye v3.1 Sequencing Buffer (5X)*, 3,2 pmols de primers, 1 µl de DNA i aigua bidestil·lada fins a un volum de 10 µl. Les condicions de la reacció eran: 25 cicles de 30s a 96 °C, 15s a la temperatura d'*anealing* dels primers menys 5 °C, i 4 min. a 60 °C. Acabada la seqüència, les mostres es precipitaven amb etanols per eliminar les restes de nucleòtids no incorporats.

### **Estudi de metilació d'illes CpG.**

Com ja s'ha esmentat al capítol d'introducció, hi ha mecanismes epigenètics que poden ser responsables del silenciament o l'activació de la transcripció d'alguns gens. Entre aquests mecanismes un dels més reconeguts és aquell que afecta a la metilació de les citosines dels dinucleòtids CpG. Per tal d'avaluar una possible regulació epigenètica dels nivells d'expressió dels nostres gens candidats vàrem analitzar els patrons de metilació de les illes CpG associades a les regions promotores dels mateixos. Vàrem comparar el patró de metilació dels tumors primaris amb el de les seves mucoses normals aparellades.

- Selecció de les regions riques en illes CpG de les regions promotores: Utilitzant una aplicació d'accés lliure de la Universitat de Califòrnia, el *UCSC Genome Browser on Human Map 2006 Assembly* (<http://www.genome.ucsc.edu>), vàrem identificar les regions promotores dels nostres gens i en vàrem obtenir la seqüència. A més, aquesta aplicació et permet situar aquests dinucleòtids CpG. Vàrem dissenyar oligonucleòtids per a l'amplificació de fragments entre 300 i 500 pb que continguessin el major nombre d'aquests dinucleòtids CpG.

- Tractament del DNA amb bisulfit: Per a la detecció de la presència d'un grup metil en la citosina, cal poder diferenciar-la d'aquella sense metilar. Per això vàrem fer servir el mètode de conversió de citosines en uracils mitjançant el tractament amb bisulfit. Es va utilitzar el *EZ DNA Methylation Kit* (Zymo Research) seguint les recomanacions del fabricant. Breument, s'afegien 5 µl de *M-dilution buffer* a 5 µl (100 ng/µl) de DNA i aigua bidestil·lada fins a un volum final de 50 µl. S'incubava la mostra a 37 °C durant 15 min. i s'hi afegien 100 µl de *CT Conversion Reagent*. La mostra s'incubava protegida de la llum durant 12 a 16 hores a 50 °C. Passat aquest temps, s'incubaven les mostres 10 min. en gel i s'hi afegien 400 µl de *M-Binding buffer*. Per a desulfonar les mostres es carregaven a les *Zymo-Spin I Column*. Es centrifugava 15-30 seg. a 10.000 g. Es col·locava la columna a un nou tub i s'hi afegien 200 µl de *M-Wash buffer* i es tornava a centrifugar. Després, 200 µl més de *M-desulphonation buffer* a la columna que es deixava 15 min a temperatura ambient (TA) abans de tornar a centrifugar. Per acabar s'afegien 200 µl més de *M-Wash buffer* i es centrifugava de nou per finalment afegir a la columna 10 µl de *M-Elution buffer* i recuperar el DNA convertit en un eppendorf.
- Amplificació per PCR i seqüenciació: Per a detectar les citosines metilades calia amplificar les mostres tractades amb bisulfit per PCR. Com que el tractament és molt agressiu i el DNA queda molt malmès, fèiem *nested PCR*. Els oligonucleòtids i les condicions de les PCRs es troben a l'annex. La PCR interna es purificava, es diluïa 1:10 i es seqüenciava seguint el protocol descrit anteriorment.

### **Anàlisi de dosi al·lèlica per FISH**

Per tal d'establir si existia una bona correlació entre les dades obtingudes de l'anàlisi de LOH i la dosi al·lèlica dels dos gens d'estudi, vàrem triar la tècnica d'hibridació fluorescent "*in situ*" o FISH (*Flourescent "in situ" hybridization*).

El més freqüent quan es realitza un FISH es fer-ho sobre cèl·lules en cultiu o sobre talls de teixit. En el primer cas, la sincronització de les cèl·lules amb colquicina permet realitzar la hibridació sobre nuclis en metafase. En el segon, la hibridació és en interfase i cal prèviament validar les teves sondes per garantir-ne l'especificitat i la validesa del resultats. Com en el nostre cas

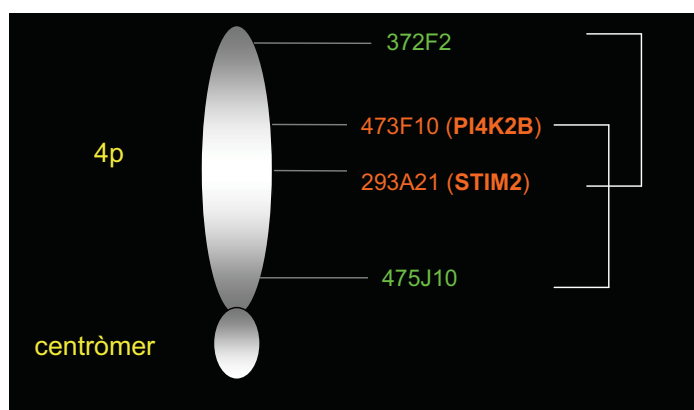
no era important conservar la histologia, vàrem realitzar els experiments sobre empremtes de teixit per estalviar-nos la feina de microtomia.

- Validació de les sondes: Les sondes utilitzades les vàrem obtenir de la llibreria BAC 32K que amablement ens va facilitar el Dr. L. Pérez Jurado (Universitat Pompeu Fabra). Abans d'hibridar les mostres es va procedir a validar l'especificitat i sensibilitat d'aquestes sondes. Per això es van realitzar experiments de FISH sobre metafases i es va verificar que aquestes sondes mapaven efectivament a les localitzacions esperades del cromosoma 4.
- Preparació de les empremtes: Es tallava un fragment de, aproximadament, 3 mm<sup>3</sup> i es deixava descongelar a temperatura ambient. Es posava sobre un portaobjectes net i amb un altre portaobjectes es feia pressió sobre el petit fragment per tal d'obtenir-ne l'empremta. La pressió feia que un nombre suficient de cèl·lules s'adherissin al portaobjectes sobre el que es realitzaria el FISH. Aquest procediment es repetia tres cops al llarg del portaobjectes. Les empremtes es deixaven assecar a temperatura ambient sobre els portes (en aquest punt es poden congelar les preparacions per fer-les servir més endavant). Abans de la hibridació es fixaven les preparacions, es cobrien totalment amb metanol:acètic (3:1) i es deixaven assecar a l'escalfor d'una bombeta, a la campana, fins que la solució de fixació s'evaporava completament. Un cop seques, es posaven a l'incubador durant 30 min. a 55 °C. Acabat aquest punt les mostres estaven llestes per la hibridació.
- Marcatge de les sondes: Es van triar quatre sondes per avaluar la pèrdua total o parcial del braç curt del cromosoma 4. Aquestes es van marcar amb fluorocroms mitjançant la tècnica de *Nick Translation*. Breument, 1 µg de DNA es barrejava amb 5 µl 0,1 mM de dTTP, 5 µl de 10X *Nick Translation Buffer*, 10 µl 0,1 mM de dNTP mix, 2,5 µl 0,2 mM de *Spectrum Green* (FITC) o Red (*Texas Red*)-dUTP, 5 µl de *Nick Translation Enzyme* i aigua bidestil·lada lliure de nucleases fins a un volum de 50 µl. L'últim pas era sempre el d'afegir l'enzim i tot el procés es realitzava amb cura que la llum directa no incidís sobre els fluorocroms. Les hibridacions es van fer per parelles de sondes marcades de la següent forma:
  - RP11-372F2, situada a 4p16.3, propera al telòmer, entre els nucleòtids 2.957.934 i 3.141.06 (*Spectrum Green*).

- RP11-293A21, situada a 4p15.2 sobre el gen *STIM2*, entre els nucleòtids 26.457.152 i 26.637.886 (*Texas Red*).
- RP11-473F10, situada a 4p15.2 sobre el gen *PI4K2B*, entre el nucleòtids 24.937.712 i 25.071.126 (*Texas Red*).
- RP11-475J10 situada a 4p13, propera al centròmer i localitzada entre els nucleòtids 45.382.013 i 45.553.406 (*Spectrum Green*).

La reacció es deixava 1 h i 15 min. al bany a 16 °C en una cambra fosca. Després s'aturava incubant els eppendorfs 10 min a 70 °C i es deixaven en gel un mínim de 15 min. Per comprovar que la reacció de *Nick Translation* havia funcionat es feia una electroforesi en gel d'agarosa al 1% de 6 µl de la reacció. Havia de quedar un *smear* entre les bandes de 200 i 700 pb per donar per bona la mida dels fragments de DNA.

Figura 10. Esquema de l'estratègia d'hibridació de les sondes per FISH.



- Precipitat de les sondes: Per precipitar el µg de sonda, afegim 10 µl (1ng/µl) de DNA cot1 humà. El cot1 bloqueja l'heterocromatina i així evitem que el DNA pugui hibridar inespecíficament amb zones d'heterocromatina que no ens resulten informatives. Es pot precipitar una part i llavors s'ha de calcular la quantitat de cot1 necessari. Afegim 0.1 volums d'Acetat Sòdic 3M pH 5.5 i 2.5 volums d'etanol 100 % fred i barrejàvem invertint. Aquests dos passos s'han de fer consecutius per a cada tub; intentar deixar la gota de NaAc a la paret del tub i després arrossegar-la quan hi afegim l'EtOH. Deixàvem precipitar el DNA en gel o al congelador un mínim de 15 min. Llavors passàvem a centrifugar 30 min a 12.000 rpm, decantar el sobrenedant, aixugar l'etanol de les parets del tub i posar a l'estufa a 37 °C 8 min. per deixar evaporar l'alcohol. Un cop sec, es resuspenia la sonda marcada i precipitada en 40 µl de formamida desionitzada i ho posàvem 5

min a 65 °C per resuspendre bé el *pellet*. Afegíem 40 µl de 20 % dextrà sulfat/12xSSC a cada tub i barrejàvem bé. Els tubs es desaven en un lloc fosc.

- Hibridació de les empremtes: Els portes amb les empremtes es deshidrataven durant un min. en etanol al 70 %, 1 min. al 90 % i 1 min. 100 %. Es deixaven evaporar l'etanol completament i es desnaturalitzaven les sondes marcades durant 8 min. a 70 °C. Entre 5 i 7 µl de sonda desnaturalitzada es pipetejava sobre el portaobjectes amb l'empremta i es cobria amb un cobreobjectes mirant de no deixar-hi bombolles d'aire. Es segellava el cobreobjectes amb cola mirant de no deixar cap forat a l'exterior, i es deixava hibridar a una cambra fosca i humida a 37 °C O.N. de 12 a 16 h.

Pels rentats trèiem els cobreobjectes i deixàvem les preparacions 2 min. en solució 0.4xSSC (20 ml 20xSSC, 950 ml d'aigua destil·lada, 1 ml de Tween 20, ajustar el pH a 7,5 i portar a un volum de 1 litre i filtrar) a 74°C procurant agitar. Després ho deixàvem 2 min. en solució 2xSSC/0.1% Tween 20 a temperatura ambient i finalment ho deixàvem assecar a l'aire protegit de la llum. Per poder observar les mostres al microscopi de fluorescència es tenyien els nuclis amb una gota de DAPI i *antifade* per retenir el senyal fluorescent.

Per contar els punts d'hibridació es va fer servir un microscopi de fluorescència (Olympus, BX60) equipat amb el joc de filtres apropiat. Per a cada hibridació es van contar un total de 100 nuclis no superposats que mostressin uns senyal clara.

## 2.2 Tècniques d'anàlisi de l'expressió gènica

Per a poder realitzar els experiments que segueixen va ser necessari aïllar el RNA de les mostres corresponents. El procediment que vàrem seguir va ser el de *TRIZOL® Reagent* (Invitrogen). Tot el protocol es realitzà a temperatura ambient. Un fragment de teixit es va homogeneïtzar en 1 ml de TRIZOL i es deixà incubar durant 5 min. Seguidament afegíem 200 µl de cloroform, agitàvem amb força i ho deixàvem 2-3 min a la poïata abans de centrifugar a 12.000g a 4 °C durant 15 min. Recuperàvem la fase aquosa (sobrenedant) i la passàvem a un eppendorf nou on afegíem 500 µl d'isopropanol i incubàvem 10 min. Després de 10 min. de centrífuga a 4 °C i 12.000g passàvem a fer els



rentats amb els tubs clavats en gel. Fèiem dos rentats amb etanol al 75 % i centrifugant després de cada un a 7.500 g durant 5 min. a 4 °C. Assecàvem les restes d'etanol amb una turunda de cotó i deixàvem evaporar l'etanol a l'aire amb els tubs en gel.

Per la quantificació del RNA obtingut es feia servir l'equip Nanodrop ND-1000 on, a més, la relació entre l'absorbància a 260/280 nm ens donava idea de la puresa. Els estocs i una alíquota a 100 ng/µl s'emmagatzemaven a -80°C. La integritat del RNA la comprovàvem per electroforesi en gel d'agarosa-TBE al 0,8% a 80 volts durant 25 min.

### **Expressió de mRNA dels gens candidats en les mostres de xenoempeltades**

- Transcripció reversa del mRNA: Dels RNAs obtinguts, 200 ng es feien servir per a la reacció de transcripció inversa per obtenció del cDNA. Vàrem utilitzar el kit *M-MLV Reverse Transcriptase Kit* (Invitrogen). La mix contenia: 2 µl d'oligo-dT (Amersham Pharmacia), 2 µl 10 mM de dNTPs, 18 µl d'aigua destil·lada estèril, 8 µl de 5x *First Strand Buffer*, 4 µl de 0,1M DTT, 2 µl de RNAase OUT (Invitrogen), 2 µl de l'enzim *M-MLV Reverse Transcriptase*, i 2 µl de RNA (100ng/µl). La reacció es feia en termociclador amb un programa de 37 °C durant 50 min. i 70 °C durant 15 min.
- Disseny dels oligonucleòtids: Donat que un nombre important de les mostres sobre les que treballàvem provenien de xenoempelts de ratolí, era important poder diferenciar entre el genoma humà i el murí. D'altra banda, en tota extracció de RNA s'arrossega una proporció no menyspreable de DNA que podria interferir en la detecció de l'expressió gènica. Per resoldre el tema de la diferenciació entre espècies es van dissenyar *primers*, basant-nos en la homologia entre les seqüències humana i murina, per a cadascun dels gens d'estudi. Un cop alineades les seqüències mitjançant l'aplicació BLAST de la pàgina web del NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi)), es buscaven aquells punts de no homologia per al disseny dels *primers*, tenint en compte que la mida del fragment a amplificar del genoma humà no superés el 120 pb i que, preferiblement, els desaparellaments es donessin a l'extrem 5' del *primer*. A més a més, i per evitar l'amplificació del DNA contaminant de la mostra, els primers s'havien de col·locar en exons diferents contigus.



Val a dir que per als gens seleccionats la homologia entre humà i ratolí va superar sempre el 85% i que per tant aquesta aproximació experimental no és en absolut senzilla. Es van haver de testar diferents combinacions de primers per a cada gen fins a trobar aquells en que el control negatiu (cDNA de ratolí) no fos amplificat.

Figura 11. Disseny d'oligonucleòtids per diferenciar la seqüència humana de la de ratolí. Les caixes assenyalen els oligos forward i reverse i es poden apreciar els desaparellaments entre seqüències.

Human	1700	GGCTGAGAAGATAAAAAAGAAGAGAAACACACTCTTTGGCACCTTCCACGTGGCCCCACAG
Mouse	1487	GGCAGAAAAAATTAAAAAGAAGAGAACACAGTCTTTGGGACCCTGCACGTTCACACAG
Human	1760	CTCTTCCCTGGATGATGTAGATCATAAAATTCTAACAGCTAAGCAAGCACTGAGCGAGGT
Mouse	1547	CTCCTCCCTGGACGAAGTAGACCACAAGATTCTGGAAGCCAAGAAAGCCCTCTCTGAGCT

- PCR quantitativa en Temps Real (RT-qPCR): Aquesta tècnica permet monitoritzar en temps real els cicles d'amplificació d'una seqüència mitjançant la utilització de fluorocroms. En el nostre cas vàrem fer servir l'equip *LightCycler 2.0* de Roche i el fluorocrom va ser *SYBR<sup>®</sup> Green*, un agent que s'incorpora a les cadenes dobles de DNA de forma inespecífica. La tècnica es basa en que, un cop unit el fluorocrom, la intensitat de la fluorescència incrementa de forma molt important. Així, a mesura que l'amplificació va produint-se, s'incorporen més molècules de *SYBR<sup>®</sup> Green*, que emetran fluorescència i que podem detectar a temps real. Les lectures de fluorescència obtingudes ens donen un valor de CP (*Crossing Point*). Aquest CP és el cicle de la reacció a partir del qual la emissió de fluorescència comença a incrementar de forma exponencial. Com més quantitat de DNA o cDNA motlle hi hagi a l'inici de la reacció, abans arribarà el seu CP. Aquest valor es pot traduir en un resultat quantitatiu si construïm una recta de regressió a partir de dilucions seriadades de concentració coneguda. Aquesta recta de regressió s'ha de calcular per a cadascun dels gens d'estudi així com per al gen de referència. Amb la recta obtenim el valor de l'eficiència (E) de la reacció d'amplificació mitjançant la fórmula

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

on *slope* és el pendent de la recta.

Amb aquest valor E es pot calcular la quantitat relativa d'un transcrit entre dues mostres, per exemple entre la mostra normal i la tumoral, amb la fórmula

$$\left( (E_{target})^{\Delta CP_{target}(control-samples)} \right) / \left( (E_{reference})^{\Delta CP_{reference}(control-samples)} \right) \text{ (Pfaffl et al., 2002)}$$

Com es pot veure a la fórmula necessitàvem la referència interna d'un gen que, en teoria, no presenti canvis en la seva expressió. Aquests gens són els anomenats *housekeeping genes*. Donada la controvèrsia sobre l'estabilitat en els nivells d'expressió d'aquests gens en diferents teixits i condicions experimentals, vàrem triar dos gens, *CICLOFILINA* i *B2-MICROGLOBULINA*. Així, si el quocient entre aquets dos gens es mantenia raonablement constant entre totes les mostres, podríem afirmar que ambdós es comportaven com a *housekeeping genes* i podríem utilitzar qualsevol dels dos com a gen de referència. En el nostre cas, el gen de referència que vàrem triar va ser el de la *B2-MICROGLOBULINA* (*B2MG*). Per a cada mostra, vàrem obtenir el valor per al nostre gen d'interés i el valor per al gen de referència. Aquests valors es van obtenir per triplicat a partir d'un *pool* de 3 cDNAs independents. Els experiments de RT-qPCR es van fer utilitzant el kit *LC FastStart DNA Master SYBR Green I Reagent set* (Roche). Les condicions per a cadascun dels gens es va haver d'optimitzar, però en tots els casos el volum de la reacció era de 10 µl i incloent-hi 1 µl de *Master Mix* que contenia l'enzim i 0,1 µM de  $Cl_2Mg$ .

D'aquesta manera, vàrem poder establir la diferència d'expressió per cada gen entre la mostra de mucosa normal i el tumor. Per saber si hi havia una tendència a la sobreexpressió o infraexpressió en les mostres tumorals respecte de les normals, es va fer servir un paquet estadístic que avalués aquestes mostres com un conjunt o població. Aquest software fou el *REST*<sup>®</sup> (*Relative Expression Software Tool*) (Pfaffl et al., 2002), disponible a la xarxa i que utilitza el test de *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test*<sup>®</sup>.

### Estudi del valor pronòstic de *PI4K2B* i *STIM2*

Vàrem utilitzar una cohort de 185 casos consecutius de pacients de CCR operats a l'Hospital Universitari de Bellvitge entre el gener de 1996 i juny de 1997. Per a tots ells disposàvem del seguiment i tots havien donat el seu

consentiment per avaluar el valor pronòstic de les alteracions genètiques subjacents. La inclusió a l'estudi no va influir el tractament adjuvant.

Un fragment representatiu de cada tumor fou fixat en formaldehid i inclòs en parafina al departament d'anatomia patològica. Entre els pacients hi havia 115 homes i 70 dones, amb edats entre els 30 i els 98 anys, amb una edat mitjana de 67 anys. La localització del tumor primari era colon en 114 casos i recte en 71. La cirurgia fou considerada curativa en 148 dels 185 casos (78,9%) i pal·liativa pels altres 39 casos. Tots els casos es van classificar segons la classificació de Dukes modificada per Astler i Coller. Hi havia 93 Dukes A-B1-B2, 67 Dukes C1-C2 i 25 Dukes D. El seguiment clínic dels pacients era de mitjana de 70,2 mesos (entre 64,5 i 75,9).

- Tissue Micro Array (TMA): Dels 185 casos, hi va haver suficient teixit tumoral en 177. Vàrem emprar el mètode de construcció de l'*array* descrit per Fernández PL *et al.* (Fernandez et al., 2001). Una secció de cadascun dels blocs es va tenyir amb hematoxilina-eosina per poder marcar dues àrees tumorals representatives i no necròtiques. D'aquestes àrees es van obtenir dos cilindres que es van dipositar en un nou bloc de parafina. Finalment els 177 casos van quedar representats en 7 blocs de parafina que contenien cadascú 30 casos amb dos cilindres per cas.
- Immunohistoquímica de PI4K2B sobre Tissue Micro Array (TMA): Per a desparafinar els talls obtinguts dels blocs del TMA vàrem fer 3x10 min. en xilol i després vàrem rehidratar les mostres en un banc d'etanols de graduació decreixent; 3 x 5 min. en etanol al 95 %, 3x 5 min. en etanol al 75 %, 3x 5 min. en etanol al 50 % i finalment el vàrem deixar en aigua destil·lada 10 min. L'activitat de la peroxidasa endògena es va bloquejar amb 10 min. en un solució de peròxid d'hidrogen al 3 %, seguit d'un rentat en aigua destil·lada de 5 min. i 3x 5 min. en PBS. El desemmascament de l'antigen es va aconseguir fent bullir el talls del TMA en un tampó de citrat 0,01 M a pH 6,0 al microones a 1.200 watts durant 15 min. Les unions inespecífiques de l'anticòs es van bloquejar, utilitzant una cambra humida, incubant els talls amb un 10 % de sèrum normal de cabra durant 20 min. a temperatura ambient. Després de 3 rentats de 5 min. en PBS, les seccions es van posar a incubar amb l'anticòs primari (PI4K2B anticòs policlonal de conill, Abcam (ab37812 ) a una dilució 1:50 O.N. a 4 °C a la

cambrà humida. L'endemà, després de 3 rentats de 5 min. en PBS, les seccions es van incubar amb un anticòs secundari biotinitat i amb estreptoavidina marcada amb peroxidasa (DAKO K0675; Dako Diagnostics). Per acabar, després de 3 rentats finals amb PBS, les mostres es van incubar amb una solució cromogènica de diaminobenzidina i es van tenyir amb hematoxilina.

Els controls positius i negatius es van incloure en cada experiment. L'expressió de PI4K2B es va avaluar de tres maneres diferents:

- (i) D'acord a la intensitat de la tinció: Es va assignar un valor d'1 als casos amb tinció negativa o indetectable i a aquells amb una tinció lleu o d'una creu (+). Un valor de 2 als casos amb tinció moderada o de dues creus (++) i un valor de 3 als casos amb una tinció intensa o de tres creus (+++)
- (ii) D'altra banda es va valorar el percentatge de cèl·lules tumorals tenyides. Es va assignar un valor d'1 als casos amb tinció negativa o < al 10 %. Un valor de 2 als casos amb una tinció de entre el 10 i el 50 %. I un valor de 3 als casos amb una tinció >50 %.
- (iii) Finalment vàrem generar un valor (*IHQ score*) que contenia la informació dels dos punts anteriors. Assignats els valor d'1 al 3 en els casos anteriors vàrem fer servir la fórmula

$$IHQscore = [(Intensitat + 1) \times Percentatge]$$

Amb la que obteníem un rang de valors entre el 2 i el 12  $[(Intensitat + 1) \times percentatge]$  que es van assignar a cada cas.

Dos patòlegs van examinar les preparacions a cegues. La concordança entre ells va ser superior al 90% i en els casos discrepants es va buscar el consens.

- Immunohistoquímica de STIM2 sobre Tissue Micro Array (TMA): El protocol per STIM2 fou pràcticament el mateix llevat d'alguns petits canvis a l'hora d'optimitzar les condicions. Òbviament, l'anticòs primari canvià i fou el d'STIM2 (anticòs policlonal d'ovella cedit per la Dra. Lorna S. Johnstone, Auckland, Nova Zelanda). De la mateixa manera, es va avaluar la tinció pels tres mètodes anteriorment descrits amb una variació: l'avaluació del percentatge de tinció. En el cas d'STIM2 la tinció era força més homogènia

i per tant a l'hora de tenir en compte els percentatges de tinció el que es va fer es assigna els valors de la següent manera: un valor de 1 al casos amb tinció de entre l'1 i el 50 %; un valor de 2 als casos amb una tinció >50 % però <100 %; i un valor de 3 als casos amb un 100 % de tinció.

- Anàlisi estadístic: La supervivència global (OS) i la supervivència lliure de malaltia (DFS) es van calcular des del moment de la cirurgia fins a la mort, recurrència o última visita de seguiment. La sèrie R0 era de 146 pacients, es a dir que en 31 casos els marges de resecció estaven afectats de cèl·lules tumorals.

Les corbes de supervivència es van calcular mitjançant el mètode de Kaplan-Meier i les diferències entre les corbes mitjançant una anàlisi multivariant utilitzant el model de regressió de Cox per a calcular el risk relatiu. Es va ajustar sempre l'anàlisi d'acord amb l'estadi tumoral, el grau de diferenciació i la localització tumoral. Es van calcular els riscos relatius (HRs) i els intervals de confiança (CIs) al 95%. Per a testar la significació es va fer un test de probabilitats on els valors de  $P \leq 0.05$  eren considerats estadísticament significatius.

### **Estudi del valor predictiu de resposta al tractament de *PI4K2B* i *STIM2***

Entre el gener de 1996 i juny de 2002 es van recollir a l'Hospital Universitari de Bellvitge 214 casos de pacients diagnosticats de CCR i que havien patit cirurgia (Dotor et al., 2006). En 140 dels 214 casos, es va recollir a més un fragment de mucosa normal aparellada. Aquests 140 casos són la cohort que es va fer servir per a avaluar el valor predictiu de resposta al tractament de la sobreexpressió de *PI4K2B* i *STIM2*. Aquest pacients van rebre el tractament estàndard de 5-fluoracil en bolus més levamisole durant 1 any. Tots els pacients van donar el consentiment per escrit per autoritzar l'ús de les mostres per a anàlisis genètiques.

Per determinar el grau d'expressió d'ambdós gens en aquests pacients es va recórrer a la RT-qPCR. El procediment per a aquesta tècnica ha estat ja descrit en apartats anteriors. Breument, l'RNA es va obtenir per a les 140 parelles de teixit normal/tumor i es va realitzar la conversió a cDNA mitjançant transcripció inversa. L'amplificació utilitzant *SYBR® Green* es va fer en una aparell diferent, el LightCycler 480, que enlloc de capil·lars de

vidre funciona amb plaques de 384 pous, i es va utilitzar el kit *LightCycler 480 SYBR Green Master I* específic per a aquest equip.

Un cop obtinguts els valors d'expressió per a cada una de les mostres es va calcular el quocient entre la mostra tumoral i la normal aparellada. Així es van obtenir els 140 valors del grau de expressió per a cada cas. Per realitzar els anàlisis estadístics es va establir el valor de la mediana d'aquests 140 casos coma punt de tall. Els valors per sobre de la mediana es van considerar casos on el tumor tenia un alt grau d'expressió. Els valors per sota de la mediana corresponien doncs a casos amb un grau d'expressió baix.

- Anàlisi estadístic: Per saber si hi havia una tendència a la sobreexpressió o infraexpressió en les mostres tumorals respecte de les normals, es va fer servir una versió del software *REST*<sup>®</sup>, el *REST*<sup>®</sup> *XL*, amb capacitat d'anàlisi d'un nombre major de mostres.

El test de Chi-quadrat ( $\chi^2$ ) es va fer servir per verificar que no hi havia diferències entre les característiques clinicopatològiques de la sèrie completa de 214 pacients i els 140 casos amb mostra normal aparellada. La supervivència global (OS) i la supervivència lliure de malaltia (DFS) es van calcular des del moment de la cirurgia fins a la mort relacionada amb la malaltia, recurrència o última visita de seguiment.

Per a l'estudi de supervivència es van fer corbes de Kaplan-Meier. Els pacients es van dividir en dos grups: (i) alta expressió i (ii) baixa expressió de *PI4K2B* i *STIM2*. Les diferències de supervivència observades en les corbes es van calcular mitjançant el model de regressió de Cox per a calcular el risk relatiu. Es va ajustar sempre l'anàlisi d'acord amb l'estadi tumoral, el grau de diferenciació i la localització tumoral. Es van calcular els riscos relatius (HRs) i els intervals de confiança (CIs) al 95%. Per a testar la significació es va fer un test de probabilitats on els valors de  $P \leq 0.05$  eren considerats estadísticament significatius.

### 3. ESTUDIS FUNCIONALS

#### 3.1 Estudi de la regulació transcripcional dels gens candidats

Vàrem voler saber si existia algun tipus de regulació transcripcional comú entre els gens candidats de la nostra regió. Per dur a terme aquest estudi vàrem dissenyar la següent estratègia: fer projeccions bioinformàtiques del grau de correlació entre la via de Wnt/ $\beta$ -catenina i l'expressió dels nostres gens, i verificar els resultats mitjançant immunoprecipitació de cromatina. La via de Wnt és una de les vies més importants en el control de l'homeòstasi de l'epiteli del còlon i està constitutivament activada en una gran majoria de CCRs.

##### Anàlisi bioinformàtic

Per avaluar les correlacions entre les dades d'expressió del factor de transcripció de la via de Wnt, TCF4, i les dels nostres 10 gens, es va recórrer a les dades públiques de *microarrays* de 295 casos de CRC dipositades pel expO (*Gene Expression Omnibus (GEO) reference GSE2109*). Les correlacions es van calcular segons el mètode de coeficient de Pearson fent servir el llenguatge de programació R ([www.r-project.org](http://www.r-project.org)). Per determinar si els valors de correlacions obtinguts amb els gens de la regió crítica eren majors dels esperats, vàrem comparar-los amb els resultat de 10.000 grups aleatoris de 10 gens agafats a l'atzar del mateix *micro-array*. Vàrem calcular quines de les interaccions de regulació transcripcional eren directes, i per això vàrem fer servir l'algoritme ARACNe (Margolin et al., 2006) i les dades de expO. El llindar de significació del valor d'informació mútua (MI, *Mutual Information*) es va establir en  $P=1E-08$  per reduir el nombre de falsos positius a menys d'un. La tolerància per a la iniquitat de processament de dades (DPI, *Data Processing Inequality*) es va establir en 0,1 per tal de quedar-nos només amb un 10% de les interaccions i assegurar-nos d'aquesta manera que fossin les interaccions directes. Les dades expO van ser prèviament normalitzades, tant en l'anàlisi de correlacions com el d'ARACNe, mitjançant l'algoritme MAS5 del *R Bioconductor suite*. Aquest sembla ser el mètode de normalització que menys sobreestimació fa de les correlacions entre transcrits (Lim et al., 2007).



### Immunoprecipitació de cromatines (ChIP, *Cromatin immunoprecipitation*)

Per a aquest experiment vàrem utilitzar un panell de tres línies cel·lulars de càncer colorectal; HCT-116, SW480, LS174T, i tres que no ho són; HeLa, HS27 i HEK293. El dia anterior vàrem sembrar les plaques per tal de tenir-les no confluents amb  $15 \times 10^6$  cèl·lules a les 24 hores. Les plaques es rentaven amb PBS 1X a 37 °C i procedíem amb la fixació dels complexos proteics al DNA o *crosslink*. Per això afegíem formaldehid a l'1% en medi de cultiu durant 10 min. a TA. La reacció s'aturava amb glicina 2,5 M i rentant amb PBS a 4 °C. Immediatament després es posava el tampó de pre-lisi (50 mM Tris pH 8, 2 mM EDTA, 0,1 % NP40, 10 % glicerol) més els inhibidors de proteases i s'incubava 5 min. en gel. Es rascaven les cèl·lules i es centrifugava 15 min. a 3.000 rpm a 4 °C. I es descartava el sobrenedant. Després s'afegia el tampó de lisi (1 % SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8) i es sonicaven les mostres un 40 % de potència amb 5 - 10 polsos de 10 seg. Després de sonicar es deixaven les mostres en gel durant 20 min. i es centrifugaven a 13.000 rpm durant 10 min. Es diluïen les mostres amb un tampó de dilució (0,01% SDS, 1,1% Tritó X-100, 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris-HCl pH 8, 167 mM NaCl). En aquest punt es feia el pre-rentat de les mostres amb 15 µl de proteïna G-agarosa (Amersham Biosciences) i 2 µg d'IgG irrellevants de la mateixa espècie que l'anticòs amb el que faríem la immunoprecipitació (IP) durant 3 hores a 4 °C en rotació orbital. El pre-rentat es feia amb una dilució 1:10 de la mostra tant per a la IP amb l'anticòs com la de la IgG. Es centrifugava 2 min. a 2.000 rpm i es recollia el sobrenedant. Per cada mostra s'apartaven 100 µl que serien l'*input*. A la resta se li afegia l'anticòs primari (Anti- β-catenina) i es deixava ON al mateix temps que es bloquejaven uns 15 µl per mostra de prot-G agarosa amb BSA 0,5% i esperma de salmó a 1mg/ml també ON.

L'endemà s'afegia a cada tub l'agarosa bloquejada i es deixava 2 hores a 4 °C a l'orbital. Després es feien els 5 rentats per cada tampó; *Low salt buffer* (0,1 % sds, 1 % Tritó X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl), *High salt buffer* (0,1 % SDS, 1 % Tritó X-100, 2 mM EDTA, 20 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl) i *LiCl buffer* (250 mM LiCl, 1 % NP-40, 1 % NaDOC, 1 mM EDTA, 10 mM Tris pH 8), amb columnes. Finalment l'IP es recollia amb 100 µl de tampó d'elució preparat al moment (1 % SDS, 0,1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 0,5 mg/ml de proteïnasa K). El tampó d'elució es deixava 30 min. a la columneta a TA i 30 min. més a 55 °C. S'afegien 8 µl de 5 M NaCl a les IP i als *inputs* i es feia el *descrosslinking*



amb formaldehid a 65 °C ON. El DNA de les IP es purificava amb un kit de QiaGen per fragments petits.

Un cop purificades les mostres es podien fer les PCRs amb oligos dissenyats específicament per a amplificar els llocs d'unió de TCF4 a les regions promotores dels gens d'estudi.

### 3.2 Caracterització funcional de *PI4K2B* i *STIM2*

Les línies cel·lular són un model idoni per a testar quines podrien ser les conseqüències de la sobreexpressió o el silenciament d'un gen candidat a jugar un paper en el desenvolupament d'una malaltia. En el cas del càncer els estudis en línies cel·lulars permeten intuir de forma més o menys ràpida quin és el rol que els nostre gen hi pot desempallegar.

#### Nivells d'expressió de *PI4K2B* i *STIM2* en línies cel·lulars

El primer que vam fer va ser establir quins eren els nivells d'expressió a nivell de RNA dels nostres gens candidats en una col·lecció de 5 línies de CRC disponibles al nostre laboratori: SW480, HT-29, DLD-1, HCT-116, LoVo. Aquestes línies es van descongelar i es van cultivar amb medi DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12) (BioWhittaker, Walkersville, MD) amb un 10 % de sèrum boví fetal (SBF) (Gibco) i un 1 % de penicil·lina/estreptomicina (Gibco) a 37 °C i un 5 % de CO<sub>2</sub>. Els cultius es van testar per a ser lliures d'infecció per micoplasma.

Després de fer un primer pase en placa de 60 mm, quan el cultiu es trobava a no més del 80 % de confluència, es van recollir les cèl·lules. Per desadherir-les de les plaques es va fer servir tripsina 1X (Gibco). Les vàrem centrifugar durant 5 min. I el *pellet* el vam rentar amb PBS. Després del rentat les cèl·lules es van tornar a centrifugar, es va retirar el PBS sobrant i els *pellets* es van congelar a -80°C.

L'RNA de les línies cel·lulars es va obtenir seguint el mateix protocol del *TRIZOL*<sup>®</sup> *Reagent* (Invitrogen) utilitzat per l'extracció de RNA dels teixits. La única diferència fou que en lloc d'homogeneïtzar el teixit amb una fulla de bisturí, un cop afegit el *TRIZOL*<sup>®</sup> *Reagent*, es feien passar les cèl·lules per una agulla fina per facilitar-ne la lisi. Amb el RNA obtingut, i com ja s'ha explicat anteriorment, es va fer la transcripció inversa per obtenir el cDNA i es van quantificar mitjançant RT-qPCR els nivells de *PI4K2B* i *STIM2* en aquestes

línies. Un cop més, *B2-MICROGLOBULINA* (*B2MG*) fou el *housekeeping gene* escollit per a la estandardització de les dades.

### Vectors d'expressió gènica

Per a *STIM2* el clon es va aconseguir a través del *Kazusa DNA Research Institute*, Kisarazu, Japó ([www.kazusa.or.jp/huge](http://www.kazusa.or.jp/huge)). El nom del clon era KIAA1482 i estava clonat entre les dianes Sal1 i Not1 d'es plasmidi pBluescript II KS/SK (+). Donat que pBluescript no és un vector d'expressió per eucariotes, vàrem subclonar-lo en un vector pCMV2A. Aquest vector incorpora, a l'extrem N-terminal, la proteïna un *tag-FLAG*. Per a *PI4K2B* el clon en el va cedir amablement la Dra. Hellen Yin de la *University of Texas Southwestern Medical Center*. Aquest cDNA venia clonat en pCMV5, un vector d'expressió per a cèl·lules eucariotes amb un *tag-MYC* N-terminal.

- Transformació de bactèries: Les bactèries utilitzades per a la transformació van ser les *Escherichia Coli*. Vàrem fer servir les bactèries competents *One Shot TOP-10 Competent Cells* (Invitrogen). Després de deixar-les descongelar en gel, es va afegir 1-5 µl (50 a 200 ng) del DNA a 25 µl de bactèries i es van deixar clavades en gel durant 20 min. Passats el 20 min. Es va fer el xoc tèrmic a 42 °C durant 30 seg. i es van tornar a clavar en gel 2 min. més. Es va afegir 300 µl de medi SOC estèril (2% triptona, 0,5 d'extracte de llevat, 10mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10mM MgCl, 10mM MgSO i 20mM de glucosa) (Invitrogen) preescalfat a 37 °C i es van posar a créixer durant 1 hora a 37 °C en agitació suau. Es va fer una centrifugada curta i suau de les bactèries, es va retirar la meitat del volum del medi SOC i amb els 150 µl restants es van sembrar tres plaques d'LB (Lauria-Bertani)-agar estèrils (1% triptona, 0,5% extracte de llevat, 1% NaCl, 1,5% agar, pH 7,5) amb kanamicina a 30 µg/ml. Es van deixar 24 hores a 37°. Es van picar 10 colònies de cada placa per comprovar si la lligació i/o transformacions havien funcionat. Per això es van fer créixer durant 10 hores en LB amb antibiòtic.
- Extracció de DNA plasmídic: Per a la recuperació dels plasmidis vàrem fer servir diferents protocols segons la quantitat i puresa que en volíem obtenir. Així docs el *QIAprep spin Miniprep Kit* el vàrem fer servir per a aïllar i purificar fins a 20 µg de DNA plasmídic, mentre que el *QIAGEN Plasmid Maxi Kit* va servir per aïllar fins a 500 µg de DNA de major puresa.

- Digestió dels vectors: En el cas d'*STIM2* es va digerir el vector Bluescript II amb els enzims Sal1 i Not1 per alliberar l'insert i comprovar en gel d'agarosa, i amb un control de pes molecular, que era de la mida corresponent. Per a la digestió vàrem fer servir 5 µl de Tampó 10x, 3 U de cada enzim (Roche), 15 µl de DNA i aigua fins un volum de 50 µl. Per a *PI4K2B* vàrem digerir només amb XhoI per linealitzar el plasmidi i comprovar-ne la mida correcta. La reacció contenia 1 µl de tampó 10x, 0,3 µl d'enzim (10 U/µl), 5 µl de plasmidi i aigua fins un volum de 10 µl.
- Lligació d'*STIM2* en pCMV2A: L'insert d'*STIM2* alliberat del vector pBluescript II, es va sotmetre a electroforesi en gel d'agarosa al 0,8 % amb TAE (Tris-Acetate-EDTA) i guanosina. Algunes digestions amb enzims de restricció generen extrems protuberants en les cadenes de DNA que són fàcilment degradats per l'acció de les DNA nucleases. L'EDTA inhibeix l'acció d'aquestes nucleases, mentre que la guanosina evita que es produeixin trencaments de doble cadena quan exposem els gels a la llum U.V. del transil·luminador. El DNA de les bandes retallades es va extreure amb el *DNA QIAquick Gel Extraction* (Qiagen) i es va purificar amb el *JETQUICK PCR Product Purification Spin Kit* (Genomed) ambdues coses seguint les instruccions del fabricant. El vector pCMV2A (Stratagene) es va amplificar també transformant una soca de *E. Coli* i es va preparar per a la lligació digerint-lo amb els mateixos enzims amb que havíem alliberat el cDNA d'*STIM2* del pBluescript II. Per afavorir la reacció de lligació, un cop linearitzat pCMV2A, es va desfosforilar amb fosfatasa alcalina. Després la lligació d'insert i vector es va fer seguint les instruccions del *Rapid DNA Ligation Kit* (Roche). Es barrejà 3 µl d'insert amb 1 µl de vector, 2 µl de *DNA Dilution Buffer 5x*, i aigua bidestil·lada fins a un volum de 10 µl. A aquesta barreja se li afegeixen 10 µl de *T4 DNA Ligation Buffer 2X*, es barreja i finalment se li afegeix 1 µl de *T4 DNA Ligase* (5U/µl). Es va incubar 10 min. a TA, i immediatament es van transformar bacteries TOP10 (Invitrogene) amb el producte de la lligació. Per seleccionar aquelles colònies que havien incorporat l'insert es va fer miniprep i digestió amb els enzims corresponents (Sal1 i Not1) d'un mínim de 25 colònies. La digestió es va comprovar en gel d'agarosa convencional a l'1%. Les colònies que per restricció mostraven una lligació correcta van ser comprovades per seqüenciació i se'n va verificar la correcta pauta de lectura.

## Transfeccions i selecció de clons estables en SW480

Les construccions pCMV2A-STIM2 i pCMV5-PI4K2B es van transfectar en la línia cel·lular SW480. Es va seleccionar aquesta línia en veure que els nivells d'expressió d'RNA eren molt baixos i equiparables als obtinguts en mostres de mucoses normals de colon. SW480 (ATCC CCL-228) es una línia establerta a partir d'un adenocarcinoma primari de còlon. Aquestes cèl·lules tenen la proteïna APC truncada al codó 1338 i presenten l'activitat transcripcional mitjançada per  $\beta$ -catenina/TCF4 constitutivament activada.

Per a la transfecció vàrem fer servir el reactiu *Lipofectamine 2000*<sup>®</sup> (Invitrogene) sobre una monocapa al 60-80 % de confluència seguint les instruccions del fabricant. Al dia anterior a la transfecció sembrarem  $1 \times 10^6$  de cèl·lules SW480 en plaques de 60 mm. Per a la transfecció es preparaven dues solucions:

- Solució A: 4  $\mu$ g del DNA en 250  $\mu$ l d'*OptiMEM* (Gibco)
- Solució B: 10  $\mu$ l de *Lipofectamine 2000*<sup>®</sup> en 250  $\mu$ l d'*OptiMEM*

La solució B s'incubava 5 min a TA. Passat aquest temps es barrejaven bé ambdues solucions i es deixaven 20 min. a TA. Durant aquest temps les plaques es rentaven dos cops amb DMEM F-12 a 37 °C sense sèrum i se'ls hi afegia medi fresc també sense sèrum i en acabar els 20 min. s'afegia la barreja sobre les plaques. S'incubaven 4 h i 30 min i es retirava aquest medi de transfecció i s'afegia DMEM F-12 complet (amb sèrum i penicil·lina/estreptomicina). Les cèl·lules les deixaven 24-48 h a l'incubador abans de recollir-les.

Per a la selecció de clons estables, es desadherien les cèl·lules de la placa amb tripsina 1x (Gibco) es centrifugaven, es rentaven amb PBS i es diluïen 1:10 en medi complet. Els vectors utilitzats incorporen un gen de resistència a la neomicina. Vàrem explotar aquesta qualitat per a la selecció d'aquells clons en que l'expressió de les nostres proteïnes (comprovada per *Western Blotting*) fos estable. Això ho vàrem fer afegint G418 (Neomicina, Gibco, 50 mg/ml) al medi a una concentració final de 750  $\mu$ g/ml. Una placa de SW480 sense transfectar es feia servir com a control. Quan en aquesta placa control havien mort totes les cèl·lules ja podíem seleccionar clons de les plaques transfectades.

La detecció de la proteïna recombinant la vàrem dur a terme mitjançant *Western Blot*. Per això vàrem fer servir el sistema *Mini-PROTEAN* de BioRad.

- Extracció de proteïnes: Per a l'extracció de les proteïnes, acabada la transfecció, les plaques es rentaven amb PBS a 4 °C i un cop aspirat i sempre amb les plaques sobre gel, s'afegia el volum adient de tampó de lisi. En el nostre cas el tampó que vàrem fer servir fou el RIPA (50 mM Tris-HCL, 150 mM NaCl 1%, Tritó x-100, 0,1% SDS, 0,5 % Na-deoycholate) A aquest tampó se li afegien inhibidors de proteases com 500 mM d'ortovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ), 10 mg/ml de leupeptina, 10 mg/ml d'aproteïnina i 0,1 M de PMSF. Per les plaques de 60 mm confluents tiràvem entre 300 i 500 µl de tampó amb inhibidors, rascàvem les cèl·lules amb un *scraper*, deixàvem els tubs 20 min. clavats en gel per acabar la lisi i seguidament es centrifugaven a 13.000 rpm 15 min. a 4 °C. Les proteïnes que ens quedaven al sobrenedant es guardaven a -20 °C.

La quantificació de les proteïnes el fèiem pel mètode colorimètric del Bradford (BioRad). La concentració de proteïna de les nostres mostres s'extrapolava usant una recta de regressió construïda amb concentracions creixents conegudes de BSA (albúmina) i llegint les plaques amb el filtre de 595 nm.

- Electroforesi, transferència i immunodetecció de les proteïnes: L'electroforesi la vàrem fer en gels de SDS-PAGE (*sodium dodecylsulfate polyacrilamide gel electroforesi*). Els gels, d'1,5 mm de gruix, consten de dues fases; una de concentració de les proteïnes o *stacking* (3,6% acrilamida, 0,1% N',N'-bis-metilen-acrilamida, 125 mM Tris-HCL, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,25% TEMED, 0,13% APS), i l'altra de separació de les mateixes o *resolving* (8-15% acrilamida, 0,22-0,4% N',N'-bis-metilen-acrilamida, 375 mM Tris-HCL, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,14% TEMED, 0,065% APS). Un cop polimeritzat el gel carregàvem uns 50 µg de proteïnes amb un tampó de càrrega 1x (2% SDS, 0,5 mg/ml DTT, 10% glicerol, 0,1 mg/ml de blau de bromofenol). Prèviament les mostres s'havien desnaturalitzat en presència del tampó incubant-les 4 min. a 95 °C i centrifugant a 14.000 rpm 30 seg. L'electroforesi es dugué a terme amb un tampó específic (25 mM Tris-HCL pH 8,3, 192 mM glicina, 0,1% SDS) a 120 V durant 1h i 30 min. i utilitzant un marcador de pes molecular (*BenchMark Prestained Protein Ladder, Invitrogene*).

La transferència electroforètica de les proteïnes es va fer sobre membranes *Immobilon-P* de PVDF (Millipore). Aquestes membranes s'han

d'activar mitjançant immersió en metanol durant 2 min. i posteriorment un rentat amb aigua bidestil·lada durant 2 min. més. Als gels se'ls hi treia la part corresponent a l'*stacking* i s'equilibraven 10 min. amb el tampó de transferència (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM glicina, 0,02% SDS i 20% metanol). La transferència es feia a 4 °C durant 1h i 30 min. a 100 V. Acabada la transferència, aquesta es verificava mitjançant una tinció de la membrana amb Roig de Ponceau (Sigma) (2-5 min. en agitació i rentats amb aigua bidestil·lada).

Per la immunodetecció es rentava la membrana amb PBS 1x i s'incubava amb una solució de bloqueig (PBS amb un 5% de llet en pols) durant 1 hora a TA i en agitació. Posteriorment es feien les incubacions amb els anticossos primaris corresponents:

- Anti-c-myc (9E10; Sigma) anticòs monoclonal de ratolí. Dilució 1:1000
- Anti-flag ( ) . Dilució 1:1000
- Anti-tubulina ( ) . Dilució 1:1000

Els anticossos primaris es diluïren en TBS (*Tris-buffered saline*) (20 mM Tris-HCl i 150 mM NaCl, pH 7,4) amb un 1% BSA i un 0,5% de llet en pols i s'incubaven ON a 4 °C en agitació. L'endemà, després de 3 rentats de 5 min amb TBS-T (TBS amb Tritó al 0,05%), les membranes s'incubaven amb l'anticòs secundari durant 30 min. a TA:

- *Goat Anti-Mouse IgG (H+L)-HRP conjugate* (Amersham Biosciences), anticòs policlonal de cabra anti IgG de ratolí utilitzat a una dilució 1:1500

Al final, es feien 3 rentats de 5 min en TBS-T, i es revelava amb el sistema de detecció per quimioluminescència ECL (Amersham) amb pel·lícules fotogràfiques *Hyperfilm* (Amersham Biosciences).

### Assaig d'interferència amb siRNA en DLD-1

Els siRNA corresponents a *PI4K2B* i *STIM2* eren comercials de la casa Ambion (AM51331 and AM16708A, respectivament). Es van transfectar a la línia cel·lular DLD-1 ja que aquesta té nivells d'expressió molt elevats d'aquests dos gens en comparació a la mucosa normal de còlon o a altres línies cel·lulars de CCR. DLD-1 (ATCC CCL-221) és una línia de CCR provinent d'un

adenocarcinoma de colon amb estadi de Dukes C. Com a control es va fer servir un altre siRNA recomanat per la casa comercial (AM4611).

Aquests experiments els vàrem realitzar en plaques de 24 pous. El dia anterior a la transfecció amb el siRNA es van sembrar  $5 \times 10^4$  cèl·lules en 500  $\mu$ l de DMEM f-12 sense antibiòtics per a que estiguessin a aproximadament un 50% de confluència en el moment de la transfecció. Les cèl·lules es poden sembrar a baixa confluència i això permet un interval de temps més gran entre la transfecció i la detecció a més de minimitzar la pèrdua de viabilitat deguda al sobre-creixement.

Per a cada experiment de transfecció es barrejaven 20 pmol del siRNA en 50  $\mu$ l d' *OptiMEM*® sense sèrum. La concentració final del siRNA quan finalment s'afegeix a les cèl·lules és de 33 nM. D'altra banda es barrejava 1  $\mu$ l de *Lipofectamine 2000*® en 50  $\mu$ l d'*OptiMEM*® també sense sèrum. Aquesta barreja s'han d'incubar 5 min. A temperatura ambient. El temps màxim a partir d'aquest punt és de 25 minuts fins a la barreja de les dues solucions. Un cop barrejades s'agitaven amb força i es deixava incubar durant 20 minuts a temperatura ambient.

Finalment s'afegia la combinació del siRNA + *Lipofectamine 2000*® a cada pou i s'incubaven les cèl·lules a 37 °C a l'incubador de CO<sub>2</sub> entre 24 i 48 hores fins que es recollien per a comprovar la reducció en l'expressió proteica. Es van fer servir anticossos policlonals de conill específics contra aquestes dues proteïnes i també subministrats per la casa Ambion (Ab37812 and Ab59342, respectivament).

### **Assaig de proliferació.**

El mètode emprat per a la quantificació de la proliferació ha estat prèviament descrit (Coward et al., 1998).

Després de sembrar transfectar amb els siRNA i incubar entre 24 i 48 hores es procedeix al marcatge de les cèl·lules amb la timidina tritiada (*[3H]thymidine*). Per això s'afegeix un micro-curie de *[3H]thymidine* (NEN #NET-027Z, 1  $\mu$ Ci/ml of *[3H]thymidine* (0.5 Ci/mmol, Amersham Biosciences)), o el que és el mateix 1  $\mu$ l de la solució de timidina en 24  $\mu$ l de medi a cada pou. Aquest reactiu es deixà incubar 8 hores a les plaques a l'incubador. Passat aquest temps es passà a quantificar el de DNA marcat amb *[3H]thymidine* de les nostres cèl·lules transfectades amb el siRNA que volíem



testar i el siRNA control. Aspiràvem el medi. Fèiem un rentat amb 1 ml de PBS a 4 °C, aspiràvem el PBS i afegíem 1 ml de TCA (triclor-acètic) a 4 °C i ho incubàvem a 4 °C durant 30 min. Després, s'aspirava i es rentava un cop amb PBS i a temperatura ambient s'hi afegien 0,5 ml de 0,5 N NaOH/0,5% SDS. Es pipetejava i s'hi afegien 400 µl d'aquesta solució als vials per al contatge.

#### **Assaig de formació de colònies.**

L'assaig es basa en la capacitat que tenen les cèl·lules sembrades de forma aïllada de produir colònies. Una colònia es considera una agrupació de més de 50 cèl·lules filles que es poden identificar a simple vista prèvia tinció amb algun colorant. En el nostre cas vàrem voler testar aquesta capacitat en les cèl·lules SW480 transfectades i sense transfectar amb pCMV2-PI4K2B. L'habilitat per formar colònies ens dóna una idea del potencial tumorigènic d'una cèl·lula ja que implica el grau d'independència dels factors de creixement externs així com dels contactes d'adhesió cèl·lula-cèl·lula.

Per a aquest assaig es van sembrar  $5 \times 10^3$  cèl·lules en plaques de 6 cm de diàmetre preincubats amb 4 ml de medi DMEM F-12. És important que tant a la placa amb les cèl·lules transfectades com la placa de cèl·lules amb el vector buit tinguin exactament el mateix nombre de cèl·lules. Per això després d'aspirar el medi i fer dos rentats amb PBS es tripsinitzaven les plaques durant 2 minuts a 37 °C. És molt important que la tripsinització sigui molt bona perquè quan és sembrin, les cèl·lules quedin aïllades i no formant grumolls. S'afegien 6 ml (relació 1:3) de medi amb SBF per aturar la reacció, i es resuspenia amb una pasteur de plàstic i transferia a un tub de 15 ml. Amb una petita alíquota es feia el contatge a la Cambra de Neubauer i es calculava el nº de cèl·lules total. Es portava la suspensió a una concentració de  $1 \times 10^6$  cel./ml. A partir d'aquí es feia un banc de dilucions que ens portés a tenir el volum necessari per sembrar plaques de 6 pous amb  $5 \times 10^3$  cèl·lules.

Aquestes plaques es deixaven a l'incubador de 37 °C durant 10-15 dies sense canviar el medi ni moure-les. Passats aquest dies es tenyien les colònies amb el colorant cristall violeta (25% ac. acètic glacial, 75% etanol i 1 gr cristall violeta) durant 20 min. L'excés s'esbandia amb aigua de l'aixeta i les plaques es podien deixar assecar i emmagatzemar.



### **Assaig de formació de tumors *in vivo***

Un dels clons de SW480 transfectats amb *STIM2*, amb expressió comprovada per qPCR, es va amplificar amb l'objectiu de consuir un experiment en ratolins immunodeprimits. Es van inocular les cèl·lules al teixit subcutani en un total de 10 ratolins. Per a cada ratolí, s'inoculaven  $2,5 \times 10^6$  cèl·lules transfectades en un flanc, i les SW480 transfectades amb el vector buit en l'altre. Des del moment en que els tumors van començar a ser palpables (dia 15 post-injecció), es van fer dues mesures del volum tumoral per setmana, fins al dia 40 post-injecció, en que els tumors control van assolir una mida superior al  $\text{cm}^3$ . Els ratolins es pasaven i se'n comprovava l'estat general.

El càlcul del volum tumoral es feia mesurant amb un peu de rei, els diàmetres major i menor de la massa tumoral i aplicant la fórmula

$Volum = \pi/6 \times R \times r^2$  on  $R$  correspon al diàmetre major i  $r$  al diàmetre menor.